

**PENENTUAN SEKUEN KONSENSUS  
PROTEASE DAN *REVERSE TRANSCRIPTASE*  
*HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS* TIPE I  
ISOLAT INDONESIA UNTUK DESAIN VAKSIN HIV/AIDS**

**TESIS**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik

**SURATNO LULUT RATNOGLIK  
NPM : 0606000245**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
JUNI 2009**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Suratno Lulut Ratnoglik**

**NPM : 0606 000 245**

**Tanda tangan :**

**Tanggal : 25 JUNI 2009**



## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Suratno Lulut Ratnoglik  
NPM : 0606 000 245  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Mikrobiologi  
Judul tesis : Penentuan Sekuen Konsensus Protease dan *Reverse Transcriptase Human Immunodeficiency Virus* Tipe I Isolat Indonesia Untuk Desain Vaksin HIV/AIDS

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Budiman Bela, Sp.MK.  
(.....)

Pembimbing II : dr. Eera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., Sp.MK  
(.....)

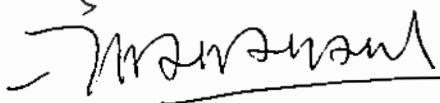
Penguji I : Andi Yasmon, S.Pi, M.Biomed.  
(.....)

Penguji II : Asmarinaha Dra., MS., Dr.rer.nat  
(.....)

Penguji III : Amarila Malik, Dra., Apt., MSi., Dr.  
(.....)

Ditetapkan di : Jakarta  
Tanggal : 25 Juni 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr.rer.Physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil'alamin. Segala puji hanya bagi Allah SWT, karena atas segala rahmat, kasih sayang, petunjuk serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini. Semoga dengan petunjuk-Nya pulalah penulis dapat mengambil hikmah dan pelajaran dari segala kejadian yang penulis alami selama menjalani pendidikan, riset sampai penulisan tesis ini .

Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada dr.Budiman Bela, Sp.MK selaku Pembimbing I, atas segala kepercayaan, bantuan, didikan, kesabaran dan nasihat-nasihat yang membangun dalam membimbing penulis mulai semester I hingga dapat menyelesaikan tesis ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada dr.Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., Sp.MK selaku Pembimbing II yang telah banyak memberikan masukan dan petunjuk yang sangat berharga dalam penulisan tesis ini.

Rasa terima kasih juga ingin penulis sampaikan kepada Dr.rer.physiol.Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu. Tidak lupa ungkapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada dr.Anis Kurniawati, Ph.D., Sp.MK selaku ketua Departemen Mikrobiologi FKUI atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melaksanakan pendidikan dan riset di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI.

Rasa terima kasih yang mendalam juga penulis sampaikan kepada Mas Andi Yasmon, S.Pi., M.Biomed dan Mbak Heni, S.Si., M.Biomed atas segala nasehat-nasehat, masukan dan diskusi yang menyenangkan dan inspiratif selama penulis menyelesaikan riset ini. Kepada segenap staf dan karyawan Departemen Mikrobiologi FKUI, teman-teman P3S FKUI, Mbak Vivi, Mbak Ika, Fitri, Yuni, Angela dan Bu Yus, serta teman-teman di IHVCB-UI yang tidak mungkin disebutkan satu persatu, terimakasih atas kerjasama, persahabatan, perhatian dan masukan yang sangat berharga sehingga membantu penulis dalam menjalani pendidikan dari awal semester hingga akhir masa pendidikan. Kepada mbak-mbak

PPDS, teman-teman kerja di ruang 23 laboratorium mikrobiologi, Mas Alfian, Mbak Tatik, Mbak Tika, Mbak Deka dan Mbak Febriana, tanpa kerja sama teman-teman, niscaya riset penulis tidak dapat berjalan lancar.

Terimakasih kepada Ayahanda Parto Lulut (alm.) dan Ibunda Saminem tercinta atas doa, pengorbanan dan kasih sayang yang tak terbalaskan, sehingga ananda bisa meraih mimpi-mimpi dan cita-cata ananda. Semoga Allah SWT senantiasa membukakan pintu rahmat bagi Ayah dan Ibunda. Ucapan terimakasih untuk segala bantuan dan pengorbanan Mbak Tini, Mas Lan, Mas Thuk, Mbak Mimin dan Aris yang telah kalian berikan selama penulis menempuh seluruh jenjang pendidikan. Semoga penulis diberikan kesempatan untuk membalas semua kebaikan itu.

Kepada istriku tercinta, Matahari Harumdini, terima kasih sudah memberikan dukungan, kasih sayang, perhatian dan doa bagi penulis. Semoga dengan selesainya tesis ini merupakan awal pemicu semangat untuk terus berjuang menggapai cita-cita dan impian kita. Terimakasih sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada Papa Nurhasyim Ilyas, Mama Meswari Amreliy, Bang Arya dan dik Rizki atas bantuan dan dukungannya dalam menerima dan memahami kehidupan penulis.

Terakhir, hanya kepada Allah SWT saja kita bersandar dan menyerahkan segala sesuatu. Semoga tesis yang tidak lepas dari kekurangan ini dapat berguna bagi kita semua. Amin ya Rabbal'alamin.

Penulis

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

---

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

Nama : Suratno Lulut Ratnoglik  
NPM : 0606 000 245  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik  
Departemen : Mikrobiologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

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:

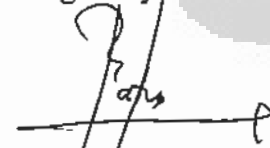
**Penentuan Sekuen Konsensus Protease dan *Reverse Transcriptase* Human Immunodeficiency Virus Tipe I Isolat Indonesia Untuk Desain Vaksin HIV/AIDS**

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 25 Juni 2009

Yang menyatakan



(Suratno Lulut Ratnoglik)

## ABSTRAK

Nama : Suratno Lulut Ratnoglik  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Penentuan Sekuen Konsensus Protease Dan *Reverse Transcriptase Human Immunodeficiency Virus* Tipe I Isolat Indonesia Untuk Desain Vaksin HIV/AIDS.

Infeksi *Human Immunodeficiency Virus* tipe 1 (HIV-1) sebagai penyebab AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) merupakan salah satu masalah utama kesehatan dunia yang harus segera diatasi. Sejak ditemukannya penyakit tersebut, vaksin yang diharapkan tidak kunjung tersedia karena berbagai usaha pengembangan vaksin HIV-1 mengalami hambatan besar oleh karena keanekaragaman HIV-1 yang tinggi. Strategi mutakhir untuk mengatasi hambatan tersebut adalah pengembangan vaksin HIV-1 yang spesifik pada sub tipe dan populasi di regional tertentu, menggunakan isolat identik dengan sekuen konsensus yang telah ditentukan, sebagai kandidat vaksin. Tujuan penelitian ini adalah menentukan sekuen konsensus HIV-1 di Indonesia dengan menggunakan sekuen – sekuen gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* HIV – 1 sub tipe paling dominan isolat Indonesia dari isolat darah plasma orang terinfeksi HIV akibat penggunaan narkoba dengan jarum suntik (penasun). Berdasarkan analisis dalam penelitian ini diketahui bahwa CRF01\_AE merupakan sub tipe paling dominan di Indonesia dan telah berhasil diperoleh sekuen konsensus *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 CRF01\_AE Indonesia. Sekuen konsensus *protease* Indonesia tersebut memiliki perbedaan dengan sekuen konsensus dari database Los Alamos National Laboratory (LANL) sebesar 2,7% untuk sekuen nukleotida ( $p = 0,030$ ); 5,1% untuk sekuen asam amino ( $p = 0,000$ ). Sedangkan sekuen konsensus *reverse transcriptase* Indonesia memiliki perbedaan dengan sekuen konsensus dari LANL sebesar 2,0% untuk nukleotida ( $p = 0,208$ ) dan 3,0% untuk asam amino ( $p = 0,015$ ).

Kata kunci : sekuen konsensus, HIV-1 sub tipe CRF01\_AE, gen *protease*, gen *reverse transcriptase*.

## ABSTRACT

Name : Suratno Lulut Ratnoglik  
Study Program : Biomedical Science  
Judul : Determination of Protease and *Reverse Transcriptase Human Immunodeficiency Virus* Type 1 Indonesia Isolat Consensus Sequences for HIV/AIDS Vaccine Design.

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) infection as the etiology of AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) is a major health problem which need to be urgently solved. Since the discovery of the disease, the effective vaccine is still not available. It is caused by widely the diversity of HIV-1. Novel strategy to overcome this problem is to develop country-specific HIV-1 vaccine, which use the most identical isolate with consensus sequences that had been determined, as vaccine candidate. This study aims to determine consensus sequences (CS) of HIV-1 in Indonesia by using sequences of protease gene and reverse transcriptase gene of the most predominant subtype HIV-1 sequences from HIV-infected intravenous drug users' blood plasma. This study concluded that CRF01\_AE is the most predominant subtype HIV-1 in Indonesia. Nucleotide and amino acid of protease which determine as CS has 2.7% ( $p = 0,030$ ) and 5.1% ( $p = 0,000$ ) differences with CS of CRF01\_AE of Los Alamos National Laboratory (LANL), respectively. While nucleotide and amino acid of reverse transcriptase of the CS has 2,0% ( $p = 0,208$ ) and 3,0% ( $p = 0,015$ ) differences with CS of CRF01\_AE of the LANL, respectively.

Keywords: consensus sequences, CRF01\_AE HIV-1 subtype, protease gen, reverse transcriptase gen.



## DAFTAR ISI

|  |           |
|--|-----------|
| HALAMAN JUDUL .....  | i         |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....   | ii        |
| HALAMAN PENGESAHAN.....  | iii       |
| KATA PENGANTAR .....   | iv        |
| LEMBAR PERSETUJUAN UNTUK PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....                                   | vi        |
| ABSTRAK.....   | vii       |
| DAFTAR ISI.....  | ix        |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xi        |
| DAFTAR LAMPIRAN.....   | xii       |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xiii      |
| DAFTAR LAMBANG .....   | xiv       |
| DAFTAR SINGKATAN NUKLEOTIDA DAN ASAM AMINO.....  | xv        |
| DAFTAR TABEL.....  | xvi       |
| <b>1. PENDAHULUAN.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 LATAR BELAKANG PENELITIAN .....  | 1         |
| 1.2 TUJUAN PENELITIAN.....   | 3         |
| 1.3 MANFAAT PENELITIAN.....  | 3         |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1 <i>HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS</i> SUBTIPE 1.....                                 | 4         |
| 2.1.1 Penemuan HIV-1/AIDS .....  | 4         |
| 2.1.2 Struktur dan genom virus HIV-1.....  | 5         |
| 2.1.3 Siklus hidup HIV-1 .....   | 8         |
| 2.1.4 Patogenesis dan pola transmisi HIV-1 .....                                       | 10        |
| 2.1.5 Respon imun terhadap infeksi HIV-1.....  | 12        |
| 2.1.6 Epidemiologi dan keanekaragaman HIV-1 .....                                      | 13        |
| 2.1.7 Perkembangan mutakhir vaksin HIV-1 .....   | 14        |
| 2.2 SEKUEN KONSENSUS HIV-1 UNTUK PENGEMBANGAN<br>VAKSIN HIV-1 .....                    | 20        |
| 2.3 GEN <i>REVERSE TRANSCRIPTASE</i> HIV-1.....  | 22        |
| 2.4 GEN <i>PROTEASE</i> HIV-1.....   | 26        |
| <b>3. METODE PENELITIAN .....</b>  | <b>29</b> |
| 3.1 STRATEGI PENELITIAN.....   | 29        |
| 3.2 BAHAN.....   | 29        |
| 3.1.1 Data sekuen gen <i>protease</i> dan gen <i>reverse transcriptase</i> HIV-1... .. | 29        |
| 3.1.2 Plasma darah donor PMI .....   | 30        |
| 3.1.3 Penentuan jumlah sampel .....  | 30        |
| 3.3 CARA KERJA .....   | 30        |
| 3.3.1 Isolasi RNA virus dari sampel plasma darah donor positif HIV....                 | 30        |
| 3.3.2 Penyiapan cDNA gen RT dan protease.....  | 31        |
| 3.3.3 Analisa produk PCR dengan elektroforesis.....                                    | 31        |
| 3.3.4 Purifikasi produk PCR.....   | 32        |
| 3.3.5 Sekuensing.....  | 32        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.6 Analisis dengan perangkat lunak Viroseq, Bioedit 7.0, MEGA 2.0 dan REGA HIV-1 subtyping Tool v.2..... | 34        |
| <b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1 HASIL .....   | 38        |
| 4.1.1 Penentuan sub tipe HIV-1 yang beredar di Indonesia.....   | 39        |
| 4.1.2 Analisis Genetik HIV-1 sub tipe dominan di Indonesia. ....  | 40        |
| 4.1.3 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protease.....   | 41        |
| 4.1.4 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino<br><i>Reverse Transcriptase</i> .....                   | 43        |
| 4.1.5 Analisis silsilah genetik HIV-1 isolat Indonesia .....  | 46        |
| 4.1.6 Penentuan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01_AE<br>Indonesia .....                                 | 48        |
| 4.2 PEMBAHASAN .....  | 51        |
| <b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>  | <b>60</b> |
| 5.1 KESIMPULAN .....  | 60        |
| 5.2 SARAN .....   | 61        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>RIWAYAT HIDUP .....</b>  | <b>99</b> |

## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| 2.1. Struktur HIV-1 .....   | 6  |
| 2.2. Genom HIV-1 .....  | 7  |
| 2.3. Siklus hidup HIV-1.....  | 9  |
| 2.4. Perjalanan penyakit AIDS.....  | 11 |
| 2.5. Pembentukan DNA virus dari RNA.....                                    | 22 |
| 2.6. Proses transkripsi balik HIV-1.....                                    | 23 |
| 3.1. Tampilan utama perangkat lunak Viroseq HIV-1 GenotypingSystem.v.2      | 36 |
| 3.2. Tampilan perangkat lunak REGA HIV-1 subtyping Tool v.2.....            | 37 |
| 4.1. Elektroforesis agarose produk RT-PCR HIV-1 PMI 04 .....                | 39 |
| 4.2. Daerah epitop spesifik CTL pada protein protease.....                  | 43 |
| 4.3. Satu epitop spesifik CD4+ T helper pada RT.....                        | 46 |
| 4.4. Pohon filogenetik metode <i>Neighbor-Joining</i> protease dan RT.....  | 47 |
| 4.5. Pohon filogenetik sekuen konsensus protease dan RT isolat Indonesia... | 50 |

## DAFTAR LAMPIRAN

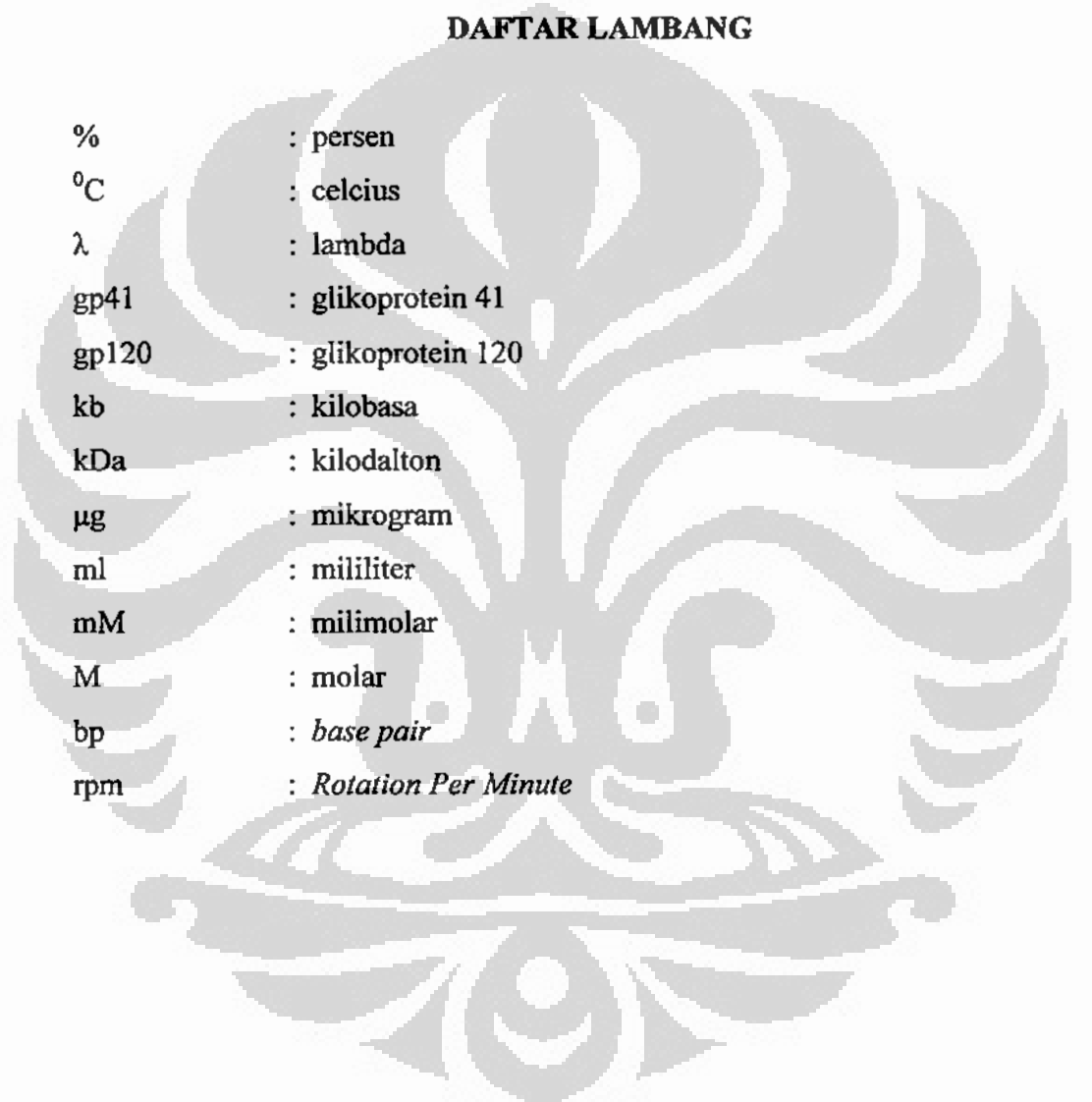
|   |    |
|---|----|
| Lampiran 1. Sekuen nukleotida gen <i>protease</i> isolat Indonesia dan isolat referensi                           | 67 |
| Lampiran 2. Sekuen asam amino protease isolat Indonesia dan isolat referensi.....                                 | 70 |
| Lampiran 3. Homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease isolat Indonesia dan isolat referensi.....         | 71 |
| Lampiran 4. Perbedaan asam amino protease HIV-1 antara SKD dengan isolat Indonesia dan Thailand.....              | 72 |
| Lampiran 5. Sekuen nukleotida gen reverse transcriptase isolat Indonesia dan isolat referensi.....                | 74 |
| Lampiran 6. Sekuen asam amino reverse transcriptase isolat Indonesia dan isolat referensi.....                    | 84 |
| Lampiran 7. Homologi sekuen nukleotida dan asam amino protein RT HIV-1 isolat Indonesia dan isolat referensi..... | 88 |
| Lampiran 8. Perbedaan asam amino protein RT HIV-1 antara SKD dengan isolat Indonesia dan Thailand .....           | 89 |
| Lampiran 9. Daerah lestari asam amino RT HIV-1 CRF01_AE .....   | 92 |
| Lampiran 10. Epitop pada reverse transcriptase yang spesifik CTL.....   | 93 |
| Lampiran 11. Sekuen konsensus isolat Indonesia nukleotida protease dan RT.....                                    | 95 |
| Lampiran 12. Sekuen konsensus isolat Indonesia asam amino protease dan RT .....                                   | 97 |
| Lampiran 13. Cara pemilihan dan penentuan jumlah sampel .....   | 98 |

## DAFTAR SINGKATAN

|        |   |
|--------|---|
| AIDS   | : <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>   |
| APC    | : <i>Antigen Presenting Cell</i>  |
| ARV    | : <i>AIDS-associated Retrovirus</i>   |
| CD     | : <i>Cluster of Differentiation</i>   |
| CTL    | : <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>   |
| DNA    | : <i>Deoxyribonucleic Acid</i>  |
| EDTA   | : <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>  |
| ELISA  | : <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>  |
| Env    | : <i>Envelope</i>   |
| HIV-1  | : <i>Human Immunodeficiency Virus Type 1</i>  |
| IDU    | : <i>Injecting Drug User</i>  |
| LAV    | : <i>Lymphadenopathy-associated Virus</i>   |
| MA     | : <i>Matrix</i>   |
| NC     | : <i>Nucleocapsid</i>   |
| ORF    | : <i>Open Reading Frame</i>   |
| PCR    | : <i>Polymerase Chain Reaction</i>  |
| RNA    | : <i>Ribonucleic Acid</i>   |
| RT     | : <i>Reverse Transcriptase</i>  |
| RT-PCR | : <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>  |
| SKD    | : Sekuen konsensus HIV-1 CRF01_AE yang diambil dari database Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA                              |
| SKDp   | : Sekuen konsensus protease HIV-1 CRF01_AE yang diambil dari database Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA                     |
| SKDr   | : Sekuen konsensus <i>reverse transcriptase</i> HIV-1 CRF01_AE yang diambil dari database Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA |
| SKI    | : sekuen konsensus HIV-1 CRF01 AE Indonesia yang diperoleh dalam penelitian ini.  |

- SKIp : sekuen konsensus protease HIV-1 CRF01 AE Indonesia yang diperoleh dalam penelitian ini.
- SKI : sekuen konsensus *reverse transcriptase* HIV-1 CRF01 AE Indonesia yang diperoleh dalam penelitian ini.

#### DAFTAR LAMBANG



|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| %         | : persen                     |
| °C        | : celcius                    |
| $\lambda$ | : lambda                     |
| gp41      | : glikoprotein 41            |
| gp120     | : glikoprotein 120           |
| kb        | : kilobasa                   |
| kDa       | : kilodalton                 |
| $\mu$ g   | : mikrogram                  |
| ml        | : mililiter                  |
| mM        | : milimolar                  |
| M         | : molar                      |
| bp        | : <i>base pair</i>           |
| rpm       | : <i>Rotation Per Minute</i> |

## DAFTAR SINGKATAN NUKLEOTIDA

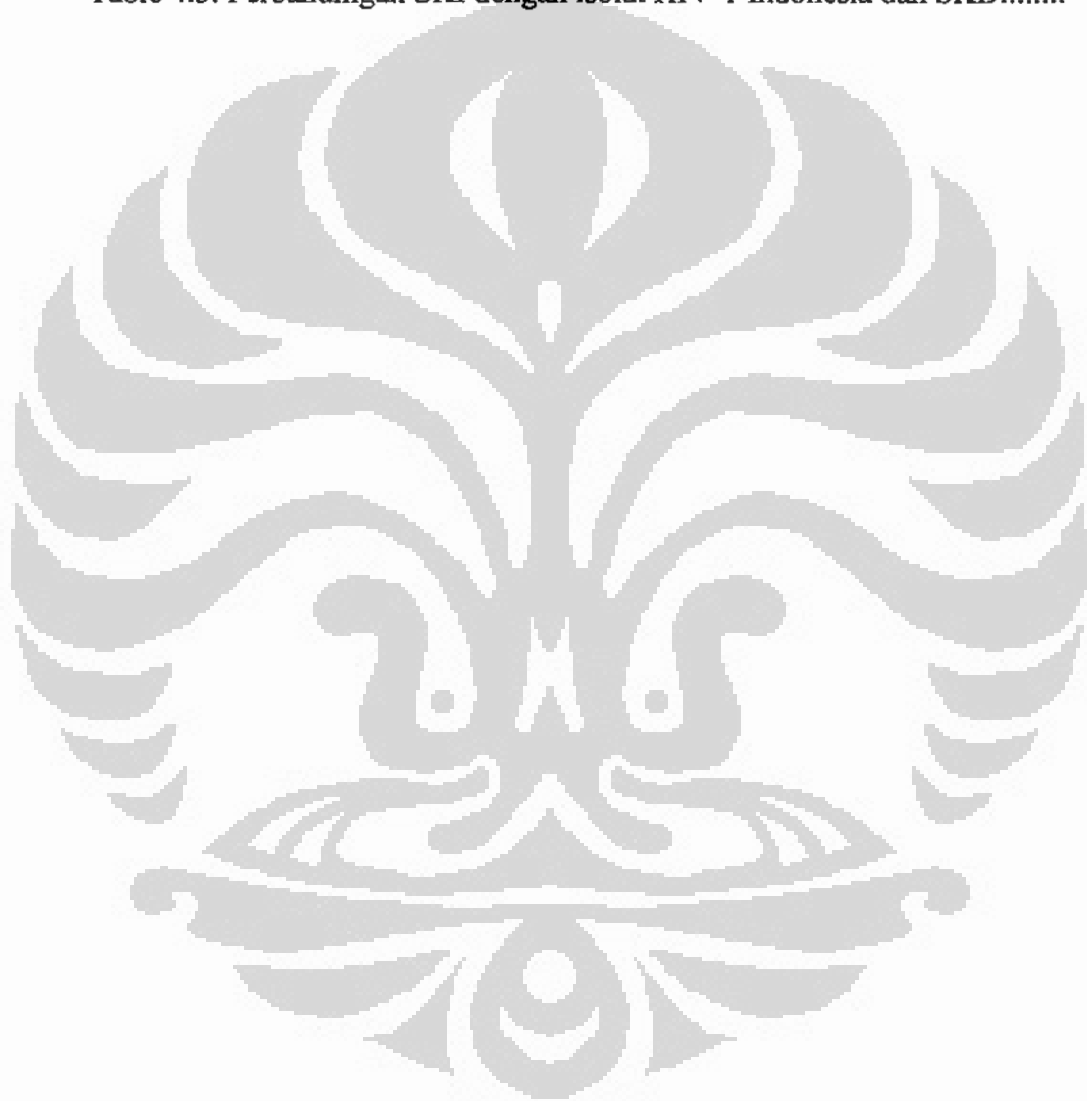
|   |           |
|---|-----------|
| A | : Adenin  |
| C | : Sitosin |
| G | : Guanin  |
| T | : Timin   |
| U | : Urasil  |

## DAFTAR SINGKATAN ASAM AMINO

|   |                       |
|---|-----------------------|
| A | : Alanin (Ala)        |
| C | : Sistein (Cys)       |
| D | : Asam Aspartat (Asp) |
| E | : Asam Glutamat (Glu) |
| F | : Fenilalanin (Phe)   |
| G | : Glisin (Gly)        |
| H | : Histidin (His)      |
| I | : Isoleusin (Ile)     |
| K | : Lisin (Lysin)       |
| L | : Leusin (Leu)        |
| M | : Metionin (Met)      |
| N | : Asparagin (Asn)     |
| P | : Prolin (Pro)        |
| Q | : Glutamin (Gln)      |
| R | : Arginin (Arg)       |
| S | : Serin (Ser)         |
| T | : Threonin (Thr)      |
| V | : Valin (Val)         |
| W | : Triptofan (Trp)     |
| Y | : Tirosin (Tyr)       |

## DAFTAR TABEL

|  |    |
|--|----|
| Tabel 3.1. Data isolat HIV-1 pembanding .....                              | 34 |
| Tabel 3.2 Data isolat sub tipe lain yang disertakan dalam filogenetik..... | 35 |
| Tabel 4.1. Hasil penentuan sub tipe HIV-1 isolat Indonesia.....            | 40 |
| Tabel 4.2. Epitop <i>Reverse Transcriptase</i> spesifik terhadap CTL.....  | 45 |
| Table 4.3. Perbandingan SKI dengan isolat HIV-1 Indonesia dan SKD.....     | 49 |





# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang penting di seluruh dunia karena infeksi ini telah menjangkiti wilayah geografis dan populasi yang berbeda-beda. Dalam satu dekade, sebagian besar individu terinfeksi HIV yang tidak diobati akan berlanjut menjadi penderita infeksi oportunistik yang fatal sebagai akibat defisiensi sistem imun yang diinduksi oleh HIV.<sup>1</sup>

Penyakit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) muncul pertama kali dalam populasi manusia pada tahun 1981. AIDS adalah suatu penyakit zoonosis dimana virus HIV sebagai agens etiologinya mampu menembus *species barrier* antara simian dan manusia yang terjadi sejak sebelum pertengahan abad ke-19 dan mungkin menyebar dalam populasi manusia sebagai akibat meningkatnya penggunaan injeksi yang tidak aman dan praktik transfusi pada era pasca kolonial di Afrika yang dapat memberi kesempatan virus melakukan adaptasi terhadap manusia melalui *serial passages*.<sup>2</sup>

Penyakit HIV/AIDS saat ini telah menjadi penyebab kematian pertama terbanyak di negara-negara sub-Sahara Afrika dan penyebab kematian terbesar ke-4 di dunia. Diperkirakan 14.000 orang/hari (5 juta orang/tahun) terinfeksi dengan HIV, dimana lebih 95% dari mereka tinggal di negara-negara berkembang.<sup>2</sup> Penyakit ini telah menginfeksi lebih dari 40 juta orang di seluruh dunia, terdapat tambahan lebih dari 4.3 juta orang baru terinfeksi pada tahun 2008.<sup>3</sup> Di Indonesia, sampai akhir Juni 2008 dilaporkan sebanyak 6277 orang penderita AIDS. Dari jumlah itu, 1.651 orang diantaranya telah meninggal dunia.<sup>4</sup>

Pengembangan vaksin yang efektif untuk mengontrol pandemik AIDS terus dilakukan sejak ditemukan dan diisolasinya virus HIV kurang lebih 25 tahun yang lalu, namun mengalami hambatan karena beberapa sifat yang unik virus HIV. Bagaimanapun pengembangan vaksin AIDS yang aman,

efektif, mudah dalam pemberian ke pasien dan murah merupakan kebutuhan umat manusia yang sangat mendesak saat ini.<sup>5</sup>

Pemberian terapi *Highly Active Antiretroviral Treatment* (HAART) bagi penderita HIV/AIDS menunjukkan hasil yang memuaskan dengan mengurangi laju progresifitas penyakit, dimana HAART mampu mengubah penyakit infeksi HIV yang letal menjadi penyakit kronik yang dapat ditangani secara efektif sehingga penderita terhindar dari kematian akibat infeksi oportunistik yang menyertai infeksi HIV/AIDS. Namun kesuksesan dalam tatalaksana medis pada penderita HIV/AIDS tersebut tidak diikuti kemajuan dalam pencegahan infeksi HIV.<sup>5</sup>

Salah satu hambatan terbesar dalam pengembangan vaksin AIDS adalah keanekaragaman *Human Immunodeficiency Virus-Type 1* (HIV-1) yang tinggi. Sejak HIV-1 group M menginfeksi manusia 75 tahun yang lalu, virus ini berkembang secara cepat, dimana saat ini mencakup sejumlah sub tipe, sub-sub tipe dan *circulating recombinant forms* (CRFs) berbeda. Perbedaan protein selubung (*envelope*) pada virus dengan sub tipe yang sama mencapai 20%, dan antara sub tipe yang berbeda mencapai 35%.<sup>6</sup>

Ide untuk mengembangkan vaksin yang spesifik terhadap wilayah regional tertentu menggunakan sub tipe dominan menjadi pertimbangan untuk mengatasi hambatan karena tingginya keanekaragaman HIV-1 tersebut.<sup>6</sup> Pengetahuan tentang adanya dominasi HIV-1 dengan sub tipe, sub-sub tipe, dan *circulating recombinant forms* (CRF) tertentu pada suatu populasi dan daerah tertentu mungkin dapat dimanfaatkan untuk menentukan apakah suatu vaksin potensial harus mencakup strain tunggal, bentuk CRF atau campuran antigen dari beberapa strain HIV-1 yang berbeda.<sup>7</sup> Oleh karena itu metode penentuan sekuen konsensus virus dapat digunakan dalam desain pengembangan vaksin untuk meminimalisir perbedaan genetik virus, sehingga secara efektif mengurangi pengaruh besarnya keanekaragaman virus. Virus HIV-1 yang sesuai sekuen konsensus inilah nantinya yang akan dipilih sebagai kandidat vaksin HIV-1.<sup>6</sup>

Usaha untuk menentukan sekuen konsensus HIV-1 telah dilakukan di berbagai negara, namun di Indonesia hal tersebut belum pernah dilakukan.

Penelitian ini bertujuan menentukan sekuen konsensus HIV-1 di Indonesia dengan menggunakan sekuen gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* dari sub tipe HIV-1 yang paling dominan yang beredar di Indonesia.

## 1.2 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berbagai sub tipe HIV-1 yang beredar di Indonesia dan mengetahui homologi atau variasi genetik sekuen HIV-1 sub tipe dominan yang beredar di Indonesia khususnya dari pasien pengguna narkoba.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe yang dominan yang beredar di Indonesia berdasarkan sekuen gen *reverse transcriptase* dan gen *protease*, yang akan digunakan sebagai acuan dalam pemilihan isolat kandidat vaksin HIV-1. Dalam penelitian ini juga ditentukan isolat yang sesuai dengan sekuen konsensus yang akan digunakan dalam pengembangan kandidat vaksin HIV-1 Indonesia.

## 1.3 MANFAAT PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini antara lain :

- 1.3.1 Sekuen konsensus yang diperoleh dapat digunakan sebagai acuan dalam pemilihan isolat HIV-1 untuk pengembangan berbagai macam kandidat vaksin HIV-1.
- 1.3.2 Mendapatkan isolat yang sesuai dengan sekuen konsensus untuk pengembangan kandidat vaksin HIV-1 di Indonesia.
- 1.3.3 Mengetahui jenis sub tipe HIV-1 yang beredar di Indonesia.
- 1.3.4 Mengetahui variasi genetik HIV-1 sub tipe dominan yang beredar di Indonesia.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TIPE 1 (HIV-1)

#### 2.1.1 Penemuan HIV-1

*Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) merupakan salah satu penyakit yang banyak menarik perhatian dewasa ini. Penyakit ini ditemukan pertama kali di tahun 1981 pada 5 orang homoseksual di Amerika Serikat. Lima tahun setelahnya, yaitu pada tahun 1986, baru diketahui bahwa penyakit tersebut disebabkan oleh infeksi *Human Immunodeficiency Virus*, yang ditandai dengan adanya penekanan sistem imunitas tubuh dengan beberapa manifestasi klinis, seperti infeksi oportunistik, keganasan, dan penurunan fungsi sistem saraf pusat. Infeksi virus ini sangat berpengaruh terhadap sistem imunitas, terutama imunitas seluler yang dipengaruhi oleh sel limfosit T CD4+.<sup>8</sup>

Pada tanggal 3 Januari 1983, Barre-Sinoussi, Cherman, dan Montagnier (dari *Pasteur Institute* di Paris) berhasil mengambil dan mengisolasi retrovirus dari cairan kelenjar getah bening (limfe) leher yang membesar pada seorang pasien. Karena berasal dari sel-sel kelenjar limfe pasien dengan limfadenopati, virus ini dinamakan *lymphadenopathy-associated virus* (LAV). Pada tahun 1984, Robert Gallo dkk., dari *National Institute of Health (NIH)*-USA berhasil mengisolasi *Human T-lymphotropic virus type III* (HTLV-III) dari limfosit darah perifer pasien AIDS. Levy dkk., dari *University of California* mengkultur *AIDS-associated retrovirus* (ARV) dari sel mononuklear darah perifer pasien AIDS. Pada analisis sekuen terhadap genom LAV dan HTLV-III, didapatkan bahwa keduanya hampir identik, hanya terdapat 1-2% divergensi. Sementara perbandingan keduanya dengan ARV menunjukkan 15% divergensi. Pada pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron, terlihat bahwa virus-virus tersebut secara morfologi sama dengan anggota genus *lentivirus* dari famili *Retroviridae*.<sup>9</sup>

Pada tahun 1985, *the New England Regional Primate Research Center* berhasil mengisolasi lentivirus dari kera Asia dengan penyakit seperti AIDS. Adanya kemiripan morfologi dan reaktivitas silang secara serologi dengan HTLV-III, maka virus ini dinamakan *simian T-lymphotropic virus type III* (STLV-III). Fakta bahwa STLV-III menyebabkan sindroma defisiensi yang fatal pada kera terinfeksi, mendukung hipotesis bahwa lentivirus merupakan penyebab AIDS pada manusia. Pada tahun 1986, Clavel, Montagnier dkk., berhasil mengisolasi lentivirus khas dan dihubungkan dengan AIDS yang terdapat pada pasien-pasien di Afrika Barat. Sejak saat dikenal istilah *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) untuk lentivirus yang menyerang manusia, dan *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) untuk lentivirus yang menginfeksi kera. *Human Immunodeficiency Virus* tipe 1 merujuk pada virus-virus yang secara genetik mirip dan sering ditemukan di beberapa daerah Afrika, Asia, Eropa, Amerika Utara dan Amerika Selatan. Sedangkan HIV-2 merupakan virus yang berbeda secara genetik dengan HIV-1 dan ditemukan di Afrika Barat. Meskipun kedua virus ini menyebabkan AIDS, namun individu yang terinfeksi HIV-2 memiliki tahap klinis yang lebih panjang dan tingkat morbiditas yang rendah.<sup>9</sup>

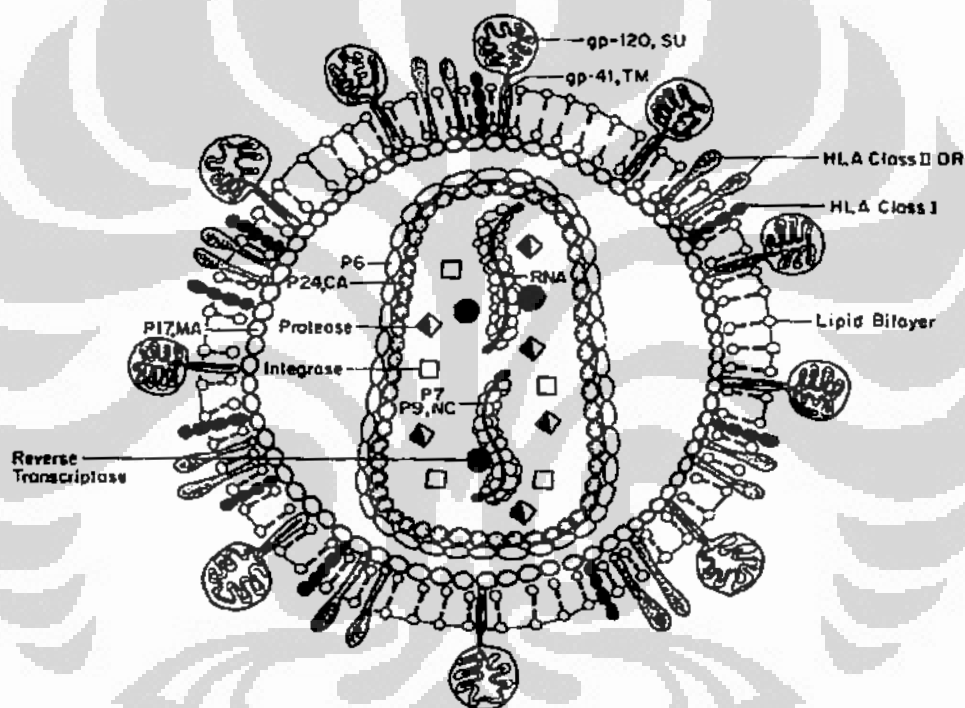
Atas penemuan HIV penyebab penyakit AIDS tersebut Luc Montagnier memperoleh Hadiah Nobel Kedokteran 2008 bersama asistennya, Françoise Barré-Sinoussi.<sup>10</sup>

### 2.1.2 Struktur dan genom HIV-1

Virion HIV-1 (Gambar 2.1) yang matur memiliki diameter  $\pm 1000 \text{ \AA}$ . Genom HIV-1 terdiri dari dua untai RNA rantai (+) nonkomplementer yang identik dengan panjang masing-masing sekitar 9,2 kb; terbungkus dalam *cone-shaped*; protein inti tersusun atas protein kapsid p24 (CA sebesar 24 kDa), dikelilingi oleh protein unik p6 yang meregulasi keluarnya virus dari sel. Lapisan yang lebih luar yang mengelilingi protein inti adalah protein matriks p17 (MA) dan keseluruhan virion diselubungi oleh *envelope* fosfolipid bilayer yang berasal dari membran sel hospes. Enzim virus yakni RT (integrase) dibungkus oleh RNA dalam inti. Glikoprotein surface gp120 (SU) dan transmembran gp41 (TM) merupakan kompleks nonkovalen.

Berbagai protein hospes diinkorporasikan ke dalam envelope termasuk HLA kelas I dan molekul DR HLA kelas II.<sup>11</sup>

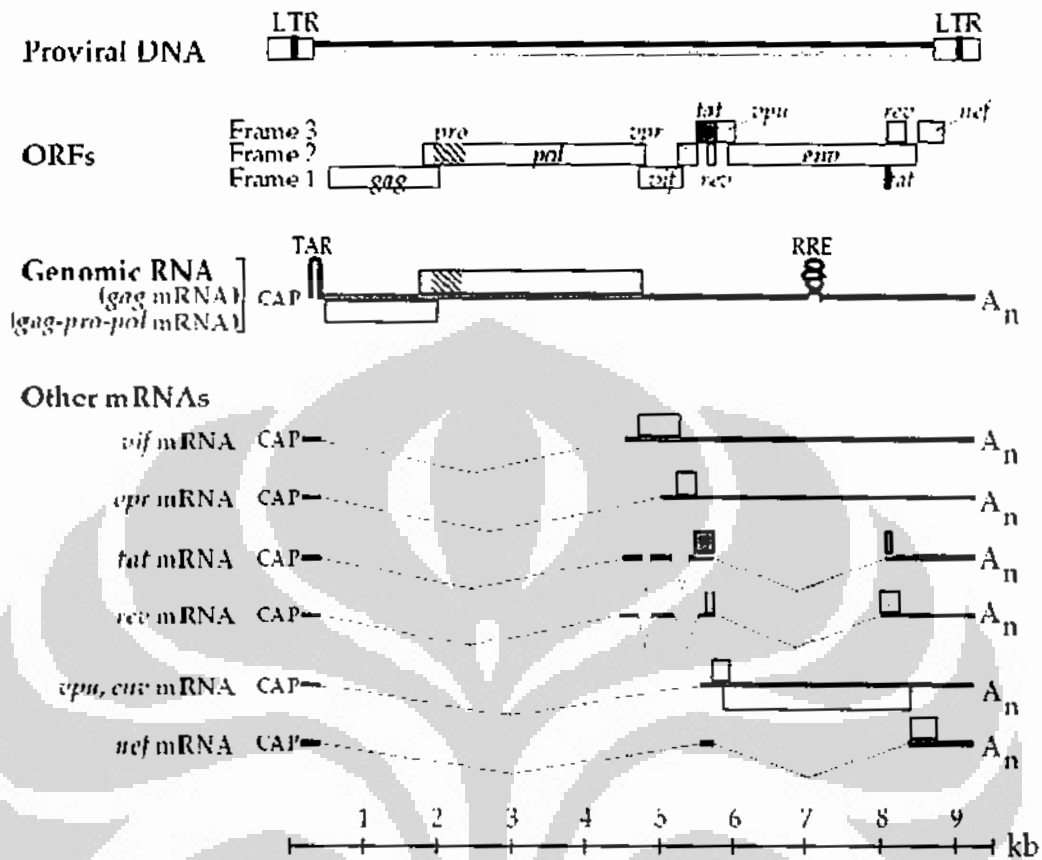
Protein selubung (*coat* = antigen permukaan) dikode oleh gen *env*. Ketika produk gen awal dibuat, kemudian dipotong-potong oleh oleh enzim sel hospes pada aparatus golgi (GA) sehingga terdapat lebih dari satu glikoprotein permukaan. Di bagian dalam membran terdapat kapsid ikosahedral mengandung protein yang dikode oleh gen *gag* (Group-specific AntiGen). Sekitar 10 kopi *reverse transcriptase* terdapat dalam virus yang matur, dikode oleh gen *pol*.



Gambar 2.1. Struktur virion HIV-1.<sup>11</sup>

Gen *pol* mengkode beberapa fungsi (sama seperti *gag*, poliprotein yang dihasilkan kemudian dipotong-potong). Produk gen *pol* antara lain :

- Reverse transcriptase
- Integrase (insersi genom virus ke genom sel hospes)
- RNase H (memotong RNA ketika DNA ditranskripsi, sehingga *reverse transcriptase* dapat membuat untai komplementer kedua dari DNA)
- Protease (memotong poliprotein yang ditranslasi dari mRNA dari gen *gag* dan gen *pol*).<sup>9</sup>



Gambar 2.2. Struktur genom HIV-1.<sup>13</sup>

Beberapa protein tersebut disintesis untuk mengontrol protein lainnya (*protein-synthesis controlling proteins*) dan kebanyakan tidak menyusun partikel virus. Pada struktur genom HIV-1 (Gambar 2.2) terlihat ada sembilan gen penyusun genom HIV-1. Dari sembilan ORF tersebut dapat dihasilkan 15 protein. Pada keadaan provirus, DNA virus direverse transkripsikan dari RNA dan diintegrasikan ke DNA kromosom sel hospes; ditandai dengan sekuen long terminal repeat (LTR) pada masing-masing ujung. Berbagai protein regulator yang berbeda berikatan dengan LTR secara positif atau negatif meregulasi transkripsi virus. Gen *gag* mengkode protein struktural untuk inti, sedangkan gen *env* mengkode prekursor besar (160 kDa) glikoprotein virus (gp160) yang kemudian mengalami pemotongan pasca translasi menjadi gp120 dan gp41. Gen *pol* mengkode beberapa enzim termasuk RT dan enzim-enzim tersebut terlibat dalam proses replikasi dan integrasi.

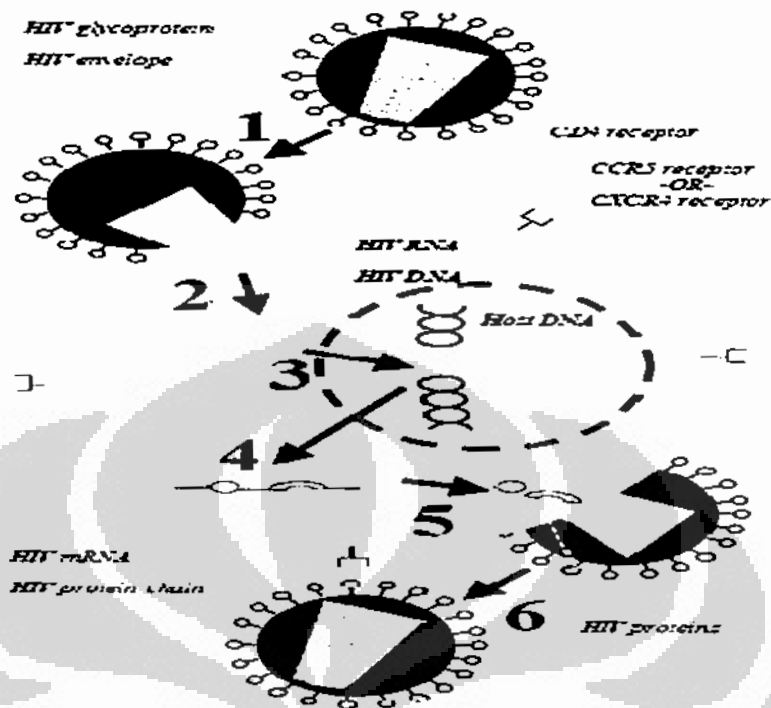
Enam gen lainnya yakni *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, dan *nef* meregulasi setiap tahapan pada proses replikasi. Produk gen *tat* merupakan regulator positif proses transkripsi sedangkan produk gen *rev* merupakan regulator ekspresi gen struktural. Gen *vif* mengkode protein infeksius yang memungkinkan transport virus ke nukleus sel dan stabilisasi DNA intermediete. Gen *vpr* mengkode protein R virus, regulator positif pada awal transkripsi virus. Protein U dikode oleh gen *vpu* yang melakukan downregulasi reseptor CD4 dan memungkinkan keluarnya virus dari sel yang terinfeksi. Satu dari gen-gen regulator teridentifikasi, *nef*, regulasi negatif replikasi virus dimulai sehingga gen ini ditandai sebagai faktor negatif. Akhir-akhir ini diketahui bahwa *nef* melakukan downregulasi reseptor CD4, meningkatkan replikasi virus secara *in vitro* maupun *in vivo*.<sup>12</sup>

### 2.1.3 Siklus hidup HIV-1

Dari penelitian telah diketahui bahwa molekul yang merupakan reseptor utama untuk HIV-1 adalah molekul CD4 yang terdapat pada sistem imun seluler yaitu sel T helper. Hal ini tidak saja mengungkapkan tropisme HIV-1 tetapi juga menjadi petunjuk untuk memahami peran glikoprotein *envelope* HIV-1 dan reseptornya. HIV-1, HIV-2 dan SIV menggunakan molekul CD4 sebagai reseptor utama. CD4 termasuk immunoglobulin G, diekspresikan pada permukaan luar limfosit T *helper*. Virion HIV-1 matang membentuk ikatan dengan CD4 melalui glikoprotein gp120. Ikatan ini kemungkinan terjadi antara domain C3 dan C4 dari gp120 dan domain N-terminal molekul CD4. Setelah terjadi ikatan antara gp120 dengan CD4, maka terjadi perubahan konformasi yang membuka domain-domain dan molekul transmembran gp41 sehingga membran seluler berfusi dengan *envelope* virus.<sup>12</sup>

Diketahui bahwa terdapat koreseptor untuk infeksi HIV-1, yaitu CCR5 dan CXCR4. HIV harus berikatan dengan CD4 dan salah satu koreseptor ini untuk memasuki sel target. Terdapat 2 strain HIV-1 yang dikenal berdasarkan proses transmisinya, yaitu virus *M-tropic* dan *T-tropic*. Virus *M-tropic* menggunakan koreseptor CCR5, sedangkan virus *T-tropic* menggunakan koreseptor CXCR4.<sup>14</sup>





Gambar 2.3. Siklus hidup HIV.<sup>27</sup>

Keterangan : 1. *Binding* dan fusi. 2. Transkripsi balik (*reverse transcriptase*). 3. Integrasi. 4. Transkripsi. 5. Perakitan komponen virus. 6. *Budding*.

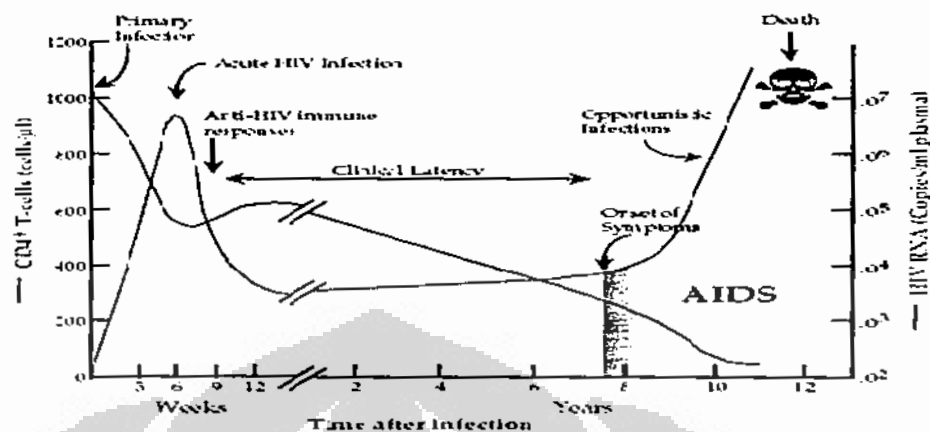
Di dalam sitoplasma sel inang, enzim *reverse transcriptase* virus mengubah untai RNA virus menjadi untai DNA. Untai DNA HIV-1 yang baru terbentuk ini kemudian menuju ke inti sel dan terintegrasi dengan DNA sel inang dengan bantuan enzim integrase untuk membentuk provirus. Agar provirus menghasilkan virus baru, maka dilakukan proses transkripsi untuk menghasilkan mRNA didalam inti sel inang. Setelah mRNA HIV-1 ditranskripsi, selanjutnya akan ditransportasikan ke sitoplasma. Genom RNA (untai plus) dikopi dari DNA yang terintegrasi oleh *RNA polymerase* II sel hospes yang selanjutnya mengalami *capping* dan poliadenilasi. Genom RNA mengalami *splicing* oleh enzim-enzim nukleus sel hospes untuk menghasilkan mRNA untuk protein lain seperti env.<sup>18</sup> Peran protein-protein HIV-1 sangat diperlukan dalam proses ini. Protein yang dikode gen *rev* membuat mRNA yang mengkode protein-protein struktural HIV-1 ditransportasikan dari inti ke sitoplasma. Tanpa protein Rev, maka protein struktural tidak akan dapat diproduksi.

Setelah itu, genom, protein-protein dan enzim-enzim HIV yang terbentuk akan bergerak ke membran plasma sel inang secara bersama-sama, dan bersamaan dengan itu protein *envelope* virus beragregasi dengan membran sel inang. Kemudian terbentuk partikel virus belum matang dan keluar dari sel inang. *Envelope* virus yang terbentuk merupakan gabungan dari membran sel inang dan protein HIV. Setelah selesai melakukan proses budding atau keluar dari sel inang, protein-protein dan enzim-enzim HIV kemudian dipecah oleh enzim protease virus. Tahap ini menghasilkan partikel virus yang matang dan bersifat infeksius.<sup>15</sup>

#### 2.1.4 Patogenesis dan pola transmisi HIV-1

Setelah virus HIV-1 memasuki tubuh pejamu dan masuk ke sirkulasi darah, virus ini akan menginfeksi sel-sel CD4<sup>+</sup> dan bereplikasi dengan cepat. Selama fase infeksi primer atau akut ini, di dalam sirkulasi darah terdapat partikel - partikel virus yang menyebar ke seluruh tubuh, kemudian berdiam di beberapa organ, terutama organ-organ limfoid. Organ-organ limfoid ini antara lain kelenjar getah bening, limpa, tonsil dan adenoid. Dalam waktu 2 - 4 minggu setelah terinfeksi, sekitar 70% individu terinfeksi mengalami gejala seperti flu.<sup>15</sup> Pada fase infeksi primer/akut, virus HIV-1 dapat dideteksi di dalam darah dengan uji terhadap asam nukleat virus (PCR untuk DNA provirus dan RT-PCR untuk RNA virus), uji terhadap antigen p24 dan kultur virus. Antibodi terhadap HIV dapat dideteksi dalam waktu 4 sampai 6 minggu setelah infeksi, menggunakan uji laboratorium yang umum digunakan. Antibodi terhadap antigen virus akan bertahan dan selalu ada seumur hidup penderita. Sedangkan gejala klinis khas dapat terlihat pada semua individu terinfeksi dalam waktu 6 bulan setelah infeksi.<sup>16</sup>

Pada fase awal infeksi, sistem imun pejamu yang mampu melawan virus adalah sel T sitotoksik (sel T CD8<sup>+</sup>/CTL) dan antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel B. dimana hal ini akan menurunkan jumlah virus dalam darah. Jumlah sel-sel T CD4<sup>+</sup> akan meningkat kembali jumlahnya bahkan dapat mencapai jumlah normal.<sup>15</sup>



Gambar 2.4. Perjalanan penyakit AIDS.<sup>13</sup>

Pada fase laten akan terjadi penurunan jumlah sel CD4+ secara kontinyu. Individu akan terbebas dari gejala yang diakibatkan infeksi HIV selama beberapa tahun, namun HIV terus bereplikasi di dalam organ-organ limfoid.<sup>15</sup> *Viral load* akan meningkat pada darah perifer. Peningkatan ini menggambarkan adanya kerusakan sistem imun secara berkelanjutan dan makin berkurangnya kemampuan sistem imun untuk menghambat replikasi virus.<sup>17</sup> Pada akhirnya penurunan jumlah sel CD4+ akan mencapai tingkat kritis sehingga menyebabkan resiko terjadinya infeksi oportunistik.<sup>15</sup>

Tiga pola utama evolusi perjalan penyakit yang disebabkan HIV-1, yaitu (1) *typical progressor*, yaitu individu terinfeksi HIV-1 yang mengalami gejala penyakit AIDS dalam kurun waktu kira-kira 10 tahun, dimana angka kejadiannya sebesar 80%-90%; (2) *rapid progressor*, yaitu individu terinfeksi HIV akan mengalami gejala klinis AIDS dalam waktu cepat (3-4 tahun), dimana angka kejadiannya sebesar 5%-10%; (3) *long-term nonprogressor*, yaitu individu terinfeksi HIV-1 akan mengalami gejala klinis AIDS setelah jangka waktu lama, dimana angka kejadiannya sekitar 5%, individu ini memiliki jumlah hitung CD4+ yang stabil dan bisa tidak mengalami gejala penyakit yang lama bahkan lebih dari 12 tahun.<sup>15,17</sup>

Pada orang dewasa, pada umumnya HIV-1 ditularkan melalui hubungan seksual dengan pasangan yang terinfeksi. Virus masuk ke dalam tubuh melalui lapisan mukosa vagina, vulva, penis, rektum, atau pada kasus yang jarang, melalui mulut dan saluran pencernaan atas setelah *oral sex*.

Transmisi tersebut dapat diperparah dengan adanya kerusakan pada lapisan mukosa karena penyakit menular seksual lainnya yang menyebabkan luka dan inflamasi. HIV-1 juga dapat ditularkan melalui kontak dengan darah yang terinfeksi. Umumnya melalui penggunaan jarum suntik yang telah terkontaminasi darah yang mengandung virus secara bergantian.

Pada anak-anak, seluruh kasus infeksi HIV-1 terjadi karena mendapatkan virus ini dari ibunya sebelum atau selama proses kelahiran. HIV-1 juga dapat ditransmisikan dari ibu yang terinfeksi kepada bayinya melalui air susu selama proses menyusui.<sup>15</sup>

HIV-1 tidak dapat ditransmisikan melalui pelukan, jabat tangan atau kontak fisik biasa dimana tidak ada perdarahan, termasuk kontak dengan keringat, air mata, *feces* dan urin penderita. Tidak ada bukti bahwa HIV-1 dapat ditularkan melalui vektor seperti nyamuk.<sup>19</sup>

#### **2.1.5 Respon imun terhadap infeksi HIV**

Pada studi terhadap individu dengan infeksi kronik HIV-1 berhasil dideteksi adanya respon imun seluler dan humoral terhadap HIV. Seperti pada infeksi virus kronik pada umumnya, *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) merespon adanya infeksi dan menghambat replikasi virus dengan 2 mekanisme. Pertama, dengan cara mematikan secara langsung sel-sel yang telah terinfeksi virus. Mekanisme yang kedua, bersamaan dengan teraktivasinya CTL untuk mematikan sel terinfeksi, maka CTL juga menghasilkan faktor-faktor solubel yang dapat menghambat replikasi HIV, seperti kemokin RANTES, MIP-1 alfa, MIP-1 beta dan defensin. Faktor-faktor solubel ini akan berkompetisi dengan virus untuk berikatan dengan beberapa koreseptor yang terdapat pada permukaan sel inang dan penting untuk masuknya virus ke dalam sel.

Respon imun seluler yang lain adalah sel-sel *T helper*. Sel-sel ini akan mengenali protein-protein virus yang terperangkap dalam lisosom *Antigen-Presenting Cell* (APC), diproses menjadi peptida-peptida yang lebih kecil dan kemudian dipresentasikan di permukaan sel oleh molekul MHC kelas II.

Hal ini menyebabkan sel T *helper* teraktivasi dan membantu dalam pembentukan respon imun yang efektif.

Antibodi netralisasi juga terdeteksi pada infeksi HIV dan memiliki target beberapa epitop yang berbeda. Terdapat antibodi yang berikatan langsung dengan protein *envelope* virus yang berperan dalam masuknya virus ke dalam sel inang (*the V3 loop antibodies*) dan ada juga antibodi yang berikatan dengan daerah pengikatan CD4 (*CD4-binding-site antibodies*). Antibodi netralisasi terhadap HIV bersifat lemah dengan kemampuan reaktivitas silang yang kurang baik, sehingga tidak memiliki kemampuan untuk menetralsiasi silang terhadap virus strain baru.<sup>20</sup>

#### 2.1.6 Epidemiologi dan keanekaragaman HIV-1

Berdasarkan data yang dikeluarkan melalui UNAIDS/WHO 2008 *AIDS Epidemic*, terdapat sekitar 40 juta orang hidup dengan HIV-1. Terdapat sekitar 4,3 juta orang dengan infeksi baru, dengan 2,8 juta orang (65%) terdapat di Sub-Sahara Afrika dan adanya peningkatan yang signifikan di Eropa Timur dan Asia Tengah, dimana terdapat beberapa indikasi bahwa tingkat infeksi telah meningkat lebih dari 50% sejak tahun 2004. Pada tahun 2008, terdapat lebih dari 2,9 juta orang meninggal karena penyakit-penyakit yang berhubungan dengan AIDS.<sup>4</sup>

Di Indonesia sendiri sampai akhir Juni 2008 dilaporkan sebanyak 6277 orang penderita AIDS. Dari jumlah itu, 1.651 orang atau 23,63% penderita AIDS diantaranya telah meninggal dunia. Cara penularan kasus kumulatif yang dilaporkan, yaitu melalui pengguna Narkoba suntik atau penasun (IDU = *Injecting Drug User*) 52,6%; heteroseksual 37,2% dan homoseksual 4,5%. Dilihat dari penyebaran kasus, hampir semua propinsi (32 propinsi, kecuali Sulawesi Barat) di Indonesia telah melaporkan adanya kasus ini.<sup>5</sup>

Analisis filogenetik beberapa strain HIV-1 yang diisolasi dari daerah geografi yang berbeda-beda menunjukkan virus ini dapat dikelompokkan menjadi grup, subtype, sub-subtype dan CRFs. HIV-1 dibagi menjadi 3 grup yaitu grup M, N dan O. Strain HIV-1 yang paling banyak ditemukan di seluruh dunia dan berperan dalam pandemi terdapat dalam grup M (*Major*).

Grup O endemik di Kamerun dan negara-negara tetangga di daerah Afrika Tengah Barat. Grup O adalah "outlier". Grup N (*New*, atau non-M, non-O) merupakan grup yang baru teridentifikasi dan didapatkan dari isolat pasien-pasien Kamerun dengan jumlah yang sedikit.<sup>21</sup> Hanya terdapat 9 subtipe HIV-1 grup M yaitu A-D, F-H, J dan K.<sup>21</sup> Subtipe dalam grup O HIV-1 belum teridentifikasi secara jelas dan disetujui bersama. Demikian juga dengan subtipe dalam grup N HIV-1 yang belum didefinisikan. Hanya sedikit isolat yang telah diidentifikasi dan disekuensing.<sup>22</sup>

Dalam beberapa subtipe, struktur filogenetik diidentifikasi lebih jauh dan dari hasil identifikasi ini maka subtipe dapat diklasifikasikan lagi menjadi sub-subtipe (*subclades*). Subtipe F dapat dibagi lagi menjadi 2 *subclade* yaitu F1 dan F2. Demikian juga dalam subtipe A telah diidentifikasi strain HIV-1 sub-subtipe A2.<sup>21</sup>

Pada subtipe-subtipe grup M diketahui bahwa beberapa isolat dapat memiliki genom dengan daerah-daerah tertentu yang berasal dari subtipe yang berbeda-beda. Hal ini dapat diketahui melalui analisa filogenetik. Genom-genom mosaik HIV-1 ini telah berhasil diidentifikasi dari beberapa individu.<sup>21</sup> Jika virus rekombinan ini ditransmisikan dari satu individu ke individu lain sehingga menjadi satu strain yang bersirkulasi dalam epidemi HIV, maka virus ini disebut sebagai *Circulating Recombinant Form* (CRFs) dan sampai saat ini telah ditemukan sebanyak 34 CRFs.<sup>22</sup>

### 2.1.7 Kemajuan dan strategi pengembangan vaksin HIV-1

Beberapa percobaan untuk mengembangkan vaksin AIDS yang aman dan efektif terhambat oleh sulitnya menentukan respon imun spesifik yang mampu mencegah infeksi dan menghambat perjalanan penyakit. Struktur dan siklus hidup yang kompleks virus HIV, kemampuan mutasi yang tinggi, variabilitas genetik virus yang tinggi, sulitnya mengembangkan antibodi dengan spektrum luas, tidak adanya hewan coba yang relevan dan rumitnya melaksanakan uji klinik dalam skala besar khususnya di negara berkembang, juga menjadi penyebab sulitnya mengembangkan vaksin AIDS yang efektif.<sup>2,23</sup>

Tingginya tingkat mutasi HIV-1 terutama pada daerah Env karena reseptor dan ko-reseptor *binding sites* mengalami kamuflase akibat perubahan residu glikoprotein yang ter-glikosilasi. Glikoprotein pada selubung virus (Env) merupakan daerah lestari tempat terjadinya perlekatan dan fusi virus ke sel pejamu. Daerah tersebut juga tahan panas (*thermostably*). Hal-hal tersebut menyebabkan virus mampu menghindari dari deteksi *cross-reactive antibody (Ab)* yang diproduksi oleh sel B yang mengenali daerah yang lestari tersebut. Fleksibilitas konformasi (bentuk) gp120 juga dapat menurunkan efisiensi ikatan Ab terhadap virus HIV karena virus mampu membuat suatu *entropic barrier* yang harus ditembus oleh Ab.<sup>23</sup> Sehingga pengembangan vaksin yang mengutamakan peran Ab atau sistem imun humoral sejauh ini menjadi tidak efektif.

Pada sebagian fase siklus hidupnya HIV-1 terintegrasi ke dalam genom sel pejamu dalam bentuk provirus laten dan jika tidak mengekspresikan protein virus dalam jumlah yang signifikan maka virus dapat terhindar dari pengenalan respon imun. Selain tingginya *error rate* reverse transcriptase (RT) serta *turnover* virion plasma yang cepat, juga merupakan hambatan bagi pengembangan vaksin yang efektif karena virus mampu lolos dari sistem respon imun humoral maupun seluler. Konsekuensi lain dari tingginya tingkat mutasi virus adalah besarnya keanekaragaman virus HIV-1. Saat ini terdapat 12 sub tipe HIV-1 yang mengalami diversitas secara cepat ke arah *intersubtype recombinants* pada manusia. Semua itu merupakan tantangan terbesar dalam pengembangan vaksin AIDS yang universal.<sup>23</sup>

Dalam usaha pengembangan vaksin HIV-1 yang telah dilaksanakan sejak lebih dari dua dekade yang lalu, terdapat bermacam-macam strategi dalam pengembangan dan pembuatan vaksin yang diharapkan efektif untuk mencegah infeksi HIV. Secara garis besar strategi pengembangan vaksin tersebut terbagi menjadi dua, yaitu pendekatan secara konvensional dan pendekatan secara mutakhir.

### ***Pengembangan vaksin konvensional***

Pendekatan vaksin konvensional dilakukan pada awal-awal ditemukannya virus HIV-1. Vaksin konvensional yang terbukti efektif untuk pencegahan penyakit infeksi seperti vaksin Sabin polio, vaksin measles, dan vaksin chickenpox menggunakan metode virus yang dilemahkan (*live attenuated virus*), vaksin Salk polio dan vaksin hepatitis A menggunakan metode virus yang diinaktivasi atau dimatikan (*inactivated or killed vaccines*), vaksin hepatitis B menggunakan protein rekombinan dan vaksin difteri yang memakai toxoid bakteri. Metode-metode tersebut telah dimanfaatkan untuk strategi pengembangan vaksin HIV.

Namun demikian, strategi-strategi tersebut memiliki resiko yang bertolak belakang dengan tujuan vaksin tersebut untuk memberi perlindungan terhadap infeksi HIV-1. Pada studi awal menggunakan virus *SIV-macaque* (*Simian Immunodeficiency Virus* pada sejenis monyet) sebagai model, mencoba virus yang telah dimodifikasi secara genetik dan masih infeksi namun patogenitasnya dilemahkan (*nef-deleted SIV*), dapat digunakan sebagai vaksin pencegah terhadap infeksi berikutnya oleh virus *wild type*. Namun, pada studi selanjutnya menyatakan bahwa dalam jangka waktu lama banyak bayi dan monyet dewasa yang disuntik dengan vaksin tersebut, lebih cepat mengalami kematian daripada yang tidak disuntik vaksin. Hal yang hampir sama dilaporkan dari group penerima transfusi darah di Australia yang terinfeksi dengan HIV mutan pada gen regulator *nef* (gen *nef* adalah gen yang dibuang pada vaksin virus yang dilemahkan). Setelah lebih dari 10 tahun, tidak satupun dari individu-individu tersebut timbul gejala penyakit dan jumlah CD4 dalam batas normal. Namun, *follow-up* data selanjutnya dari pasien - pasien tersebut menunjukkan penurunan sel T yang bermakna yang mirip dengan vaksinasi monyet menggunakan virus yang dilemahkan. Pada perkembangan berikutnya pada pasien-pasien itu timbul gejala *AIDS like disease*.<sup>23</sup> Tampaknya usaha pengembangan vaksin menggunakan virus HIV yang dilemahkan sangat tidak aman, sehingga strategi ini mulai ditinggalkan.



Sementara itu vaksin dengan virus yang diinaktivasi (*inactivated viral vaccines*) yang menggunakan *SIV-macaque* sebagai model juga memperoleh hasil yang tidak memuaskan. Vaksin gagal menghasilkan respon proteksi yang kuat dan luas. Beberapa studi menunjukkan bahwa evaluasi vaksin virus inaktif, pada fase awal uji imunogenitas manusia (*early-phase human immunogenicity trials*) juga menunjukkan hasil yang tidak memuaskan, dimana ketika kadar viral inaktif menurun atau berkurang, tidak ada respon Ab maupun CTL. Selain itu tidak ada pemicu sintesis protein virus (yang berperan sebagai antigen) di dalam sel untuk mempertahankan respon imun. Penggunaan vaksin virus HIV-1 inaktivasi sebagai strategi pengembangan vaksin HIV-1 memerlukan kajian yang lebih mendalam.<sup>23</sup> Strategi yang lain yaitu menggunakan protein rekombinan atau peptida virus HIV-1 sebagai vaksin. Uji coba dengan pendekatan ini telah dilakukan dengan menggunakan rekombinan dari glikoprotein Env HIV-1 sebagai imunogen. Respon Ab muncul pada fase awal uji coba pada manusia, dan Ab tersebut memiliki kemampuan yang terbatas untuk menetralkan HIV. Sementara respon CTL tidak muncul pada uji vaksin ini. Pada uji klinis fase III menggunakan rekombinan Env gp120 menunjukkan bahwa secara statistik tidak ada penurunan angka kejadian infeksi HIV yang bermakna dalam populasi.<sup>23</sup>

Meskipun vaksin-vaksin konvensional tersebut dianggap gagal memberikan tingkat proteksi yang diinginkan, tetapi uji coba – uji coba yang telah dilakukan tersebut dimana salah satunya telah sampai pada fase III uji klinis, merupakan kemajuan yang luar biasa dibidang penelitian dan pengembangan vaksin HIV-1.<sup>23</sup>

#### ***Pengembangan vaksin dengan strategi mutakhir***

Ketidakmampuan vaksin tradisional dalam menghasilkan vaksin yang sesuai untuk HIV-1, mendorong ilmuwan untuk membuat strategi baru dalam pengembangan vaksin. Beberapa pendekatan yang dianggap menjanjikan adalah penggunaan *live recombinant vectors* dan DNA plasmid yang imunogen.

a. *Live Vaccine Vectors*

Mekanisme kerja teknologi *live vaccine vector* untuk HIV secara garis besar yaitu, gen-gen HIV diklon ke dalam mikroorganisme yang mampu bereplikasi yang berperan sebagai vektor, dan pada vaksinasi respon imun akan ditimbulkan oleh vektor maupun produk gen HIV yang dibawa oleh vektor. Setelah protein HIV diproduksi di dalam sel dan masuk ke jalur MHC kelas I, imunogen mampu menghasilkan respon imun seluler melalui CTL. Pada kasus tertentu, vektor menjadi target langsung sel dendritik (DC).<sup>24</sup>

*Viral vektor*

Beberapa jenis virus yang dikembangkan sebagai *live viral vectors* untuk vaksin HIV-1 adalah poxvirus, rhabdovirus, *replication-defective adenoviruses*, herpesviruses, picornaviruses, dan adeno-associated viruses *Recombinant vaccinia virus* yang dicoba sebagai kandidat vaksin pada primata non manusia (*nonhuman primate*), mampu menghasilkan respon imun CTL terhadap protein HIV dan SIV.

Tetapi *vaccinia virus* dapat menyebabkan encephalitis pada manusia yang *immunocompromise*. Poxvirus yang dilemahkan (*attenuated poxviruses*) dapat menghasilkan respon imun pada primata non manusia dan dievaluasi sebagai kandidat vektor vaksin HIV pada fase awal uji klinis pada manusia. Vektor-vektor tersebut terbukti aman dan imunogenik.

Pada uji infeksi menggunakan SHIV, vaksin dengan vektor adenovirus dan *vesicular stomatitis virus* (VSV) memiliki kemampuan untuk mempertahankan jumlah virus dalam tingkat yang baik sehingga memberikan proteksi terhadap penyakit dalam jangka waktu lama. Hasil ini mendorong penelitian yang lebih cermat di bidang *recombinant virus vector* ke tingkat yang lebih menjanjikan. Sejauh ini penggunaan vektor adenovirus mampu menghasilkan imunitas seluler pada studi klinis fase II pada manusia. Contohnya adalah Ad5 (*E1- and E3-deleted replication-incompetent serotype 5 adenovirus*), yang memiliki imunogenitas yang sangat baik pada studi primata non manusia (*nonhuman primata*) dan murine.<sup>23</sup>

### *Bacterial vectors*

Bakteri juga dapat digunakan sebagai vektor vaksin. Sebagai contoh, *Salmonella vectors* yang telah dikembangkan sebagai *oral delivery* antigen HIV dan telah memberikan hasil yang menarik pada studi preklinik. *Recombinant Listeria monocytogenes* juga telah dievaluasi sebagai vektor perantara protein Gag HIV pada hewan coba monyet dan berhasil menimbulkan respon imun seluler yaitu CTL spesifik terhadap Gag dan CD4 di mukosa. Sebuah studi pada mencit menunjukkan *recombinant Shigella* yang mengkode Gag p55 dapat menghasilkan imun spesifik terhadap protein Gag.<sup>23</sup>

*Bacille Calmette-Guerin*(BCG), suatu preparasi *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan juga sedang diteliti sebagai kandidat vektor vaksin karena kemampuan membuat infeksi yang persisten dan kronik, serta telah terbukti aman dalam penggunaannya di seluruh dunia. Pada suatu studi terbatas menggunakan monyet mengindikasikan bahwa infeksi dengan *recombinant BCG* dapat menimbulkan respon CTL spesifik virus AIDS.<sup>25</sup>

### *Vaksin DNA*

Vaksin berbasis DNA dan RNA telah diteliti sebagai kandidat vaksin HIV yang potensial. Transfeksi mRNA ke sel dendritik ( DC ) telah digunakan untuk menginduksi imunitas sel T antitumor yang poten di vivo dan in vitro[19]. Transfeksi mRNA yang mengkode protein Gag HIV ke sel dendritik tion of DCs menghasilkan respon imun dengan menginduksi sel T CD4 dan CD8 yang poten dalam sistem in vivo.<sup>26</sup>

Bentuk vaksin DNA lebih disukai daripada bentuk vaksin RNA. Sehingga yang strategi pengembangan vaksin HIV dengan menggunakan vaksin DNA lebih menjanjikan.

## 2.2 SEKUEN KONSENSUS UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN HIV-1

Hambatan utama dalam pengembangan vaksin adalah keanekaragaman HIV-1 yang tinggi. Salah satu bukti bahwa variasi genetik menghambat pengembangan efikasi vaksin HIV adalah berkurangnya kemampuan untuk membangkitkan respon reaksi silang ( *cross reactive* ) CTL pada individu yang di vaksinasi dengan vaksin HIV-1 berbasis sub tipe B, ketika terinfeksi oleh virus dari sub tipe yang berbeda (selain B) dibandingkan jika terinfeksi oleh virus HIV-1 dari sub tipe B. Pada studi yang dilakukan terhadap pekerja seks yang telah resisten HIV-1 di Nairobi, Kenya oleh Rowland-Jones *et.al.* ditemukan bahwa terjadi pengutamaan pengenalan respon imun oleh CTL (*preferential CTL recognition*) terhadap peptida sub tipe A atau D (sub tipe HIV-1 yang beredar di Kenya), daripada pengenalan terhadap peptida sub tipe B. Hal yang sama juga terjadi pada individu yang terinfeksi di Thailand, dimana terdapat pengutamaan pengenalan CTL terhadap sel yang terinfeksi oleh sub tipe yang sesuai. Demikian juga perbandingan epitop CTL yang telah diketahui karakter dan sifatnya menunjukkan bahwa tingkat kelestariannya lebih besar pada sub tipe yang sama daripada antar sub tipe. Jadi kemampuan respon CTL terhadap HIV-1 sub tipe heterolog lebih berkurang dibandingkan respon terhadap sub tipe homolog. Oleh karena itu dimungkinkan pengembangan vaksin yang sesuai dengan virus yang beredar pada target populasi tertentu dengan menggunakan sekuen genom HIV-1 yang memiliki tingkat kelestarian yang tinggi seperti gen gag p24, RT atau protease. Sehingga vaksin dengan menggunakan gen – gen tersebut dapat menimbulkan *cross-subtype reactivity* yang potensial.<sup>39</sup>

Pengetahuan tentang adanya dominasi HIV-1 dengan sub tipe, sub-sub tipe, dan *circulating recombinant forms* (CRFs) tertentu pada suatu populasi dan daerah tertentu mungkin dapat dimanfaatkan untuk menentukan apakah suatu vaksin potensial harus mencakup strain tunggal, bentuk CRF atau campuran antigen dari beberapa strain HIV-1 yang berbeda.<sup>7</sup>

Saat ini terdapat dua pendekatan untuk menyeleksi strain vaksin yang dapat mengatasi permasalahan tingginya variasi sekuen HIV. Pertama, seleksi berdasarkan isolat dari subtipe tertentu yang diambil dari wilayah dimana vaksin tersebut akan digunakan. Contoh pendekatan ini adalah vaksin yang sedang dikembangkan untuk subtipe A, C dan CRF01. Pendekatan ini dapat diintegrasikan dengan pertimbangan biologis, seperti penggunaan koreseptor, kerentanan ataupun potensi Ab netralisasi serum dari pasien yang mana isolat kandidat vaksin tersebut diperoleh.<sup>6</sup> Pendekatan ini dikenal dengan pengembangan vaksin berbasis isolat (*isolate-based vaccines*).

Pendekatan yang kedua yaitu dengan mengkonstruksi sekuen buatan (*artificial sequences*) baik sekuen konsensus atau dengan merekonstruksi suatu sekuen nenek moyang (*ancestral sequence*) berdasarkan suatu model evolusioner.<sup>6</sup> Definisi sekuen konsensus dalam biologi molekuler dan bioinformatika adalah suatu cara untuk merepresentasikan hasil kesejajaran beberapa sekuen (*multiple sequence alignment*), dimana hubungan sekuen – sekuen tersebut dibandingkan satu sama lain, dan ditemukan kesamaan pola sekuen fungsional (*functional sequence motifs*). Sekuen konsensus memperlihatkan residu yang mana yang lestari (*conserved*) yang memiliki urutan sekuen yang selalu sama, dan residu yang bervariasi. Sekuen tersebut dapat berupa sekuen nuklotida atau sekuen asam amino. Dalam penentuan sekuen konsensus digunakan perangkat lunak komputer.<sup>40</sup>

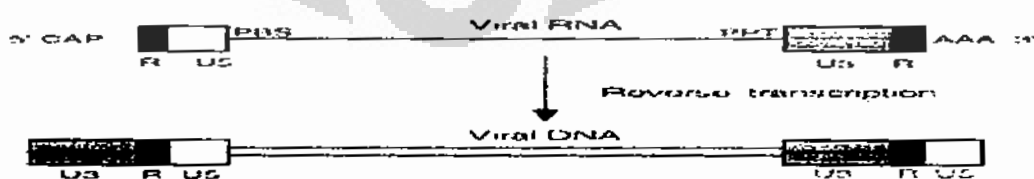
Dalam hal pengembangan vaksin HIV-1 menggunakan sekuen konsensus ataupun sekuen *ancestral*, masing - masing sekuen hasil konstruksi tersebut dinilai menguntungkan karena menjadi titik sentral dan sekuen yang paling mirip dengan strain yang beredar dan mungkin dapat meningkatkan potensi respon reaksi silang (*cross-reactive*). Pendekatan ini mungkin juga memberi keuntungan secara ekonomi dan politik. Keuntungan ekonomi karena hal itu dapat mengurangi jumlah vaksin yang harus diproduksi dan di uji coba jika dibandingkan dengan pendekatan pertama yang harus membuat vaksin tiap negara/wilayah yang memerlukan vaksin.

Memberi keuntungan secara politik, karena sekuen buatan (*artificial sequence*) tidak berkaitan dengan negara tertentu sebagai asalnya.<sup>6</sup>

Saat ini, ide untuk mengembangkan vaksin yang spesifik terhadap negara atau wilayah regional tertentu menggunakan isolat dengan subtype paling dominan sedang dilakukan bahkan telah sampai pada tahap uji pre-klinik seperti yang telah dilakukan di Afrika Selatan.<sup>6,41</sup> Dalam pengembangan vaksin tersebut metode pemilihan isolat kandidat vaksin-nya dengan menggunakan sekuen konsensus sebagai acuan.<sup>39</sup> Pengembangan vaksin yang menggunakan sekuen konsensus juga sedang dilakukan di Thailand.<sup>42</sup>

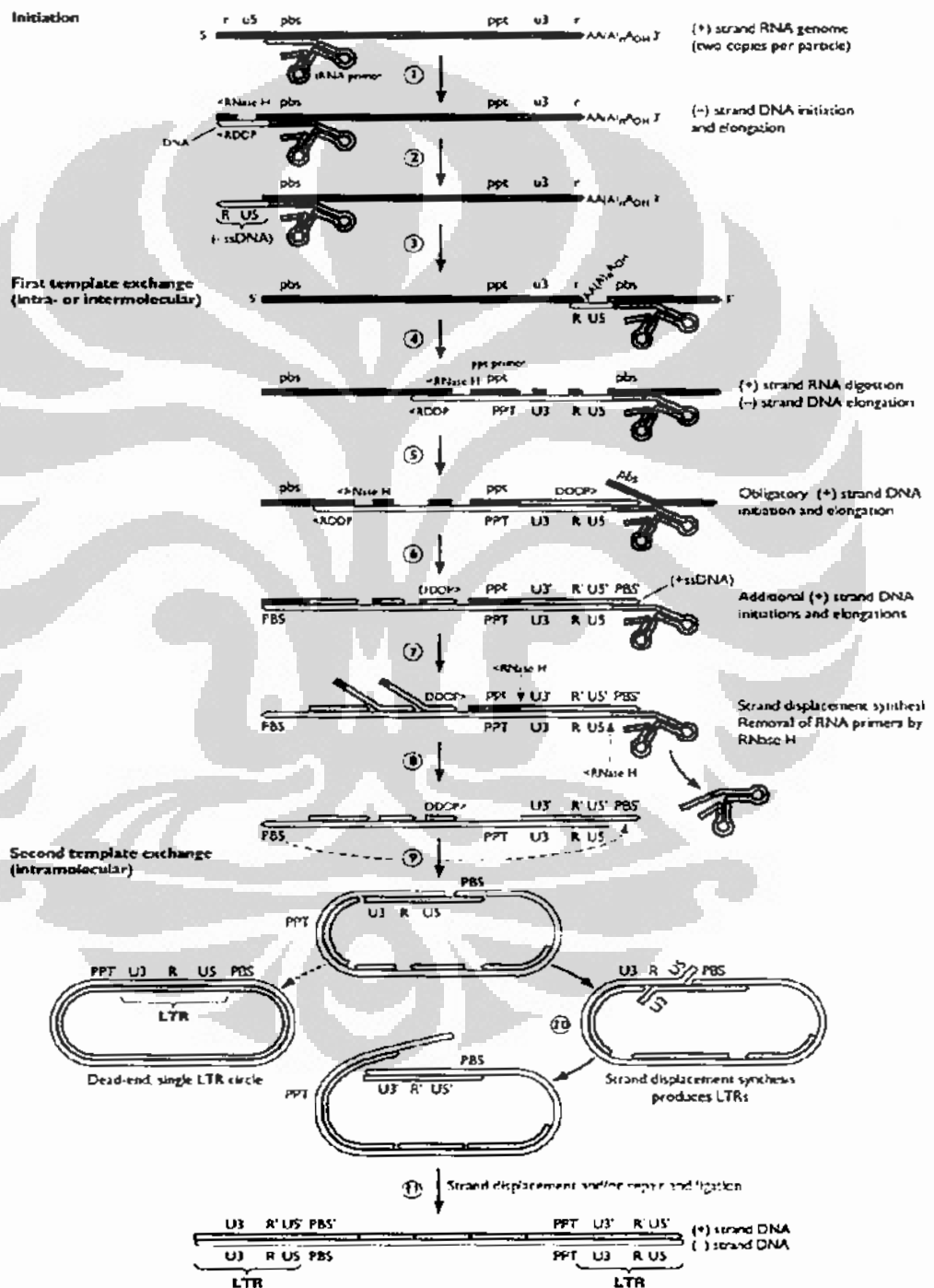
### 2.3 GEN REVERSE TRANSCRIPTASE HIV-1

Kebanyakan retrovirus seperti HIV-1 masuk ke dalam sel dengan melakukan fusi dengan membran plasma. Selain itu ada yang menggunakan jalur endosomal. Ketika berada dalam sel, partikel subviral mengadakan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) terhadap RNA virus sehingga memproduksi dsDNA linier. Komposisi partikel subviral tersebut belum banyak diketahui, namun diperkirakan mengandung *reverse transcriptase* (RT) dan aktivitasnya berkaitan dengan komponen yang berasal dari protein Gag.<sup>9</sup> Hal yang menjadi ciri khas retrovirus dibandingkan virus lain adalah kemampuannya membentuk genom DNA dari RNA. (Gambar 10) Karena kemampuannya yang unik itu maka kelompok virus ini dinamakan Retrovirus. Tahapan pembentukan DNA dari RNA ini dimulai setelah masuknya inti virion ke sitoplasma sel inang.<sup>9</sup>



Gambar 2.5. Pembentukan DNA virus dari RNA.<sup>9</sup>

Transkripsi balik genom RNA viral ke bentuk untai ganda DNA merupakan keistimewaan retrovirus. *Reverse* transkripsi normalnya dimulai sesaat setelah masuknya inti virion ke sitoplasma sel yang terinfeksi. Reaksi ini melibatkan berbagai komponen inti virion termasuk nukleokapsid, RT, IN dan RNA viral.<sup>9</sup>



Gambar 2.6. Proses lengkap transkripsi balik HIV-1.<sup>9</sup>

Tahapan reverse transkripsi genom retrovirus :

- a. *Pembentukan Minus-Strand Strong-Stop DNA*. Proses *reverse* transkripsi diawali dari pemasangan primer 3'OH tRNA yang di-*anneal* ke genom RNA virus pada sekuen komplementer yang disebut pbs (*primer binding site*). DNA pertama kali disintesis dari primer ini, menggunakan genom RNA *plus-strand* sebagai *template*-nya, membentuk sekuen DNA minus-strand. Sintesis berlangsung dari ujung 5' RNA membentuk sekuen U5 dan R. Bentuk intermediate ini disebut *minus-strand strong-stop* DNA. Primer tRNA masih melekat pada ujung 5'.
- b. *Translokasi pertama*. Tahap selanjutnya adalah translokasi atau *jump* strong-stop DNA dari ujung 5' ke ujung 3'. Translokasi ini memerlukan degradasi sekuen RNA 5'. Degradasi dibantu oleh aktivitas RNase H dari RT.
- c. *Sintesis Long Minus-Strand DNA*. *Annealing minus-strand strong-stop* DNA memerlukan primer yang sesuai untuk sintesis DNA, dan RT kemudian melakukan elongasi *minus-strand strong-stop* DNA membentuk long minus-strand DNA. Sintesis berakhir disekitar pbs. Begitu terbentuk hybrid RNA:DNA, RNA virus kemudian didegradasi oleh RNase H.
- d. *Inisiasi sintesis Plus-Strand DNA*. Primer untuk sintesis *Plus-Strand DNA* dibuat dengan memotong genom RNA menggunakan RNase H pada suatu tempat khusus, sekuen yang kaya purin dekat ujung 3', ppt, yang relative tahan terhadap aktivitas RNase H. Oligonukleotida masih terhibridisasi pada minus-strands DNA dan berperan sebagai primer dalam sintesis plus-strands DNA menggunakan minus-strands DNA sebagai *template*-nya. Sekuen bagian *upstream* dari ppt, daerah yang kaya AT yang disebut T-box adalah bagian penting dalam proses *priming*. Proses sintesis berlangsung kearah ujung 5' minus-strands, yang mengkopi bagian U3, R, dan U5, serta kemudian mengkopi bagian primer tRNA yang masih ada di ujung 5'. Elongasi berhenti pada basa posisi 19 dari tRNA. Proses ini menghasilkan plus-strand strong-stop DNA.



- e. *Penghilangan tRNA*. Tahap berikutnya primer tRNA diujung 5' minus strand DNA dihilangkan dengan menggunakan RNase H. Pembuangan ini terjadi dalam 2 tahap, pertama pemotongan daerah dekat ikatan DNA-RNA dan kedua pada tRNA.
- f. *Translokasi kedua*. Penghilangan tRNA memungkinkan ujung 3' plus strand strong-stop DNA berpasangan dengan ujung 3' minus-strand DNA. Perlekatan sekuen dengan menggunakan sekuen pbs (*priming binding site*). Perlekatan tersebut berbentuk sirkuler *intermediate*, dengan terminal 3' dalam struktur yang memungkinkan terjadinya elongasi.
- g. *Pembentukan kedua untai DNA yang lengkap*. Kedua untai kini mengalami elongasi, dengan bentuk akhiri berupa lingkaran DNA, yang kemudian terbuka membentuk DNA linier dengan ujung identik.<sup>9</sup>

Proses transkripsi balik tersebut mulai terjadi di sitoplasma. Setelah dsDNA terbentuk proses transkripsi balik diakhiri dengan transfer dsDNA ke nukleus dan akan terintegrasi dengan kromosom sel pejamu secara random dengan bantuan enzim integrase (IN). Pada virus sederhana, transfer dsDNA ke nukleus hanya terjadi pada saat pembelahan sel. Namun, pada retrovirus kompleks seperti HIV transfer dsDNA dapat terjadi pada sel yang tidak membelah, karena HIV menghasilkan protein yang mampu membentuk kompleks dengan DNA, sehingga kompleks protein-DNA tersebut dapat menembus membran inti sel pejamu.<sup>13</sup>

Selain peranan gen RT yang sangat vital bagi siklus hidup HIV-1, dalam usaha pengembangan vaksin HIV-1 dengan pendekatan mutakhir, gen RT memiliki potensi yang besar untuk digunakan sebagai salah satu komponen vaksin. Hal itu karena berdasarkan studi dan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, asam amino RT memiliki 26 epitop spesifik CTL yang mampu menginduksi respon imun terhadap HIV-1. Epitop – epitop itu adalah asam amino RT pada posisi 179–187 (VIYQYMDDL), 09–317 (ILKEPVHGV), 33–43 (ALVEICTEMEK), 73–82 (KLVDFRELNK), 93–101 (GIPHPAGLK), 158–166 (AIFQSSMTK), 269–277 (QIYPGIKVR), 356–366 (RMRGAHTNDVK), 158–166 (AIFQSSMTK), 341–350

(IYQEPFKNLK), 173–181 (KQNPDIYIY), 263–271 (KLNWASQIY), 356–365 (MRGAHTNDV), 392–401 (PIQKETWETW) , 18–26 (GPKVKQWPL), 260–271 (LVGKLNWASQIY), 309–318 (ILKEPVHGVY), 107–115 (TVLDVGDAY), 118–127 (VPLDEDFRKY), 175–183 (NPDIYIYQY), 175–183 (HPDIYIYQY), 5–12 (IETVPVKL), 271–279 (YPGIKVRQL), 42–50 (EKEGKISK), 128–135 (TAFTIPSI), 375–383 (IAMESIVIW).<sup>34</sup>

Asam amino RT juga memiliki satu epitop spesifik terhadap CD4+ *helper* yaitu pada posisi asam amino 36 – 52 yaitu EICTEMEKEGKISKIGP.<sup>34</sup>

#### 2.4 GEN *PROTEASE* HIV-1

Protease adalah enzim yang mengkatalisa hidrolisis ikatan-ikatan peptida. Enzim ini dapat diklasifikasikan berdasarkan daerah tempat enzim bekerja, yaitu eksoprotease dan endoprotease. Eksoprotease akan memecah ikatan peptida asam-asam amino pada ujung amino atau ujung karboksil suatu protein, dan umumnya akan berlanjut ke urutan asam-asam amino selanjutnya. Endoprotease atau proteinase akan memecah ikatan-ikatan peptida spesifik antara dua asam amino yang terletak di bagian dalam suatu protein atau polipeptida.<sup>28</sup>

Terdapat urutan asam-asam amino tertentu yang membentuk daerah katalitik, bersifat tetap (*conserved*) di alam dan menjadi dasar bagi klasifikasi proteinase. Terdapat 4 kelas proteinase, yaitu serin, sistein (atau *thiol*), proteinase aspartat (atau *acidic proteinases*) dan metalloproteinase.<sup>28</sup>

Proteinase serin memiliki tiga serangkai asam amino yang membentuk daerah katalitik yaitu His, Asp dan Ser, yang berperan dalam proses pemotongan ikatan-ikatan peptida. Proteinase sistein memiliki dua asam amino pembentuk daerah katalitik yaitu residu Cys dan His yang berdekatan dan berinteraksi satu sama lain. Proteinase aspartat memiliki daerah katalitik yang terdiri dari dua residu Asp. Pada kelompok metalloproteinase, terdapat sebuah kation divalen, pada umumnya  $Zn^{2+}$  terdapat pada daerah katalitik.

Daerah katalitik ini memiliki motif asam amino –His-Xaa-Xaa-Glu-His- (dimana Xaa adalah asam amino apapun).<sup>28</sup>

Hubungan enzim-substrat untuk proteinase retrovirus sangat spesifik. Proteinase yang berbeda dari retrovirus yang berbeda-beda mengenali daerah-daerah yang spesifik pada prekursor polipeptida. Pada virus HIV, daerah pemotongan telah diketahui melalui analisa sekuen asam amino. Secara keseluruhan, struktur dari proteinase retrovirus mirip dengan proteinase aspartat pada umumnya.<sup>28</sup> Bentuk matang dari protease terdiri dari 99 asam amino dan memiliki berat sekitar 10 kDa.<sup>9</sup> Protease HIV merupakan homodimer yang simetris dengan ruang pengikatan substrat bersifat simetris dan terletak di bagian tengah.<sup>29</sup> Protease HIV-1, HIV-2 dan avian sarcoma-leukemia virus memiliki struktur yang sama. Protease memiliki spesifisitas pada lebih dari 1 daerah pemotongan. Tiga daerah pemotongan pada poliprotein Gag-Pol HIV-1 (substrat) memiliki konsensus sekuen Ser-Thr-Xa-Ya-Phe/Tyr-Pro-Z (pemotongan di antara Phe/Tyr-Pro) dan daerah pemotongan lain terjadi pada sekuen Leu-Ala, Met-Met, Phe-Leu, dan Leu-Phe.<sup>9</sup>

Pada tahap akhir siklus replikasi virus, setelah dilepaskan dari membran plasma virus akan menjadi matang dan bersifat infeksius. Pematangan virus terjadi ketika terdapat proses dimana protease virus memotong protein Gag-Pol. Protease berperan dalam memotong dirinya sendiri dari prekursor protein dan kemudian melakukan pemotongan-pemotongan lain pada protein ini.<sup>30</sup>

Ketiadaan protease yang fungsional menyebabkan partikel virus terbentuk, namun bersifat tidak matang dan tidak infeksius.<sup>29</sup> Penghambatan terhadap protease merupakan suatu target terapi yang menjanjikan untuk menghentikan perjalanan penyakit akibat infeksi HIV.<sup>32</sup> Pengetahuan yang mendalam mengenai struktur domain pengikatan substrat dan struktur protein protease HIV-1 telah menghasilkan desain penghambat spesifik. Penghambat ini memiliki afinitas kuat terhadap daerah aktif protease HIV dan menghambat aktivitas katalitik enzim ini.<sup>29</sup>

Resistensi terhadap penghambat protease terjadi karena adanya substitusi sekuen asam amino protease pada daerah domain pengikatan substrat atau daerah-daerah yang lebih jauh. Secara langsung atau tidak langsung, perubahan asam amino ini akan turut mengubah jumlah dan daerah interaksi antara penghambat protease dengan protease, sehingga akan menurunkan tingkat afinitas penghambat protease dengan protease.<sup>29</sup>

Selain protease sebagai target terapi penghambatan replikasi virus, protease juga berpotensi untuk digunakan sebagai komponen pengembangan vaksin HIV-1 yang berbasis gen yang mampu menginduksi sistem imun. Hal tersebut dikarenakan protease memiliki tingkat kelestarian sekuen asam amino yang relative tinggi dan berdasarkan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, protease memiliki 3 epitop yang spesifik terhadap CTL. Ketiga epitop itu adalah asam amino protease pada posisi amino 3–11 (ITLWQRPLV), 34–42 (EEMNLPGRW), 30–38 (DTVLEEWNL).<sup>34,43</sup>

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Mikrobiologi, FKUI mulai bulan Januari – Mei 2009.

#### **3.1 STRATEGI PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan kerja :

- 3.1.1 Isolasi RNA virus dari sampel plasma penderita HIV/AIDS positif
- 3.1.2 Penyiapan cDNA RT dan protease dengan reaksi transkripsi balik dan amplifikasi fragmen-fragmen genom dengan PCR
- 3.1.3 Analisis produk PCR dengan elektroforesis
- 3.1.4 Purifikasi produk PCR
- 3.1.5 Sekuensing
- 3.1.6 Analisis data dengan perangkat lunak Viroseq, Bioedit 7.0, Mega 4.1, REGA HIV-1 Subtyping Tool – v2.0.

#### **3.2 BAHAN**

- 3.2.1 Dua puluh data sekuen gen *protease* dan gen *reverse transkriptase* yang berhasil di sekuensing berasal dari 70 sampel darah segar yang diambil dari pasien pengguna narkoba jarum suntik (penasun) yang telah dinyatakan positif HIV-1 dengan menggunakan metode ELISA dari beberapa rumah sakit di Propinsi DKI Jakarta. Data sekuen tersebut diperoleh dari Tim Peneliti HIV Drug Resistensi (HIV-DR) Departemen Mikrobiologi FKUI yang telah dikerjakan sepanjang tahun 2007. Data sekuen tersebut adalah sebagai berikut : 01023107061440 (selanjutnya disingkat 0102), 02041108061149 (0204), 02200603071221 (0220), 03071608061100 (0307), 03112408061530 (0311), 03182109061305 (0318), 03202209061330 (0320), 03241710061430 (0324), 03270811061130 (0327), 03351801071520 (0335), 04010808060930 (0401), 04020808060930 (0402), 04060609061005 (0406), 05012707061030 (050127), 05012908061310 (050129), 05200404071545 (0520), 05210404071620 (0521), 05230404071628 (0523), 03042807061400 (0304), 03022107061500 (0302).

3.2.2 Bahan yang penulis kerjakan dalam penelitian ini sesuai strategi penelitian dari tahap nomer 3.1.1 sampai 3.1.4 adalah 4 sampel darah donor ( PMI 04, PMI 09, PMI 12 dan PMI 15 ) dari Palang Merah Indonesia (PMI) Propinsi DKI Jakarta yang positif mengandung HIV-1 yang telah dikonfirmasi dengan tes 3 rapid tes dengan metode berbeda atau 2 rapid test dengan metode berbeda dan 1 kali test dengan ELISA.

3.2.3 Penentuan besar sampel dalam penelitian ini tercantum pada lampiran 13.

### 3.3 CARA KERJA

#### 3.3.1 Isolasi RNA virus dari sampel plasma darah donor positif HIV.

Isolasi RNA dilakukan dengan kit QIAamp viral RNA (Invitrogen). *Thawing* 1000  $\mu$ L plasma sampel HIV-1 dan setting mesin sentrifuge pada suhu 4°C. Pindahkan 1000  $\mu$ L sampel plasma HIV-1 ke dalam tabung *screw cap*. Sentrifuge dengan kecepatan 21.000 g selama 75 menit. Buang supernatant tanpa merusak pelet dengan menyisakan larutan sebanyak 200 $\mu$ L. Tambahkan 25  $\mu$ L proteinase K ( invitrogen) pada tabung yang berisi 200  $\mu$ L sampel. Kemudian tambahkan 200  $\mu$ L lisis buffer. Lalu tambahkan *carrier RNA* (Invitrogen) sebanyak 6  $\mu$ L. Campurkan larutan tersebut dengan di vortex selama 15 detik. Inkubasi pada suhu 56°C selama 15 menit. Kemudian di spin selama 15 detik untuk menurunkan cairan yang menempel pada tutup tabung. Ambil sebanyak 681  $\mu$ L larutan dalam tabung dan pindahkan ke tabung spin kolom. Lalu sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan kolom spin ke dalam tabung 2 ml yang baru. Tambahkan 500  $\mu$ L *wash buffer*. Lalu sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtratnya, lalu masukkan kolom spin ke tabung 2 mL yang sama. Tambahkan 500  $\mu$ L *wash buffer*. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan kolom spin ke dalam tabung 2 mL yang baru, lalu sentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pindahkan kolom spin ke tabung mikrosentrifuse 1,5 mL. Tambahkan RNase-free water sebanyak 15  $\mu$ L. Inkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Sentrifuse selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Lalu tambahkan Rnase Inhibitor (Rnasin).

### 3.3.2 Penyiapan cDNA gen *reverse transcriptase* dan gen *protease* dengan reaksi transkripsi balik dan amplifikasi fragmen-fragmen genom dengan PCR.

Reaksi transkripsi balik terhadap RNA virus dilakukan dengan kit invitrogen menggunakan primer spesifik pada daerah gen *pol*. Campuran satu reaksi transkripsi balik (*reverse transcriptase*) terdiri dari primer reverse 10  $\mu$ L, mix dNTP 10 mM, 5x *cDNA Synthesis buffer*, DTT 0,1 M, enzim RnaseOut, enzim Thermoscript. Ke dalam larutan campuran tersebut kemudian di tambahkan RNA HIV-1 hasil isolasi. Tabung lalu dimasukkan mesin PCR dengan kondisi suhu dan siklus yang telah dioptimasi sebelumnya. Setelah selesai proses transkripsi balik, cDNA yang telah diperoleh kemudian diperbanyak dengan PCR amplifikasi. Campuran untuk satu kali reaksi PCR yang dipakai dalam amplifikasi cDNA adalah 10x buffer HiFi, MgSO<sub>4</sub> 50 mM, Mix dNTP 10 mM, primer, enzim HiFi Taq Polimerase dan *nuclease free-water*. Ke dalam larutan campuran master PCR di tambahkan 10  $\mu$ L. Lalu tabung PCR dimasukkan ke mesin PCR dengan kondisi suhu dan siklus yang telah dioptimasi sebelumnya.

### 3.3.3 Analisa produk PCR dengan gel elektroforesis

Untuk mendeteksi produk PCR dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dalam larutan buffer TAE 1X. Larutan dipanaskan dalam microwave selama 1-2 menit atau sampai mendidih. Kemudian larutan yang masih panas dituang ke dalam lempeng cetakan yang telah disiapkan lengkap dengan sisir pembentuk sumur. Setelah gel mengeras, sisir dicabut. Gel kemudian diletakkan dalam tangki elektroforesis yang berisi buffer TAE 1X. Sebanyak 5  $\mu$ L sampel dicampurkan dengan 2  $\mu$ L *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel. Marka/penanda yang digunakan adalah DNA yang telah diketahui ukurannya (  $\lambda$ Hind III (Promega). Elektroforesis dilakukan pada 120 volt selama 30 menit. Setelah selesai, gel direndam dengan etidium bromide 0,04 mg/ml selama 10 menit, lalu di *destaining* dalam air steril selama 15 menit.

Visualisasi gen yang diharapkan dilakukan di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 260 nm dengan illuminator ultraviolet menggunakan alat pendokumentasi gel (*gel documentation*)(Bio-rad).

### 3.3.4 Purifikasi DNA.

Purifikasi produk PCR dapat dilakukan menggunakan *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)* untuk produk PCR yang bisa langsung dimurnikan dan *QIAquick Gel Extraction Purification kit (QIAGEN)* untuk memurnikan produk PCR dari *Low melting agarose (LMA)*. Dalam penelitian ini hanya menggunakan metode kit *QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)*. Metode ini di desain untuk memurnikan produk PCR rantai tunggal maupun rantai ganda yang besarnya berkisar 100bp sampai 10 kb dari primer, nukleotida, *polymerase* dan garam, menggunakan kolom spin di mikrosentrifugasi. Lima volume buffer PB ditambahkan pada 1 volume reaksi PCR dan dicampur menggunakan pipet secara *up and down* tanpa perlu menghilangkan minyak mineralnya.

Masukkan ke kolom *QIAquick spin* yang dilengkapi dengan tabung pengumpulan 2 ml. Sampel dimasukkan ke dalam kolom *QIAquick (QIAGEN)* untuk mengikat DNA dan disentrifugasi pada 12.000 rpm, 30-60 detik. Hasil elusinya dibuang, lalu kolom *QIAquick* diletakkan ke tabung yang sama. Kemudian ditambahkan 0,75 ml buffer PE untuk mencuci dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Hasil elusinya dibuang, lalu kolom *QIAquick* diletakkan di tabung yang sama. Sentrifugasi kolom selama kurang lebih 1 menit pada 13.000 rpm. Untuk mengelusi, kolom *QIAquick* diletakkan di tabung mikrofuge 1,5 ml. lalu tambahkan 50  $\mu$ L buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) atau H<sub>2</sub>O. Kolom diputar dengan kecepatan maksimal selama 1 menit.

### 3.3.5 Sekuensing

Pada penelitian ini, penulis tidak melakukan sekuensing. Dua puluh data mentah sekuen gen *protease* dan *reverse transcriptase* yang berhasil diperoleh produk sekuennya, sekuensing dilakukan oleh Tim Peneliti HIV



Drug Resistensi (HIV-DR) Departemen Mikrobiologi FKUI menggunakan mesin *sequencer* milik PT. Charon Pophand Jakarta. Metode yang digunakan adalah sebagai berikut : DNA disekuens dengan automatic sequencer berdasarkan metode Sanger (*dideoxy termination method*). Reaksi ini didasarkan pada bahan yang dilabel dengan fluoresens yang akan member perubahan warna yang sesuai setelah melewati sinar laser pada mesin otomatis. Kit yang digunakan adalah *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* yang terdiri dari *dye terminator*, *deoxynucleoside triphosphate*, *Ampli Taq DNA Polymerase*, FS,  $MgCl_2$  dan dapar Tris-HCl pH 9,0. DNA cetakan sebanyak kurang lebih 80ng – 220ng (0,1 ng per 100bp cetakan) dicampur dengan 1  $\mu L$  primer ( 2 pmol.  $\mu L$ ), 3,5  $\mu L$  *ready Kit* dan ditambah  $H_2O$  sampai volume total 10  $\mu L$ . Campuran dengan total volume 10  $\mu L$  tersebut direaksikan pada mesin *Thermal Cycle Model 9700* (Perkin Palmer) dengan kondisi : denaturasi pada suhu  $96^\circ C$  selama 30 detik, annealing  $50^\circ C$  selama 15 detik, dan ekstensi selama  $60^\circ C$  selama 4 menit. Produk PCR selanjutnya di presipitasi dengan 25  $\mu L$  etanol 95%, 3  $\mu L$  3 M NaAc (pH 5,2), 33ortex dan inkubasi pada  $4^\circ C$ . Supernatan lalu dibuang, ditambahkan 250  $\mu L$  etanol 70% pada setiap tabung, lalu diputar lagi selama 10 menit pada 12.000 rpm pada suhu  $4^\circ C$ . Supernatan dibuang dan sampel dikeringkan dengan menggunakan *speed vac* (BioRad) selama 7 menit. DNA yang sudah dikeringkan dilarutkan dalam 3  $\mu L$  loading buffer ( 50mg/ml *blue dextran* dalam larutan EDTA 25 mM yang mengandung dimetilformamid 40% dengan perbandingan 5:1).

Sebelum dielektroforesis, campuran yang mengandung DNA tersebut dipanaskan pada suhu  $90^\circ C$  selama 2 menit dan segera didinginkan dengan meletakkannya di dalam es. Larutan DNA di elektroforesis pada gel akrilamid/urea konsentrasi 4% [ 18 gr urea; 5 ml 40% stok akrilamid (38 gr akrilamid, 2 gr bis akrilamid, 100 ml ddH<sub>2</sub>O ); 0,5 gr mixed-bed resin; 50 ml TBE 1X ( lampiran ); 250  $\mu L$  APS 10% ( 0,1 gr *ammonium persulfate* dan 1 ml ddH<sub>2</sub>O); 35  $\mu L$  TEMED] dalam *running buffer* TBE 1X selama lebih kurang 7 jam.

### 3.3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan perangkat lunak ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.20, Bioedit 2.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>), perangkat lunak online REGA HIV-1 Subtyping Tool -- v.2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) dan MEGA 4.1 (<http://www.megasoftware.net/>). Dalam penelitian ini analisis data dilakukan untuk pengeditan data sekuen nukleotida hasil sekuensing, penentuan subtipe, analisis variasi genetik dan penentuan sekuen konsensus HIV-1 isolat Indonesia. Dalam analisis variasi genetik, untuk mendapatkan tingkat homologi, runutan nukleotida dan asam amino dibandingkan satu sama lain dan juga dibandingkan dengan isolat HIV-1 HXB2 serta sejumlah isolat HIV-1 yang telah dipublikasi (GenBank NCBI, <http://www.ncbi.go>) yang memiliki subtipe yang sama dengan subtipe HIV-1 yang paling dominan dari isolat hasil sekuensing dari penelitian ini. Berikut adalah daftar isolat pembanding dalam analisis homologi tersebut :

Tabel 3.1. Data isolat HIV-1 pembanding

| Asal     | Tahun | Nama isolat  | Subtipe  | No. akses GenBank |
|----------|-------|--------------|----------|-------------------|
| Perancis | 1985  | HIVHXB2R     | -        | K03455            |
| Thailand | 2004  | 02TH.OUR7691 | CRF01_AE | AY358062          |
| Thailand | 2006  | 01TH.R2184   | CRF01_AE | AY945730          |

Untuk penentuan sekuen konsensus HIV-1 isolat hasil penelitian ini, menggunakan data pembanding yaitu sekuen konsensus subtipe CRF01\_AE yang diperoleh dari GenBank (<http://www.ncbi.go>).

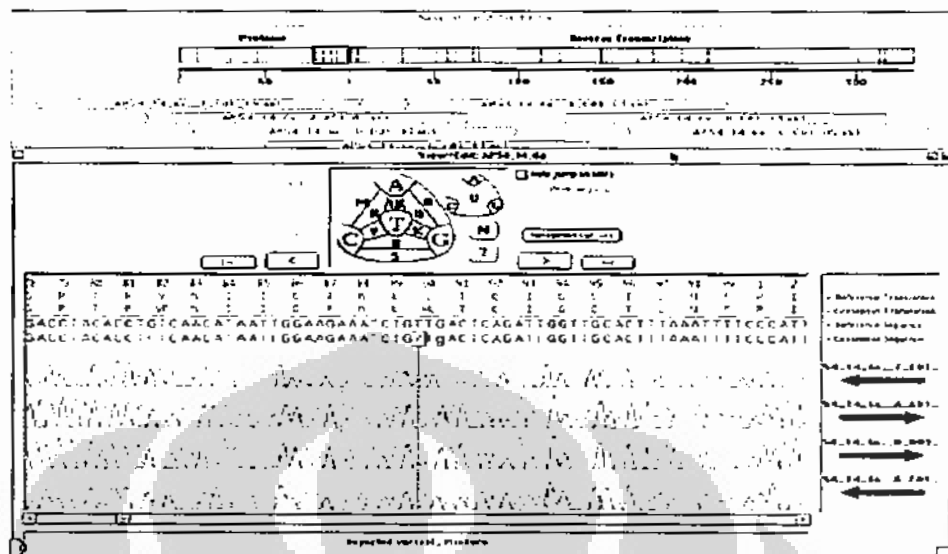
Kladogram/silsilah genetik dirancang dengan bantuan perangkat lunak MEGA 4.1. Dalam analisis kladogram selain isolate yang tercantum pada tabel 1, juga disertakan pula beberapa isolat HIV-1 yang mewakili semua subtipe yang diperoleh dari GenBank (<http://www.ncbi.go>) (Tabel.2).

Tabel 3.2. Data isolat subtipe lain yang disertakan dalam analisis filogenetik

| Asal          | Tahun | Nama isolat   | Subtipe  | No.akses GenBank |
|---------------|-------|---------------|----------|------------------|
| Kongo         | 2006  | 97CD.KCC2     | A        | AM000053         |
| China         | 2002  | CNHN24        | B        | AY180905         |
| Jepang        | 1999  | 93IN101       | C        | AB023804         |
| Afrika Tengah | 2003  | 90CF11697     | E        | AF197340         |
| China         | 2008  | 07JSWX045     | CRF01_AE | FJ441290         |
| Jepang        | 2003  | 93JP-NH1      | CRF01_AE | BD187399         |
| Thailand      | 2006  | 01TH.C1436    | CRF01_AE | AY945713         |
| Thailand      | 2006  | -             | CRF01_AE | AY945730         |
| Thailand      | 2006  | 00TH.C1705HYP | CRF01_AE | AY945715         |
| Thailand      | 2006  | 00TH.C1468HYP | CRF01_AE | AY945714         |
| China         | 2008  | 07JSWX045     | CRF01_AE | FJ441290         |
| Afrika Tengah | 2002  | 90CF11697     | E        | AF197340         |
| Kenya         | 2006  | KNH1239       | AA2D     | AY945739         |
| Kenya         | 2006  | KNH1268       | D        | AY945738         |
| Japan         | 99    | 93IN101       | C        | AB023804         |

### 3.3.6.1 Pengeditan data sekuen nukleotida

Data mentah hasil pembacaan sekuen oleh komputer mesin sekuenser diperiksa ulang menggunakan perangkat lunak ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.20. dengan mencocokkan gambaran elektroferogram yang mewakili satu primer sekuensing dengan susunan nukleotida – nukleotida satu persatu. Dalam pengecekan dan pengeditan nukleotida harus menggunakan dua atau lebih elektroferogram (primer sekuensing) yang saling *overlapping*. Selain itu hasil pengecekan dan pengeditan dikonfirmasi dengan data sekuens nukleotida yang telah ada (HBX2 dari GenBank). Dengan demikian susunan sekuen yang diperoleh benar – benar valid. Pada penelitian ini fragmen sekuen yang diperiksa dan diperbaiki adalah sekuens genom *protease* dan *RT*.



Gambar. 3.1. Tampilan utama perangkat lunak ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.20.

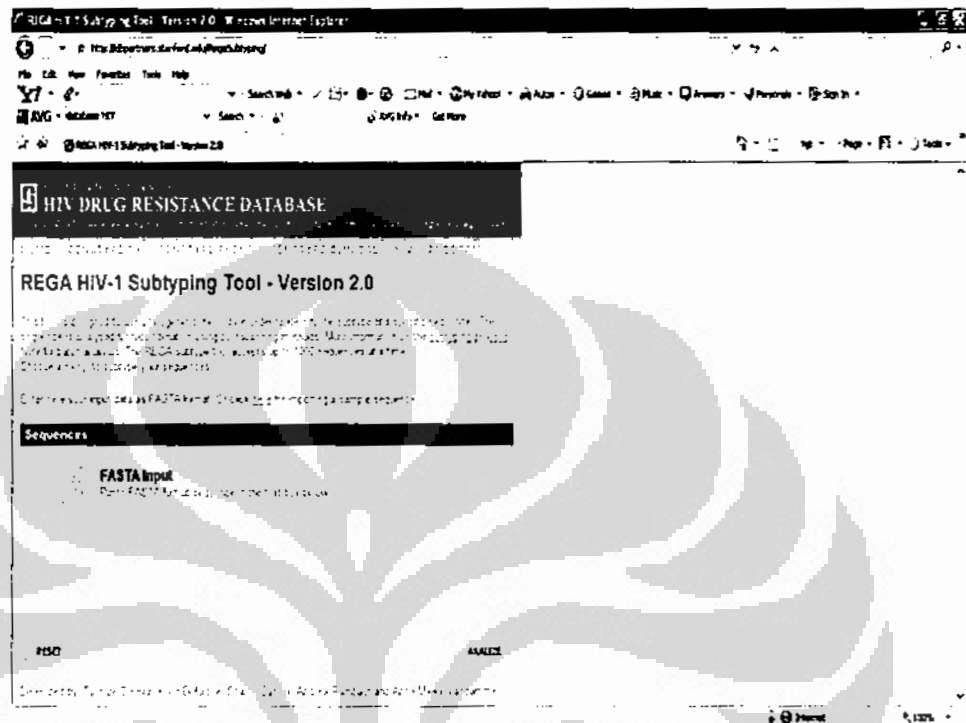
### 3.3.6.2 Penentuan sub tipe HIV-1 isolat Indonesia.

Penentuan sub tipe HIV-1 menggunakan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0 secara online pada alamat situs <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>. Dalam penentuan sub tipe HIV-1 isolat Indonesia dilakukan dengan memasukkan sekuen nukleotida gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* yang telah berhasil di sekuensing secara bersamaan. Setelah terlihat hasilnya, kemudian dilakukan perhitungan untuk menentukan jumlah dan presentasi masing-masing jenis sub tipe yang diperoleh dari isolat tersebut. Ditentukan jenis sub tipe HIV-1 yang paling dominan dengan melihat presentasi sub tipe yang paling besar.

### 3.3.6.3 Analisis variasis genetik HIV-1 sub tipe dominan isolat Indonesia.

Analisis variasi genetik HIV-1 isolat Indonesia dilakukan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0 dan Mega 4.1. Data sekuen yang di gunakan dalam analisis ini adalah sekuen isolat HIV-1 yang paling dominan saja. Untuk mendapatkan tingkat homologi, sekuen nukleotida dan asam amino dibandingkan satu sama lain serta dibandingkan dengan sekuen isolat referensi (Tabel 3.1).

Sekuen asam amino diperoleh dengan mengkonversi sekuen nukleotida yang telah didapat sebelumnya dengan perangkat lunak Bioedit 7.0.



Gambar 3.2. Tampilan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool-v.2.0

#### 3.3.6.4 Penentuan isolat sekuen konsensus HIV-1 sub tipe dominan di Indonesia.

Dalam penentuan sekuen konsensus HIV-1 digunakan kombinasi sekuen nukleotida dan asam amino gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* HIV-1 dari isolat dengan jenis sub tipe yang paling dominan. Untuk analisis sekuen konsensus ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 HASIL

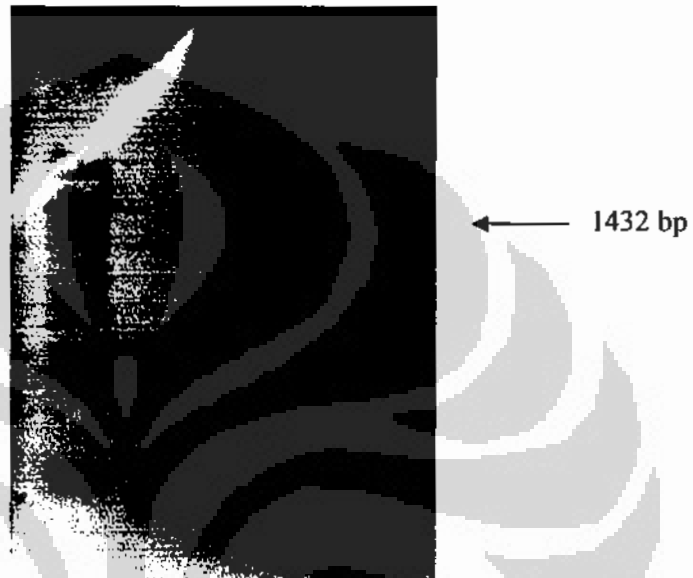
Pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* HIV-1, untuk mengetahui sub tipe HIV-1 yang beredar di Indonesia, variasi genetik dan penentuan sekuen konsensus dari sub tipe HIV-1 paling dominan yang ditemukan dalam penelitian ini. Data sekuen diperoleh dari pasien pengguna narkoba memakai jarum suntik (penasun) dari beberapa rumah sakit di Provinsi DKI Jakarta tahun 2007 dan isolat yang berasal dari darah donor Palang Merah Indonesia Provinsi DKI Jakarta tahun 2005.

Dari studi-studi sebelumnya, gen *protease* yang memiliki panjang lengkap 297 nukleotida atau 99 asam amino dan gen *reverse transcriptase* yang memiliki panjang lengkap 1372 nukleotida atau 457 asam amino, merupakan gen-gen dari HIV-1 yang memiliki tingkat kelestarian sangat tinggi, dengan variabilitas asam amino kurang dari 1%.<sup>33</sup> Sehingga gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 dapat digunakan untuk berbagai analisis dalam menentukan sub tipe isolat HIV-1, menentukan tingkat homologi dan variasi genetik antar isolat HIV-1, mengetahui silsilah genetik atau tingkat kekerabatan suatu isolat HIV-1 dengan isolat lain dari sub tipe, sub sub tipe dan asal geografis yang berbeda. Dalam penelitian ini, kedua gen tersebut juga digunakan untuk menentukan sekuen konsensus dari isolat-isolat yang berhasil di sekuen untuk desain vaksin HIV-1.

Sebanyak 70 isolat dari penasun 20 diantaranya berhasil di sekuensing oleh tim peneliti HIV-DR dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (untuk selanjutnya disebut isolat Indonesia). Gen yang berhasil di sekuensing adalah gen *protease* lengkap dengan panjang 297 nukleotida atau 99 asam amino protease dan gen *RT* tidak lengkap sepanjang 1005 nukleotida atau 335 asam amino ( 73,3% dari residu total asam amino RT).

Sementara isolat yang berasal dari darah donor Palang Merah Indonesia (PMI) tidak berhasil diperoleh produk sekuenya karena gagal pada saat purifikasi cDNA sebanyak 1 isolat yaitu sampel PMI 04 dan gagal pada saat amplifikasi sebanyak 3 isolat yaitu PMI 09, PMI 12 dan PMI15.

M 1 2 K-



Gambar 4.1. Sampel positif HIV PMI no.04 yang berhasil diamplifikasi namun tidak berhasil diperoleh produk sekuenya.

M = marker; Lajur 1 = spesimen HIV PMI no. 09;  
2 = spesimen HIV PMI no.04; K- = kontrol negatif

Untuk mendapatkan hasil data sekuen yang akurat, telah dilakukan pengeditan data terhadap 20 sampel yang berhasil di sekuensing menggunakan software ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.2.

#### 4.1.1 Penentuan subtype HIV-1 yang beredar di Indonesia

Dalam penelitian ini, setelah diperoleh hasil sekuen data gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* yang akurat, lalu dilakukan penentuan subtype terhadap 20 isolat yang berasal dari pasien HIV positif penansun tersebut dengan menggunakan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0 secara online pada alamat situs <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>. Dan hasilnya seluruh isolat memiliki subtype A (01\_AE) atau CRF01\_AE. Sehingga presentase subtype HIV-1 CRF01\_AE mencapai 100%.

Tabel 4.1. Hasil penentuan subtype HIV-1 isolat Indonesia

| Nama Isolat Indonesia | Gen <i>protease + RT</i> | Subtipe  | Kesesuaian |
|-----------------------|--------------------------|----------|------------|
| 01023107061440        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 02041108061149        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 99%        |
| 02200603071221        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03022107061500        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03042807061400        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 99 %       |
| 03071608061100        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03112408061530        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03182109061305        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03202209061330        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03241710061430        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03270811061130        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 03351801071520        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 99 %       |
| 04010808060930        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 04020808060930        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 04060609061005        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 05012707061030        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 05012908061310        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 05200404071545        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 05210404071620        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |
| 05230404071628        | 1432 bp                  | CRF01_AE | 100 %      |

#### 4.1.2 Analisis Variasi Genetik HIV-1 subtype dominan di Indonesia.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penentuan subtype terhadap 20 isolat Indonesia, dimana subtype CRF01\_AE merupakan subtype paling dominan (sebesar 100%), maka dalam penelitian ini analisis variasi genetik dilakukan terhadap sekuen dari isolat Indonesia yang memiliki subtype CRF01\_AE saja.



#### 4.1.2.1 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein Protease.

##### a. Perbandingan seluruh sekuen nukleotida dan asam amino.

Untuk mengetahui perbandingan sekuen nukleotida *protease* dan asam amino protein *protease*, maka dilakukan penyelarasan (*alignment*) sekuen - sekuen nukleotida dan asam amino *protease* HIV-1 sub tipe CRF01\_AE. Homologi nukleotida dan asam amino antara isolat yang di peroleh dari penelitian (isolat Indonesia) dan 2 isolat dengan sub tipe sama dari Thailand sebagai data referensi ( AY358062 dan AY945730 ), di bandingkan dengan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE yang diperoleh dari *HIV Immunology and Sequence Databases*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos (selanjutnya disingkat SKD) (lampiran 1 dan 2). Setelah dilakukan penyelarasan sekuen, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino *protease* masing- masing berkisar antara 92,2 - 100% dan 88,8 - 100% (lampiran 3).

##### b. Perbedaan Jenis Asam Amino Pada Protein Protease.

Perbedaan asam amino sangat menentukan terjadinya perubahan struktur sekunder protein, dan perubahan struktur sekunder juga sangat berpengaruh terhadap sifat antigenisitas protein antigen. Setelah dilakukan analisis perbedaan asam amino *protease* HIV-1 antara isolat Indonesia dan Thailand terhadap SKD, diperoleh 19 perbedaan asam amino. Perubahan asam amino dengan posisi 3I menjadi 3V, 20K menjadi 20R dan 70K menjadi 70R dijumpai dengan frekuensi tinggi (hampir pada semua isolat ) (lampiran 4). Perbedaan dan perubahan asam amino tersebut dikarenakan adanya mutasi atau variasi pada nukleotida pertama dan kedua penyusun kodon asam amino tersebut.

**c. Perbandingan sekuen nukleotida dan asam amino pada posisi spesifik.**

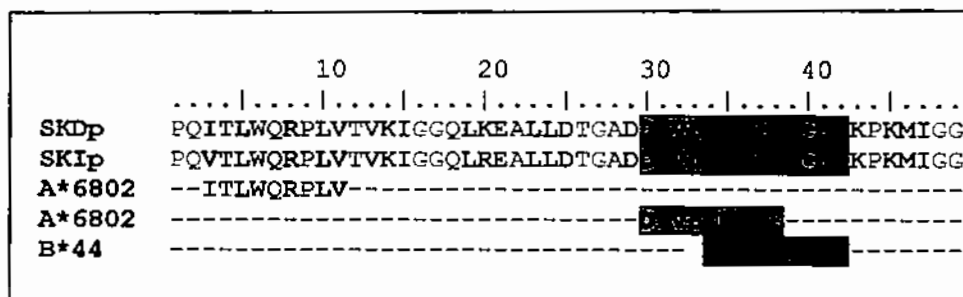
***Daerah lestari asam amino***

Berdasarkan analisis menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0, dari 20 sekuen isolat Indonesia yang diselaraskan, asam amino protease memiliki 2 daerah lestari (konsepartif) yaitu, pada posisi 58 – 74 dengan susunan asam amino QYDQILIEICGKKAIGT dengan panjang 17 segmen. Daerah lestari yang kedua pada posisi 80 – 96 dengan susunan asam amino sepanjang 17 segmen yaitu TPVNIIGRNMLTQIGCT.

***Epitop spesifik CTL pada protein protease***

Berdasarkan studi dan data yang terdapat dalam *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, epitop spesifik CTL pada protein protease HIV-1 adalah epitop A\*6802 pada posisi 3–11 (ITLWQRPLV), B\*44 pada posisi 34–42 (EEMNLPGRW), dan A\*8602 pada posisi 30–38 (DTVLEEWNL).<sup>34,43</sup> Dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0, diselaraskan 3 epitop spesifik CTL tersebut terhadap sekuen konsensus asam amino protease isolat Indonesia (SKIp) dan sekuen konsensus asam amino protease dari database LANL (SKDp). SKIp diperoleh dari proses penentuan sekuen konsensus asam amino protease pada sub bab 4.1.4.

Setelah dibandingkan ternyata ketiga epitop tersebut bersesuaian dengan sekuen SKIp dan SKDp pada posisi yang sesuai. Namun ditemukan perbedaan residu asam amino penyusun epitop dengan residu asam amino SKIp dan atau SKDp. Pada epitop A\*6802(3-11) residu asam amino 3I menjadi 3V pada SKIp. Pada epitop A\*6802 (30-38) residu asam amino 35E menjadi 35D pada SKIp dan SKDp, serta 36W menjadi 36I. Sedangkan pada epitop B\*44 terdapat 3 perbedaan residu asam amino yaitu residu asam amino 35 E menjadi 35 D pada SKIp dan SKDp, residu asam amino 36M menjadi 36I pada SKIp dan SKDp, serta residu asam amino 41R menjadi 41K pada SKIp dan SKDp.



Gambar 4.2. Tiga daerah epitop CTL pada protein protease.

#### 4.1.2.2 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein RT.

##### a. Perbandingan seluruh sekuen nukleotida dan asam amino.

Untuk mengetahui perbandingan sekuen nukleotida dan asam amino protein *reverse transcriptase*, dilakukan penyelarasan (*alignment*) sekuen- sekuen nukleotida dan asam amino RT HIV-1 sub tipe CRF01\_AE. Homologi nukleotida dan asam amino antara isolat yang di peroleh dari penelitian (20 isolat Indonesia) dan 2 isolat dengan sub tipe sama dari Thailand sebagai data referensi ( AY358062 dan AY945730 ), di bandingkan dengan SKD (lampiran 5 dan 6). Setelah dilakukan penjejeran, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease masing- masing berkisar antara 93,6 - 99,0% dan 88,6 - 97,9% (lampiran 7).

##### b. Perbedaan Jenis Asam Amino Pada Protein Reverse Transcriptase.

Perbedaan asam amino sangat menentukan terjadinya perubahan struktur sekunder protein, dan perubahan struktur sekunder juga sangat berpengaruh terhadap sifat antigenisitas protein antigen. Setelah dilakukan analisis perbedaan asam amino *reverse transcriptase* antara isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE Indonesia dan Thailand terhadap sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari LANL, diperoleh 54 perbedaan asam amino. Perubahan asam amino dengan frekuensi paling sering terdapat pada posisi 43E menjadi 43K, 172R menjadi 172K dan 272A menjadi 272P ( hampir pada seluruh isolat) (lampiran 8).

**c. Perbandingan sekuen nukleotida dan asam amino pada posisi spesifik.**

***Daerah lestari asam amino***

Dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0, dilakukan analisis terhadap 20 sekuen isolat Indonesia, dan diperoleh hasil bahwa *reverse transcriptase* memiliki 4 daerah lestari (*conserved*) dengan panjang sekuen antara 15-40 asam amino. (lampiran 9). Daerah lestari tersebut adalah daerah residu asam amino pada posisi 44 - 63 (EGKISKIGPENPYNTPVFAI); daerah ke-2 pada posisi 65 - 79 (KKDSTKWRKLVDFRE); daerah ke-3 pada posisi 87 - 106 (FWEVQLGIPHPAGLKKKKS SV); daerah ke-4 pada posisi 246 - 285 (LPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVKQLCKLLRG)

***Epitop spesifik CTL pada reverse transcriptase***

Berdasarkan data dalam *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, protein *reverse transcriptase* HIV-1 memiliki 27 epitop spesifik terhadap CTL seperti pada tabel 4.2.<sup>34</sup>

Dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0, dua puluh enam epitop spesifik CTL tersebut diselaraskan terhadap sekuen konsensus asam amino *RT* HIV-1 CRF01\_AE isolat Indonesia (SKIr) dimana data diperoleh dari sub bab 4.1.4 dan SKD CRF01\_AE. Terdapat 5 epitop yaitu 356-366 (RMRGAHTNDVK) 341-350 (IYQEPFKNLK), 356-365 (RMRGAHTNDV), 392-401 (PIQKETWETW), 375-383 (IAMESIVIW) yang tidak dapat dilakukan penyelarasan karena epitop berada pada posisi lebih dari 333 AA. Hal ini dikarenakan sekuen *RT* yang diperoleh dalam penelitian ini tidak lengkap.

Sementara 22 epitop bersesuaian dengan sekuen asam amino *reverse transcriptase* SKIr dan SKDr CRF01\_AE pada posisi yang sesuai. Terdapat 12 epitop yang memiliki perbedaan residu asam amino dengan sekuen SKIr dan atau SKDr CRF01\_AE, dengan jumlah perbedaan residu antara 1- 3 asam amino (lampiran 10).

Tabel 4.2. Epitop asam amino RT HIV-1 spesifik terhadap CTL serta perbedaannya pada sekuen SKIr dan SKDr

| Nama epitop                        | Asam amino   | SKIr                       | SKDr                       |
|------------------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>1. B*4001 (B60) RT 5-12</b>     | IETVPVKL     | 6E→D<br>11K→T              | 6E→D<br>11K→T              |
| 2. B*0801 (B8) RT 18-26            | GPKVKQWPL    | -                          | -                          |
| 3. A*0301 (A3) RT 33-43            | ALVEICTEMEK  | 35V→T<br>39T→K             | 35V→T<br>39T→K<br>43K→E    |
| 4. <b>B*5101 (B51) RT 42-50</b>    | EKEGKISKI    | -                          | 43K→E                      |
| 5. A*0301 (A3) RT 73-82            | KLVDFRELNK   | -                          | -                          |
| 6. A*0301 (A3) RT 93-101           | GIPHPAGLK    | -                          | -                          |
| 7. B*3501 (B35) RT 107-115         | TVLDVGDAY    | -                          | -                          |
| <b>8. B*3501 (B35) RT 118-127</b>  | VPLDEDFRKY   | 123D→S                     | 123D→S                     |
| 9. B*5101 (B51) RT 128-135         | TAFTIPSI     | -                          | -                          |
| 10. A*0301 (A3) RT 158-166         | AIFQSSMTK    | -                          | -                          |
| 11. A*1101 (A11) RT 158-166        | AIFQSSMTK    | -                          | -                          |
| <b>12. A*3002 (A30) RT 173-181</b> | KQNPDIYIY    | 177D→E<br>178I→M           | 177D→E<br>178I→M           |
| 13. B*3501 (B35) RT 175-183        | NPDIYIYQY    | 177D→E<br>178I→M           | 177D→E<br>178I→M           |
| <b>14. B*3501 (B35) RT 175-183</b> | HPDIYIYQY    | 175H→N<br>177D→E<br>178I→M | 175H→N<br>177D→E<br>178I→M |
| 15. A*0201 (A2) RT 179-187         | VIYQYMDDL    | -                          | -                          |
| <b>16. B*4001 (B60) RT 202-210</b> | IEELRQHLL    | 207Q→A                     | 207Q→A                     |
| 17. B*1501 (B62) RT 260-271        | LVGKLNWASQIY | -                          | -                          |
| 18. A*3002 (A30) RT 263-271        | KLNWASQIY    | -                          | -                          |
| 19. A*0301 (A3) RT 269-277         | QIYPGIKVR    | -                          | 272P→A                     |
| <b>20. B*4201 (B42) RT 271-279</b> | YPGIKVRQL    | 277R→K                     | 272P→A<br>277R→K           |
| 21. A*0201 (A2) RT 309-317         | ILKEPVHGV    | 312E→T                     | 312E→T                     |
| <b>22. B*1501 (B62) RT 309-318</b> | ILKEPVHGVY   | 312E→T                     | 312E→T                     |
| 23. A*1101 (A11) RT 341-350        | IYQEPFKNLK   | -                          | -                          |
| 24. A*3002 (A30) RT 356-365        | RMRGAHTNDV   | -                          | -                          |
| 25. A*0301 (A3) RT 356-366         | RMRGAHTNDVK  | -                          | -                          |
| 26. B*5801 (B58) RT 375-383        | IAMESIVIW    | -                          | -                          |
| 27. A*3201 (A32) RT 392-401        | PIQKETWETW   | -                          | -                          |

Keterangan : 1. Dua belas epitop tercetak tebal adalah epitop yang memiliki asam amino berbeda dengan SKIr dan SKDr.  
2. Epitop yang dicetak miring adalah epitop yang tidak termasuk dalam sekuen yang dianalisis.

### ***Epitop spesifik CD4+ T helper pada reverse transcriptase***

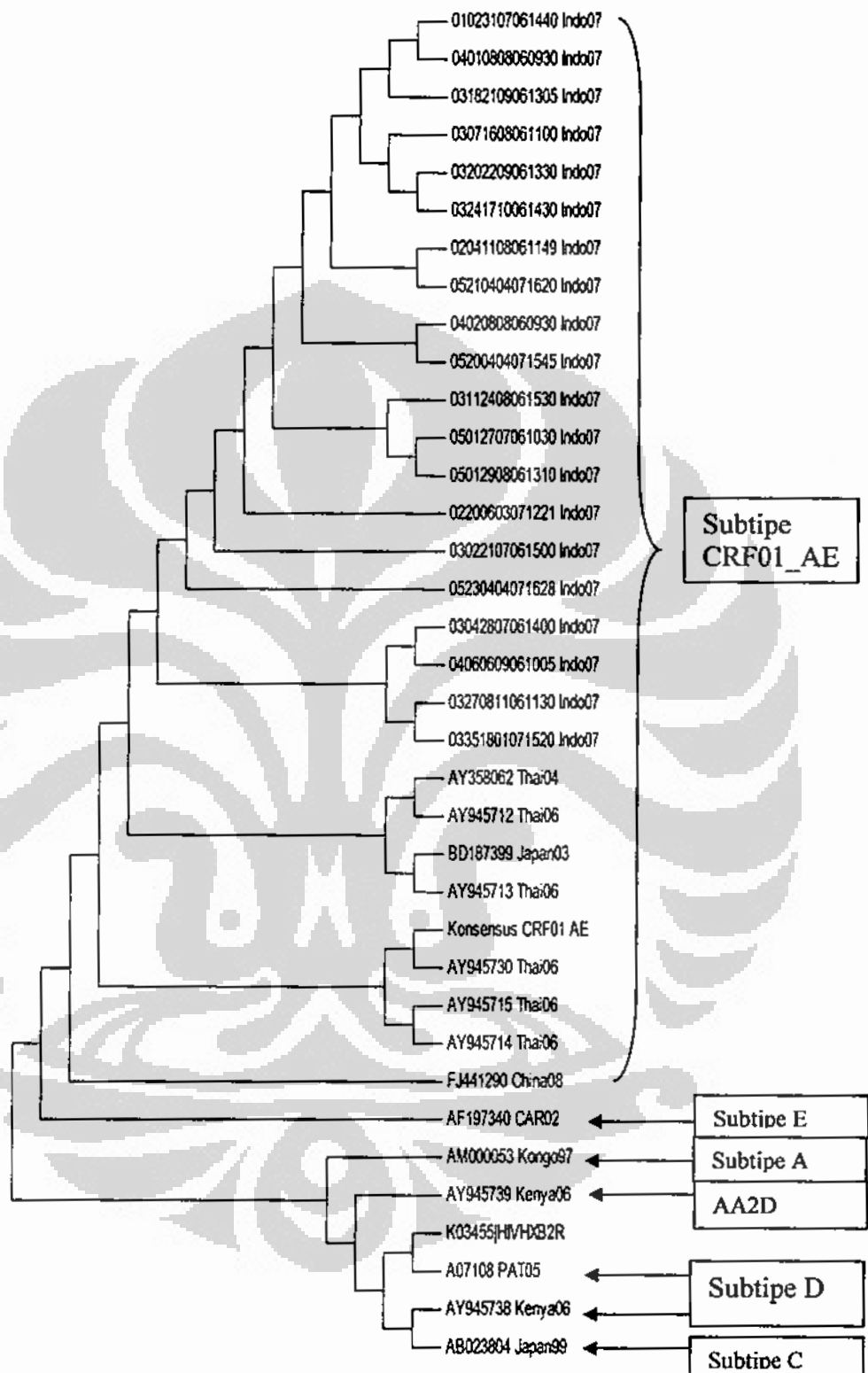
CD4+ T helper berperan penting proses infeksi kronis HIV-1 karena sel CD4+ T helper merupakan target utama infeksi HIV-1. Berdasarkan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, epitop spesifik terhadap sel CD4+ yang terdapat pada RT sebanyak 1 epitop pada posisi asam amino 36 – 52 yaitu EICTEMEKEGKISKIGP. Setelah epitop tersebut selaraskan dengan sekuen konsensus asam amino isolat Indonesia (SKIr) dan sekuen konsensus CRF01\_AE dari LANL (SKD), ditemukan 1 perbedaan residu asam amino yaitu pada posisi ke-40.

|              | 20   | 30 | 40                | 50 |
|--------------|--|----|-------------------|----|
| SKDr         | TLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICKEMEEEGKISKIGP |    |                   |    |
| SKIr         | TLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICKEMEKEGKISKIGP |    |                   |    |
| epitop CD4RT | -----                                      |    | EICTEMEKEGKISKIGP |    |

Gambar 4.3. Satu epitop spesifik CD4+ T helper pada RT disejajarkan dengan SKIr dan SKDr

### **4.1.3 Analisis silsilah genetik**

Pada penelitian ini dilakukan analisis silsilah genetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan distribusi geografi diantara semua isolat HIV-1 CRF01\_AE. Pohon filogenetik dibangun berdasarkan gabungan sekuen nukleotida gen *protease* utuh dan gen *RT* tidak utuh menggunakan *Neighbor-Joining method* yang terdapat pada perangkat lunak MEGA 4.1. Dalam analisis silsilah ini disertakan beberapa isolat virus HIV-1 yang berasal dari Afrika Tengah, Kongo, Kenya, Thailand, Jepang dan China untuk mewakili semua sub tipe. Disertakan juga isolat HIV-1 HBX2, yang merupakan isolat HIV-1 yang pertama kali ditemukan. Kladogram menunjukkan bahwa kedua puluh isolat Indonesia berada pada dalam satu kelompok (*cluster*) sub tipe yang sama yaitu sub tipe CRF01\_AE. Demikian juga dengan isolat - isolat sub tipe CRF01\_AE yang berasal dari Thailand yang digunakan sebagai pembandingan.



Gambar 4.4. Pohon filogenetik metode *Neighbor-Joining (NJ)* sekuen asam amino protease dan RT

#### 4.1.4 Penentuan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE isolat Indonesia.

Pada penelitian ini, dalam menentukan sekuen konsensus isolat-isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari Indonesia, antara gen protease dan gen RT dilakukan secara terpisah. Untuk mendapatkan sekuen konsensus gen *protease* dilakukan penyelarasan sekuen nukleotida dan asam amino protease dengan menggunakan proses *clustal W* pada perangkat lunak Bioedit 7.0. Kemudian ditentukan sekuen konsensusnya. Proses yang sama dilakukan pada penentuan sekuen konsensus gen RT. Sekuen konsensus ini selanjutnya di sebut sekuen konsensus Indonesia (SKI). Kemudian pada masing-masing sekuen konsensus protease (SKIp) dan RT (SKIr) yang telah diperoleh, dibandingkan dengan sekuen nukleotida dan asam amino isolat komponen penyusunannya. Dan dibandingkan juga dengan nukleotida dan asam amino sekuen konsensus CRF01\_AE dari database Los Alamos National Laboratory (SKD).

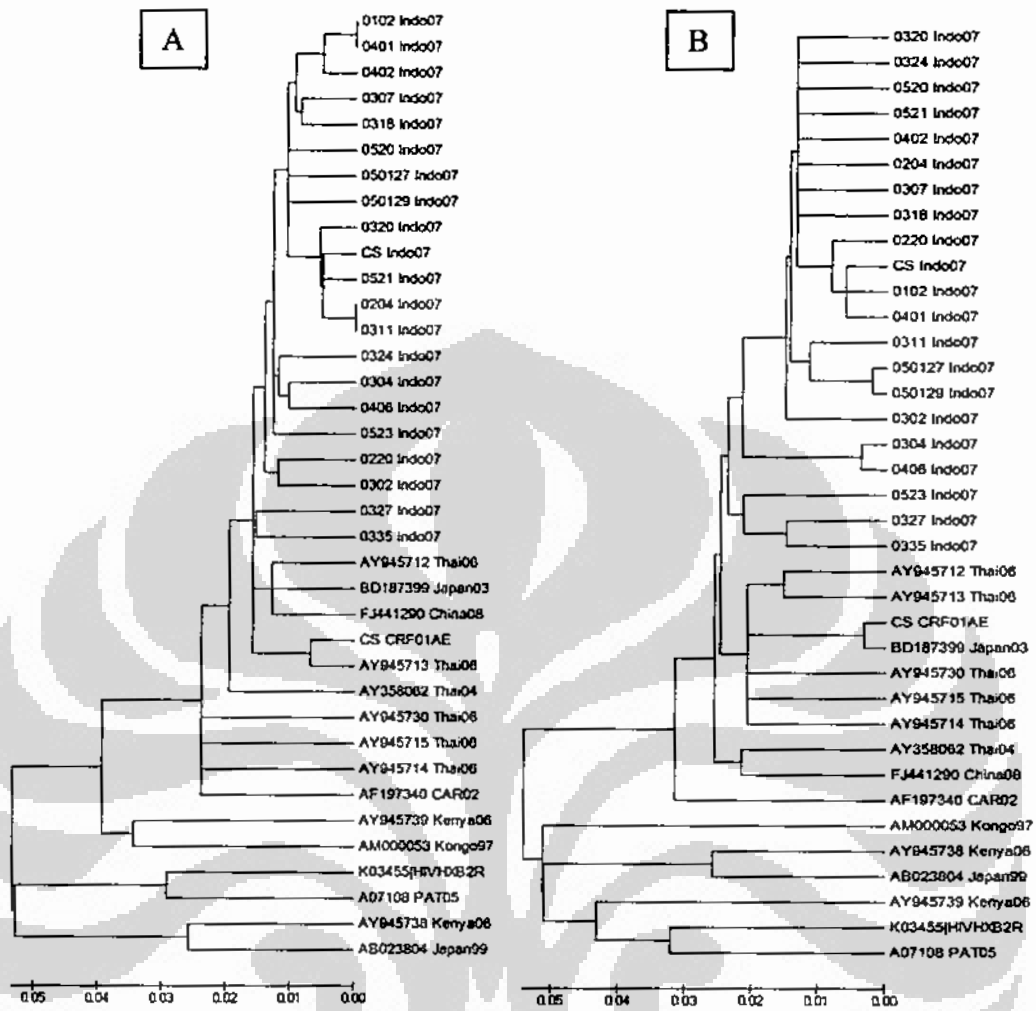
Dari analisis diperoleh bahwa perbedaan SKIp dengan SKDp hanya 2,7% pada sekuen nukleotida dan 5,1% pada sekuen asam amino. Sedangkan perbedaan SKIr dengan SKDr adalah sebesar 2,0% pada perbandingan sekuen nukleotida dan sebesar 3,0% pada perbandingan sekuen asam amino. Perbandingan SKIp terhadap masing – masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 0,4 – 4,4% untuk sekuen nukleotida dan 0-7,1% untuk sekuen asam amino protease. Perbandingan SKIr terhadap masing – masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 1,0-4,1% untuk nukleotida dan 2,1 - 7,5% untuk sekuen asam amino *reverse transcriptase*. Isolat 03042807061400 memiliki perbedaan terkecil dengan SKIp sekuen nukleotida, sedangkan isolat 02041108061149 tidak memiliki perbedaan atau sama dengan sekuen asam amino SKIp. Pada *reverse transcriptase* diperoleh isolat dengan perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino terkecil dengan SKIr adalah isolat 01023107061440.



Tabel 4.3 Perbandingan antara SKI dengan SKD dan isolat HIV-1 Indonesia

| Isolat Indonesia    | Perbandingan dengan SKI protease |                          | Perbandingan dengan SKI RT |                          |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                     | Perbedaan nukleotida (%)         | Perbedaan asam amino (%) | Perbedaan nukleotida (%)   | Perbedaan asam amino (%) |
| 01023107061440      | 1,4                              | 1,1                      | <b>1,0</b>                 | <b>2,1</b>               |
| 02041108061149      | 0,7                              | <b>0</b>                 | 1,6                        | 3,0                      |
| 02200603071221      | 1,7                              | 2,1                      | 1,2                        | 3,0                      |
| 03022107061500      | 3,4                              | 1,1                      | 2,1                        | 3,3                      |
| 03042807061400      | <b>0,4</b>                       | 1,1                      | 1,5                        | 2,7                      |
| 03071608061100      | 1,7                              | 2,1                      | 1,7                        | 3,9                      |
| 03112408061530      | 1,4                              | 3,1                      | 2,9                        | 6,3                      |
| 03182109061305      | 1,4                              | 3,1                      | 1,7                        | 3,3                      |
| 03202209061330      | 4,1                              | 4,1                      | <b>4,1</b>                 | 4,2                      |
| 03241710061430      | 3,4                              | 7,1                      | 3,6                        | 6,0                      |
| 03270811061130      | 1,4                              | 1,1                      | 1,3                        | 2,3                      |
| 03351801071520      | 0,7                              | 1,1                      | 1,2                        | 2,1                      |
| 04010808060930      | 3,1                              | 2,1                      | 3,5                        | 5,4                      |
| 04020808060930      | 2,4                              | 3,1                      | 1,9                        | 4,5                      |
| 04060609061005      | 4,4                              | 4,1                      | 1,9                        | 4,2                      |
| 05012707061030      | 1,7                              | 3,1                      | 3,0                        | 7,2                      |
| 05012908061310      | 1,4                              | 2,1                      | 2,9                        | <b>7,5</b>               |
| 05200404071545      | 2,4                              | 2,1                      | 3,4                        | 5,1                      |
| 05210404071620      | 2,4                              | 3,1                      | 3,1                        | 3,3                      |
| 05230404071628      | 2,7                              | 5,1                      | 1,9                        | 2,1                      |
| <b>SKD CRF01_AE</b> | <b>2,7</b>                       | <b>5,1</b>               | <b>2,0</b>                 | <b>3,0</b>               |

Untuk menentukan nilai kemaknaan dari perbedaan sekuen – sekuen tersebut dilakukan analisis statistik dengan menggunakan metode uji t tidak berpasangan. Dalam pengujian tersebut menggunakan perangkat lunak SPSS.



Gambar 4.5. Hubungan filogenetik sekuen konsensus Indonesia ( digambar ditulis CS Indo07) gen *protease* (A) dan gen *reverse transcriptase* (B) dibandingkan sekuen –sekuen isolat Indonesia, SKD, dan beberapa isolat dari subtype selain CRF01\_AE.

Penentuan isolat Indonesia yang memiliki kemiripan dengan SKI dapat menggunakan pohon silsilah (*filogenetik tree*). Isolat yang memiliki kekerabatan paling erat dengan SKI dan memiliki presentase perbedaan terkecil dengan SKI merupakan isolat yang akan digunakan sebagai kandidat vaksin HIV-1. Pada pohon silsilah SKI protease (gambar 4.5.A) menunjukkan isolat 0311 Indo07 (03112408061530) dan 0204 Indo07 (02041108061149) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr (CS Indo07). Pada pohon silsilah SKI *reverse transcriptase* (gambar 4.5.B) menunjukkan isolat 0102 Indo07 (01023107061440) dan 0401 Indo07 (04010808060930) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr.

## 4.2 PEMBAHASAN

Setelah lebih dari 25 tahun ditemukannya HIV-1 penyebab AIDS, usaha untuk mengembangkan vaksin untuk mencegah dan melindungi manusia dari infeksi HIV-1. Salah satu kendala utama pengembangan vaksin HIV-1 adalah keanekaragaman virus yang tinggi. Salah satu pendekatan untuk mengatasi masalah tersebut adalah pemilihan kandidat vaksin dengan menggunakan sekuen konsensus subtipe HIV-1 yang paling dominan di suatu wilayah dan populasi tertentu. Pada penentuan sekuen konsensus dalam penelitian ini digunakan jenis isolat HIV-1 yang berasal dari penasun dan darah donor PMI yang positif mengandung HIV-1. Namun usaha mendapatkan sekuen dari darah donor tidak berhasil dilakukan. Hal tersebut mungkin dikarenakan beberapa faktor seperti kondisi sampel yang memang kurang baik, viral load yang kurang tinggi, atau kondisi primer yang tidak sesuai. Sehingga dalam penelitian ini hanya dilakukan analisa terhadap sekuen dari penasun yang telah dikerjakan oleh Tim HIV-DR Departemen Mikrobiologi FKUI.

Pada penelitian ini digunakan sekuen gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 untuk penentuan sekuen konsensus karena merupakan sekuen yang konservatif. Pada pasien yang belum mendapatkan terapi antiretroviral, sekuen asam amino protease menunjukkan tingkat kelestarian yang tinggi dimana tingkat variabilitasnya kurang dari 1%.<sup>33,39</sup> Sekuen gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 juga dapat digunakan untuk menentukan subtipe HIV-1, variasi genetik dan menentukan kekerabatan genetik suatu isolat HIV-1.<sup>35</sup>

### 4.2.1 Penentuan subtipe HIV-1 isolat Indonesia

Dalam menentukan subtipe HIV-1 pada umumnya lebih disukai menggunakan sekuen selubung virus (*env*), karena sekuen *env* memiliki variabilitas yang besar. Namun dalam beberapa studi menunjukkan bahwa sekuen gen - gen HIV-1 yang lain juga bisa digunakan untuk penentuan subtipe HIV-1 dan dapat mengidentifikasi genom rekombinan pada HIV.<sup>35</sup>

Penelitian terhadap gen protease dan gen RT untuk mengetahui mutasi gen yang berkaitan dengan resistensi virus terhadap *RT* dan *protease-inhibitor*, membuat sekuen nukleotida pada daerah tersebut dapat digunakan sebagai alternatif metode penentuan subtype HIV-1.<sup>35</sup>

Menurut beberapa penelitian *genotyping* HIV-1 yang telah dilakukan di Indonesia, subtype HIV-1 yang paling dominan di Indonesia adalah CRF01\_AE. Pada penelitian identifikasi *genotype* HIV-1 menggunakan gen *envelope* dan *gag* di Timika Papua Barat oleh Foley B *et.al*,2001 menyebutkan subtype yang paling dominan adalah CRF01\_AE sebesar 87,5% dan penelitian oleh Merati TP,*et al*,2008 menggunakan gen *envelope* di Bali dan Klinik Rehabilitasi Narkoba di Bogor diperoleh data subtype yang paling dominan adalah subtype CRF01\_AE sebesar 90,7%.<sup>36,37</sup>

Pada penelitian ini dilakukan penentuan subtype HIV-1 Indonesia menggunakan sekuen gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* yang diproses dengan bantuan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0. Hasilnya menunjukkan subtype HIV-1 CRF01\_AE sebesar 100%. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa subtype HIV-1 yang paling dominan di Indonesia adalah CRF01\_AE. Pada penelitian ini variasi subtype HIV-1 Indonesia sangat rendah, bahkan tidak ada variasi, kemungkinan disebabkan virus belum/tidak mengalami mutasi akibat gangguan efek obat antiretroviral karena pasien belum pernah mendapatkan obat antiretroviral.<sup>33,39</sup>

#### **4.2.2 Analisis Variasi Genetik HIV-1 subtype dominan di Indonesia.**

Telah diketahui bahwa subtype HIV-1 yang paling dominan adalah CRF01\_AE. Bahkan pada penelitian ini seluruh isolat merupakan HIV-1 subtype CRF01\_AE (100%). Sehingga dalam analisis variasi genetik HIV-1 isolat Indonesia digunakan seluruh sampel yang berhasil di sekuen.

##### **4.2.2.1 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein Protease.**

Berdasarkan analisis homologi sekuen nukleotida gen protease yang membandingkan sekuen isolat Indonesia dengan SKD dan isolat Thailand diperoleh angka kemiripan antar sekuen sebesar 92,2- 100%.

Sedangkan homologi sekuen asam amino protease dari sekuen isolat – isolat tersebut adalah sebesar 88,8-100%. Tingginya tingkat homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease tersebut menunjukkan bahwa gen protease relatif lestari. Tingkat kelestarian gen protease tidak dipengaruhi distribusi geografis. Hal ini di tunjukkan pada perbandingan sekuen isolat Indonesia dengan sekuen konsensus dari LANL (SKD) sebesar 93,9 – 98,3% untuk sekuen nukleotida dan 91,9 – 98,9% untuk sekuen asam amino. Demikian juga perbandingan antara sekuen isolat Indonesia dengan sekuen isolat Thailand yang menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan kisaran antara 92,5 – 97,9 % pada sekuen nukleotida dan 88,8 - 97,9% pada sekuen asam amino.

Pada analisis perbedaan asam amino protease dengan membandingkan sekuen isolat- isolat Indonesia dengan sekuen konsensus LANL (SKD) sebagai prototipe dan sekuen isolat Thailand sebagai referensi, diperoleh perbedaan asam amino pada tiga posisi yaitu 3I menjadi 3V, 20K menjadi 20R dan 70K menjadi 70R. Perubahan asam amino tersebut terjadi pada hampir semua isolat Indonesia. Perbedaan pada ketiga posisi tersebut tidak dijumpai pada sekuen isolat Thailand. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan isolat yang digunakan untuk membangun sekuen konsensus CRF01\_AE LANL (SKD), dimana sekuen yang digunakan untuk membangun SKD mungkin adalah sekuen – sekuen isolat dari Thailand.

Protein protease memiliki 2 daerah lestari yaitu, pertama pada posisi 58 sampai 74 dengan susunan asam QYDQILIEICGKKAIGT dengan panjang 17 segmen. Daerah lestari yang kedua pada posisi 80 sampai 96 dengan susunan asam amino sepanjang 17 segmen yaitu TPVNIIGRNMLTQIGCT. Adanya daerah lestari tersebut sangat berpengaruh terhadap tingginya tingkat homologi protease.

Pada proses infeksi virus, respon CTL sangat penting untuk proses penyembuhan penyakit akibat infeksi virus tersebut. Berdasarkan studi terdahulu asam amino protease HIV-1 memiliki 3 daerah epitop yang mampu merangsang respon CTL yaitu asam amino pada posisi 3–11 (ITLWQRPLV), 34–42 ( EEMNLPGRW ), 30–38 (DTVLEEWNL).<sup>34</sup>

Ketiga epitop tersebut ditemukan juga pada sekuen asam amino isolat Indonesia. Namun pada sebagian isolat Indonesia, epitop A\*6802 posisi 34 – 42 (EEMNLPGRW) terjadi perubahan asam amino 35E menjadi D dan 36W menjadi 36I. Sedangkan pada epitop A\*6802 posisi 30 – 38 (DTVLEEWNL) terjadi perubahan asam amino 35E menjadi 35D dan 36M menjadi 36I.

Beberapa epitop mampu mensensitisasi sel secara efisien, namun jika terjadi perubahan pada beberapa asam amino maka kemampuan untuk mensensitisasi sel juga akan berbeda, sehingga kemungkinan kemampuan untuk menghancurkan virus juga berbeda. Mengingat besarnya peran epitop dalam proses eliminasi virus infeksi, maka dalam upaya pengembangan vaksin genetik, studi terhadap epitop asam amino tertentu seperti protease sangat penting.

Menurut sifat – sifatnya, beberapa asam amino yang terdapat dalam protein terbagi menjadi dua golongan besar berdasarkan gugus R yang melekat pada atom karbon alfa polar sehingga bersifat hidrofilik dan atom karbon alfa non-polar sehingga bersifat hidrofobik. Beberapa asam amino yang bersifat hidrofobik yaitu Alanin (A), Isoleusin (I), Leusin (L), Metionin (M), Fenilalanin (F), Prolin (P), Triptofan (W), Valin (V). Sedangkan asam amino yang bersifat hidrofilik yaitu Arginin (R), Asparagin (N), asam aspartat (D), sistein (C), Asam glutamat (E), Glutamin (Q), Glisin (G), Histidin (H), Lisin (L), Serin (S), Treonin (T), Tisoin (Y).

Dari analisis tentang perbandingan epitop CTL pada asam amino protease dengan SKIp dan SKDp, hanya epitop B\*44 yang memiliki perbedaan asam amino terhadap SKIp dan SKDp yang signifikan dimana kemungkinan terjadi perubahan sifat epitop tersebut pada SKIp dan SKDp. Hal ini ditandai dengan adanya perubahan asam amino yang bersifat hidrofobik pada epitop B\*44 (asam amino M dan R) menjadi asam amino yang bersifat hidrofilik pada sekuen SKIp dan SKDp (asam amino E dan P). Namun besarnya pengaruh perubahan residu asam amino epitop tersebut terhadap sifat imunogenik-nya dalam merangsang respon imun CTL, perlu dibuktikan secara *in vitro* dan *in vivo*.

#### 4.2.2.2 Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein *Reverse Transcriptase*.

Untuk mengetahui perbandingan sekuen nukleotida gen *reverse transcriptase* dan asam amino protein reverse transcriptase, maka dilakukan penyelarasan ( *alignment* ) sekuen- sekuen nukleotida dan asam amino protease HIV-1 sub tipe CRF01\_AE. Homologi nukleotida dan asam amino antara isolat yang di peroleh dari penelitian (20 isolat Indonesia) dan 2 isolat dengan sub tipe sama dari Thailand sebagai data referensi (AY358062 dan AY945730), di bandingkan dengan SKD. Setelah dilakukan penjejeran, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease masing- masing berkisar antara 93,6%-99,0% dan 88,6%-97,9%.

Perbedaan asam amino sangat menentukan terjadinya perubahan struktur sekunder protein, dan perubahan struktur sekunder juga sangat berpengaruh terhadap sifat antigenisitas protein antigen. Setelah dilakukan analisis perbedaan asam amino *reverse transcriptase* antara isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE Indonesia dan Thailand terhadap sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari GenBank, diperoleh 54 perbedaan asam amino. Perubahan asam amino 43E menjadi 43K, 172R menjadi 172K dan 272A menjadi 272P dijumpai dengan frekuensi tinggi (hampir pada seluruh isolat). *Reverse transcriptase* memiliki 4 daerah lestari dengan panjang sekuen antara 15 - 40 asam amino.

Daerah lestari tersebut adalah daerah 1 pada 44 sampai 63 yaitu asam amino EGKISKIGPENPYNTPVFAI; daerah 2 pada posisi 65 sampai 79 yaitu KKDSTKWRKLVDFRE ; daerah 3 pada posisi 87 sampai 106 dengan sekuen asam amino FWEVQLGIPHPAGL KKKKSV; daerah 4 pada posisi 246 sampai 285 dengan urutan asam amino LPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVKQLCKLLRG.

Pada RT terdapat dua puluh tujuh epitop spesifik CTL dalam studi sebelumnya. Setelah dibandingkan ternyata terdapat 5 epitop yang tidak dapat dilakukan penyelarasan karena epitop – epitop tersebut berada pada posisi asam amino yang lebih dari 330. Sedangkan 22 epitop lainnya

bersesuaian dengan sekuen konsensus asam amino *RT* isolat Indonesia (SKIr) dan sekuen konsensus *RT* dari database LANL (SKD) pada posisi yang sesuai. Terdapat 12 jenis epitop yang memiliki perbedaan asam amino dengan SKIr dan SKDr. Jumlah asam amino yang berubah pada epitop – epitop yang berbeda tersebut berkisar antara 1 sampai 3 asam amino.

Berdasarkan sifat hidrofobik atau hidrofilik asam amino, dilakukan analisis terhadap perbedaan residu asam amino epitop *RT* spesifik pada CTL dengan SKIr dan SKDr. Dari tabel 4.2 diperoleh bahwa epitop A\*0301 (A3) *RT* 33–43 (ALVEICTEMEK) terdapat perbedaan residu asam amino pada 35V menjadi 35T pada SKIr dan SKDr, serta B\*4001 (B60) *RT* 202–210 IEELRQHLL terdapat perbedaan pada 207Q menjadi 207A. Kedua perbedaan residu asam amino pada kedua epitop tersebut diperkirakan menimbulkan pengaruh yang sangat signifikan terhadap sifat – sifat imunogenik kedua epitop. Hal ini dikarenakan asam amino 35V (valin) bersifat hidrofobik atau non-polar berubah menjadi 35T (Treonin) yang bersifat hidrofilik atau polar. Demikian juga perubahan asam amino 207Q (Glutamin) yang bersifat hidrofilik menjadi 207A (Alanin) yang bersifat hidrofobik. Perubahan sifat asam amino tersebut mengakibatkan perubahan struktur protein sehingga sifat imunogeniknya juga berubah. Sedangkan perbedaan residu asam amino pada epitop – epitop yang lain diperkirakan tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap sifat imunogeniknya, karena perubahannya terjadi pada ruang lingkup sifat asam amino yang sama, hidrofobik atau hidrofilik. Namun hal tersebut masih perlu dibuktikan secara *in vitro* maupun *in vivo*.

*RT* juga memiliki epitop spesifik terhadap sel CD4+ sebanyak 1 epitop pada posisi asam amino 36 – 52 yaitu, EICTEMEKEGKISKIGP. Ditemukan 1 perbedaan residu asam amino jika dibandingkan dengan SKIr dan SKDr yaitu asam amino ke-39, dimana T (Treonin) menjadi K (Lisin). Namun diperkirakan perubahan tersebut tidak memiliki pengaruh terhadap sifat imunogenik epitop karena kedua residu tersebut sama – sama bersifat hidrofilik.



### 4.2.3 Analisis Silsilah genetik

HIV-1 memiliki keanekaragaman yang sangat tinggi. Sampai sekarang terdapat tiga grup besar yaitu M,N dan O. Grup M memiliki 9 sub tipe dan antar sub tipe dapat membentuk rekombinan yang disebut CRF (*circulating recombinant form*). Telah ditemukan 34 macam CRF. Distribusi geografi sub tipe dan CRF HIV-1 juga sangat dinamis. Pada penelitian ini dilakukan analisis silsilah atau filogenetik HIV-1 dengan menggunakan kladogram dalam untuk mengetahui posisi filogenetik HIV-1 sub tipe CRF01\_AE yang sangat dominan di Indonesia dibandingkan dengan isolat – isolat dari negara lain. Pada analisis kladogram yang menggunakan metode *Neighbor-Joining* dari perangkat lunak MEGA2.0 menunjukkan bahwa kedua puluh isolat Indonesia yang disekuensing pada penelitian ini berada pada dalam satu kelompok (*cluster*) sub tipe yang sama yaitu sub tipe CRF01\_AE. Demikian juga dengan beberapa isolat sub tipe CRF01\_AE yang berasal dari Thailand, Jepang dan China yang digunakan sebagai pembanding. Hal yang menarik dari analisis kladogram tersebut adalah isolat Indonesia CRF01\_AE memiliki satu akar yang sama dan secara signifikan terpisah dalam satu kelompok. Hal yang sama terlihat pada isolat CRF01\_AE dari Thailand. Sekuen konsensus CRF01\_AE yang berasal dari database Los Alamos National Laboratory menunjukkan memiliki kekerabatan yang dekat dengan isolat – isolat CRF01\_AE dari Thailand. Hal tersebut menunjukkan bahwa sekuen konsensus CRF01\_AE dari database LANL mungkin dibangun dari isolat – isolat dari Thailand.

### 4.2.4 Penentuan Sekuen Konsensus HIV-1 CRF01\_AE Isolat Indonesia

Pada penelitian ini, dalam menentukan sekuen konsensus isolat-isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari Indonesia, antara gen *protease* dan gen *RT* dilakukan secara terpisah. Untuk mendapatkan sekuen konsensus gen *protease* dilakukan penyelarasan sekuen nukleotida dan asam amino protease dengan menggunakan proses *clustal W* pada perangkat lunak Bioedit 7.0. Kemudian ditentukan sekuen konsensusnya.

Proses yang sama dilakukan pada penentuan sekuen konsensus gen *RT*. Sekuen konsensus ini selanjutnya di sebut sekuen konsensus Indonesia (SKI). Kemudian pada masing-masing sekuen konsensus protease (SKI<sub>p</sub>) dan *RT* (SKI<sub>r</sub>) yang telah diperoleh, dibandingkan dengan sekuen nukleotida dan asam amino isolat komponen penyusunannya. Dan dibandingkan juga dengan nukleotida dan asam amino SKD.

Dari analisis diperoleh bahwa perbedaan SKI<sub>p</sub> dengan SKD<sub>p</sub> hanya 2,7% pada sekuen nukleotida dan 5,1% pada sekuen asam amino. Sedangkan perbedaan SKI<sub>r</sub> dengan SKD<sub>r</sub> adalah sebesar 2,0% pada perbandingan sekuen nukleotida dan sebesar 3,0% pada perbandingan sekuen asam amino. Perbandingan SKI<sub>p</sub> terhadap masing – masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 0,4 – 4,4% untuk sekuen nukleotida dan 0-7,1% untuk sekuen asam amino protease. Perbandingan SKI<sub>r</sub> terhadap masing –masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 1,0 - 4,1% untuk nukleotida dan 2,1-7,5% untuk asam amino *RT*.

Dari hasil analisis statistik menggunakan “uji *t* tidak berpasangan” diperoleh nilai kemaknaan sebagai berikut :

- a. Perbandingan sekuen nukleotida SKI<sub>p</sub> dengan SKD<sub>p</sub> diperoleh nilai *p* sebesar 0,030; artinya antara keduanya memiliki perbedaan bermakna.
- b. Perbandingan sekuen asam amino SKI<sub>p</sub> dengan SKD<sub>p</sub> diperoleh nilai *p* sebesar 0,000; artinya kedua sekuen memiliki perbedaan yang bermakna.
- c. Perbandingan sekuen nukleotida SKI<sub>r</sub> dengan SKD<sub>r</sub> diperoleh nilai *p* sebesar 0,208; artinya kedua sekuen memiliki perbedaan *tidak* bermakna.
- d. Perbandingan sekuen asam amino SKI<sub>r</sub> dengan SKD<sub>r</sub> diperoleh nilai *p* sebesar 0,015; artinya kedua sekuen memiliki perbedaan yang bermakna.

Dari hasil uji statistik tersebut dapat disimpulkan bahwa sekuen konsensus asam amino protease dan *reverse transcriptase* HIV-1 dari Indonesia memiliki perbedaan yang nyata dengan sekuen konsensus dari data Los Alamos, NL. Dengan demikian setiap isolat HIV-1 CRF01\_A Indonesia memiliki kemungkinan yang besar berbeda dengan isolat negara lain, termasuk didalamnya perbedaan epitop – epitop yang merangsang sistem imun seluler maupun humoral.

Oleh karena itu pendekatan baru dalam pengembangan vaksin HIV-1 yang spesifik pada wilayah regional, subtipe dan populasi tertentu perlu dipertimbangkan untuk dilakukan di Indonesia. Pendekatan tersebut dapat berupa pengembangan vaksin HIV-1 yang berbasis isolat (*isolate based-vaccine*) atau dengan sekuen buatan (*artificial sequences*).

Pada penelitian ini juga ditentukan isolat HIV-1 yang memiliki potensi kuat untuk dijadikan kandidat vaksin berdasarkan pendekatan *isolate based-vaccine*. Isolat yang memiliki tingkat perbedaan paling rendah dengan sekuen konsensus adalah isolat yang akan dipilih sebagai kandidat vaksin. Dan dari analisis diperoleh isolat 03042807061400 memiliki perbedaan terkecil dengan SKIp sekuen nukleotida, sedangkan isolat 02041108061149 tidak memiliki perbedaan atau sama dengan sekuen asam amino SKIp. Pada *reverse transcriptase* diperoleh isolat dengan perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino terkecil dengan SKIr adalah isolat 01023107061440.

Penentuan isolat Indonesia yang memiliki kemiripan dengan SKI dapat digunakan pohon silsilah (*filogenetik tree*). Isolat yang memiliki kekerabatan paling erat dengan SKI dan memiliki presentase perbedaan terkecil dengan SKI merupakan isolat yang akan digunakan sebagai kandidat vaksin HIV-1. Pada pohon silsilah SKI protease (gambar 4.5.A) menunjukkan isolat 0311 Indo07 dan 0204 Indo07 (02041108061149) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr(CS Indo07). Pada pohon silsilah SKI *reverse transcriptase* (gambar 4.5.B) menunjukkan isolat 0102 Indo07 (01023107061440) dan 0401 Indo07 memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr.

Pada analisis diperoleh kesimpulan bahwa isolat dengan kode 02041108061149 merupakan isolat yang memiliki potensi paling kuat untuk dipakai pengembangan vaksin gen protease dibandingkan isolat lain yang di analisis pada penelitian ini. Sementara isolat nomer 01023107061440 isolat yang memiliki potensi untuk dipakai sebagai kandidat vaksin berbasis gen *reverse transcriptase*.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe paling dominan yang beredar di Indonesia sebagai acuan untuk mendapatkan isolat terbaik sebagai bahan baku pengembangan vaksin HIV-1. Untuk itu dilakukan penelitian dengan melakukan analisis sekuen nukleotida gen dan sekuen asam amino protein yang akan digunakan komponen pembuatan vaksin yaitu protease dan *reverse transcriptase*.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan :

1. Dari 20 sampel isolat HIV-1 positif penasun yang berhasil di sekuen ternyata seluruh sampel memiliki sub tipe CRF01\_AE, yang berarti HIV-1 sub tipe CRF01\_AE merupakan sub tipe paling dominan di Indonesia.
2. Analisis variasi genetik terhadap nukleotida gen dan asam amino protease isolat – isolat Indonesia dibandingkan dengan sekuen referensi dan sekuen konsensus dari LANL diperoleh tingkat homologi 92,2 - 100% untuk sekuen nukleotida dan 88,8-100% untuk sekuen asam amino. Sekuen asam amino protease memiliki 2 daerah lestari dan 3 daerah yang merupakan epitop terhadap CTL. Pada sekuen *reverse transcriptase* diperoleh tingkat homologi 93,6 - 99,0% untuk sekuen nukleotida dan dan 88,6 - 97,9% untuk sekuen asam amino. Sekuen asam amino *reverse transcriptase* isolat Indonesia memiliki 4 daerah lestari, dan 22 epitop terhadap CTL.
3. Sekuen konsensus HIV-1 CRF01\_AE untuk nukleotida dan asam amino protease dan *reverse transcriptase* dari Indonesia berhasil disusun. Sekuen konsensus protease Indonesia (SKIp) memiliki perbedaan dengan sekuen konsensus dari LANL (SKDp) sebesar 2,7% untuk sekuen nukleotida dan 5,1% untuk sekuen asam amino. Sedangkan sekuen konsensus *reverse transcriptase* Indonesia (SKIr) memiliki perbedaan dengan dengan sekuen konsensus dari LANL (SKDr) sebesar 2,0% untuk nukleotida dan 3,0% untuk asam amino.

4. Dari analisis kesamaan sekuen dengan sekuen konsensus HIV-1 CRF01\_AE Indonesia dan analisis filogenetik diperoleh satu isolat Indonesia sebagai kandidat vaksin HIV-1 menggunakan gen *protease* yaitu isolat berkode lengkap 02041108061149. Dengan cara yang sama diperoleh isolat Indonesia berkode lengkap 01023107061440 sebagai isolat kandidat vaksin HIV-1 yang menggunakan gen *reverse transcriptase*.

## 5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka diajukan saran sebagai berikut :

1. Melakukan penelitian dengan jumlah dan variasi isolat HIV-1 yang lebih banyak. Demikian juga cakupan wilayah geografis di Indonesia dalam pengambilan sampel perlu lebih luas.
2. Kegagalan memperoleh sekuen HIV-1 dari darah donor perlu dievaluasi faktor-faktor penyebabnya, sehingga akan diperoleh hasil penelitian dengan variasi isolat yang lebih banyak. Dengan demikian diharapkan penelitian ini menjadi lebih sempurna.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkonfirmasi tingkat antigenisitas dan imunogenisitas secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap asam amino dari isolat kandidat vaksin HIV-1 berdasarkan sekuen konsensus HIV-1 CRF01\_AE yang diperoleh dari penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks, G.F., Butel, J.S., & Morse, A.S. (2004). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology (edisi ke-23)*. Philadelphia: McGraw-Hill Companies Inc.
2. Girard, M.P., Osmanov, S.K., & Kieny, M.P. (2006). A review of vaccine research and development: the Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Vaccine*, 24, 4062–4081.
3. World Health Organization. (2008). Global AIDS epidemic continues to grow. 19 Februari 2009. <http://www.who.int>
4. Departemen Kesehatan. Peringatan hari AIDS sedunia “Stop AIDS: saatnya melayani!” 19 Februari 2009. <http://www.depkes.go.id>
5. Flores, J.E. (2005). *The HIV-1 pipeline and global expansion of clinical trials*. Keystone meeting, Banff, Canada. [Abstract no.043].
6. Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., & Foley, B. (2002). Diversity consideration in HIV-1 vaccine selection. *Science*, 296, 2354-2360.
7. Ellenberger, D.L., Li, B., & Lupo, D.L. (2002). Generation of a consensus sequence from prevalent and incident HIV-1 infections in West Africa to guide AIDS vaccine development. *Virology*, 302, 155–163.
8. Abbas, A., Lichtman, A., & Pober, J. (1994). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: WB Saunders Co.
9. Luciw, P.A. (1996). Human Immunodeficiency Viruses and their replication. Dalam: Fields, B.N., Knipe, D.M., & Howley, P.M (Ed.) *Fields Virology (edisi ke-3)*. Volume 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
10. Nobelprize. org. Nobel Prize in physiology or medicine 2008. 27 Mei 2009. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/index.html).
11. Knipe, D.M., & Howley, P.M. (2001). *Fundamental of Virology (edisi ke-4)*. Philadelphia: Lippincot William & Wilkins.

12. Folks, T.M., & Hart, C.E. (1997). The life cycle of Human Immunodeficiency Virus Type I. Dalam: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (eds). *AIDS: etiology, diagnosis, treatment, and prevention (edisi ke-4)*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
13. Strauss, J.H., & Strauss, E.G. (2002). Viruses whose life cycle uses. Dalam: Strauss, J.H., Strauss, E.G. *Viruses and human disease*. San Diego, California: Academic Press.
14. University of Arizona. *Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy*. 25 Mei 2009. <http://student.biology.arizona.edu>
15. National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID). Course of HIV infection: the relationship between the Human Immunodeficiency Virus and the acquired immunodeficiency syndrome. Dalam: *AIDS educational global information system (AEGiS)*. 17 Mei 2009. <http://www.aegis.org>.
16. World Health Organization. *Guidelines for HIV diagnosis and monitoring of antiretroviral therapy*. 27 Februari 2009. <http://www.who.int>.
17. Pantaleo, G., Cohen, O., Graziosi, C., Vaccarezza, M., Paolucci, S., Demarest, D.F., & Fauci, A.S. (1997). Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection. Dalam: DeVita, V.T., S. Hellman, S.A. Rosenberg (eds). *AIDS: etiology, diagnosis, treatment, and prevention (edisi ke-4)*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
18. Fields, B.N. (1996). Human retrovirus. Dalam: *Fields Virology (edisi ke-3)*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
19. Wikipedia. *HIV*. 20 April 2009. <http://en.wikipedia.org>.
20. Walker, B.D. *Immunopathogenesis and immune response in HIV infection*. 17 April 2009. <http://www.medscape.com>.
21. Peeters, M. (2000). *Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic*. 24 September 2004. <http://www.hiv.lanl.gov>.

22. Los Alamos National Laboratory. *HIV and SIV nomenclature*. 20 April 2009. <http://hiv-web.lanl.gov>.
23. Giri, M., Ugen, K.E., Weiner, W.B. (2004). DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the past decade. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 370–389.
24. Snustad, D.P., & Simmons, M.J. *Principles of genetics (edisi ke-2)*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
25. Yasutomi, Y., Koenig, S., Haun, S.S., Stover, C.K., Jackson, R.K., Conard, P.A., Conley, J., Emini, E.A., Fuerst, T.R., & Letvin, N.L. (1993). Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *Journal Immunology*, 150, 3101–3107.
26. Weissman, D., Ni, H., Scales, D., Dude, A., Capodici, J., McGibney, K., Abdool, A., Isaacs, S.N., Cannon, G., & Kariko, K. (2000). HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *Journal Immunology*, 165, 4710–4717.
27. *The Body. HIV Life Cycle*. 9 Oktober 2008. [www.thebody.com](http://www.thebody.com).
28. Dougherty, W.G., & Semler, B.L. (1993). Expression of virus-encoded proteinase: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiology Reviews*, 57, 781–822.
29. Clavel, F., & Hance, A.J. (2004). HIV drug resistance. Review article. *New England Journal Medicine*, 350, 1023–1035.
30. Goff, S.P. (2001). Retroviridae: the retrovirus and their replication. Dalam: Knipe, D.M., & Howley, P.M. (ed). *Fields Virology (edisi ke-4)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
31. Pavlakis, G.N. (1997). The molecular biology of Human Immunodeficiency Virus type I. Dalam: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (ed). *AIDS: etiology, diagnosis, treatment, and prevention (edisi ke-4)*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.



32. Markgren, P.O., Hamalainen, M., Danielson, U.H. (2000). Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal Biochem*, 279, 71-78.
33. Ceccherini-Silbersteina, F., Erbaa, F., & Gagob, F. (2004). Identification of the minimal conserved structure of HIV-1 protease in the presence and absence of drug pressure. *AIDS*, 18(12), F11-F19.
34. Korber, B., Brander, C., & Haynes, B.F. (ed). (2008). *HIV immunology and sequence databases*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.
35. Pasquier, A., Millot, N., Njouom, R., Sandres, K., Cazabat, M., Puel J., Izopet, J. (2001). HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of *pol* gene sequences. *Journal of Virological Methods*, 94, 45-54.
36. Foley, B., Donegan, E., Silitonga, N., Wignall, F.S., Busch, M.P., Delwart, E.L. (2001). Importation of multiple HIV type 1 strains into West Papua, Indonesia (Irian Jaya). *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17(17), 1655-1659.
37. Merati, T.P., Ryan, C., Tumbul, S, Wirawan, D.N., Otto, B, Bakta, M, Crowe, S. (2008). *Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia*. 10 Juli 2008. <http://www.ejournal.unud.ac.id>.
38. *Protease Ab epitope map*. HIV molecular immunology database. 15 Juni 2009. <http://hiv-web.lanl.gov>.
39. van Harmelen, J.H., Shephard, E., Thomas, R., Hanke, T., Williamson, A.L., Williamson, C. (2003). Construction and characterization of a candidate HIV-1 subtype C DNA vaccine for South Africa. *Vaccine*, 21, 4380-4389.
40. International Society For Complexity Information and Design (ISCID). Consensus sequences. 15 Juni 2009, [http://www.iscid.org/encyclopedia/consensus\\_sequence](http://www.iscid.org/encyclopedia/consensus_sequence).
41. Burgers, W.A., van Harmelen, J.H., Shephard, E., Adams, C., Mgweb, T., & Bourn, W. 2006. Design and preclinical evaluation of a multigene human immunodeficiency virus type 1 subtype C DNA vaccine for clinical trial. *Journal of General Virology*, 87, 399-410.

42. Hamano, T., Sawanpanyalert, P., Yanai, H., Piyaworawong, S., Hara, T., Sapsutthipas, S., et.al. 2004. Determination of HIV type 1 CRF01\_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Research And Human Retroviruses*, 203, 337–340.
43. Brander, C., Goulder, P.J.R. (2001). The identification of optimal HIV derived CTL epitopes in diverse populations using HIV clade-specific consensus. *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.



Lampiran 1. Sekuen nukleotida gen *protease* isolat Indonesia dan isolat referensi.

|                |   |    |    |    |    |
|----------------|---|----|----|----|----|
|                | 10  | 20 | 30 | 40 | 50 |
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |    |    |    |    |
| AY358062       | CCTCAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTGTGCACAGTAAAAATAGGAGG           |    |    |    |    |
| AY945730       | .....G.....   |    |    |    |    |
| 01023107061440 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 02041108061149 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 02200603071221 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03071608061100 | .....G.....   |    |    |    |    |
| 03112408061530 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03182109061305 | .....GG.....C.....  |    |    |    |    |
| 03202209061330 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03241710061430 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03270811061130 | .....GG.....C.....  |    |    |    |    |
| 03351801071520 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 04010808060930 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 04020808060930 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 04060609061005 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 05012707061030 | .....GG.....G.....  |    |    |    |    |
| 05012908061310 | .....GG.....C.....A.....G.....GA.....                       |    |    |    |    |
| 05200404071545 | .....GG.....C.....  |    |    |    |    |
| 05210404071620 | .....GGG.....   |    |    |    |    |
| 05230404071628 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03042807061400 | .....GG.....  |    |    |    |    |
| 03022107061500 | .....GG.....  |    |    |    |    |

|                |  |    |    |    |     |
|----------------|--|----|----|----|-----|
|                | 60   | 70 | 80 | 90 | 100 |
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |    |    |    |     |
| AY358062       | ACAGCTGAAAGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAG |    |    |    |     |
| AY945730       | .....A.....  |    |    |    |     |
| 01023107061440 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 02041108061149 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 02200603071221 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 03071608061100 | G.....G.....                                       |    |    |    |     |
| 03112408061530 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 03182109061305 | G.....G.....                                       |    |    |    |     |
| 03202209061330 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 03241710061430 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 03270811061130 | .....A.....  |    |    |    |     |
| 03351801071520 | .....A.....T.....                                  |    |    |    |     |
| 04010808060930 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 04020808060930 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 04060609061005 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 05012707061030 | .....G.....T.....                                  |    |    |    |     |
| 05012908061310 | G..AG..G.....T.....                                |    |    |    |     |
| 05200404071545 | G...T...G.....                                     |    |    |    |     |
| 05210404071620 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 05230404071628 | R.....G.....                                       |    |    |    |     |
| 03042807061400 | .....G.....  |    |    |    |     |
| 03022107061500 | .....GG.....                                       |    |    |    |     |

## Lanjutan lampiran 1.

|                | 110   | 120  | 130 | 140 | 150 |  |
|----------------|---|--|-----|-----|-----|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | AAGATATAAAATTTGCCACGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATT |     |     |     |  |
| AY358062       | .G.....   |  |     |     |     |  |
| AY945730       | .....   |  |     |     |     |  |
| 01023107061440 | .....   |  |     |     |     |  |
| 02041108061149 | .....   |  |     |     |     |  |
| 02200603071221 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03071608061100 | .....G.....   |  |     |     |     |  |
| 03112408061530 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03182109061305 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03202209061330 | .....G.....   |  |     |     |     |  |
| 03241710061430 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03270811061130 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03351801071520 | .....G.....   |  |     |     |     |  |
| 04010808060930 | .....   |  |     |     |     |  |
| 04020808060930 | .....   |  |     |     |     |  |
| 04060609061005 | .....G.....   |  |     |     |     |  |
| 05012707061030 | .....A.....   |  |     |     |     |  |
| 05012908061310 | .....A.....   |  |     |     |     |  |
| 05200404071545 | .....   |  |     |     |     |  |
| 05210404071620 | .....   |  |     |     |     |  |
| 05230404071628 | .....   |  |     |     |     |  |
| 03042807061400 | .....G.....   |  |     |     |     |  |
| 03022107061500 | .....   |  |     |     |     |  |

|                | 160   | 170  | 180    | 190    | 200    |        |
|----------------|---|--|--------|--------|--------|--------|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | GGAGGTTTTATCAAGGTAAGGCCAATATGATCAGATACTTATAGAATTTG |        |        |        |        |
| AY358062       | .....   |  |        |        |        | C..... |
| AY945730       | .....   | A.....   | A..... | C..... |        |        |
| 01023107061440 | .....G.....   |  |        |        |        | G..... |
| 02041108061149 | .....   |  |        |        |        |        |
| 02200603071221 | .....R.....   |  |        |        |        |        |
| 03071608061100 | .....   |  |        |        |        |        |
| 03112408061530 | .....   |  |        |        |        |        |
| 03182109061305 | .....   | A.....   |        |        |        |        |
| 03202209061330 | .....   | G.....   |        |        |        |        |
| 03241710061430 | .....   |  |        |        | Y..... |        |
| 03270811061130 | .....   |  |        |        |        |        |
| 03351801071520 | .....   | R.....   |        |        |        |        |
| 04010808060930 | .....G.....   |  |        |        |        | G..... |
| 04020808060930 | .....   |  |        |        |        |        |
| 04060609061005 | .....   | A.....   | a..... |        |        |        |
| 05012707061030 | .....   | c.....   | R..... |        |        |        |
| 05012908061310 | .....   | c.....   |        |        |        |        |
| 05200404071545 | .....Y.....   |  |        |        |        |        |
| 05210404071620 | .....   |  |        |        |        |        |
| 05230404071628 | .....   | R.....   |        |        |        |        |
| 03042807061400 | .....   | A.....   |        |        |        |        |
| 03022107061500 | .....   | A.....   |        |        | R..... |        |

## Lanjutan lampiran 1.

|                | 210  | 220 | 230 | 240 | 250 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | TGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACA |     |     |     |     |
| AY358062       | .....G.....A.....                                  |     |     |     |     |
| AY945730       | .....G.....  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....G.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....G..A.....                                     |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....R..GA.....                                    |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....G.....C.....A.....                            |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....R.....  |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....GA.....C.....                                 |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....G.....  |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....GA.....                                       |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....R.....  |     |     |     |     |

|                | 260  | 270 | 280 | 290 |  |
|----------------|--|-----|-----|-----|--|
| SKD CRF01_AE   | TAATTGGACGAAATATGTTGACTCAGATTGGTTGACTTTAAATTTC |     |     |     |  |
| AY358062       | .....  |     |     |     |  |
| AY945730       | .....T.....                                    |     |     |     |  |
| 01023107061440 | .....C.....A.....T.....                        |     |     |     |  |
| 02041108061149 | .....C.....T.....                              |     |     |     |  |
| 02200603071221 | .....C.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03071608061100 | .....C.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03112408061530 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03182109061305 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03202209061330 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03241710061430 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 03270811061130 | .....C.....A.....C.....T.....                  |     |     |     |  |
| 03351801071520 | .....C.....A.....T.....                        |     |     |     |  |
| 04010808060930 | .....C.....A.....T.....                        |     |     |     |  |
| 04020808060930 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 04060609061005 | .....CC.....T.....                             |     |     |     |  |
| 05012707061030 | .....C.....T.....                              |     |     |     |  |
| 05012908061310 | .....C.....T.....                              |     |     |     |  |
| 05200404071545 | .....A.....T.....                              |     |     |     |  |
| 05210404071620 | .....GA.....A.....T.....                       |     |     |     |  |
| 05230404071628 | .....G.....C.....T.....                        |     |     |     |  |
| 03042807061400 | .....CC.....T.....                             |     |     |     |  |
| 03022107061500 | .....Y.....M.....T.....                        |     |     |     |  |

**Lampiran 2. Sekuen asam amino protease isolat Indonesia dan isolat referensi.**

|                | 10   | 20 | 30 | 40 | 50 |
|----------------|--|----|----|----|----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |    |    |    |    |
| AY358062       | EQITLWQRPLVIVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDINLPCKWKPKMIGGI |    |    |    |    |
| AY945730       | .....V.....  |    |    |    |    |
| 01023107061440 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 02041108061149 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 02200603071221 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 03071608061100 | ..V.....V.....R.....                               |    |    |    |    |
| 03112408061530 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 03182109061305 | ..V.....A.....R.....                               |    |    |    |    |
| 03202209061330 | ..V.....R.....R.....                               |    |    |    |    |
| 03241710061430 | .....R.....  |    |    |    |    |
| 03270811061130 | ..V.....   |    |    |    |    |
| 03351801071520 | ..V.....F.E.....                                   |    |    |    |    |
| 04010808060930 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 04020808060930 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
| 04060609061005 | ..V.....D.....                                     |    |    |    |    |
| 05012707061030 | ..V.....R.....F.E.....                             |    |    |    |    |
| 05012908061310 | ..V.....I.....R.VR.....F.E.....                    |    |    |    |    |
| 05200404071545 | ..V.....P.....R.....                               |    |    |    |    |
| 05210404071620 | ..RV.....R.....                                    |    |    |    |    |
| 05230404071628 | ..V.....X.....R.....                               |    |    |    |    |
| 03042807061400 | .....R.....D.....                                  |    |    |    |    |
| 03022107061500 | ..V.....R.....                                     |    |    |    |    |
|                | 60   | 70 | 80 | 90 |    |
|                | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |    |    |    |    |
| SKD CRF01_AE   | GGFIKVRQYDQILIEIGCKKAIGTVLVEGPTPVNIGRNMLTQICQTLNF  |    |    |    |    |
| AY358062       | .....I.....  |    |    |    |    |
| AY945730       | .....E.P.....                                      |    |    |    |    |
| 01023107061440 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 02041108061149 | .....I.....  |    |    |    |    |
| 02200603071221 | ..X.....   |    |    |    |    |
| 03071608061100 | .....I.....  |    |    |    |    |
| 03112408061530 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 03182109061305 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 03202209061330 | .....X.I.....I.....                                |    |    |    |    |
| 03241710061430 | .....X.....I.....I.....                            |    |    |    |    |
| 03270811061130 | .....R.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 03351801071520 | ..X.....X.....I.....                               |    |    |    |    |
| 04010808060930 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 04020808060930 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 04060609061005 | .....I.....  |    |    |    |    |
| 05012707061030 | ..X.....I.....                                     |    |    |    |    |
| 05012908061310 | .....I.....  |    |    |    |    |
| 05200404071545 | ..X.....I.....I.....                               |    |    |    |    |
| 05210404071620 | .....I.....I.....                                  |    |    |    |    |
| 05230404071628 | .....X.....  |    |    |    |    |
| 03042807061400 | .....I.....  |    |    |    |    |
| 03022107061500 | .....X.....X.....X.....X.....                      |    |    |    |    |

Lampiran 3. Homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease isolat Indonesia dan isolat referensi

|          |       | Homologi asam amino protease |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |       |       |       |       |       |
|----------|-------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nukltd.  | SKD   | AY35                         | AY940 | 0102  | 0204  | 0220  | 0307  | 0318  | 0320  | 0324  | 03270 | 0335  | 0401  | 0402  | 0406  | 050127 | 050129 | 0520  | 0521  | 0523  | 0304  | 0302  |
| SKD      | ID    | 0.989                        | 0.969 | 0.959 | 0.969 | 0.969 | 0.959 | 0.949 | 0.939 | 0.959 | 0.969 | 0.939 | 0.959 | 0.959 | 0.969 | 0.939  | 0.919  | 0.939 | 0.949 | 0.959 | 0.969 | 0.939 |
| AY358062 | 0.983 | ID                           | 0.959 | 0.949 | 0.959 | 0.959 | 0.949 | 0.939 | 0.929 | 0.949 | 0.979 | 0.929 | 0.949 | 0.949 | 0.959 | 0.929  | 0.909  | 0.929 | 0.939 | 0.949 | 0.959 | 0.929 |
| AY945730 | 0.979 | 0.969                        | ID    | 0.929 | 0.939 | 0.939 | 0.949 | 0.919 | 0.909 | 0.939 | 0.939 | 0.909 | 0.929 | 0.929 | 0.939 | 0.909  | 0.888  | 0.909 | 0.919 | 0.929 | 0.939 | 0.909 |
| 0102     | 0.969 | 0.956                        | 0.956 | ID    | 0.989 | 0.969 | 0.979 | 1.000 | 0.989 | 0.979 | 0.949 | 0.939 | 1.000 | 1.000 | 0.969 | 0.959  | 0.939  | 0.979 | 0.989 | 0.959 | 0.969 | 0.949 |
| 0204     | 0.976 | 0.959                        | 0.962 | 0.983 | ID    | 0.979 | 0.989 | 0.969 | 0.969 | 0.969 | 0.959 | 0.929 | 0.989 | 0.989 | 0.979 | 0.969  | 0.949  | 0.969 | 0.979 | 0.969 | 0.979 | 0.949 |
| 0220     | 0.973 | 0.956                        | 0.959 | 0.973 | 0.989 | ID    | 0.969 | 0.969 | 0.949 | 0.949 | 0.959 | 0.949 | 0.969 | 0.969 | 0.959 | 0.969  | 0.929  | 0.949 | 0.959 | 0.969 | 0.979 | 0.949 |
| 0307     | 0.966 | 0.956                        | 0.966 | 0.973 | 0.983 | 0.973 | ID    | 0.979 | 0.969 | 0.959 | 0.949 | 0.919 | 0.979 | 0.979 | 0.969 | 0.959  | 0.939  | 0.959 | 0.969 | 0.959 | 0.969 | 0.949 |
| 0311     | 0.976 | 0.959                        | 0.962 | 0.986 | 0.996 | 0.986 | 0.979 | ID    | 0.989 | 0.979 | 0.949 | 0.939 | 1.000 | 1.000 | 0.969 | 0.959  | 0.939  | 0.979 | 0.989 | 0.959 | 0.969 | 0.949 |
| 0318     | 0.969 | 0.952                        | 0.952 | 0.979 | 0.983 | 0.973 | 0.979 | 0.986 | ID    | 0.969 | 0.969 | 0.929 | 0.989 | 0.989 | 0.989 | 0.949  | 0.929  | 0.969 | 0.979 | 0.989 | 0.959 | 0.949 |
| 0320     | 0.966 | 0.952                        | 0.956 | 0.976 | 0.986 | 0.976 | 0.973 | 0.989 | 0.976 | ID    | 0.959 | 0.939 | 0.979 | 0.979 | 0.949 | 0.939  | 0.919  | 0.959 | 0.969 | 0.979 | 0.949 | 0.939 |
| 0324     | 0.979 | 0.962                        | 0.969 | 0.976 | 0.986 | 0.976 | 0.969 | 0.989 | 0.976 | 0.979 | ID    | 0.919 | 0.979 | 0.979 | 0.949 | 0.939  | 0.919  | 0.959 | 0.969 | 0.939 | 0.949 | 0.929 |
| 0327     | 0.962 | 0.959                        | 0.949 | 0.956 | 0.966 | 0.962 | 0.956 | 0.952 | 0.952 | 0.952 | ID    | 0.929 | 0.949 | 0.949 | 0.959 | 0.929  | 0.909  | 0.929 | 0.939 | 0.949 | 0.939 | 0.929 |
| 0335     | 0.966 | 0.959                        | 0.956 | 0.962 | 0.966 | 0.969 | 0.959 | 0.969 | 0.962 | 0.966 | 0.959 | ID    | 0.939 | 0.939 | 0.929 | 0.959  | 0.919  | 0.919 | 0.929 | 0.919 | 0.909 | 0.909 |
| 0401     | 0.969 | 0.956                        | 0.956 | 1.000 | 0.983 | 0.973 | 0.973 | 0.986 | 0.979 | 0.976 | 0.956 | 0.962 | ID    | 1.000 | 0.969 | 0.959  | 0.939  | 0.979 | 0.989 | 0.959 | 0.969 | 0.949 |
| 0402     | 0.979 | 0.962                        | 0.966 | 0.989 | 0.993 | 0.983 | 0.983 | 0.956 | 0.989 | 0.986 | 0.966 | 0.973 | 0.989 | ID    | 0.969 | 0.959  | 0.939  | 0.979 | 0.989 | 0.959 | 0.969 | 0.949 |
| 0406     | 0.959 | 0.942                        | 0.952 | 0.959 | 0.976 | 0.969 | 0.959 | 0.973 | 0.966 | 0.962 | 0.956 | 0.952 | 0.959 | 0.969 | ID    | 0.949  | 0.929  | 0.949 | 0.959 | 0.949 | 0.959 | 0.949 |
| 050127   | 0.959 | 0.942                        | 0.946 | 0.966 | 0.983 | 0.979 | 0.966 | 0.979 | 0.966 | 0.969 | 0.949 | 0.966 | 0.966 | 0.976 | 0.962 | ID     | 0.959  | 0.939 | 0.949 | 0.939 | 0.949 | 0.919 |
| 050129   | 0.939 | 0.922                        | 0.925 | 0.946 | 0.962 | 0.952 | 0.952 | 0.959 | 0.952 | 0.949 | 0.932 | 0.939 | 0.946 | 0.956 | 0.939 | 0.966  | ID     | 0.919 | 0.929 | 0.929 | 0.929 | 0.898 |
| 0520     | 0.962 | 0.946                        | 0.949 | 0.973 | 0.983 | 0.973 | 0.973 | 0.986 | 0.979 | 0.976 | 0.949 | 0.956 | 0.973 | 0.983 | 0.959 | 0.966  | 0.956  | ID    | 0.969 | 0.939 | 0.949 | 0.929 |
| 0521     | 0.966 | 0.949                        | 0.952 | 0.976 | 0.986 | 0.976 | 0.969 | 0.989 | 0.976 | 0.979 | 0.952 | 0.959 | 0.976 | 0.986 | 0.962 | 0.969  | 0.949  | 0.976 | ID    | 0.949 | 0.959 | 0.939 |
| 0523     | 0.969 | 0.952                        | 0.959 | 0.969 | 0.986 | 0.983 | 0.973 | 0.983 | 0.976 | 0.973 | 0.959 | 0.959 | 0.969 | 0.979 | 0.966 | 0.969  | 0.952  | 0.973 | 0.973 | ID    | 0.949 | 0.939 |
| 0304     | 0.973 | 0.956                        | 0.959 | 0.966 | 0.983 | 0.976 | 0.966 | 0.979 | 0.966 | 0.969 | 0.949 | 0.952 | 0.966 | 0.976 | 0.979 | 0.969  | 0.946  | 0.966 | 0.969 | 0.969 | ID    | 0.929 |
| 0302     | 0.966 | 0.949                        | 0.952 | 0.966 | 0.976 | 0.976 | 0.962 | 0.976 | 0.966 | 0.966 | 0.956 | 0.962 | 0.966 | 0.976 | 0.966 | 0.962  | 0.939  | 0.962 | 0.966 | 0.969 | 0.966 | 0.929 |

Lampiran 4. Perbedaan asam amino protein protease HIV-1 antara sekuen konsensus CRF01\_AE dengan isolat Indonesia dan Thailand.

| Isolat HIV<br>CRF01_AE | Pembelian asam amino |     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
|------------------------|----------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
|                        | 2Q→R                 | 3→V | 10I→V | 12I→V | 13V→I | 16G→A | 17G→R | 19I→V | 20K→R | 33I→I | 35D→I | 37N→I | 45K→R | 60D→I | 63I→I | 70K→R | 77V→R | 82V→I | 97L→I |   |
| AY358062               | -                    | -   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - |
| AY945730               | -                    | -   | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | - |
| 0102                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0204                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 0220                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - |
| 0307                   | -                    | +   | +     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 0311                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0318                   | -                    | +   | -     | -     | -     | +     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0320                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0324                   | -                    | -   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0327                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | - |
| 0335                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | + |
| 0401                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0402                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0406                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 050127                 | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 050129                 | -                    | +   | -     | -     | +     | -     | +     | -     | +     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 0520                   | -                    | +   | -     | +     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0521                   | +                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | + |
| 0523                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 0304                   | -                    | -   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | - |
| 0302                   | -                    | +   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - |

Penomoran asam amino di mulai dari residu N-terminal.

Simbol + dan - menyatakan ada dan tidak adanya asam amino dibandingkan dengan asam amino sekuen konsensus HIV-1 CRF01\_AE (GenBank)



**Lampiran 5.**  
**Sekuen nukleotida gen *reverse transcriptase* isolat Indonesia dan isolat referensi**

|                | 10  | 20  | 30    | 40    | 50    |
|----------------|---|---|-------|-------|-------|
| SKD CRF01_AE   | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... | CCAATTAGTCCTATTGACACTGTACCAGTAACATTAAGCCAGGAATGGA |       |       |       |
| AY358062       | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| AY945730       | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 01023107061440 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 02041108061149 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 02200603071221 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03071608061100 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03112408061530 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03182109061305 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03202209061330 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03241710061430 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03270811061130 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03351801071520 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 04010808060930 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 04020808060930 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 04060609061005 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 05012707061030 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 05012908061310 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 05200404071545 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 05210404071620 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 05230404071628 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03042807061400 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03022107061500 | .....   | .....   | ..... | ..... | ..... |

|                | 60  | 70   | 80    | 90    | 100   |
|----------------|---|--|-------|-------|-------|
| SKD CRF01_AE   | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... | TGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTGACAGAGRAAAAAATAAAAGCAT |       |       |       |
| AY358062       | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| AY945730       | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 01023107061440 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 02041108061149 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 02200603071221 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03071608061100 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03112408061530 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03182109061305 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03202209061330 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03241710061430 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03270811061130 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03351801071520 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 04010808060930 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 04020808060930 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 04060609061005 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 05012707061030 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 05012908061310 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 05200404071545 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 05210404071620 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 05230404071628 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03042807061400 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |
| 03022107061500 | .....   | .....  | ..... | ..... | ..... |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 110   | 120 | 130 | 140 | 150 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....               |     |     |     |     |
| AY358062       | TAACAGAAATTTGTAAGAGATCGAAGAGGAAGGAAAAATCTCAAAAATT |     |     |     |     |
| AY945730       | .G.....A.....                                     |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....A.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....A.....G.....                                 |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....T.....A.....Y.....                           |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....G.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....C.....GA.....A.....                          |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....G.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....R.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....R.....T.....                                 |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....A.....G.....A.....                           |     |     |     |     |
| 04060609061005 | ...TG.....G.....A.....                            |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....C.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....C.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....Y.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....G.C.....A.....                               |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....R.....                                       |     |     |     |     |
| 03042807061400 | ...TG.....G.....A.....                            |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....T.....                                       |     |     |     |     |

|                | 160  | 170 | 180 | 190 | 200 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....              |     |     |     |     |
| AY358062       | GGCCCTGAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCTATAAAGAAAAGGA |     |     |     |     |
| AY945730       | .....  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....  |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....  |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....T.....S.....                                |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....  |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....T.....G.....                                |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....T.....R.....                                |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....  |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....  |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....T.....                                      |     |     |     |     |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 210   | 220 | 230 | 240 | 250 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....           |     |     |     |     |
| AY358062       | CAGCACCAAAATGGAGGAAATTAGTAGATTTCAGAGAGCTCAATAAAAGAA |     |     |     |     |
| AY945730       | T.....  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....A.G.....T.....AG.                              |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....T.....A.G.....T.....                           |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....A.G.....T.....                                 |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....A.G.....T.....T.....AG.                        |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....A.G.....T.....A.....                           |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....T.....A.G.....T.....A.....                     |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....A.G.....T.....A.....                           |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....A.G.....T.....A.....                           |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....R.....R.R.....                                 |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....R.....R.R.....                                 |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A.G.....T.....AG.                              |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....A.G.....T.....                                 |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....A.....A.G.....R.....                           |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....A.G.....T.....Y.....                           |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....A.G.....T.....Y.....                           |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....Y.....A.G.....T.....                           |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....A.G.....T.....A.....                           |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....A.....A.G.....                                 |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....A.....A.G.....                                 |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....   |     |     |     |     |

|                | 260  | 270 | 280 | 290 | 300 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |     |     |     |     |
| AY358062       | CTCAGGACTTTTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCGCATCCAGCAGGTTTA |     |     |     |     |
| AY945730       | .....A.....G.....                                  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....C.....  |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....  |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....  |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....  |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....  |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....  |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....  |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....  |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....  |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....A.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....Y.....  |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....  |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....  |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....  |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....A.....A.....R.....                            |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....A.....A.....T.....                            |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....  |     |     |     |     |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 310  | 320 | 330 | 340 | 350 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....              |     |     |     |     |
| AY358062       | AAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTGGGAGATGCATATTTTC |     |     |     |     |
| AY945730       | .....G..G.....                                   |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....A.A.....                                    |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....M.....T.....                                |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....W.....T.....R.....                          |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....Y.....                                      |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....W.....                                      |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....T.....C.....                                |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....W.....W.....T.....                          |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....A.....Y.....                                |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....T.....                                      |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....Y.....                                      |     |     |     |     |

|                | 360   | 370 | 380 | 390 | 400 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....               |     |     |     |     |
| AY358062       | AGTTCCTTTAGATGAAAGCTTAGAAAGTATACTGCATTACCATAACCTA |     |     |     |     |
| AY945730       | .....C.....                                       |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....KK.....G.....                                |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....C.....                                       |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....K.....R.....                                 |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....A.....R.....W.....                           |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....AY.....                                      |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....GR.....                                      |     |     |     |     |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 410   | 420   | 430 | 440 | 450 |  |
|----------------|---|---|-----|-----|-----|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | GTATAACAATGAGACACCAGGAATCAGATATCAGTACAATGTGCTGCCA |     |     |     |  |
| AY358062       | .....   | .....   |     |     |     |  |
| AY945730       | ..C.....  | .....   |     |     |     |  |
| 01023107061440 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 02041108061149 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 02200603071221 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03071608061100 | ..C.....  | .....G.....A.....                                 |     |     |     |  |
| 03112408061530 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03182109061305 | ..C.....  | .....G.....R.....A.....                           |     |     |     |  |
| 03202209061330 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03241710061430 | .....   | .....G.....A.....                                 |     |     |     |  |
| 03270811061130 | .....   | .....T.....                                       |     |     |     |  |
| 03351801071520 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 04010808060930 | .....   | .....K.....A.....                                 |     |     |     |  |
| 04020808060930 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 04060609061005 | .....R.....                                     | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 05012707061030 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 05012908061310 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 05200404071545 | ..C.....  | .....WK.....T.....S.....A.....                    |     |     |     |  |
| 05210404071620 | .....   | .....W.....W.....Y.....R.....W.....               |     |     |     |  |
| 05230404071628 | .....   | .....K.....A.....T.....                           |     |     |     |  |
| 03042807061400 | .....   | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03022107061500 | .....   | .....K.....R.....                                 |     |     |     |  |

|                | 460                                 | 470   | 480 | 490 | 500 |  |
|----------------|-------------------------------------|---|-----|-----|-----|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | CAGGGATGGAAGGATCACCGGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAAAAAT |     |     |     |  |
| AY358062       | .....                               | .....T.....G.....                                 |     |     |     |  |
| AY945730       | .....                               | .....G.....                                       |     |     |     |  |
| 01023107061440 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 02041108061149 | .....G.....                         | .....A.....Y.....T.....                           |     |     |     |  |
| 02200603071221 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03071608061100 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03112408061530 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03182109061305 | .....                               | .....A.....R.....S.....K.....                     |     |     |     |  |
| 03202209061330 | .....                               | .....A.....A.....                                 |     |     |     |  |
| 03241710061430 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03270811061130 | .....                               | .....T.....                                       |     |     |     |  |
| 03351801071520 | .....                               | .....A.....W.....                                 |     |     |     |  |
| 04010808060930 | .....                               | .....A.....YC.....                                |     |     |     |  |
| 04020808060930 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 04060609061005 | .....                               | .....AA.....A.....                                |     |     |     |  |
| 05012707061030 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 05012908061310 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 05200404071545 | .....                               | .....AT.....CA.....                               |     |     |     |  |
| 05210404071620 | .....                               | .....AA.....                                      |     |     |     |  |
| 05230404071628 | .....                               | .....M.....T.....                                 |     |     |     |  |
| 03042807061400 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |
| 03022107061500 | .....                               | .....A.....                                       |     |     |     |  |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 510                                 | 520   | 530   | 540   | 550   |
|----------------|-------------------------------------|---|-------|-------|-------|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | CTTAGAGCCCTTTAGATAAAAAATCCAGAAATGGTTATCTATCAATACA |       |       |       |
| AY358062       | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| AY945730       | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 01023107061440 | .....                               | AG  | ..... | ..... | ..... |
| 02041108061149 | .....                               | AG  | G     | ..... | T     |
| 02200603071221 | .....                               | AG  | ..... | ..... | ..... |
| 03071608061100 | .....                               | AG  | G     | C     | ..... |
| 03112408061530 | .....                               | AG  | ..... | A     | T     |
| 03182109061305 | .....                               | AG  | ..... | ..... | ..... |
| 03202209061330 | .....                               | AG  | ..... | A     | A     |
| 03241710061430 | .....                               | AG  | ..... | ..... | ..... |
| 03270811061130 | .....                               | G   | ..... | AA    | ..... |
| 03351801071520 | .....                               | R   | ..... | A     | ..... |
| 04010808060930 | .....                               | AG  | ..... | ..... | ..... |
| 04020808060930 | .....                               | AG  | ..... | ..... | C     |
| 04060609061005 | .....                               | A   | ..... | A     | ..... |
| 05012707061030 | .....                               | AG  | ..... | ..... | Y     |
| 05012908061310 | .....                               | A   | ..... | ..... | Y     |
| 05200404071545 | .....                               | AG  | M     | ..... | ..... |
| 05210404071620 | .....                               | AG  | ..... | ..... | G     |
| 05230404071628 | .....                               | .....   | C     | ..... | A     |
| 03042807061400 | .....                               | .....   | ..... | ..... | A     |
| 03022107061500 | .....                               | AG  | ..... | ..... | A     |
|                | 560                                 | 570   | 580   | 590   | 600   |
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | TGGATGACTTGTATGTAGGATCTGATTAGAAATAGGGCAGCACAGAACA |       |       |       |
| AY358062       | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| AY945730       | .....                               | .....   | C     | ..... | A     |
| 01023107061440 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 02041108061149 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 02200603071221 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03071608061100 | .....                               | T   | ..... | ..... | ..... |
| 03112408061530 | .....                               | .....   | ..... | ..... | T     |
| 03182109061305 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03202209061330 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03241710061430 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03270811061130 | .....                               | .....   | ..... | G     | ..... |
| 03351801071520 | .....                               | .....   | ..... | R     | ..... |
| 04010808060930 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 04020808060930 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 04060609061005 | .....                               | .....   | ..... | ..... | R     |
| 05012707061030 | .....                               | .....   | ..... | ..... | T     |
| 05012908061310 | .....                               | Y   | ..... | ..... | ..... |
| 05200404071545 | .....                               | .....   | ..... | ..... | G     |
| 05210404071620 | .....                               | .....   | R     | ..... | ..... |
| 05230404071628 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |
| 03042807061400 | .....                               | .....   | ..... | ..... | T     |
| 03022107061500 | .....                               | .....   | ..... | ..... | ..... |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 610   | 620 | 630 | 640 | 650 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....   |     |     |     |     |
| AY358062       | AAAATAGAGGAGCTAAGAGCTCATCTATTGAGCTGGGGATTACTACACC |     |     |     |     |
| AY945730       | .....A.....G.....C.....                           |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....R..R.....R.....                              |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....R.....Y.....                                 |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....R.....                                       |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....   |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....   |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....R.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....GA.....                                      |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....G.....T.....T.....                           |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....G.G.....T.....T.....                         |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A..A.....                                    |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....C.....                                       |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....G..R.....G.....                              |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....G..Y.....                                    |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....G..Y.....                                    |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....A.....                                       |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....   |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....   |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....G.....G.....                                 |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....   |     |     |     |     |

|                | 660  | 670 | 680 | 690 | 700 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |     |     |     |     |
| AY358062       | AGACAAAAGCATCAGAAGGAACCTCCATTTCCTTTGGATGGGATATGAAC |     |     |     |     |
| AY945730       | .....T.....  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....R.....  |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....  |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....  |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....G.....  |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....  |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....G.....  |     |     |     |     |
| 03202209061330 | R.....G.....                                       |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....  |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....  |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....G.....  |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....  |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....  |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....R.....  |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....S.....  |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....R.....  |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....  |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....  |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....  |     |     |     |     |

## Lanjutan lampiran 5.

|                | 710  | 720 | 730 | 740 | 750 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....                |     |     |     |     |
| AY358062       | TCCATCCTGACAGATGGACAGTCCAGCCTATAGAACTGCCAGAAAAAGAC |     |     |     |     |
| AY945730       | .....A.....T                                       |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....A.....G..                                     |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....R.....A.....R..                               |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .T.....A.....S.T.....                              |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .Y.....A.....R.Y.....                              |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....A.....A.....G..                               |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....A.....A.....G..                               |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....A.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....A.....A.....A.....                            |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....A.....R.....                                  |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....A.....R.....T.....                            |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....A.....T.....G..                               |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....A.....  |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .Y.....A.....                                      |     |     |     |     |

|                | 760   | 770 | 780 | 790 | 800 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... .....               |     |     |     |     |
| AY358062       | AGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAATTAGTGGGAAAATAAATTGGGC |     |     |     |     |
| AY945730       | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....T.....T.....                                 |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....T.....A.....                                 |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....T.....C.....                                 |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....T.....T.....C.....                           |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....T.....C.....                                 |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....T.....                                       |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....T.....                                       |     |     |     |     |



## Lanjutan lampiran 5.

|                | 810  | 820 | 830 | 840 | 850 |
|----------------|--|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....    |     |     |     |     |
| AY358062       | AAGTCAAATTTATGCAGGGATTAAGGTAAAGCAACTGTGTAAACTCCTCA |     |     |     |     |
| AY945730       | .....C.....G.....                                  |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....C.....R...G...T.....                          |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....C...A.....T.....                              |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....CC.....A...T.....                             |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....Y...C.....T.....                              |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....C.....T.....G.....                            |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....C.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....C.....A.....                                  |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....C.....T.....G.....                            |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....C...C.....T.....                              |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....C.....T.....                                  |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....C.....T.....G.....                            |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....C...C.....T.....                              |     |     |     |     |

|                | 860   | 870 | 880 | 890 | 900 |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....   |     |     |     |     |
| AY358062       | GGGAGCTAAAGCACTAACAGACATAGTACCACTGACTGAAGAAGCAGAA |     |     |     |     |
| AY945730       | .....G.T.....                                     |     |     |     |     |
| 01023107061440 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 02041108061149 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 02200603071221 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 03071608061100 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 03112408061530 | .....A...G.....G.....                             |     |     |     |     |
| 03182109061305 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 03202209061330 | .....A.....G.....A.....                           |     |     |     |     |
| 03241710061430 | .....G...T.....                                   |     |     |     |     |
| 03270811061130 | .....A.....G.....                                 |     |     |     |     |
| 03351801071520 | .....G.....S.....                                 |     |     |     |     |
| 04010808060930 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 04020808060930 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 04060609061005 | .....G.....AC.....                                |     |     |     |     |
| 05012707061030 | .....A...G.....G.....M.....                       |     |     |     |     |
| 05012908061310 | .....A...G.....G.....M.....                       |     |     |     |     |
| 05200404071545 | .....R.....R...G.....W.....                       |     |     |     |     |
| 05210404071620 | .....G.....                                       |     |     |     |     |
| 05230404071628 | .....Y...G.....                                   |     |     |     |     |
| 03042807061400 | .....G.....AC.....                                |     |     |     |     |
| 03022107061500 | .....G.....                                       |     |     |     |     |

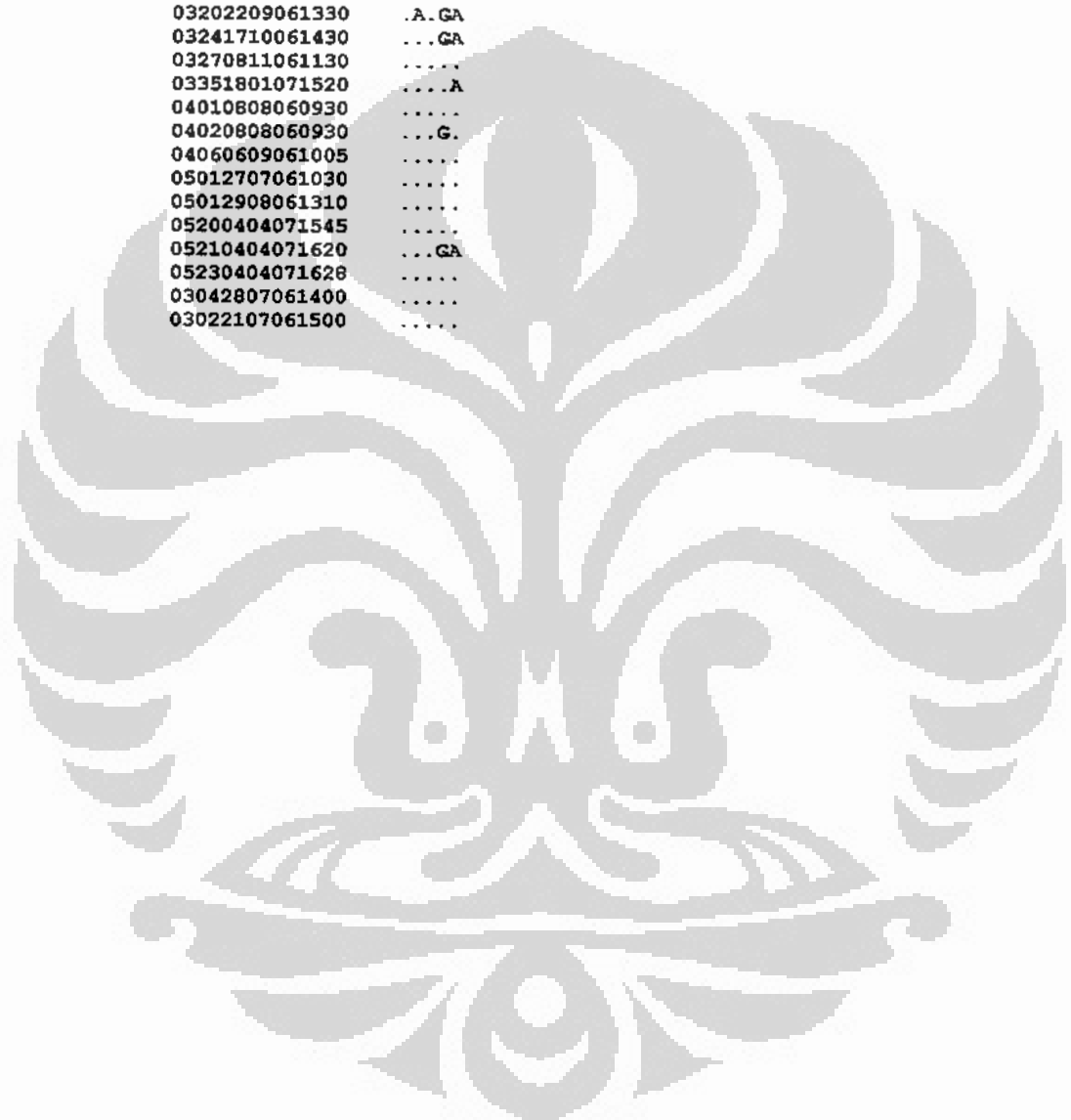
## Lanjutan lampiran 5.

|                | 910                                 | 920  | 930          | 940         | 950         |  |
|----------------|-------------------------------------|--|--------------|-------------|-------------|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | TTAGAGTTGGCAGAGAACAGGGAGATTCTAAAAACCCCTGTGCATGGAGT |              |             |             |  |
| AY358062       | .....A.....                         | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| AY945730       | .....                               | .....T.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 01023107061440 | .....R.....                         | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 02041108061149 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 02200603071221 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 03071608061100 | .....                               | .....A.....  | .....A.....  | .....       | .....       |  |
| 03112408061530 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 03182109061305 | .....R.....                         | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 03202209061330 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 03241710061430 | .....                               | .....  | .....R.....  | .....       | .....       |  |
| 03270811061130 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....A..... | .....       |  |
| 03351801071520 | .....                               | .....T.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 04010808060930 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....       |  |
| 04020808060930 | .....                               | .....A.....  | .....A.....  | .....       | .....       |  |
| 04060609061005 | .....                               | .....A.....  | .....A.....  | .....       | .....       |  |
| 05012707061030 | .....                               | .....  | .....A.....  | .....C..... | .....       |  |
| 05012908061310 | .....                               | .....  | .....A.....  | .....C..... | .....       |  |
| 05200404071545 | .....                               | .....  | .....A.....  | .....       | .....       |  |
| 05210404071620 | .....                               | .....R.....  | .....RA..... | .....A..... | .....       |  |
| 05230404071628 | .....                               | .....  | .....A.....  | .....       | .....       |  |
| 03042807061400 | .....                               | .....A.....  | .....        | .....       | .....R..... |  |
| 03022107061500 | .....                               | .....  | .....A.....  | .....A..... | .....       |  |

|                | 960                                 | 970   | 980         | 990         | 1000              |  |
|----------------|-------------------------------------|---|-------------|-------------|-------------------|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ATATTATGACCCATCAAAAGACTTAGTAGCAGAGTACAGAAACAAGGGC |             |             |                   |  |
| AY358062       | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....G.....       |  |
| AY945730       | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 01023107061440 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 02041108061149 | .....                               | .....   | .....A..... | .....       | .....             |  |
| 02200603071221 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 03071608061100 | .....C.....                         | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 03112408061530 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 03182109061305 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 03202209061330 | .....T.....                         | .....   | .....A..... | .....A..... | .....G.....G..... |  |
| 03241710061430 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....C.....G..... |  |
| 03270811061130 | .....                               | .....   | .....A..... | .....       | .....             |  |
| 03351801071520 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 04010808060930 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 04020808060930 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 04060609061005 | .....                               | .....A.....                                       | .....       | .....       | .....A.....       |  |
| 05012707061030 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 05012908061310 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....             |  |
| 05200404071545 | .....                               | .....R.....                                       | .....       | .....       | .....             |  |
| 05210404071620 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....R.....       |  |
| 05230404071628 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....G.....       |  |
| 03042807061400 | .....                               | .....   | .....       | .....       | .....A.....       |  |
| 03022107061500 | .....                               | .....   | .....T..... | .....       | .....             |  |

**Lanjutan lampiran 5.**

|                |       |
|----------------|-------|
| SKD CRF01_AE   | ....I |
| AY358062       | AGGAC |
| AY945730       | .A... |
| 01023107061440 | ..... |
| 02041108061149 | ..... |
| 02200603071221 | ..... |
| 03071608061100 | ..... |
| 03112408061530 | ..... |
| 03182109061305 | ..... |
| 03202209061330 | .A.GA |
| 03241710061430 | ...GA |
| 03270811061130 | ..... |
| 03351801071520 | ....A |
| 04010808060930 | ..... |
| 04020808060930 | ...G. |
| 04060609061005 | ..... |
| 05012707061030 | ..... |
| 05012908061310 | ..... |
| 05200404071545 | ..... |
| 05210404071620 | ...GA |
| 05230404071628 | ..... |
| 03042807061400 | ..... |
| 03022107061500 | ..... |



**Lampiran 6.**  
**Sekuen asam amino reverse transkriptase isolat Indonesia dan isolat referensi.**

|                | 10                                  | 20  | 30 | 40 | 50  |  |
|----------------|-------------------------------------|---|----|----|-----|--|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | PISPIDTVEVTLKPCMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICKEMEEEGKISKI  |    |    |     |  |
| AY358062       | .....K.....R.....                   | .....   |    |    |     |  |
| AY945730       | .....R.....                         | .....K.....   |    |    |     |  |
| 01023107061440 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 02041108061149 | .....K.....                         | .....K.....R.....                                   |    |    |     |  |
| 02200603071221 | .....                               | .....N.....K.....X.....                             |    |    |     |  |
| 03071608061100 | .....K.....                         | .....E.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 03112408061530 | .....K.....                         | .....N.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 03182109061305 | X.....                              | .....X.....E.....K.....                             |    |    |     |  |
| 03202209061330 | .....                               | .....X.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 03241710061430 | .....K.....                         | .....K.....   |    |    |     |  |
| 03270811061130 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 03351801071520 | .....                               | .....X.....X.....                                   |    |    |     |  |
| 04010808060930 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 04020808060930 | .....                               | .....K.....T.....                                   |    |    |     |  |
| 04060609061005 | .....                               | .....I.....M.....E.....K.....                       |    |    |     |  |
| 05012707061030 | .....X.....                         | .....T.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 05012908061310 | .....X.....                         | .....T.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 05200404071545 | .....                               | .....X.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 05210404071620 | .....                               | .....X.....D.....K.....                             |    |    |     |  |
| 05230404071628 | .....                               | .....X.....X.....                                   |    |    |     |  |
| 03042807061400 | .....                               | .....I.....M.....E.....K.....                       |    |    |     |  |
| 03022107061500 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
|                | 60                                  | 70  | 80 | 90 | 100 |  |
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | GRENPNYNTPEVFAIKKQDSTKWRKLVDFRELNKRQDFWEVQLGIPHPAGL |    |    |     |  |
| AY358062       | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| AY945730       | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 01023107061440 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 02041108061149 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 02200603071221 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 03071608061100 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 03112408061530 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 03182109061305 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 03202209061330 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 03241710061430 | .....                               | .....K.....   |    |    |     |  |
| 03270811061130 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 03351801071520 | .....                               | .....X.XX.....E.....                                |    |    |     |  |
| 04010808060930 | .....                               | .....K.....I.....                                   |    |    |     |  |
| 04020808060930 | .....                               | .....X.....   |    |    |     |  |
| 04060609061005 | .....                               | .....X.....   |    |    |     |  |
| 05012707061030 | .....                               | .....X.....X.....                                   |    |    |     |  |
| 05012908061310 | .....                               | .....X.....   |    |    |     |  |
| 05200404071545 | .....                               | .....R.....X.....                                   |    |    |     |  |
| 05210404071620 | .....                               | .....X.....K.....                                   |    |    |     |  |
| 05230404071628 | .....                               | .....X.....   |    |    |     |  |
| 03042807061400 | .....                               | .....   |    |    |     |  |
| 03022107061500 | .....                               | .....   |    |    |     |  |

## Lanjutan lampiran 6.

|                | 110                                 | 120   | 130       | 140    | 150            |
|----------------|-------------------------------------|---|-----------|--------|----------------|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | KKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESEFRKYTAFTIPSINNETPCIRYQYNVLP |           |        |                |
| AY358062       | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| AY945730       | .....                               | I.....  | .....     | T..... | .....          |
| 01023107061440 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 02041108061149 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 02200603071221 | .....                               | X.....  | .....     | .....  | .....          |
| 03071608061100 | .....                               | .....   | .....     | T..... | V.....         |
| 03112408061530 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 03182109061305 | .....                               | .....   | .....     | T..... | X.....         |
| 03202209061330 | .....                               | X..X..  | X.....    | R..... | .....          |
| 03241710061430 | .....                               | .....   | .....     | .....  | M.....         |
| 03270811061130 | .....                               | .....   | N.....    | .....  | .....          |
| 03351801071520 | .....                               | X.....  | N.....    | .....  | .....          |
| 04010808060930 | .....                               | .....   | S.....    | .....  | X.....         |
| 04020808060930 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 04060609061005 | .....                               | .....   | .....     | X..... | .....          |
| 05012707061030 | .....                               | .....   | X.....    | .....  | .....          |
| 05012908061310 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 05200404071545 | .....                               | .....   | X.....    | X..... | T...XX.I...X.. |
| 05210404071620 | .....                               | X.X.....  | N..X..X.. | .....  | X..X.X..XX     |
| 05230404071628 | .....                               | I..X.....   | X.....    | .....  | X.....         |
| 03042807061400 | .....                               | .....   | .....     | .....  | .....          |
| 03022107061500 | .....                               | X.....  | X.....    | .....  | XX.....        |

|                | 160                                 | 170  | 180       | 190     | 200    |
|----------------|-------------------------------------|--|-----------|---------|--------|
| SKD CRF01_AE   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... | QGWKGS PAIFQSSMTKILEPFRKKNPEMVIYQYMDLTVGSDLEIGQHRT |           |         |        |
| AY358062       | .....                               | S.....   | R.....    | .....   | .....  |
| AY945730       | .....                               | .....  | R.....    | .....   | E..... |
| 01023107061440 | .....                               | .....  | K.....    | .....   | .....  |
| 02041108061149 | .....                               | X..I.....  | KR.....   | .....   | .....  |
| 02200603071221 | .....                               | .....  | K.....    | .....   | .....  |
| 03071608061100 | .....                               | .....  | K..D..... | X.....  | .....  |
| 03112408061530 | .....                               | .....  | K.....    | I.....  | I..... |
| 03182109061305 | .....                               | X.XX.....  | K.....    | .....   | .....  |
| 03202209061330 | .....                               | .....  | K.....    | I.....  | *..... |
| 03241710061430 | .....                               | .....  | K.....    | .....   | .....  |
| 03270811061130 | .....                               | C.....   | V.....    | II..... | .....  |
| 03351801071520 | .....                               | X.....   | X.....    | I.....  | X..... |
| 04010808060930 | .....                               | .....  | X.....    | K.....  | .....  |
| 04020808060930 | .....                               | .....  | K.....    | .....   | .....  |
| 04060609061005 | .....                               | T.....   | K.....    | I.....  | X...I  |
| 05012707061030 | .....                               | .....  | K.....    | X.....  | X..... |
| 05012908061310 | .....                               | .....  | K.....    | X.....  | X..... |
| 05200404071545 | .....                               | S..P.....  | K..X..... | .....   | A..... |
| 05210404071620 | .....                               | T.....   | K.....    | .....   | X..... |
| 05230404071628 | .....                               | X..C.....  | T.....    | I.....  | .....  |
| 03042807061400 | .....                               | .....  | .....     | I.....  | I..... |
| 03022107061500 | .....                               | .....  | K.....    | I.....  | .....  |

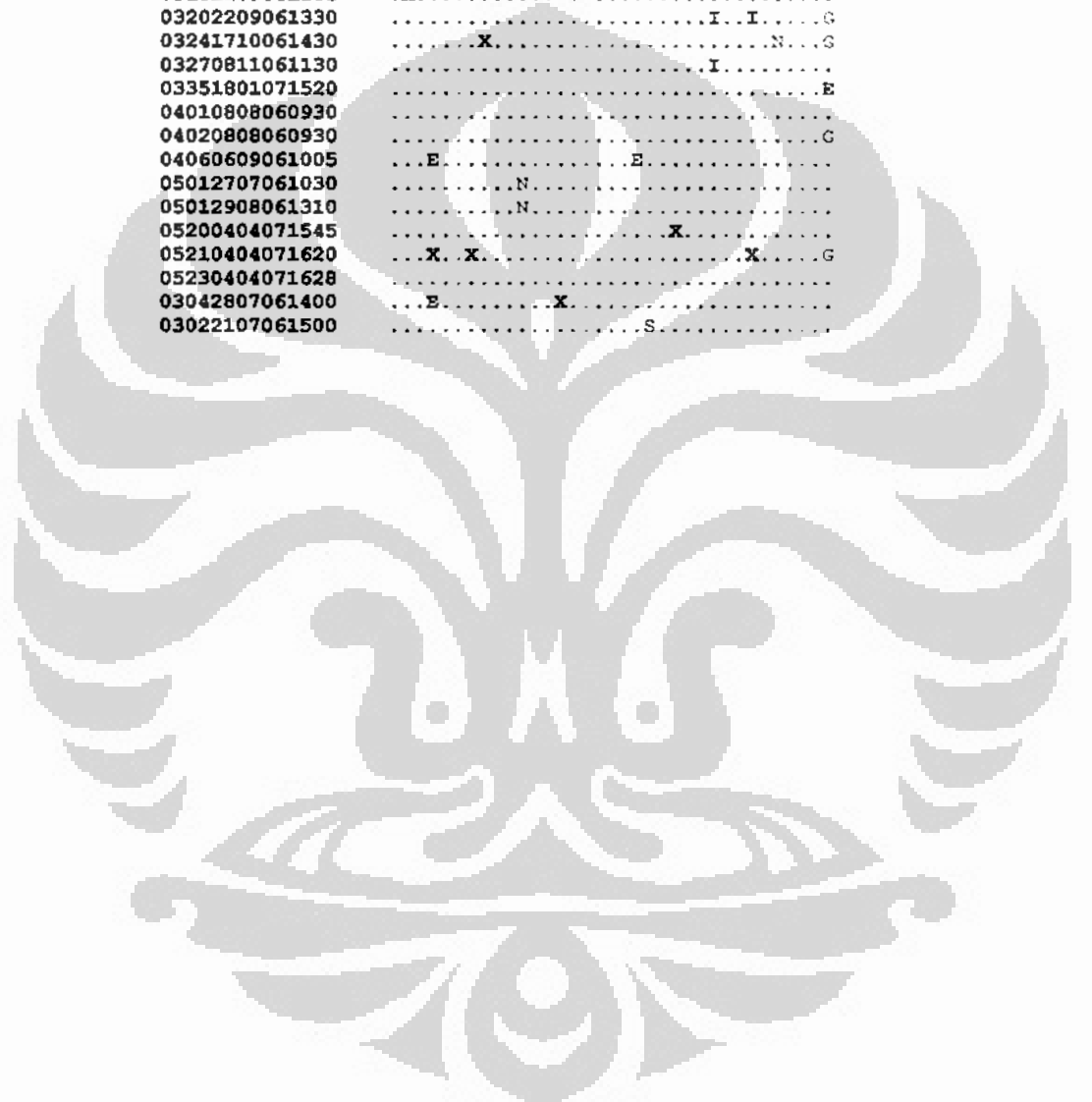
## Lanjutan lampiran 6.

|                | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | K   | I   | E   | E   | L   |
| AY358062       | R   | A   | H   | L   | L   |
| AY945730       | S   | W   | G   | F   | T   |
| 01023107061440 | T   | P   | D   | K   | K   |
| 02041108061149 | K   | H   | K   | H   | K   |
| 02200603071221 | K   | O   | K   | E   | P   |
| 03071608061100 | P   | P   | F   | L   | W   |
| 03112408061530 | M   | G   | Y   | E   | L   |
| 03182109061305 | H   | P   | D   | R   | W   |
| 03202209061330 | I   | V   | Q   | P   | I   |
| 03241710061430 | L   | D   | E   | P   | K   |
| 03270811061130 | K   |     |     |     |     |
| 03351801071520 |     |     |     |     |     |
| 04010808060930 |     |     |     |     |     |
| 04020808060930 |     |     |     |     |     |
| 04060609061005 |     |     |     |     |     |
| 05012707061030 |     |     |     |     |     |
| 05012908061310 |     |     |     |     |     |
| 05200404071545 |     |     |     |     |     |
| 05210404071620 |     |     |     |     |     |
| 05230404071628 |     |     |     |     |     |
| 03042807061400 |     |     |     |     |     |
| 03022107061500 |     |     |     |     |     |

|                | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| SKD CRF01_AE   | S   | W   | T   | V   | N   |
| AY358062       | D   | I   | Q   | K   | L   |
| AY945730       | V   | C   | K   | L   | N   |
| 01023107061440 | W   | A   | S   | Q   | I   |
| 02041108061149 | Y   | A   | G   | I   | K   |
| 02200603071221 | K   | V   | K   | Q   | L   |
| 03071608061100 | C   | K   | L   | L   | R   |
| 03112408061530 | G   | A   | K   | A   | L   |
| 03182109061305 | T   | D   | I   | V   | P   |
| 03202209061330 | L   | T   | E   | E   | A   |
| 03241710061430 |     |     |     |     |     |
| 03270811061130 |     |     |     |     |     |
| 03351801071520 |     |     |     |     |     |
| 04010808060930 |     |     |     |     |     |
| 04020808060930 |     |     |     |     |     |
| 04060609061005 |     |     |     |     |     |
| 05012707061030 |     |     |     |     |     |
| 05012908061310 |     |     |     |     |     |
| 05200404071545 |     |     |     |     |     |
| 05210404071620 |     |     |     |     |     |
| 05230404071628 |     |     |     |     |     |
| 03042807061400 |     |     |     |     |     |
| 03022107061500 |     |     |     |     |     |

## Lanjutan lampiran 6.

|                | 310 | 320 | 330 |
|----------------|-----|-----|-----|
| SKD CRP01_AE   | LE  | LA  | EN  |
| AY358062       | RE  | IL  | KT  |
| AY945730       | VP  | HG  | VY  |
| 01023107061440 | YD  | PS  | KL  |
| 02041108061149 | VA  | EV  | QK  |
| 02200603071221 | QO  |     |     |
| 03071608061100 |     |     |     |
| 03112408061530 |     |     |     |
| 03182109061305 |     |     |     |
| 03202209061330 |     |     |     |
| 03241710061430 |     |     |     |
| 03270811061130 |     |     |     |
| 03351801071520 |     |     |     |
| 04010808060930 |     |     |     |
| 04020808060930 |     |     |     |
| 04060609061005 |     |     |     |
| 05012707061030 |     |     |     |
| 05012908061310 |     |     |     |
| 05200404071545 |     |     |     |
| 05210404071620 |     |     |     |
| 05230404071628 |     |     |     |
| 03042807061400 |     |     |     |
| 03022107061500 |     |     |     |



Lampiran 7. Homologi sekuen nukleotida dan asam amino protein RT HIV-1 CRF01\_AE isolat Indonesia dan isolat referensi.

| Homologi |       | Homologi asam amino protein reverse transkriptase HIV-1 CRF01_AE |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |       |       |       |       |       |
|----------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nukltd   | SKD   | AY35   | AY94  | D1023 | O2041 | O220  | O307  | O311  | O318  | O320  | O324  | O327  | O335  | O401  | O402  | O406  | O50127 | O50129 | O520  | O521  | O523  | O304  | O302  |
| SKD      | ID    | 0.979  | 0.979 | 0.964 | 0.967 | 0.957 | 0.970 | 0.970 | 0.958 | 0.940 | 0.964 | 0.970 | 0.940 | 0.973 | 0.976 | 0.949 | 0.955  | 0.961  | 0.925 | 0.925 | 0.964 | 0.967 | 0.970 |
| AY358062 | 0.97c | ID   | 0.970 | 0.949 | 0.958 | 0.952 | 0.961 | 0.961 | 0.943 | 0.925 | 0.955 | 0.955 | 0.925 | 0.958 | 0.961 | 0.937 | 0.943  | 0.949  | 0.919 | 0.913 | 0.952 | 0.952 | 0.955 |
| AY945730 | 0.98e | ID   | 0.949 | 0.952 | 0.952 | 0.961 | 0.955 | 0.949 | 0.928 | 0.949 | 0.949 | 0.949 | 0.922 | 0.958 | 0.961 | 0.937 | 0.943  | 0.949  | 0.922 | 0.910 | 0.943 | 0.952 | 0.949 |
| O102     | 0.97z | 0.954  | 0.959 | ID    | 0.955 | 0.961 | 0.958 | 0.958 | 0.928 | 0.951 | 0.943 | 0.919 | 0.967 | 0.964 | 0.931 | 0.943 | 0.949  | 0.913  | 0.916 | 0.934 | 0.943 | 0.946 | 0.952 |
| O204     | 0.97c | 0.950  | 0.958 | 0.976 | ID    | 0.958 | 0.961 | 0.967 | 0.949 | 0.931 | 0.961 | 0.952 | 0.922 | 0.967 | 0.967 | 0.928 | 0.943  | 0.949  | 0.916 | 0.913 | 0.943 | 0.946 | 0.955 |
| O220     | 0.97e | 0.952  | 0.963 | 0.983 | 0.978 | ID    | 0.958 | 0.970 | 0.952 | 0.931 | 0.961 | 0.955 | 0.925 | 0.964 | 0.970 | 0.931 | 0.943  | 0.949  | 0.922 | 0.919 | 0.937 | 0.949 | 0.955 |
| O307     | 0.96f | 0.947  | 0.957 | 0.975 | 0.971 | 0.973 | ID    | 0.967 | 0.964 | 0.934 | 0.967 | 0.946 | 0.922 | 0.967 | 0.964 | 0.937 | 0.949  | 0.955  | 0.922 | 0.922 | 0.940 | 0.955 | 0.952 |
| O311     | 0.971 | 0.953  | 0.958 | 0.977 | 0.977 | 0.982 | 0.972 | ID    | 0.955 | 0.940 | 0.970 | 0.961 | 0.931 | 0.967 | 0.976 | 0.946 | 0.955  | 0.961  | 0.931 | 0.925 | 0.940 | 0.964 | 0.958 |
| O318     | 0.96e | 0.948  | 0.960 | 0.979 | 0.976 | 0.977 | 0.974 | 0.974 | ID    | 0.922 | 0.952 | 0.937 | 0.913 | 0.961 | 0.958 | 0.925 | 0.934  | 0.940  | 0.922 | 0.919 | 0.934 | 0.943 | 0.946 |
| O320     | 0.95e | 0.942  | 0.948 | 0.966 | 0.964 | 0.967 | 0.962 | 0.967 | 0.964 | ID    | 0.934 | 0.928 | 0.895 | 0.937 | 0.940 | 0.907 | 0.919  | 0.925  | 0.892 | 0.907 | 0.910 | 0.925 | 0.922 |
| O324     | 0.970 | 0.952  | 0.957 | 0.978 | 0.975 | 0.979 | 0.972 | 0.978 | 0.974 | 0.969 | ID    | 0.949 | 0.928 | 0.967 | 0.976 | 0.925 | 0.940  | 0.946  | 0.919 | 0.928 | 0.934 | 0.943 | 0.952 |
| O327     | 0.976 | 0.954  | 0.961 | 0.951 | 0.949 | 0.959 | 0.947 | 0.955 | 0.948 | 0.941 | 0.952 | ID    | 0.946 | 0.952 | 0.961 | 0.937 | 0.934  | 0.940  | 0.910 | 0.919 | 0.958 | 0.955 | 0.958 |
| O335     | 0.970 | 0.946  | 0.958 | 0.954 | 0.954 | 0.962 | 0.950 | 0.956 | 0.951 | 0.942 | 0.956 | 0.970 | ID    | 0.928 | 0.940 | 0.907 | 0.913  | 0.916  | 0.886 | 0.898 | 0.919 | 0.925 | 0.943 |
| O401     | 0.971 | 0.953  | 0.958 | 0.988 | 0.976 | 0.980 | 0.974 | 0.976 | 0.976 | 0.965 | 0.976 | 0.950 | 0.953 | ID    | 0.973 | 0.934 | 0.946  | 0.952  | 0.928 | 0.925 | 0.943 | 0.952 | 0.967 |
| O402     | 0.974 | 0.952  | 0.961 | 0.980 | 0.978 | 0.983 | 0.975 | 0.981 | 0.977 | 0.967 | 0.981 | 0.955 | 0.958 | 0.979 | ID    | 0.937 | 0.949  | 0.955  | 0.931 | 0.934 | 0.946 | 0.955 | 0.964 |
| O406     | 0.965 | 0.946  | 0.954 | 0.959 | 0.954 | 0.958 | 0.954 | 0.958 | 0.957 | 0.947 | 0.952 | 0.947 | 0.945 | 0.957 | 0.957 | ID    | 0.922  | 0.928  | 0.895 | 0.898 | 0.922 | 0.976 | 0.925 |
| O50127   | 0.970 | 0.951  | 0.957 | 0.974 | 0.971 | 0.974 | 0.970 | 0.976 | 0.969 | 0.961 | 0.970 | 0.948 | 0.951 | 0.972 | 0.974 | 0.954 | ID     | 0.994  | 0.904 | 0.901 | 0.928 | 0.940 | 0.940 |
| O50129   | 0.973 | 0.954  | 0.960 | 0.974 | 0.972 | 0.975 | 0.971 | 0.977 | 0.970 | 0.962 | 0.971 | 0.951 | 0.953 | 0.973 | 0.975 | 0.957 | 0.996  | ID     | 0.910 | 0.907 | 0.934 | 0.946 | 0.946 |
| O520     | 0.956 | 0.936  | 0.945 | 0.962 | 0.961 | 0.965 | 0.957 | 0.963 | 0.964 | 0.953 | 0.961 | 0.937 | 0.940 | 0.961 | 0.966 | 0.942 | 0.959  | 0.959  | ID    | 0.901 | 0.901 | 0.910 | 0.919 |
| O521     | 0.959 | 0.939  | 0.946 | 0.965 | 0.963 | 0.967 | 0.963 | 0.966 | 0.964 | 0.957 | 0.968 | 0.942 | 0.948 | 0.964 | 0.971 | 0.945 | 0.958  | 0.959  | 0.955 | ID    | 0.907 | 0.910 | 0.919 |
| O523     | 0.974 | 0.953  | 0.959 | 0.958 | 0.957 | 0.962 | 0.953 | 0.958 | 0.956 | 0.945 | 0.955 | 0.960 | 0.955 | 0.957 | 0.961 | 0.948 | 0.956  | 0.959  | 0.944 | 0.947 | ID    | 0.937 | 0.952 |
| O304     | 0.973 | 0.952  | 0.962 | 0.963 | 0.960 | 0.964 | 0.960 | 0.964 | 0.962 | 0.951 | 0.959 | 0.955 | 0.953 | 0.962 | 0.963 | 0.990 | 0.960  | 0.963  | 0.945 | 0.949 | 0.954 | ID    | 0.943 |
| O302     | 0.979 | 0.957  | 0.964 | 0.973 | 0.971 | 0.976 | 0.968 | 0.973 | 0.970 | 0.959 | 0.970 | 0.964 | 0.965 | 0.974 | 0.977 | 0.955 | 0.968  | 0.969  | 0.959 | 0.963 | 0.966 | 0.961 | ID    |



Lampiran 8 Perbedaan asam amino protein RT HIV-1 antara sekuen konsensus CRF01\_AE dengan isolat Indonesia dan Thailand

| Perubahan | Isolat HIV-1 CRF01_AE dari Indonesia dan Thailand |          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |        |        |      |      |      |      |      |   |
|-----------|---|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|---|
|           | AY358062  | AY945734 | 0102 | 0204 | 0220 | 0307 | 031E | 0318 | 0320 | 0324 | 0327 | 0335 | 0401 | 0402 | 0406 | 050127 | 050129 | 0520 | 0521 | 0523 | 0304 | 0302 |   |
| 11T→K     | +   | -        | -    | +    | -    | +    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 20K→R     | +   | +        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 20K→I     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | +    | - |
| 35T→M     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | +    | - |
| 39K→N     | -   | -        | -    | -    | +    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 39K→E     | -   | -        | -    | +    | -    | +    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | +    | - |
| 39K→T     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 39K→D     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | +    | -    | -    | - |
| 43E→K     | +   | -        | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +      | +      | +    | +    | +    | -    | +    | - |
| 47S→T     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 44K→R     | -   | -        | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 64K→R     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 83R→K     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 86D→E     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 92L→I     | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 111V→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 116V→I    | -   | +        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 125L→S    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 128S→N    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 131K→R    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 140I→T    | -   | +        | -    | -    | -    | +    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 147I→V    | -   | -        | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 147I→M    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |

Lanjutan lampiran 8.

| Perubahan | Isolat HIV-1 CRF01_AE dari Indonesia dan Thailand |          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |        |        |      |      |      |      |      |   |
|-----------|---|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|---|
|           | AY358062  | AY945730 | 0102 | 0204 | 0220 | 0307 | 0311 | 0318 | 0320 | 0324 | 0327 | 0335 | 0401 | 0402 | 0406 | 050127 | 050129 | 0520 | 0521 | 0523 | 0304 | 0302 |   |
| A.Amino   | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 148R→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 158A→S    | +   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 158A→T    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 162S→C    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 165T→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 166K→R    | +   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 169E→K    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 172R→K    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 173 I→R   | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 173 I→V   | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 173 I→T   | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 177E→D    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 178M→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 179V→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 196G→E    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 200T→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 202 I→V   | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 209L→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 214F→L    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 238R→K    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 272A→P    | +   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 274 I→V   | +   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 286A→T    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 297E→T    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |

Lanjutan lampiran 8.

| Perubahan | Isolat HIV-1 CRF01_AE dari Indonesia dan Thailand |          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |        |        |      |      |      |      |      |   |
|-----------|---|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|---|
|           | AY358062  | AY945730 | 0102 | 0204 | 0220 | 0307 | 0311 | 0318 | 0320 | 0324 | 0327 | 0335 | 0401 | 0402 | 0406 | 050127 | 050129 | 0520 | 0521 | 0523 | 0304 | 0302 |   |
| A. Amino  | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 304A→E    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | +    | - |
| 311K→N    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 321P→S    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | + |
| 326V→     | -   | -        | -    | -    | +    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 329V→I    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 331K→N    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 335D→G    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | +    | -    | -    | -    | +    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |
| 335D→E    | -   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | -    | -    | -    | -      | -      | -    | -    | -    | -    | -    | - |

Penomoran asam amino di mulai dari residu N-terminal.

Simbol + dan - menyatakan ada atau tidak adanya asam amino dibandingkan dengan asam amino sekuen konsesus HIV-1 CRF01\_AE (GenBank)

**Lampiran 9. Daerah lestari asam amino protease HVI-1 CRF01\_AE**

|                | 60          | 70          | 80                | 90                |
|----------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|
| SKD CRF01AE    | ..EIKVRQ    | ..DQILIEIC  | ..KKALSTVLV       | ..ETEVNII         |
| AY358062       | .....       | .....       | .....             | .....I.....       |
| AY945730       | .....       | E..P.....   | .....             | .....             |
| 01023107061440 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 02041108061149 | .....       | .....       | .....I.....       | .....             |
| 02200603071221 | .....Z..... | .....       | .....             | .....             |
| 03071608061100 | .....       | .....       | .....I.....       | .....             |
| 03112408061530 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 03182109061305 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 03202209061330 | .....       | .....       | .....Z.....I..... | .....I.....       |
| 03241710061430 | .....       | .....Z..... | .....I.....       | .....I.....       |
| 03270811061130 | .....       | .....R..... | .....I.....       | .....             |
| 03351801071520 | .....Z..... | .....       | .....Z.....       | .....I.....       |
| 04010808060930 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 04020808060930 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 04060609061005 | .....       | .....       | .....I.....       | .....             |
| 05012707061030 | .....Z..... | .....       | .....I.....       | .....             |
| 05012908061310 | .....       | .....       | .....I.....       | .....             |
| 05200404071545 | .....Z..... | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 05210404071620 | .....       | .....       | .....I.....       | .....I.....       |
| 05230404071628 | .....Z..... | .....       | .....I.....       | .....             |
| 03042807061400 | .....       | .....       | .....I.....       | .....             |
| 03022107061500 | .....Z..... | .....       | .....Z.....       | .....Z.....Z..... |



**Lanjutan lampiran 10.**

|  |  |
|--|--|
| <p>15. B*5101 (B51) RT 128-135</p> <pre> ..... 128 133 140 ----- B*5101 (B51) RT 128-135 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre> | <p>19. B*3501 (B35) RT 175-183</p> <pre> ..... 170 180 190 ----- B*3501 (B35) RT 175-183 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre> |
| <p>16. B*5101 (B51) RT 42-50</p> <pre> ..... 40 50 ----- B*5101 (B51) RT 42-50 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre>           | <p>20. B*4001 (B35) RT 5-12</p> <pre> ..... 10 ----- B*4001 (B60) RT 5-12 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre>                |
| <p>17. B*3501 (B35) RT 175-183</p> <pre> ..... 170 180 190 ----- B*3501 (B35) RT 175-183 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre> | <p>21. B*3501 (B35) RT 118-127</p> <pre> ..... 110 120 130 ----- B*3501 (B35) RT 118-127 SKIR 00000000 00000000 SKD CRFOIAE 00000000 00000000                     </pre> |
| <p>18. B*1501 (B62) RT 309-318</p> <pre> ..... 310 320 ----- B*1501 (B62) RT 309-318 SKD CRFOIAE 00000000 00000000 SKIR 00000000 00000000                     </pre>     |  |

22. A\*0301 (A3) 158-166

```

.....
160 170
-----
A*0301 (A3) RT 158-166
SKIR 00000000 00000000
SKD CRFOIAE 00000000 00000000
                    
```

## Lampiran 11. Sekuen konsensus isolat Indonesia nukleotida protease & RT

### 1. Sekuen konsensus isolat Indonesia (SKI) nukleotida protease

```

      10      20      30      40      50
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease CCTCaggTCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAGTAAAAATAGGagg
      60      70      80      90      100
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease aCAGcTgAgaGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTaG
      110     120     130     140     150
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease AAGATATAaATTGCCAGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGGAATT
      160     170     180     190     200
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease GGaGGTTTtATCAAgGTAAGgCAATATGATCAGATACTKATAGAAATTTG
      210     220     230     240     250
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease TGGAAAAAGGCTATAGGTACAGTattgaTAGGACctACACCTGTCAACA
      260     270     280     290
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. protease TAATTGGACGAAAATATGTTGACTCAGATTGGtTGtACTaTAAATTTT

```

### 2. Sekuen konsensus isolat Indonesia (SKI) nukleotida RT

```

      10      20      30      40      50
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT CCAATTAGTCCTATTGACACTGTACCAGTAAcATTAAAGCCAGGAATGGA
      60      70      80      90      100
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT TGGaCCAAAGgTcAAACAGTGGCCATTGACAGAAaGAAAAAATAAAAGCAT
      110     120     130     140     150
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT TAACaGAAATTTGTaaaGAgATGGAaaAGGAAGGAAAAATcTCAAAAATT
      160     170     180     190     200
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT GGGCCTGAAAATCCATAtAATACTCCAGTATTTGCTATAaaGAAAAAGGA
      210     220     230     240     250
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT CAGcACcAAATGGAGaAAgTTAGTAGATTTtAGAGAGCTcAATAAAAGaA
      260     270     280     290     300
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT CTCAgGAaTTTTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCgCATCCAGCAGGTTTA
      310     320     330     340     350
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT AAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTAtTAGATGTGGGAGATGCaTATTTTTTC
      360     370     380     390     400
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl. RT AGTTCCTTTAGATGAAAgcTTTAGAAaGTATACTGCATTCCACCATACCTA
      410     420     430     440     450
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

SKI nukl.RT GTATAACAATGAGACACCAGGAATcAgATATCAgTACAATGTGCTaCCA
                460      470      480      490      500
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT CAGGGATGGAAAGGATCACCagCAATATTCCAgagTAGCATGAcAAAAAT
                510      520      530      540      550
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT CTTAGAGCCCTTAagAtAAAAAATCCAGAAATggTTATCTATCAATAcA
                560      570      580      590      600
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT TGGATGAcTTGTATGTAGGATCTGATTAGAAATAGGGCAGCACAGAAcA
                610      620      630      640      650
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT AAAaTAGARGARcTaAGAGCTCATCTATTGAgcTGGGgATTTACTACACC
                660      670      680      690      700
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT AGACAAAAGCATCAGAAgGAaCCTCCATTcCTTTGGATGGGgATATGAAC
                710      720      730      740      750
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT TcCATCCTGACAgATGGACAGTCCAGCCTATAaAAcTGCCAGAAAAaGAC
                760      770      780      790      800
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT AGtTGGACTGTCAATGATATACAGAAATTAGTGGGAAAAcTAAATTGGGC
                810      820      830      840      850
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT AAGTCAAATtTATCCAGGGATTAAAGGTAAAgCAAtTGTGTAAAcTCCTCA
                860      870      880      890      900
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT GGGGAgCTAAaGCaCTAACAGACATAGTgCCACTGACTgaAGAAGCAGAA
                910      920      930      940      950
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT TTAGAGTTGGcAGAGAACAGgGAaATTCTAAAaACCCCTGTGCATGGAGT
                960      970      980      990      1000
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SKI nukl.RT aTATTATGACCCATCAAAGACTTAgTAGCAGAAgTACAgAAAcAaGGGC
                .....|
SKI nukl.RT AGGAc

```



## Lampiran 12. Sekuen konsensus isolat Indonesia (SKI) asam amino Protease dan Reverse Transcriptase

### 1. Sekuen konsensus isolat Indonesia (SKI) Protease

```

      10      20      30      40      50
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        PQVTLWQRPLVTVKIGGQLREALDTCADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI
      60      70      80      90
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        GGFIKVRQYDQIXIEICGKKAIGTVLIGPTPVNIIGRNMLTQIGCTINE
  
```

### 2. Sekuen konsensus isolat Indonesia (SKI) Protease dan R T

```

      10      20      30      40      50
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        PISPIDTVPVILKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICKEMEKEGKISKI
      60      70      80      90     100
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        GPENPYNTFVEAIAKKKDSWKWRKLVDFRELNKRTOEFWEVQLGIPHPAGL
      110     120     130     140     150
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        KKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESFRKYTAFTIPINNTPGIRYQYNVLP
      160     170     180     190     200
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        QGWKGSFAIFQSSMTKILEPFKIKNPEMVIYQYMDLDLYVGSLEIGQHRT
      210     220     230     240     250
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        KIXXLRRAHLLSWGFTTDPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDRWTVQPIKLPKED
      260     270     280     290     300
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        SWTVNDIQKLVCKLNWASQIYPGIVKQKLLRCAKALTDIVPLTEEEAE
      310     320     330
SKI RT  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        LELAENREILKTPVHGVYDPSKDLVAEVQKQGQD
  
```

**Lampiran 13. Cara pemilihan dan Penentuan besar sampel penelitian ini (studi *cross-sectional*).**

Sampel diambil dengan cara *consecutive sampling* yaitu setiap sampel yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam penelitian sampai besar sampel terpenuhi. Besar sampel yang digunakan ditentukan dengan rumus :

$$N = \frac{Z_{\alpha}^2 PQ}{d^2}$$

N = besar sampel

P = proporsi virus HIV-1 yang beredar di Indonesia

Q = 100% - P

d = tingkat ketepatan absolut yang dikehendaki.

$\alpha$  = tingkat kemaknaan yang dikehendaki.

Dalam penelitian ini tingkat kepercayaan yang dikehendaki sebesar 95% dan ketepatan absolut yang diinginkan sebesar 15%. Karena nilai proporsi genotype HIV-1 di Indonesia tidak diketahui, maka di pakai nilai P = 0,50.

Maka P = 0,50 ;  $Z_{\alpha} = 1,960$  ; d = 15% = 0,15

$$N = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times (1 - 0,5)}{(0,15)^2} = 43$$

Jadi, jumlah penderita yang dibutuhkan adalah sebanyak 43 orang.



### RIWAYAT HIDUP

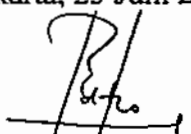
1. Nama : Suratno Lulut Ratnoglik
2. NPM : 0606000245
3. Alamat : Jl. Kramat Jaya Baru G. V/471, Jakarta Pusat
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Magetan, 13 Juli 1977
6. Riwayat Pendidikan :
 

|     |   |                  |
|-----|---|------------------|
| SD  | : SD Duwet I  | Lulus Tahun 1990 |
| SMP | : SMP Negeri I Kawedanan  | Lulus Tahun 1993 |
| SMA | : SMA Negeri I Magetan  | Lulus Tahun 1996 |
| S1  | : Universitas Airlangga<br>Fakultas Kedokteran<br>Program Studi Pendidikan Dokter                           | Lulus Tahun 2004 |
| S2  | : Universitas Indonesia<br>Fakultas Kedokteran<br>Program Magister Ilmu Biomedik<br>Kekhususan Mikrobiologi | Lulus Tahun 2009 |

Sumber dana penelitian tesis :

1. WHO representative, Indonesia.
2. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

Jakarta, 25 Juni 2009

  
 ( Suratno Lulut Ratnoglik )

Universitas Indonesia

**PENENTUAN SEKUEN KONSENSUS  
PROTEASE DAN REVERSE TRANSCRIPTASE  
HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TIPE I  
ISOLAT INDONESIA UNTUK DESAIN VAKSIN HIV/AIDS**

Suratno Lulut Ratnoglik<sup>a</sup>, Henny Saraswati<sup>a</sup>, Andi Yasmon<sup>a</sup>, Budiman Bela<sup>a</sup>,  
Fera Ibrahim<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jl.  
Pegangsaan Timur No.16 Jakarta. [sl.ratnoglik@yahoo.com](mailto:sl.ratnoglik@yahoo.com)

**Abstrak**

Infeksi *Human Immunodeficiency Virus* tipe 1 (HIV-1) sebagai penyebab AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) merupakan salah satu masalah utama kesehatan dunia yang harus segera diatasi. Sejak ditemukannya penyakit tersebut, vaksin yang diharapkan tidak kunjung tersedia karena berbagai usaha pengembangan vaksin HIV-1 mengalami hambatan besar oleh karena keanekaragaman HIV-1 yang tinggi. Strategi mutakhir untuk mengatasi hambatan tersebut adalah pengembangan vaksin HIV-1 yang spesifik pada sub tipe dan populasi di regional tertentu, menggunakan isolat identik dengan sekuen konsensus yang telah ditentukan, sebagai kandidat vaksin. Tujuan penelitian ini adalah menentukan sekuen konsensus HIV-1 di Indonesia dengan menggunakan sekuen – sekuen gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* HIV – 1 sub tipe paling dominan isolat Indonesia dari isolat darah plasma orang terinfeksi HIV akibat penggunaan narkoba dengan jarum suntik (penasun). Berdasarkan analisis dalam penelitian ini diketahui bahwa CRF01\_AE merupakan sub tipe paling dominan di Indonesia dan telah berhasil diperoleh sekuen konsensus protease dan *reverse transcriptase* HIV-1 CRF01\_AE Indonesia. Sekuen konsensus protease Indonesia tersebut memiliki perbedaan dengan sekuen konsensus dari database Los Alamos National Laboratory (LANL) sebesar 2,7% untuk sekuen nukleotida ( $p=0,030$ ); 5,1% untuk sekuen asam amino ( $p=0,000$ ). Sedangkan sekuen konsensus *reverse transcriptase* Indonesia memiliki perbedaan dengan sekuen konsensus dari LANL sebesar 2,0% untuk nukleotida ( $p = 0,208$ ) dan 3,0% untuk asam amino ( $p = 0,015$ ).

Kata kunci : sekuen konsensus, HIV-1 sub tipe CRF01\_AE, gen *protease*, gen *reverse transcriptase*.

**Pendahuluan**

Infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang penting di seluruh dunia karena infeksi ini telah menjangkiti wilayah geografis dan populasi yang berbeda-beda. Dalam satu dekade, sebagian besar individu terinfeksi HIV yang tidak diobati akan berlanjut menjadi penderita infeksi oportunistik yang fatal akibat defisiensi sistem imun.<sup>1</sup>

Saat ini, HIV/AIDS telah menjadi penyebab kematian terbesar ke-4 di dunia. Penyakit ini telah menginfeksi lebih dari 40 juta orang di seluruh dunia, terdapat tambahan lebih dari 4.3 juta orang baru terinfeksi pada tahun 2008.<sup>2</sup> Di Indonesia sendiri sampai akhir Juni 2008 dilaporkan sebanyak 6277 orang penderita AIDS. Dari jumlah itu, 1.651 orang atau 23,63% penderita AIDS diantaranya telah meninggal dunia.<sup>3</sup>

Salah satu hambatan terbesar dalam pengembangan vaksin AIDS adalah keanekaragaman *Human Immunodeficiency Virus-Type 1* (HIV-1) yang tinggi. Perbedaan protein selubung (*envelope*) pada virus dengan subtipe yang sama mencapai 20%, dan antara subtipe yang berbeda mencapai 35%. Untuk mengatasi hambatan tersebut, ide untuk mengembangkan vaksin yang spesifik terhadap negara atau regional tertentu sedang dilakukan. Pengetahuan tentang adanya dominasi HIV-1 dengan subtipe, sub-subtipe, dan *circulating recombinant forms* (CRF) tertentu pada suatu populasi dan daerah tertentu mungkin dapat dimanfaatkan untuk menentukan apakah suatu vaksin potensial harus mencakup strain tunggal, bentuk CRF atau campuran antigen dari beberapa strain HIV-1 yang berbeda. Metode penentuan sekuen konsensus virus dapat digunakan dalam desain pengembangan vaksin untuk meminimalisir perbedaan genetik virus, sehingga secara efektif mengurangi pengaruh besarnya keanekaragaman virus. Virus HIV-1 yang sesuai sekuen konsensus inilah nantinya yang akan dipilih sebagai kandidat vaksin HIV-1.<sup>4</sup>

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuen konsensus HIV-1 subtipe yang dominan yang beredar di Indonesia berdasarkan sekuen gen *reverse transcriptase* dan gen *protease*, yang akan digunakan sebagai kandidat vaksin HIV-1. Sedangkan tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mengetahui homologi sekuen HIV-1 subtipe dominan yang beredar di Indonesia khususnya dari pasien pengguna narkoba.

## **Bahan dan Metode**

### ***Bahan***

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 data sekuen gen *protease* dan gen *reverse transkriptase* yang berhasil diperoleh dari 70 sampel darah

plasma berasal dari pasien pengguna narkoba jarum suntik (penasun) yang telah dinyatakan positif HIV-1 dengan menggunakan metode ELISA dari beberapa rumah sakit di Propinsi DKI Jakarta. Data tersebut diperoleh dari Tim Peneliti HIV Drug Resistensi (HIV-DR) Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan 4 sampel darah donor dari Palang Merah Indonesia (PMI) Propinsi DKI Jakarta yang positif mengandung HIV-1 yang telah dikonfirmasi dengan tes 3 rapid tes dengan metode berbeda atau 2 rapid test dengan metode berbeda dan 1 kali test dengan ELISA.

### **Metode**

#### *Isolasi RNA virus dari sampel plasma darah donor positif HIV.*

Isolasi RNA dilakukan sesuai dengan protokol kit QIAamp viral RNA (Invitrogen). *Thawing* 1000  $\mu$ L plasma sampel HIV-1 dan setting mesin sentrifuge pada suhu 4°C. Pindahkan 1000  $\mu$ L sampel plasma HIV-1 ke dalam tabung *screw cap*. Sentrifuge dengan kecepatan 21.000 g selama 75 menit. Buang supernatant tanpa merusak pelet dengan menyisakan larutan sebanyak 200 $\mu$ L. Tambahkan 25  $\mu$ L proteinase K (Invitrogen) pada tabung yang berisi 200  $\mu$ L sampel. Kemudian tambahkan 200  $\mu$ L lisis buffer. Lalu tambahkan *carrier RNA* (Invitrogen) sebanyak 6  $\mu$ L. Campurkan larutan tersebut dengan di vortex selama 15 detik. Inkubasi pada suhu 56°C selama 15 menit. Kemudian di spin selama 15 detik untuk menurunkan cairan yang menempel pada tutup tabung. Ambil sebanyak 681  $\mu$ L larutan dalam tabung dan pindahkan ke tabung spin kolom. Lalu sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan kolom spin ke dalam tabung 2 ml yang baru. Tambahkan 500  $\mu$ L *wash buffer*. Lalu sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtratnya, lalu masukkan kolom spin ke tabung 2 mL yang sama. Tambahkan 500  $\mu$ L *wash buffer*. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan kolom spin ke dalam tabung 2 mL yang baru, lalu sentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pindahkan kolom spin ke tabung mikrosentrifuse 1,5 mL. Tambahkan RNase-free water sebanyak 15  $\mu$ L. Inkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Sentrifuse selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Lalu tambahkan RNase Inhibitor (RNasin).

#### *Penyiapan cDNA gen reverse transcriptase dan gen protease dengan RT-PCR.*

Reaksi transkripsi balik terhadap RNA virus dilakukan dengan kit Invitrogen menggunakan primer spesifik pada daerah gen *pol*. Campuran satu reaksi transkripsi balik (*reverse transcriptase*) terdiri dari primer reverse 10  $\mu$ L, mix dNTP 10 mM, 5x *cDNA Synthesis buffer*, DTT 0,1 M, enzim RNaseOut, enzim Thermoscript. Ke dalam larutan campuran tersebut kemudian di tambahkan RNA HIV-1 hasil isolasi. Tabung lalu dimasukkan mesin PCR dengan kondisi suhu dan siklus yang telah dioptimasi sebelumnya. Setelah selesai proses transkripsi balik, cDNA yang telah diperoleh kemudian diperbanyak dengan PCR amplifikasi. Campuran untuk satu kali reaksi PCR yang dipakai dalam amplifikasi cDNA adalah 10x buffer HiFi, MgSO<sub>4</sub> 50 mM, Mix dNTP 10 mM, primer, enzim HiFi Taq Polimerase dan *nuclease free-water*. Ke dalam larutan campuran master PCR di tambahkan 10  $\mu$ L. Lalu tabung PCR dimasukkan ke mesin PCR dengan kondisi suhu dan siklus yang telah dioptimasi sebelumnya.

#### *Analisa produk PCR dengan gel elektroforesis*

Untuk mendeteksi produk PCR dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dalam larutan buffer TAE 1X. Larutan dipanaskan dalam microwave selama 1-2 menit atau sampai mendidih. Kemudian larutan yang masih panas dituang ke dalam lempeng cetakan yang telah disiapkan lengkap dengan sisir pembentuk sumur. Setelah gel mengeras, sisir dicabut. Gel kemudian diletakkan dalam tangki elektroforesis yang berisi buffer TAE 1X. Sebanyak 5  $\mu$ L sampel dicampurkan dengan 2  $\mu$ L *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel. Marka/penanda yang digunakan adalah DNA yang telah diketahui ukurannya ( $\lambda$ /Hind III (Promega). Elektroforesis dilakukan pada 120 volt selama 30 menit. Setelah selesai, gel direndam dengan etidium bromide 0,04 mg/ml selama 10 menit, lalu di *destaining* dalam air steril selama 15 menit. Visualisasi gen yang diharapkan dilakukan di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 260 nm dengan illuminator ultraviolet menggunakan alat pendokumentasi gel (*gel documentation*)(Bio-rad).

### *Purifikasi DNA.*

Purifikasi produk PCR dapat dilakukan menggunakan *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)* untuk produk PCR yang bisa langsung dimurnikan dan *QIAquick Gel Extraction Purification kit (QIAGEN)* untuk memurnikan produk PCR dari *Low melting agarose (LMA)* terlebih dahulu sebelum dimurnikan. Dalam penelitian ini hanya menggunakan metode kit *QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)*. Metode ini di desain untuk memurnikan produk PCR rantai tunggal maupun rantai ganda yang besarnya berkisar 100bp sampai 10 kb dari primer, nukleotida, polymerase dan garam, menggunakan kolom spin di mikrosentrifugasi. Lima volume buffer PB ditambahkan pada 1 volume reaksi PCR dan dicampur menggunakan pipet secara *up and down*. Minyak mineral tidak perlu dihilangkan. Masukkan ke kolom *QIAquick spin* yang dilengkapi dengan tabung pengumpulan 2 ml. Sampel dimasukkan ke dalam kolom *QIAquick (QIAGEN)* untuk mengikat DNA dan disentrifugasi pada 12.000 rpm, 30-60 detik. Hasil elusinya dibuang, lalu kolom *QIAquick* diletakkan ke tabung yang sama. Kemudian ditambahkan 0,75 ml buffer PE untuk mencuci dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Hasil elusinya dibuang, lalu kolom *QIAquick* diletakkan di tabung yang sama. Sentrifugasi kolom selama kurang lebih 1 menit pada 13.000 rpm. Untuk mengelusi, kolom *QIAquick* diletakkan di tabung mikrofuge 1,5 ml. lalu tambahkan 50  $\mu$ L buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) atau H<sub>2</sub>O. Kolom diputar dengan kecepatan maksimal selama 1 menit.

### *Sekuensing*

Sekuensing dilakukan di PT. Charon Pophand Jakarta. DNA disekuens dengan *automatic sequencer* berdasarkan metode Sanger (*dideoxy termination method*). Reaksi ini didasarkan pada bahan yang dilabel dengan fluoresens yang akan member perubahan warna yang sesuai setelah melewati sinar laser pada mesin otomatis. Kit yang digunakan adalah *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* yang terdiri dari *dye terminator, deoxynucleoside triphosphate, Ampli Taq DNA Polymerase, FS, MgCl<sub>2</sub>* dan dapar Tris-HCl pH 9,0. DNA cetakan sebanyak kurang lebih 80ng - 220ng (0,1 ng per 100bp cetakan) dicampur



dengan 1  $\mu\text{L}$  primer ( 2 pmol.  $\mu\text{L}$ ), 3,5  $\mu\text{L}$  *ready Kit* dan ditambah  $\text{H}_2\text{O}$  sampai volume total 10  $\mu\text{L}$ . Campuran dengan total volume 10  $\mu\text{L}$  tersebut direaksikan pada mesin *Thermal Cycle Model 9700* (Perkin Palmer) dengan kondisi : denaturasi pada suhu  $96^\circ\text{C}$  selama 30 detik, annealing  $50^\circ\text{C}$  selama 15 detik, dan ekstensi selama  $60^\circ\text{C}$  selama 4 menit. Produk PCR selanjutnya di presipitasi dengan 25  $\mu\text{L}$  etanol 95%, 3  $\mu\text{L}$  3 M NaAc (pH 5,2), vorteks dan inkubasi pada  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan lalu dibuang, ditambahkan 250  $\mu\text{L}$  etanol 70% pada setiap tabung, lalu diputar lagi selama 10 menit pada 12.000 rpm pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan dibuang dan sampel dikeringkan dengan menggunakan *speed vac* (BioRad) selama 7 menit. DNA yang sudah dikeringkan dilarutkan dalam 3  $\mu\text{L}$  loading buffer ( 50mg/ml *blue dextran* dalam larutan EDTA 25 mM yang mengandung dimetilformamid 40% dengan perbandingan 5:1). Sebelum dielektroforesis, campuran yang mengandung DNA tersebut dipanaskan pada suhu  $90^\circ\text{C}$  selama 2 menit dan segera didinginkan dengan meletakkannya di dalam es. Larutan DNA di elektroforesis pada gel akrilamid/urea konsentrasi 4% [ 18 gr urea; 5 ml 40% stok akrilamid (38 gr akrilamid, 2 gr bis akrilamid, 100 ml dd $\text{H}_2\text{O}$  ); 0,5 gr mixed-bed resin; 50 ml TBE 1X ( ); 250  $\mu\text{L}$  APS 10% ( 0,1 gr *ammonium persulfate* dan 1 ml dd $\text{H}_2\text{O}$ ); 35  $\mu\text{L}$  TEMED] dalam *running buffer* TBE 1X selama lebih kurang 7 jam.

#### *Analisis Data*

Analisis data dilakukan dengan perangkat lunak ViroSeq<sup>TM</sup> HIV-1 Genotyping System v.20. Bioedit 2.0, perangkat lunak online REGA HIV-1 Subtyping Tool – v.2.0 dan MEGA 4.1.

#### **Hasil**

Sebanyak 70 isolat dari penasun, 20 isolat diantaranya berhasil diperoleh produk sekuen gen protease dan RT oleh tim peneliti HIV-DR dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (untuk selanjutnya disebut isolat Indonesia). Sekuen gen *protease* lengkap dengan panjang 297 nukleotida atau 99 asam amino protease dan gen *RT* tidak lengkap sepanjang 1005 nukleotida atau 335 asam amino ( 73,3% dari residu total asam amino RT).

Sementara isolat yang berasal dari darah donor Palang Merah Indonesia (PMI) tidak berhasil diperoleh produk sekuen karena gagal pada saat purifikasi cDNA sebanyak 1 isolat yaitu sampel PMI 04 dan gagal pada saat amplifikasi sebanyak 3 isolat yaitu PMI 09, PMI 12 dan PMI15.

Untuk mendapatkan hasil data sekuen yang akurat, telah dilakukan pengeditan data terhadap 20 sampel yang berhasil di sekuen menggunakan software ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.20.

#### ***Penentuan sub tipe HIV-1 yang beredar di Indonesia***

Dalam penelitian ini, setelah diperoleh hasil sekuen data gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* yang akurat, lalu dilakukan penentuan sub tipe terhadap 20 isolat yang berasal dari pasien HIV positif penasun tersebut dengan menggunakan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0 secara online pada alamat situs <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>. Dan hasilnya seluruh isolat memiliki sub tipe A (01\_AE) atau CRF01\_AE. Sehingga presentase sub tipe HIV-1 CRF01\_AE dalam penelitian mencapai 100%.

#### ***Analisis Variasi Genetik HIV-1 sub tipe dominan di Indonesia.***

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penentuan sub tipe terhadap 20 isolat Indonesia, dimana sub tipe CRF01\_AE merupakan sub tipe paling dominan (sebesar 100%), maka dalam penelitian ini analisis variasi genetik menggunakan sekuen dari isolat Indonesia yang memiliki sub tipe CRF01\_AE saja.

#### ***Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein Protease.***

Homologi nukleotida dan asam amino antara isolat yang di peroleh dari penelitian (isolat Indonesia) dan 2 isolat dengan sub tipe sama dari Thailand sebagai data referensi ( AY358062 dan AY945730 ), di bandingkan dengan sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE yang diperoleh dari *HIV Immunology and Sequence Databases*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos ( yang selanjutnya disingkat SKD ). Setelah dilakukan penyelarasan sekuen, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease masing-masing berkisar antara 92,2 - 100% dan 88,8 - 100%.

Perbedaan asam amino sangat menentukan terjadinya perubahan struktur sekunder protein, dan perubahan struktur sekunder juga sangat berpengaruh terhadap sifat antigenisitas protein antigen. Setelah dilakukan analisis perbedaan asam amino protease HIV-1 antara isolat Indonesia dan Thailand terhadap SKD, diperoleh 19 perbedaan asam amino. Perubahan asam amino dengan posisi 3I menjadi 3V, 20K menjadi 20R dan 70K menjadi 70R dijumpai dengan frekuensi tinggi (hampir pada semua isolat).

Asam amino protease memiliki 2 daerah lestari (konsepartif) yaitu, pertama pada posisi 58 sampai 74 dengan susunan asam QYDQILIEICGKKAIGT dengan panjang 17 segmen. Daerah lestari yang kedua pada posisi 80 sampai 96 dengan susunan asam amino sepanjang 17 segmen yaitu TPVNIIGRNMLTQIGCT.

Berdasarkan data yang terdapat dalam *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, epitop spesifik CTL pada protein protease HIV-1 adalah asam amino pada 3-11 (ITLWQRPLV), 34-42 (EEMNLPGRW), 30-38 (DTVLEEWNL).<sup>5,6</sup> Dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0, diselaraskan 3 epitop spesifik CTL tersebut terhadap sekuen konsensus asam amino protease isolat Indonesia (SKI) dan SKD. Setelah dibandingkan ternyata ketiga epitop bersesuaian dengan sekuen asam amino protease semua isolat pada posisi yang sesuai. Namun terdapat perbedaan pada beberapa isolat termasuk SKD di epitop 30-38, dimana 35E menjadi D dan 36W menjadi 36I. Demikian juga pada epitop 34-42, terdapat perubahan asam amino 35E menjadi 35D dan 36 M menjadi 36I.

#### *Analisis Sekuen Nukleotida Gen Dan Asam Amino Protein Reverse Transcriptase*

Homologi nukleotida dan asam amino antara isolat yang di peroleh dari penelitian (20 isolat Indonesia) dan 2 isolat dengan subtipe sama dari Thailand sebagai data referensi (AY358062 dan AY945730 ), di bandingkan dengan SKD. Setelah dilakukan penyelarasan, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease masing- masing berkisar antara 93,6 - 99,0% dan 88,6 - 97,9%.

Pada analisis perbedaan asam amino *reverse transcriptase* antara isolat HIV-1 subtipe CRF01\_AE Indonesia dan Thailand terhadap sekuen konsensus HIV-1 CRF01\_AE dari LANL (SKD), diperoleh 54 perbedaan asam amino.

Perubahan asam amino 43E menjadi 43K, 172R menjadi 172K dan 272A menjadi 272P dijumpai dengan frekuensi tinggi (hampir pada seluruh isolat).

*Reverse transcriptase* memiliki 4 daerah lestari (*conserved*) dengan panjang sekuen antara 15-40 asam amino. Daerah lestari tersebut adalah daerah 1 pada 44 sampai 63 yaitu asam amino EGKISKIGPENPYNTPVFAI; daerah 2 pada posisi 65 sampai 79 yaitu KKDSTKWRKLVDFRE ; daerah 3 pada posisi 87 sampai 106 dengan sekuen asam amino FWEVQLGIPHPAGLKKKKSV; daerah 4 pada posisi 246 sampai 285 dengan urutan asam amino LPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQI YPGIKVKQLCKLLRG.

Berdasarkan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, terdapat 27 epitop spesifik CTL pada protein *reverse transcriptase* HIV-1 yaitu asam amino pada 179-187 (VIYQYMDDL), 09-317 (ILKEPVHGV), 33-43 (ALVEICTEMEK), 73-82 (KLVDFRELNK), 93-101 (GIPHPAGLK), 158-166 (AIFQSSMTK), 269-277 (QIYPGIKVR), 356-366 (RMARGAHTNDVK), 158-166 (AIFQSSMTK), 158-166 (AIFQSSMTK), 341-350 (IYQEPFKNLK), 173-181 (KQNPDIYIY), 263-271 (KLNWASQIY), 356-365 (MRGAHTNDV), 392-401 (PIKETWETW) , 18-26 (GPKVKQWPL), 260-271 (LVGKLNWASQIY), 309-318 (ILKEPVHGVY), 107-115 (TVLDVGDAY), 118-127 (VPLDEDFRKY), 175-183 (NPDIYIYQY), 175-183 (HPDIYIYQY), 5-12 (IETVPVKL), 271-279 (YPGIKVRQL), 42-50 (EKEGKISK), 128-135 (TAFTIPSI), 375-383 (IAMESIVIW).<sup>5</sup>

Setelah epitop - epitop tersebut dibandingkan dengan SKI dan SKD, ternyata terdapat 5 epitop yaitu 356-366 (RMARGAHTNDVK), 341-350 (IYQEPFKNLK), 356-365 (RMARGAHTNDV), 392-401 (PIKETWETW), 375-383 (IAMESIVIW) yang tidak dapat dilakukan penyelarasan karena epitop berada pada posisi lebih dari 333 AA. Hal ini karena sekuen *RT* pada SKI yang diperoleh tidak lengkap. Sedangkan 22 epitop lainnya bersesuaian dengan sekuen asam amino *reverse transcriptase* dari SKI dan SKD pada posisi yang sesuai. Terdapat 12 epitop yang memiliki perbedaan residu asam amino dengan sekuen SKIr dan atau SKDr CRF01\_AE, dengan jumlah perbedaan residu antara 1- 3 asam amino.

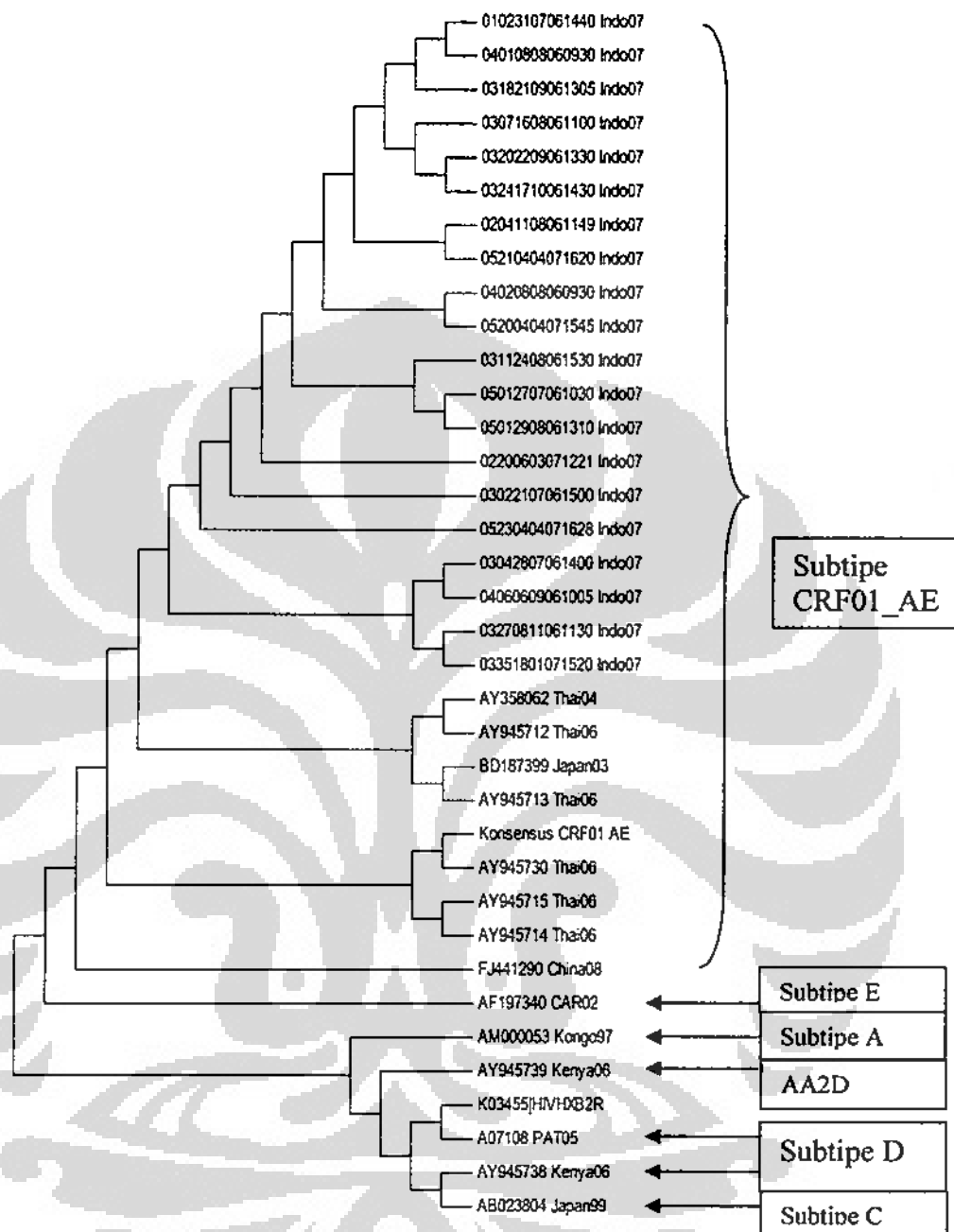
Berdasarkan studi dan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, epitop spesifik terhadap sel CD4+ yang terdapat pada RT sebanyak 1 epitop pada posisi asam amino 36 – 52 yaitu EICTEMEKEGKISKIGP. Setelah epitop tersebut diselaraskan dengan SKIr dan SKD CRF01\_AE, terdapat 1 perbedaan residu asam amino pada posisi ke – 40.

### ***Analisis silsilah genetik***

Analisis silsilah genetik dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan distribusi geografi diantara semua isolat. Kladoogram dibangun berdasarkan sekuen nukleotida gen *protease* utuh dan gen *RT* tidak utuh menggunakan *Neighbor-Joining method* yang terdapat pada perangkat lunak MEGA 4.1. Dalam analisis silsilah ini disertakan beberapa isolat virus HIV-1 yang berasal dari Afrika Tengah, Kongo, Kenya, Thailand, Jepang dan China untuk mewakili semua subtipe. Disertakan juga isolat HIV-1 HBX2, yang merupakan isolat HIV-1 yang pertama kali ditemukan. Kladoogram menunjukkan bahwa kedua puluh isolat Indonesia berada pada dalam satu kelompok (*cluster*) subtipe yang sama yaitu subtipe CRF01\_AE. Demikian juga dengan isolat - isolat subtipe CRF01\_AE yang berasal dari Thailand yang digunakan sebagai pembandingan.

### ***Penentuan sekuen konsensus HIV-1 subtipe CRF01\_AE isolat Indonesia.***

Pada penelitian ini, dalam menentukan sekuen konsensus isolat-isolat HIV-1 subtipe CRF01\_AE dari Indonesia, antara gen *protease* dan gen *RT* dilakukan secara terpisah. Untuk mendapatkan sekuen konsensus gen *protease* dilakukan penyelarasan sekuen nukleotida dan asam amino *protease* dengan menggunakan proses *clustal W* pada perangkat lunak Bioedit 7.0. Kemudian ditentukan sekuen konsensusnya. Proses yang sama dilakukan pada penentuan sekuen konsensus gen *RT*. Sekuen konsensus ini selanjutnya di sebut sekuen konsensus Indonesia (SKI). Kemudian pada masing-masing sekuen konsensus *protease* (SKIp) dan *RT* (SKIr) yang telah diperoleh, dibandingkan dengan sekuen nukleotida dan asam amino isolat komponen penyusunannya, serta dengan SKD.



Gambar 1. Hasil analisis filogenetik *Neighbor-Joining (NJ) method* sekuen asam amino protease dan *RT*.

Dari analisis diperoleh bahwa perbedaan SKIp dengan SKDp hanya 2,7% pada sekuen nukleotida dan 5,1% pada sekuen asam amino. Sedangkan perbedaan SKIr dengan SKDr adalah sebesar 2,0% pada perbandingan sekuen nukleotida dan sebesar 3,0% pada perbandingan sekuen asam amino.

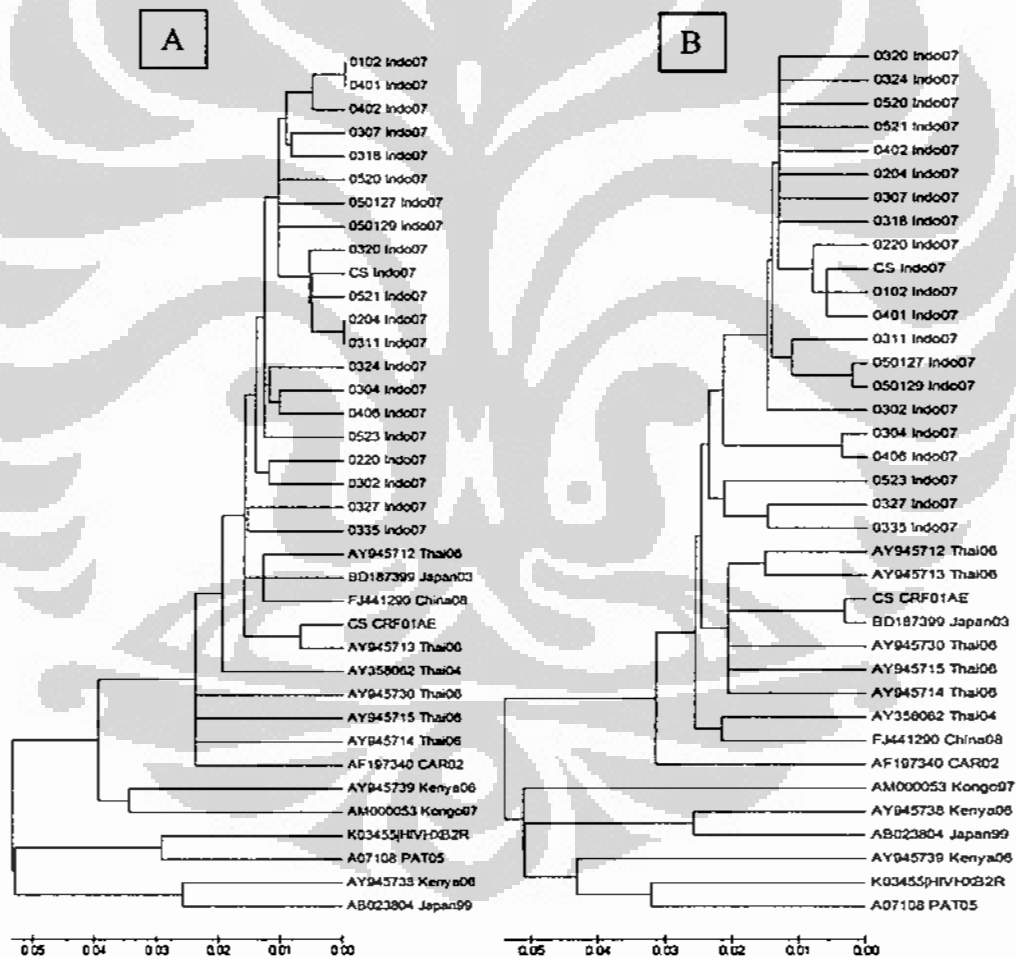
Perbandingan SKIp terhadap masing – masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 0,4 – 4,4% untuk sekuen nukleotida dan 0-7,1% untuk sekuen asam amino protease. Perbandingan SKIr terhadap masing –masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 1,0-4,1% untuk nukleotida dan 2,1 - 7,5% untuk sekuen asam amino *reverse transcriptase*. Isolat 03042807061400 memiliki perbedaan terkecil dengan SKIp sekuen nukleotida, sedangkan isolat 02041108061149 tidak memiliki perbedaan atau sama dengan sekuen asam amino SKIp. Pada *reverse transcriptase* diperoleh isolat dengan perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino terkecil dengan SKIr adalah isolat 01023107061440.

Untuk menentukan nilai kemaknaan dari perbedaan sekuen – sekuen tersebut dilakukan analisis statistik dengan menggunakan metode uji t tidak berpasangan. Dalam pengujian tersebut menggunakan perangkat lunak SPSS.

Tabel 1. Perbandingan antara SKI dengan SKD dan masing-masing isolat HIV-1 Indonesia

| Isolat Indonesia | Perbandingan dengan SKI protease |                         | Perbandingan dengan SKI RT |                          |
|------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                  | Perbedaan nukleotida (%)         | Perbedaan asam amino(%) | Perbedaan nukleotida(%)    | Perbedaan asam amino (%) |
| 01023107061440   | 1,4                              | 1,1                     | 1,0                        | 2,1                      |
| 02041108061149   | 0,7                              | 0                       | 1,6                        | 3,0                      |
| 02200603071221   | 1,7                              | 2,1                     | 1,2                        | 3,0                      |
| 03022107061500   | 3,4                              | 1,1                     | 2,1                        | 3,3                      |
| 03042807061400   | 0,4                              | 1,1                     | 1,5                        | 2,7                      |
| 03071608061100   | 1,7                              | 2,1                     | 1,7                        | 3,9                      |
| 03112408061530   | 1,4                              | 3,1                     | 2,9                        | 6,3                      |
| 03182109061305   | 1,4                              | 3,1                     | 1,7                        | 3,3                      |
| 03202209061330   | 4,1                              | 4,1                     | 4,1                        | 4,2                      |
| 03241710061430   | 3,4                              | 7,1                     | 3,6                        | 6,0                      |
| 03270811061130   | 1,4                              | 1,1                     | 1,3                        | 2,3                      |
| 03351801071520   | 0,7                              | 1,1                     | 1,2                        | 2,1                      |
| 04010808060930   | 3,1                              | 2,1                     | 3,5                        | 5,4                      |
| 04020808060930   | 2,4                              | 3,1                     | 1,9                        | 4,5                      |
| 04060609061005   | 4,4                              | 4,1                     | 1,9                        | 4,2                      |
| 05012707061030   | 1,7                              | 3,1                     | 3,0                        | 7,2                      |
| 05012908061310   | 1,4                              | 2,1                     | 2,9                        | 7,5                      |
| 05200404071545   | 2,4                              | 2,1                     | 3,4                        | 5,1                      |
| 05210404071620   | 2,4                              | 3,1                     | 3,1                        | 3,3                      |
| 05230404071628   | 2,7                              | 5,1                     | 1,9                        | 2,1                      |
| SKD CRF01_AE     | 2,7                              | 5,1                     | 2,0                        | 3,0                      |

Penentuan isolat Indonesia yang memiliki kemiripan dengan SKI dapat menggunakan pohon silsilah (*filogenetik tree*). Isolat yang memiliki kekerabatan paling erat dengan SKI dan memiliki presentase perbedaan terkecil dengan SKI merupakan isolat yang akan digunakan sebagai kandidat vaksin HIV-1. Pada pohon silsilah SKI protease (gambar 2A) menunjukkan isolat 0311 Indo07 (03112408061530) dan 0204 Indo07 (02041108061149) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr(CS Indo07). Pada pohon silsilah SKI *reverse transcriptase* (gambar 2B) menunjukkan isolat 0102 Indo07(01023107061440) dan 0401 Indo07 (04010808060930) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr.



Gambar 2. Hubungan filogenetik sekuen konsensus Indonesia ( digambar ditulis CS Indo07) gen *protease* (A) dan gen *reverse transcriptase* (B) dibandingkan sekuen --sekuen isolat Indonesia, SKD, dan beberapa isolat dari subtype selain.



## **Pembahasan**

Pada penelitian ini digunakan sekuen gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 untuk penentuan sekuen konsensus karena merupakan sekuen yang konservatif. Pada pasien yang belum mendapatkan terapi antiretroviral, sekuen asam amino protease menunjukkan tingkat kelestarian yang tinggi dimana tingkat variabilitasnya kurang dari 1%.<sup>7,8</sup> Sekuen gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 juga dapat digunakan untuk menentukan subtype HIV-1, variasi genetik dan menentukan kekerabatan genetik suatu isolat HIV-1.<sup>9</sup>

### ***Penentuan subtype HIV-1 isolat Indonesia***

Dalam menentukan subtype HIV-1 pada umumnya lebih disukai menggunakan sekuen selubung virus (*env*), karena sekuen *env* memiliki variabilitas yang besar. Namun dalam beberapa studi menunjukkan bahwa sekuen gen - gen HIV-1 yang lain juga bisa digunakan untuk penentuan subtype HIV-1 dan dapat mengidentifikasi genom rekombinan pada HIV. Penelitian terhadap gen protease dan gen RT untuk mengetahui mutasi gen yang berkaitan dengan resistensi virus terhadap RT dan *protease-inhibitor*, membuat sekuen nukleotida pada daerah tersebut dapat digunakan sebagai alternatif metode penentuan subtype HIV-1.<sup>9</sup>

Menurut beberapa penelitian *genotyping* HIV-1 yang telah dilakukan di Indonesia, subtype HIV-1 yang paling dominan di Indonesia adalah CRF01\_AE. Pada penelitian identifikasi *genotype* HIV-1 menggunakan gen *envelope* dan *gag* di Timika Papua Barat oleh Foley B *et al*, 2001 menyebutkan subtype yang paling dominan adalah CRF01\_AE sebesar 87,5% dan penelitian oleh Merati TP, *et al*, 2008 menggunakan gen *envelope* di Bali dan Klinik Rehabilitasi Narkoba di Bogor diperoleh data subtype yang paling dominan adalah subtype CRF01\_AE sebesar 90,7%.<sup>10,11</sup>

Pada penelitian ini dilakukan penentuan subtype HIV-1 Indonesia menggunakan sekuen gen *protease* dan gen *reverse transcriptase* yang diproses dengan bantuan perangkat lunak REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0. Hasilnya menunjukkan subtype HIV-1 CRF01\_AE sebesar 100%. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa subtype HIV-1 yang paling dominan di Indonesia

adalah CRF01\_AE. Pada penelitian ini variasi sub tipe HIV-1 Indonesia sangat rendah, bahkan tidak ada variasi, kemungkinan disebabkan virus belum/tidak mengalami mutasi akibat gangguan efek obat antiretroviral karena pasien belum pernah mendapatkan obat antiretroviral.

*Analisis Variasi Genetik HIV-1 sub tipe dominan di Indonesia.*

Berdasarkan analisis homologi sekuen nukleotida gen protease yang membandingkan sekuen isolat Indonesia dengan SKD dan isolat Thailand diperoleh angka kemiripan antar sekuen sebesar 92,2- 100%. Sedangkan homologi sekuen asam amino protease dari sekuen isolat – isolat tersebut adalah sebesar 88,8-100%. Tingginya tingkat homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease tersebut menunjukkan bahwa gen protease relatif lestari. Tingkat kelestarian gen protease tidak dipengaruhi distribusi geografis. Hal ini di tunjukkan pada perbandingan sekuen isolat Indonesia dengan sekuen konsensus dari LANL (SKD) sebesar 93,9 – 98,3% untuk sekuen nukleotida dan 91,9 – 98,9% untuk sekuen asam amino. Demikian juga perbandingan antara sekuen isolat Indonesia dengan sekuen isolat Thailand yang menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan kisaran antara 92,5 – 97,9 % pada sekuen nukleotida dan 88,8 - 97,9% pada sekuen asam amino.

Pada analisis perbedaan asam amino protease dengan membandingkan sekuen isolat- isolat Indonesia dengan sekuen konsensus LANL (SKD) sebagai prototipe dan sekuen isolat Thailand sebagai referensi, diperoleh perbedaan asam amino pada tiga posisi yaitu 3I menjadi 3IV, 20K menjadi 20R dan 70K menjadi 70R. Perubahan asam amino tersebut terjadi pada hampir semua isolat Indonesia. Perbedaan pada ketiga posisi tersebut tidak dijumpai pada sekuen isolat Thailand. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan isolat yang digunakan untuk membangun sekuen konsensus CRF01\_AE LANL (SKD).

Sekuen asam amino protease memiliki 2 daerah lestari yaitu, pertama pada posisi 58 sampai 74 dengan susunan asam QYDQILIEICGKKAIGT dengan panjang 17 segmen. Daerah lestari yang kedua pada posisi 80 sampai 96 dengan susunan asam amino sepanjang 17 segmen yaitu TPVNIIGRNMLTQIGCT.

Adanya daerah lestari tersebut sangat berpengaruh terhadap tingginya tingkat homologi protease.

Pada proses infeksi virus, respon CTL sangat penting untuk proses penyembuhan penyakit akibat infeksi virus tersebut. Asam amino protease HIV-1 memiliki 3 daerah epitop yang mampu merangsang respon CTL. Dari analisis tentang perbandingan epitop CTL pada asam amino protease dengan SKIp dan SKDp, epitop 34-42 (EEMNLPGRW) memiliki perbedaan asam amino terhadap SKIp dan SKDp yang signifikan dimana kemungkinan terjadi perubahan sifat epitop tersebut pada SKIp dan SKDp. Hal ini ditandai adanya perubahan asam amino yang bersifat hidrofobik pada epitop (asam amino M dan R) menjadi asam amino yang bersifat hidrofilik pada SKIp dan SKDp (asam amino E dan P).

Sedangkan homologi nukleotida dan asam amino *reverse transcriptase* antara isolat yang di peroleh dari penelitian ( 20 isolat Indonesia ) dan 2 isolat dengan sub tipe sama dari Thailand sebagai data referensi (AY358062 dan AY945730), di bandingkan dengan SKD. Setelah dilakukan penjejeran, diperoleh homologi sekuen nukleotida dan asam amino protease masing- masing berkisar antara 93,6%-99,0% dan 88,6%-97,9%.

Perbedaan asam amino sangat menentukan terjadinya perubahan struktur sekunder protein, dan perubahan struktur sekunder juga sangat berpengaruh terhadap sifat antigenisitas protein antigen. Setelah dilakukan analisis perbedaan asam amino *reverse transcriptase* antara isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE Indonesia dan Thailand terhadap sekuen konsensus HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari GenBank, diperoleh 54 perbedaan asam amino. Perubahan asam amino 43E menjadi 43K, 172R menjadi 172K dan 272A menjadi 272P dijumpai dengan frekuensi tinggi .

*Reverse transcriptase* memiliki 4 daerah lestari dengan panjang sekuen antara 15-40 asam amino. Daerah lestari tersebut adalah daerah 1 pada 44 sampai 63 yaitu asam amino EGKISKIGPENPYNTPVFAI; daerah 2 pada posisi 65 sampai 79 yaitu KKDSTKWRKLVDFRE ; daerah 3 pada posisi 87 sampai 106 dengan sekuen asam amino FWEVQLGIPHPAGLKKKKS SV; daerah 4 pada posisi 246 sampai 285 dengan urutan asam amino LPEKDSWTVNDIQKLV GKLNWASQIYPGIKVKQLCKLLRG

Pada studi dan data dari *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pada RT terdapat 27 epitop spesifik CTL, terdapat 22 epitop yang dapat dianalisis dan bersesuaian dengan SKI dan SKD pada posisi yang sesuai. Terdapat 12 jenis epitop yang memiliki perbedaan asam amino dengan SKI *reverse transcriptase* dan SKD. Jumlah asam amino yang berubah pada epitop – epitop yang berbeda tersebut berkisar antara 1 sampai 3 asam amino.

Berdasarkan sifat hidrofobik atau hidrofilik asam amino, dilakukan analisis terhadap 12 epitop yang memiliki perbedaan residu asam amino dengan SKIr dan SKDr. Diperoleh bahwa epitop A\*0301 (A3) RT 33–43 (ALVEICTEMEK) terdapat perbedaan residu asam amino pada 35V menjadi 35T pada SKIr dan SKDr, serta B\*4001 (B60) RT 202–210 IEELRQHLL terdapat perbedaan pada 207Q menjadi 207A. Kedua perbedaan residu asam amino pada kedua epitop tersebut diperkirakan menimbulkan pengaruh yang sangat signifikan terhadap sifat – sifat imunogenik kedua epitop. Hal ini dikarenakan asam amino 35V (valin) bersifat hidrofobik atau non-polar berubah menjadi 35T (Treonin) yang bersifat hidrofilik atau polar. Demikian juga perubahan asam amino 207Q (Glutamin) yang bersifat hidrofilik menjadi 207A (Alanin) yang bersifat hidrofobik. Perubahan sifat asam amino tersebut mengakibatkan perubahan struktur protein sehingga sifat imunogenik-nya juga berubah. Sedangkan perbedaan residu asam amino pada epitop – epitop yang lain diperkirakan tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap sifat imunogeniknya, karena perubahannya terjadi pada ruang lingkup sifat asam amino yang sama, hidrofobik atau hidrofilik . Namun hal tersebut masih perlu dibuktikan secara *in vitro* maupun *in vivo*.

RT juga memiliki epitop spesifik terhadap sel CD4+ sebanyak 1 epitop pada posisi asam amino 36 – 52 yaitu, EICTEMEKEGKISKIGP. Ditemukan 1 perbedaan residu asam amino jika dibandingkan dengan SKIr dan SKDr yaitu asam amino ke-39, dimana T (Treonin) menjadi K (Lisin). Namun diperkirakan perubahan tersebut tidak memiliki pengaruh terhadap sifat imunogenik epitop karena kedua residu tersebut sama – sama bersifat hidrofilik.

### ***Analisis Silsilah genetik***

HIV-1 memiliki keanekaragaman yang sangat tinggi. Distribusi geografi sub tipe dan CRF HIV-1 juga sangat dinamis. Pada penelitian ini dilakukan analisis silsilah atau filogenetik HIV-1 dengan menggunakan kladogram untuk mengetahui posisi filogenetik HIV-1 sub tipe CRF01\_AE yang sangat dominan di Indonesia dibandingkan dengan isolat – isolat dari negara lain. Pada analisis filogenetik menunjukkan bahwa kedua puluh isolat Indonesia yang disekuensing pada penelitian ini berada pada dalam satu kelompok (*cluster*) sub tipe yang sama yaitu sub tipe CRF01\_AE. Demikian juga beberapa isolat sub tipe CRF01\_AE yang berasal dari Thailand, Jepang dan China sebagai pembandingan.

Hal yang menarik adalah isolat Indonesia CRF01\_AE memiliki satu akar yang sama dan secara signifikan terpisah dalam satu kelompok. Hal yang sama terlihat pada isolat CRF01\_AE dari Thailand. Sekuen konsensus CRF01\_AE yang berasal dari database Los Alamos National Laboratory menunjukkan memiliki kekerabatan yang dekat dengan isolat – isolat CRF01\_AE dari Thailand.

### ***Penentuan Sekuen Konsensus HIV-1 Sub tipe CRF01\_AE Isolat Indonesia***

Pada penelitian ini, ditentukan sekuen konsensus nukleotida dan asam amino isolat-isolat HIV-1 sub tipe CRF01\_AE dari Indonesia dari gen protease dan gen RT dilakukan secara terpisah. Sekuen konsensus ini selanjutnya di sebut sekuen konsensus Indonesia (SKI). Kemudian pada masing-masing sekuen konsensus protease (SKIp) dan RT (SKIr) yang telah diperoleh, dibandingkan dengan sekuen nukleotida dan asam amino isolat komponen penyusunannya. Selain itu dibandingkan juga dengan nukleotida dan asam amino SKD.

Dari analisis diperoleh bahwa terdapat perbedaan secara bermakna antara SKIp dengan SKDp sebesar 2,7% ( $p = 0,030$ ) pada sekuen nukleotida dan 5,1% ( $p = 0,000$ ) pada sekuen asam amino. Sedangkan pada perbandingan sekuen nukleotida SKIr dengan SKDr terdapat perbedaan *tidak* bermakna sebesar 2,0% ( $p = 0,208$ ). Pada perbandingan sekuen asam amino SKIr dengan SKDr terdapat perbedaan yang bermakna sebesar 3,0% ( $p = 0,015$ ).

Perbandingan SKIp terhadap masing – masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 0,4 – 4,4% untuk sekuen nukleotida dan 0-7,1% untuk sekuen asam amino protease. Perbandingan SKIr terhadap masing –masing isolat Indonesia memiliki perbedaan berkisar antara 1,0 - 4,1% untuk nukleotida dan 2,1-7,5% untuk sekuen asam amino *reverse transcriptase*.

Dari hasil uji statistik tersebut dimana nilai  $p < 0,05$  berarti berbeda bermakna, maka dapat diambil kesimpulan bahwa sekuen konsensus asam amino protease dan *reverse transcriptase* HIV-1 dari Indonesia memiliki perbedaan yang nyata dengan sekuen konsensus dari data Los Alamos,NL. Dengan demikian setiap isolat HIV-1 CRF01\_A Indonesia memiliki kemungkinan yang besar berbeda dengan isolat negara lain, termasuk didalamnya perbedaan epitop – epitop yang merangsang sistem imun seluler maupun humoral.

Sehingga pendekatan baru dalam pengembangan vaksin HIV-1 yang spesifik pada wilayah regional, subtype dan populasi tertentu perlu dipertimbangkan untuk dilakukan di Indonesia. Pendekatan tersebut dapat berupa pengembangan vaksin HIV-1 yang berbasis isolat (*isolate based-vaccine*) atau dengan sekuen buatan (*artificial sequences*).

Pada penelitian ini juga ditentukan isolat HIV-1 yang memiliki potensi kuat untuk dijadikan kandidat vaksin berdasarkan pendekatan *isolate based-vaccine*. Isolat yang memiliki tingkat perbedaan paling rendah dengan sekuen konsensus adalah isolat yang akan dipilih sebagai kandidat vaksin. Dan dari analisis diperoleh isolat 03042807061400 memiliki perbedaan terkecil dengan SKIp sekuen nukleotida, sedangkan isolat 02041108061149 tidak memiliki perbedaan atau sama dengan sekuen asam amino SKIp. Pada *reverse transcriptase* diperoleh isolat dengan perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino terkecil dengan SKIr adalah isolat 01023107061440.

Penentuan isolat Indonesia yang memiliki kemiripan dengan SKI dapat menggunakan analisis filogenetik. Isolat yang memiliki kekerabatan paling erat dengan SKI dan memiliki perbedaan terkecil dengan SKI adalah isolat yang dipilih sebagai kandidat vaksin HIV-1. Analisis filogenetik SKI protease (gambar 2A) menunjukkan isolat 0311 Indo07 (03112408061530) dan 0204 Indo07 (02041108061149) memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr(CS Indo07).

Pada pohon silsilah SKI *reverse transcriptase* (gambar 2B) menunjukkan isolat 0102 Indo07 (01023107061440) dan 0401 Indo07 memiliki kekerabatan yang tinggi dengan SKIr.

Pada analisis diperoleh kesimpulan bahwa isolat dengan kode 02041108061149 merupakan isolat yang memiliki potensi paling kuat untuk dipakai pengemabangan vaksin gen protease dibandingkan isolat lain yang di analisis pada penelitian ini. Sementara isolat nomer 01023107061440 isolat yang memiliki potensi untuk dipakai sebagai kandidat vaksin berbasis gen *reverse transcriptase*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks, G.F., Butel, J.S., & Morse, A.S. (2004). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology (edisi ke-23)*. Philadelphia: McGraw-Hill Companies Inc.
2. World Health Organization. (2008). Global AIDS epidemic continues to grow. 19 Februari 2009. <http://www.who.int>
3. Departemen Kesehatan. Peringatan hari AIDS sedunia "Stop AIDS: saatnya melayani!" 19 Februari 2009. <http://www.depkes.go.id>
4. Ellenberger, D.L., Li, B., & Lupo, D.L. (2002). Generation of a consensus sequence from prevalent and incident HIV-1 infections in West Africa to guide AIDS vaccine development. *Virology*, 302, 155–163.
5. Korber, B., Brander, C., & Haynes, B.F. (ed). (2008). *HIV immunology and sequence databases*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.
6. Brander, C., Goulder, P.J.R. (2001). The identification of optimal HIV derived CTL epitopes in diverse populations using HIV clade-specific consensus. *HIV Immunology and Sequence Databases*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.
7. Ceccherini-Silbersteina, F., Erbaa, F., & Gagob, F. (2004). Identification of the minimal conserved structure of HIV-1 protease in the presence and absence of drug pressure. *AIDS*, 18(12), F11-F19.

8. van Harmelen, J.H., Shephard, E., Thomas, R., Hanke, T., Williamson, A.L., Williamson, C. (2003). Construction and characterization of a candidate HIV-1 subtype C DNA vaccine for South Africa. *Vaccine*, 21, 4380–4389.
9. Pasquier, A., Millot, N., Njouom, R., Sandres, K., Cazabat, M., Puel J., Izopet, J. (2001). HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of *pol* gene sequences. *Journal of Virological Methods*, 94, 45–54.
10. Foley, B., Donegan, E., Silitonga, N., Wignall, F.S., Busch, M.P., Delwart, E.L. (2001). Importation of multiple HIV type 1 strains into West Papua, Indonesia (Irian Jaya). *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17(17), 1655-1659.
11. Merati, T.P., Ryan, C., Tumbul, S., Wirawan, D.N., Otto, B., Bakta, M., Crowe, S. (2008). *Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia*. 10 Juli 2008. <http://www.ejournal.unud.ac.id>.

