

**STUDI AWAL REAKTIVITAS PROTEIN P24 *HUMAN*
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 REKOMBINAN
SUBTIPE B TERHADAP SERUM ORANG
DENGAN HIV/AIDS DARI JAKARTA
DAN BEBERAPA PROPINSI
DI INDONESIA**

TESIS

FEBRIANA CATUR ISWANTI

0606 000 081



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
JAKARTA
JUNI 2009**

**STUDI AWAL REAKTIVITAS PROTEIN P24 *HUMAN*
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 REKOMBINAN
SUBTIPE B TERHADAP SERUM ORANG
DENGAN HIV/AIDS DARI JAKARTA
DAN BEBERAPA PROPINSI
DI INDONESIA**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister

FEBRIANA CATUR ISWANTI

0606 000 081



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
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 : Febriana Catur Iswanti

NPM : 0606000081

Tanda tangan : 

Tanggal : 29 Juni 2009



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Febriana Catur Iswanti
NPM : 0606 000 081
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : **Studi awal reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan terhadap serum orang dengan HIV/AIDS dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia**

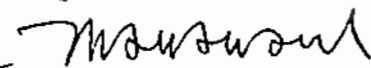
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk meraih gelar Magister Biomedik pada Program Studi Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Budiman Bela, Sp.MK (.....)
Pembimbing : Andi Yasmon, SPI,M.Biomed (.....)
Peng uji : dr. Alida Harahap, Phd,SpPK (K) (.....)
Peng uji : dr.Indra G.Mansyur, DHEB, Sp.And (.....)
Peng uji : Prof.dr.Agus Sjahrurachman,Phd,Sp.MK (.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 29 Juni 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr.rer physiol. dr.Septelia Inawati Wanandi

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari banyak pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Budiman Bela, Sp.MK selaku Pembimbing I dan Bpk. Andi Yasmon, SPI, Mbiomed, selaku Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya selama penelitian sampai penyusunan tesis ini;
2. Dr. rer.physiol. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik dan memberi kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu;
3. dr. Alida Harahap, Ph.D, Sp.PK selaku ketua kekhususan Imunologi FKUI (sampai periode 2008) dan DR. Heri Wibowo MS selaku ketua kekhususan Imunologi FKUI, atas perhatian, bimbingan dan pengarahan yang telah diberikan;
4. dr. Anis Karuniawati, Ph.D., Sp.MK., atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI;
5. Prof.dr.Mohamad Sadikin selaku pembimbing akademik atas perhatian dan bimbingan yang telah diberikan selama masa studi saya;
6. Suami (dr. Ardiyan, SpAn) dan anak-anakku (Arbyan Naufal Ramadhan dan Ardina Nayla Salsabila) tercinta atas dukungan, doa dan semangat yang diberikan selama ini;
7. Orang tua (Ayahanda Drs.H. Sarwan dan Ibunda Hj. Sri Sulasmi, BA) dan mertua (bapak dr.H.Arnis Djamaan dan almh ibu Hj.Sumarni) serta kakak-kakak dan adik-adik saya yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini;

8. Sahabat-sahabat saya, mbak Deka, Fithri, Yuni, mbak Ika, dan teman satu angkatan pada Program Biomedik yang telah memberikan bantuan, dukungan doa, semangat dan persahabatan; serta sahabat lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala kerjasama, bantuan, nasehat, doa dan persahabatan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
9. Seluruh staf dan pegawai di Departemen Mikrobiologi FKUI.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 29 Juni 2009

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Febriana Catur Iswanti
NPM : 06 06 000 081
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Imunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

Evaluasi reaktifitas protein p24 rekombinan Human immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) terhadap serum orang dengan HIV/AIDS

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta
Pada tanggal: 29 Juni 2009
Yang menyatakan



(Febriana Catur Iswanti)

ABSTRAK

Nama : Febriana Catur Iswanti
Program studi: Ilmu Biomedik
Judul : Studi awal reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan subtipe B terhadap serum orang dengan HIV/AIDS dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia

Uji diagnostik dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi untuk deteksi infeksi HIV sangat penting dikembangkan untuk mengontrol infeksi HIV di Indonesia. Uji diagnostik berbasis serologi yang digunakan untuk deteksi infeksi HIV di Indonesia seharusnya dapat mengenali epitop virus HIV subtipe CRF01_AE karena subtipe ini merupakan strain dominan (90%) di Indonesia. Penggunaan antigen rekombinan dilaporkan meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji serologi dan antigen murni dapat diproduksi dengan lebih mudah dan lebih aman.

Pada studi ini, antigen p24 HIV-1 rekombinan digunakan untuk mendapatkan data awal tentang reaktivitas antigen p24 HIV-1 subtipe B dengan serum yang diduga terinfeksi HIV/AIDS dan plasma terinfeksi HIV/AIDS subtipe CRF01_AE dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia. Reaktivitas plasma dan serum terhadap antigen p24 rekombinan dalam bentuk terdenaturasi dan non-denaturasi diuji dengan dot blot (DB) dan western blot (WB).

Hasil penelitian ini menunjukkan 33 dari 33 (100%) serum/plasma HIV + reaktif dengan uji WB dan DB, sedangkan dari 21 serum indeterminate 43% sampel reaktif dengan uji WB dan tidak ada (0%) yang reaktif dengan uji dot blot. Dua sampel serum negatif HIV reaktif dengan uji WB tapi tidak reaktif dengan DB. Studi ini menunjukkan bahwa antigen p24 subtipe B bereaksi silang dengan serum/plasma individu dengan CRF01_AE. Hasil yang tidak konsisten tampak pada reaktivitas protein p24 rekombinan terhadap sampel *indeterminate* dan negatif. Diperlukan studi lebih lanjut dengan jumlah sampel lebih besar dan lokasi geografis lebih luas dengan pemeriksaan PCR dan kultur untuk menjelaskan hal ini.

Kata kunci: protein p24 rekombinan HIV-1 subtipe B, uji western blot, uji dot blot

ABSTRACT

Diagnostic system with high sensitivity and specificity for detection of HIV infection is important to develop for control of HIV infection in Indonesia. It is however important that the immunoassays used for detection of HIV infection in Indonesia involve the recognition of epitopes belonging to HIV-1 AE_CRF01 subtype since this particular subtype constitutes approximately 90% of the circulating HIV-1 strains in Indonesia. The use of recombinant antigen has been shown to improve the sensitivity and specificity of serology diagnostic while allowing safe and large scale production of pure antigen with relatively less technical difficulties.

In this study, His-Tagged recombinant P24 HIV-1 antigen was utilized to obtain initial data concerning the reactivity of subtype B HIV-1 p24 antigen with sera of HIV-AIDS suspected individuals and plasma of AE_CRF01 infected individuals from Jakarta and several other provinces in Indonesia. The reactivity of the plasma and sera with native and linearized form of the recombinant p24 antigen were respectively assessed by dot blot (DB) and Western blot (WB) assays.

The results of this study showed that 33 of 33 (100%) HIV positive sera/plasma is reactive with both WB and dot blot assay, while of the 21 indeterminate sera/plasma samples 43% reactivity was observed by WB and none (0%) by DB. The two negative sera/plasma samples from suspected HIV-AIDS infected individuals were both reactive by WB but non-reactive by DB. This study showed that the p24 antigen of HIV-1 subtype B cross-react with sera/plasma from AE_CRF01 infected individuals. The inconsistent result shown by DB and WB in the reactivity of recombinant p24 reactivity with plasma and sera of individuals with indeterminate and negative infection status is interesting to be furtherly studied using expanded number of samples from a wider geographical location involving other methods for detection of HIV-1 infection such as PCR and culture, in order to obtain a statistically representative data concerning this findings.

Keywords: recombinant p24 HIV-1 subtype B, western blot, dot blot

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>	5
2.1.1.Genom dan struktur virus.....	5
2.1.2.Patogenesis HIV.....	7
2.1.3.Respon imun humoral selama infeksi HIV.....	9
2.1.4.Mekanisme penularan HIV.....	10
2.1.5.Epidemiologi HIV.....	10
2.1.6.Diagnosis HIV.....	11
2.1.7. Sensitivitas dan spesifisitas sistem diagnosis serologi HIV....	13
2.1.8. Protein rekombinan HIV-1.....	14
2.1.9. Protein p24.....	15
2.2. Uji western blot.....	15
2.3. Uji dot blot.....	17
3. BAHAN DAN CARA KERJA	18
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2. Alur Penelitian.....	18
3.3. Bahan	18

3.3.1. Protein p24 HIV-1 rekombinan.....	18
3.3.2. Spesimen.....	18
3.3.3. Preparasi spesimen.....	19
3.4. Cara kerja.....	19
3.4.1. SDS PAGE.....	19
3.4.2. Transfer protein dengan metode Transblot semidry.....	20
3.4.3. Uji western blot.....	21
a. Optimasi pengenceran serum manusia.....	22
b. Optimasi konsentrasi protein p24 rekombinan HIV-1	22
c. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP.....	22
d. Optimasi waktu inkubasi substrat.....	23
e. Analisis interaksi non spesifik.....	23
3.4.4. Uji dot blot.....	23
3.5. Analisis deskriptif.....	24
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1. Hasil	25
4.1.1. Identifikasi protein p24 rekombinan.....	25
4.1.2. Transfer protein.....	25
4.1.3. Optimasi pengenceran serum manusia.....	26
4.1.4. Optimasi protein p24 rekombinan HIV-1.....	27
4.1.5 Optimasi konsentrasi streptavidin-HRP.....	28
4.1.6. Optimasi waktu inkubasi substrat.....	29
4.1.7. Analisis interaksi non spesifik.....	29
4.1.8. Uji western blot dan uji dot blot.....	30
a. Uji western blot dan uji dot blot dengan serum PMI.....	30
b. Uji western blot dan dot blot dengan serum indeterminate	32
4.2. Pembahasan.....	34
4.2.1. Optimasi pengenceran serum manusia.....	34
4.2.2. Optimasi protein p24 rekombinan.....	34
4.2.3. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP	35
4.2.4. Pengaruh penggunaan dapar elektroforesis.....	36
4.2.5. Uji western blot dan uji dot blot pada serum PMI.....	36
4.2.6. Uji western blot dan uji dot blot pada serum indeterminate.....	39
5. KESIMPULAN DAN SARAN	41
DAFTAR REFERENSI	42
RIWAYAT HIDUP	46
LAMPIRAN	47
ARTIKEL.....	52

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 2.1. Struktur virus HIV secara skematik
- Gambar 2.2. Genom HIV secara skematik
- Gambar 2.3. Diagram skematik timbulnya antigen virus dan respon antibodi selama infeksi HIV
- Gambar 2.4. Rekomendasi WHO/UNAIDS untuk diagnosis HIV
- Gambar 3.1. Alur penelitian
- Gambar 4.1. Hasil SDS PAGE protein p24 rekombinan HIV-1
- Gambar 4.2. Gel poliakrilamid 12% setelah ditransfer ke membran nitroselulosa.
- Gambar 4.3. Optimasi pengenceran serum pada uji western blot.
- Gambar 4.4. Optimasi konsentrasi protein p24 rekombinan HIV-1 pada uji western blot.
- Gambar 4.5.. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP pada uji western blot
- Gambar 4.6. Optimasi waktu inkubasi pada uji western blot.
- Gambar 4.7. Uji western blot pada serum HIV +
- Gambar 4.8. Hasil uji western blot dengan serum PMI
- Gambar 4.9. Hasil uji dot blot dengan serum PMI
- Gambar 4.10. Hasil uji western blot dengan serum indeterminate
- Gambar 4.11. Hasil uji dot blot pada serum indeterminate

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Rekomendasi interpretasi uji western blot


Tabel 4.1. Hasil uji western blot dan dot blot pada serum PMI

Tabel.4.2. Hasil uji western blot dan dot blot pada plasma IDU

Tabel 4.3. Hasil uji western blot dan dot blot pada serum indeterminate



DAFTAR SINGKATAN



μ L	Mikroliter
Ab	Antibodi
Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
DAB	<i>Diamino Benzydine</i>
DTT	Dithiotreitol
E.coli	<i>Eschericia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoassay</i>
gp	Glikoprotein
HCl	<i>Hydrogen Chloride</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ig	Immunoglobulin
kD	Kilo Dalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililiter
mM	Milimolar
NaCl	Natrium Chloride
ng	Nanogram
p	Protein
PBS	Phosphate Buffer Saline
pH	Derajat keasaman
p24r	Protein P24 rekombinan
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel uji western blot dan dot blot dengan serum PMI dan plasma IDU

Lampiran 2. Tabel uji western blot dan dot blot dengan serum indeterminate

Lampiran 3. Gambar hasil uji western blot dan dot blot dengan serum PMI, plasma IDU dan serum *indeterminate*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang penelitian

Infeksi Human immunodeficiency virus (HIV) merupakan penyebab timbulnya gejala *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS).¹ Lebih dari 2 dekade sejak pertama ditemukan pada tahun 1981 penyakit ini telah menjadi pandemi di seluruh dunia. Menurut data UNAIDS jumlah total penderita HIV di dunia sampai bulan Desember 2007 telah mencapai 33 juta orang, dengan jumlah orang yang terinfeksi baru sebanyak 2,7 juta orang. Kasus terbanyak ditemukan di sub sahara Afrika dengan 22 juta orang yang terinfeksi HIV. Sedangkan di Asia Tenggara dan Selatan mencapai 4,2 juta orang dengan infeksi HIV. Angka kematian akibat AIDS pada tahun 2007 mencapai 2,0 juta orang.²

Virus HIV termasuk golongan retrovirus dari famili *Retroviridae*. Virus ini memiliki enzim *reverse transcriptase* yang mampu mengubah informasi genetik dari RNA menjadi DNA untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Terdapat dua tipe virus HIV yaitu HIV-1 dan HIV-2, dengan perbedaan sekuens sekitar 50%. Infeksi HIV-1 menyebar ke seluruh dunia terutama sub sahara Afrika, sedangkan infeksi HIV-2 terutama di Afrika khususnya Afrika Barat dan saat ini menyebar ke India.^{1,3}

Virus HIV-1 dibedakan menjadi beberapa grup, subtipe, sub-subtipe, *circulating recombinant form* (CRF) dan *unique recombinant form* (URF).⁴ Subtipe HIV-1 secara global mempunyai distribusi yang berbeda antara satu daerah dengan daerah lainnya, dan prevalensinya berubah dari waktu ke waktu. Sementara ini distribusi global subtipe HIV-1 dipercaya lebih berhubungan dengan perubahan sosial ekonomi, imigrasi, dan perjalanan internasional dibandingkan dengan perbedaan sifat atau daya transmisi virus.⁵

Diagnosis infeksi HIV umumnya berbasis uji serologi dengan mendeteksi antibodi terhadap HIV. Uji serologi ini diklasifikasikan menjadi uji skrining dan uji konfirmasi. Uji skrining bertujuan untuk identifikasi adanya spesimen yang positif mengandung antibodi, sedangkan uji konfirmasi bertujuan

untuk mengkonfirmasi adanya spesimen yang reaktif dengan uji skrining mengandung antibodi spesifik terhadap HIV.⁶ Namun adanya dua tahap uji diagnostik ini menyebabkan adanya masalah tersendiri. Beberapa peneliti melaporkan tingginya hasil yang tidak dapat disimpulkan (*indeterminate*) pada uji diagnostik HIV-1 dan mencoba mengetahui faktor risiko maupun cara meminimalkan timbulnya hal ini.^{7,8}

Enzyme immunoassay (EIA) merupakan uji yang sering digunakan dalam uji skrining HIV. Uji ini dapat digunakan pada serum, plasma, urin, cairan tubuh dan bercak darah kering. Bila uji skrining reaktif atau tidak dapat disimpulkan maka diperlukan uji konfirmasi. Uji konfirmasi dapat mendeteksi antibodi terhadap HIV lebih spesifik, biasanya digunakan uji western blot. Selain itu, dapat juga digunakan *radio immuno precipitation assay* (RIPA), *immunofluorescent antibody assay* (IFA), *line immunoassay* (LIA) dan *polymerase chain reaction* (PCR).^{4,9}

Antigen virus yang digunakan dalam uji serologi pada awalnya dalam bentuk lisat yang diperoleh dari virus utuh. Namun hasil purifikasi virion dari virus yang bereplikasi dalam sel inang seringkali masih mengandung protein sel pejamu. Bila antigen ini digunakan dalam uji serologi maka protein sel pejamu ini akan dikenali oleh antibodi manusia sehingga menghasilkan reaksi positif palsu.¹⁰

Perkembangan cepat dalam bidang biologi molekuler terutama kemampuan mengidentifikasi sekuens genetik virus dan teknik pengklonaan memungkinkan diproduksi antigen virus spesifik dalam jumlah besar. Hal ini berpengaruh dalam perkembangan uji serologi dengan penggunaan antigen rekombinan. Tidak adanya protein sel inang dalam preparasi antigen rekombinan dapat menurunkan hasil reaksi positif palsu. Produk ini tidak hanya digunakan untuk meningkatkan spesifisitas deteksi antibodi dalam uji diagnostik namun juga untuk meneliti respon imun humoral selama infeksi HIV.^{10,11}

Salah satu antigen HIV-1 yang lazim digunakan dalam uji diagnostik adalah protein p24. Protein p24 diturunkan dari prekursor poliprotein HIV yaitu p55 yang kemudian membelah menjadi protein p24, p17 dan p7/p9. Protein p24

tidak terglisosilasi dengan berat molekul 24 kD. Protein ini membentuk inti virus dan melindungi kode genetik virus. Deteksi antibodi terhadap protein *envelope* merupakan dasar kit imunodiagnostik untuk deteksi infeksi HIV. Namun kit ini tidak mampu mendeteksi sampel yang sedang dalam fase serokonversi awal dimana antibodi terhadap antigen p24 pertama kali terbentuk. Penambahan antigen ini dalam kit untuk uji diagnostik dapat meningkatkan sensitifitas uji.¹²

Penggunaan antigen rekombinan dilaporkan meningkatkan sensitifitas uji serologi yang digunakan. Beberapa peneliti melaporkan sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi pada penggunaan RIBA HIV-1/2 SIA yang mengandung protein p24 rekombinan dibandingkan uji *western blot* konvensional.^{13,14} Sedangkan Bhardwaj melaporkan penggunaan p24 rekombinan dalam uji ELISA memberikan sensitifitas 99,63% dengan spesifisitas 99,88%.¹² Houfbauer juga melaporkan penggunaan antigen p41 rekombinan dalam uji *western blot* sangat sensitif dan spesifik dalam mendeteksi infeksi HIV-1.¹⁵

Meskipun sebagian besar metode EIA dapat mendiagnosis orang yang terinfeksi HIV namun terdapat kesulitan dalam mendeteksi orang yang terinfeksi HIV subtipe non-B. Hal ini disebabkan sebagian besar antigen yang digunakan dalam uji diagnostik yang beredar di pasaran adalah subtipe B.¹⁶ Adanya penyebaran subtipe yang berbeda berpotensi menimbulkan masalah dalam akurasi metode serodiagnosis yang digunakan.

1.2. Permasalahan

p24 merupakan protein kapsid HIV-1 dengan antigenisitas tinggi. Respon imun humoral terhadap p24 terbentuk pertama kali pada individu yang terinfeksi HIV, dan kadarnya menurun seiring dengan progresivitas penyakit. Uji diagnostik dengan antigen p24 yang beredar di pasaran umumnya menggunakan subtipe B. Berdasarkan penelitian terdapat indikasi kesulitan deteksi infeksi HIV pada daerah dengan distribusi HIV subtipe non B pada penggunaan uji diagnostik dengan antigen subtipe B. Dalam pengembangan uji diagnostik seharusnya dapat mendeteksi infeksi sesuai subtipe yang dominan terdapat di daerah tersebut. p24 HIV-1 rekombinan subtipe B telah diperoleh

melalui ekspresi dan purifikasi protein fusi p24 HIV-1 ber-tag Histidin namun belum didapatkan data reaktivitas terhadap antibodi HIV-1 pada populasi ODHA di Indonesia yang sebagian besar (90%) terinfeksi oleh sub tipe CRF01_AE.

1.3. Tujuan penelitian

Tujuan umum penelitian adalah untuk memperoleh informasi tentang reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan sub tipe B terhadap serum orang dengan HIV/AIDS di Jakarta dan beberapa kota lain di Indonesia.

Adapun tujuan khusus penelitian adalah :

1. Memperoleh kondisi uji *western blot* yang optimal untuk menilai reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan terhadap serum ODHA.
2. Memperoleh informasi tentang gambaran reaktivitas protein fusi his-tag p24 HIV-1 rekombinan terhadap serum ODHA
3. Memperoleh data awal tentang gambaran serum yang menunjukkan hasil *indeterminate* dengan uji *rapid test* di Indonesia
4. Mendapatkan data awal mengenai kelayakan penggunaan sub tipe HIV-1 di Indonesia untuk pengembangan uji serologi.

1.4. Manfaat penelitian

Manfaat penelitian adalah :

1. Informasi tentang reaktivitas protein fusi his-tag p24 HIV-1 rekombinan terhadap serum uji (positif, indeterminate, negatif) merupakan informasi awal yang dapat digunakan untuk mengarahkan pengembangan uji diagnostik serologik infeksi HIV-1
2. Pengembangan uji diagnostik untuk deteksi infeksi HIV-1 di Indonesia dapat berpotensi mengurangi ketergantungan dengan kit komersial produksi dari luar Indonesia.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Human immunodeficiency virus (HIV)

Virus HIV termasuk dalam golongan retrovirus dari genus *Lentivirus* dan family *Retroviridae*. Retrovirus mampu mengubah informasi genetik dari RNA ke DNA dengan enzim *reverse transcriptase* (RT) yang dikode oleh gen *pol* pada genom retrovirus. Gen ini dan 2 gen lainnya yaitu *gag* dan *env* merupakan regio pengkode utama untuk protein struktural yang diperlukan retrovirus untuk mempertahankan siklus hidupnya.¹

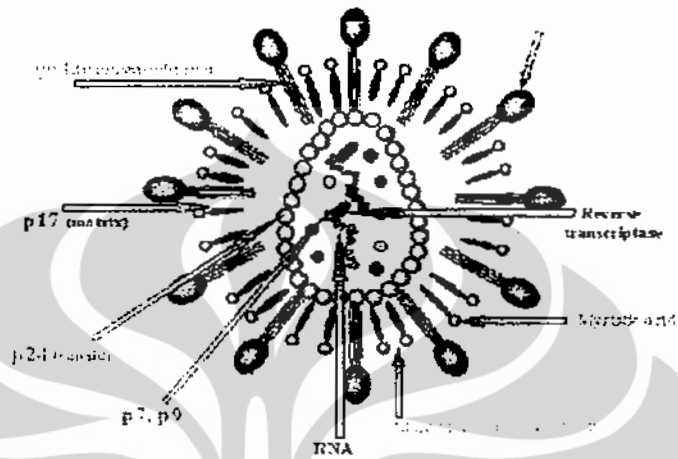
Terdapat dua tipe virus HIV, yaitu HIV-1 dan HIV-2. Kedua tipe tersebut memiliki perbedaan organisasi genom dan hubungan filogenetik dengan lentivirus primata lainnya. Perbedaan sekuens antara HIV-1 dan HIV-2 berkisar 55%.¹⁷

Berdasarkan sekuens gen *env*, HIV-1 terbagi menjadi tiga grup, yaitu M (*major*), N dan O (*outlier*) dimana grup M yang utama memiliki beberapa subtipe atau *clade* yaitu A,B,C,D,,F,G,H, dan J. Sedangkan untuk HIV-2 berdasarkan gen *env* dan *gag* terdapat lima subtipe yaitu A,B,C,D dan E. Infeksi HIV-1 tersebar di seluruh dunia dengan jumlah kasus terbanyak di sub sahara Afrika. Pertumbuhan jumlah kasus terbanyak di Asia dan Amerika Serikat. HIV-2 lebih banyak terdapat di Afrika terutama Afrika Barat dan saat ini meluas ke India. HIV-2 menyebabkan penyakit yang sama dengan HIV-1 namun lebih ringan dibandingkan AIDS.^{3,17}

2.1.1. Genom dan struktur virus

Retrovirus berselubung (*envelope*), merupakan virus RNA untai positif, memiliki enzim khas yaitu *reverse transcriptase* untuk mengubah genom RNA menjadi provirus DNA. Virion HIV-1 berbentuk sferis dengan diameter 120 nm dan mengandung inti berbentuk kerucut yang dikelilingi oleh selubung (*envelope*) berupa dua lapis lipid yang berasal dari membrane sel inang. Inti virus mengandung protein kapsid utama p24, protein nukleokapsid p7/p9, dua kopi genom RNA dan tiga enzim yaitu *protease*, *reverse transcriptase* dan *integrase*. Inti virus dikelilingi oleh protein matriks yang disebut p17 yang

terletak di bawah selubung virion. Bertaburan pada selubung adalah dua glikoprotein virus yaitu gp120 dan gp41 yang memiliki peran penting dalam infeksi HIV pada sel.¹⁷



Gambar 2. 1. Struktur virus HIV secara skematik¹⁸

Beberapa tonjolan pada permukaan virion yaitu gp120 berperan dalam penempelan virus pada sel inang. gp41 berperan untuk masuknya virus ke dalam sel inang. Protein matriks p17 berperan dalam menjaga struktur virus, membawa genom virus ke inti sel inang dan pelepasan virion baru. Inti virion terdiri dari antigen kapsid p24, dua kopi RNA untai tunggal dan beberapa protein yaitu nukleokapsid dan tiga enzim penting *reverse transcriptase*, *protease* dan *integrase*.¹⁷



Gambar 2.2. Genom HIV secara skematik.¹⁸

Terdapat tiga gen utama dan enam gen tambahan. Tiga gen utama adalah *gag*, *pol* dan *env*. Gen *gag* (dari grup antigen) dan *pol* (dari polymerase) dapat menghasilkan protein yang akan dibagi menjadi beberapa segmen oleh enzim

protease virus menjadi beberapa enzim fungsional dan unit struktural. Tiga enzim yang dihasilkan yaitu *protease*, *reverse transcriptase* dan *integrase* sedangkan unit struktural yang dihasilkan adalah sejumlah protein termasuk protein kapsid (p24) dan protein matriks p17. Gen *env* menghasilkan protein prekursor yang akan diproses oleh enzim sel inang untuk memberikan glikoprotein permukaan gp120 dan glikoprotein transmembran gp41.¹⁷

Selain tiga gen utama tersebut, HIV mengandung beberapa gen asesori lainnya, yaitu *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* dan *vpu* yang berperan dalam sintesis dan penyusunan partikel infeksius serta berperan dalam patogenitas virus.^{3,17}

2.1.2. Patogenesis HIV

Infeksi HIV biasanya berlangsung sekitar 1 dekade. Tahapannya meliputi infeksi primer, penyebaran virus ke organ limfoid, fase laten klinis, peningkatan ekspresi HIV, fase klinis penyakit dan kematian. Lamanya infeksi primer dan perkembangannya sampai fase klinis berkisar 10 tahun. Pada kasus yang tanpa terapi, kematian biasanya terjadi selama 2 tahun setelah timbulnya gejala klinis.¹

Setelah infeksi primer, terdapat periode 4 sampai 11 hari antara infeksi mukosa dan viremia awal. Viremia terdeteksi selama 8-12 minggu. Pada fase ini virus menyebar di seluruh badan dan terjadi pembesaran organ limfoid. Sindrom seperti *mononucleosis* akut terjadi pada banyak pasien 3-6 minggu setelah infeksi primer. Terjadi penurunan jumlah sel CD4 secara bermakna pada fase awal. Respon imun terhadap HIV terjadi pada 1 minggu sampai 3 bulan setelah infeksi, viremia dalam plasma menurun dan kadar sel T CD4+ membaik. Namun respon imun tidak mampu mengatasi infeksi secara tuntas sehingga sel yang terinfeksi HIV tetap ada di kelenjar getah bening.¹

Sindrom retroviral akut dimulai pada 50% sampai 70% orang yang terinfeksi HIV setelah periode inkubasi 6 hari sampai 6 minggu, dengan gejala demam, nyeri kepala dan otot, pembesaran kelenjar getah bening dan ruam. Gejala-gejala ini biasanya berlangsung 1 sampai 4 minggu dan menghilang tanpa gejala. Dengan atau tanpa gejala, kadar HIV dalam darah meningkat tinggi bersamaan dengan sel yang baru terinfeksi melepaskan virus baru. Viremia yang

bermakna biasanya menurun dengan diproduksi sel T sitotoksik yang belum terinfeksi. Pada fase awal kadar sel T CD4+ menurun, kemudian meningkat perlahan-lahan namun tidak mencapai kadar sebelum infeksi. Setelah episode akut individu yang terinfeksi HIV memasuki periode tanpa gejala yang berlangsung beberapa bulan sampai beberapa tahun. Kadar RNA virus HIV yang diperiksa dalam plasma yang bersirkulasi dan kelenjar getah bening merupakan prediktor yang bagus untuk fase penyakit. Kadar yang tinggi menunjukkan perkembangan yang lebih cepat ke arah AIDS. Walaupun tanpa gejala, pertarungan terus berlangsung antara virus HIV dengan sistem imun selama hidup individu tersebut. Virus yang menginfeksi tetap ada dalam darah maupun hasil sekresi tubuh.¹⁷

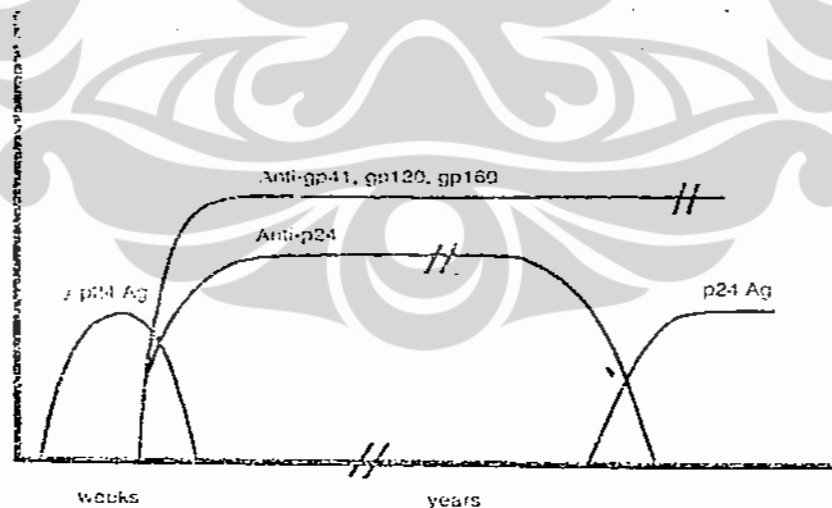
Pada 80 % individu yang terinfeksi HIV kemampuan sistem imun semakin menurun meskipun tubuh dapat mengganti 1 juta sel T CD4+ per hari. Hitung sel T CD4+ dalam darah perifer menurun rata-rata 50 sel/ μ L/tahun. Gejala AIDS biasanya muncul ketika hitung sel T CD4+ menurun sampai di bawah 200 sel/ μ L. Kadar virus pada fase ini biasanya meningkat sangat tinggi. Pada fase ini, patologi biasanya didominasi oleh neoplasma maligna ataupun infeksi oportunistik. Setengah dari pasien yang mencapai fase ini biasanya berlangsung selama 9 sampai 10 tahun.¹⁷

Berdasarkan lamanya infeksi HIV dan kinetika virologi dan imunologi yang tampak selama berlangsungnya penyakit, terdapat 3 pola evolusi penyakit HIV. Pertama, 80% sampai 90% orang yang terinfeksi HIV merupakan *typical progressor* dengan rata-rata usia harapan hidup dalam perjalanan penyakit HIV adalah 10 tahun. Kedua, 5% sampai 10% orang yang terinfeksi HIV merupakan *rapid progressor* dengan perjalanan penyakit 3 sampai 4 tahun. Sedangkan yang ketiga, sekitar 5% orang yang terinfeksi HIV tidak mengalami progresifitas penyakit dalam periode yang lama (minimal 7 tahun) dan disebut *long term non-progressor (LTNP)*.¹⁹

2.1.3. Respon imun humoral selama infeksi HIV

Setelah virus HIV masuk ke dalam tubuh seseorang, terjadi periode viremia dalam plasma dan peningkatan titer antigen p24. Periode antara infeksi sebelum terbentuknya antibodi ini disebut *window periode*, biasanya berlangsung 0-6 minggu. Pada fase ini sudah terjadi infeksi namun tidak dapat dideteksi dengan tes serologi yang mendeteksi antibodi. Untuk deteksi fase awal infeksi biasanya diperlukan pemeriksaan antigen maupun antibodinya, dan pemeriksaan ulang bila keduanya negatif. Metode lain untuk mendeteksi infeksi adalah dengan isolasi virus dan amplifikasi asam nukleat. Biasanya deteksi antigen atau genom virus HIV belum positif sampai terjadinya viremia.¹¹

Produksi antibodi spesifik terhadap HIV biasanya berlangsung dalam 2-8 minggu. Antibodi terhadap komponen *gag*, protein inti yang utama yaitu p24 dan p55 biasanya timbul pertama kali setelah infeksi. Sedangkan antibodi terhadap *env* dan produk gen *pol* kadang diproduksi bersamaan dengan antibodi terhadap komponen *gag* atau lebih lambat dan jarang sekali diproduksi sebelum antibodi terhadap protein inti. Protein struktural inti dan selubung (*envelope*) bersifat memicu respon imun humoral dengan kuat. Dalam perjalanan infeksi, antibodi terhadap p24 biasanya menurun seiring dengan peningkatan kadar antigen p24 pada saat perkembangan penyakit semakin progresif. Sebaliknya, antibodi anti-*env* misalnya anti-gp120 tetap ada selama infeksi.¹¹



Gambar 2.3. Diagram skematik timbulnya antigen virus dan respon antibodi selama infeksi HIV¹¹

2.1.4. Mekanisme penularan HIV

Virus HIV terutama menyebar melalui hubungan seksual. Hubungan seksual yang berisiko terutama adalah hubungan seksual dengan beberapa pasangan, hubungan seksual dengan orang yang sering berganti pasangan, hubungan seksual melalui anus dan penyakit menular seksual yang menyebabkan iritasi dan inflamasi.¹⁷

Cara transmisi lain adalah melalui darah dan produk darah. Salah satu produk darah dari donor adalah faktor VIII yang digunakan untuk terapi perdarahan pada pasien hemofilia. Transmisi melalui darah masih merupakan faktor utama di daerah pandemi HIV dengan penggunaan jarum suntik secara bersama-sama oleh pengguna narkotika.¹⁷

HIV juga dapat menular dari ibu ke bayinya, baik pada saat di dalam kandungan, dalam proses melahirkan maupun melalui ASI. Pemberian ASI juga merupakan faktor risiko penularan HIV dari ibu ke bayinya, terutama bila ibu menderita infeksi HIV akut.¹⁷

2.1.5. Epidemiologi HIV

Menurut data UNAIDS jumlah total penderita HIV di dunia sampai bulan Desember 2007 telah mencapai 33 juta orang, dengan jumlah orang yang terinfeksi baru sebanyak 2,7 juta orang. Kasus terbanyak ditemukan di sub Sahara Afrika dengan 22 juta orang yang terinfeksi HIV. Sedangkan di Asia Tenggara dan Selatan mencapai 4,2 juta orang dengan infeksi HIV. Angka kematian akibat AIDS pada tahun 2007 mencapai 2,0 juta orang.²

Menurut data Ditjen PPM&PL Departemen Kesehatan RI sampai bulan Maret 2009 tercatat terdapat 23.632 kasus HIV dan AIDS dengan 3.492 kematian di Indonesia. Propinsi yang melaporkan kasus AIDS terbanyak adalah Jawa Barat dengan 3.162 kasus AIDS dan 579 kematian. Sedangkan DKI Jakarta melaporkan 2.807 kasus dengan 425 kematian dan Jawa Timur .2652 kasus dengan 596 kematian. Prevalensi kasus AIDS di Indonesia yang tertinggi adalah di Papua dengan 135,7 per 100.000 penduduk, sedangkan Bali 36,21 kasus per 100.000 penduduk. Prevalensi kasus AIDS di DKI Jakarta adalah 30,81 per 100.000 penduduk. Penderita AIDS terbanyak pada usia muda dengan

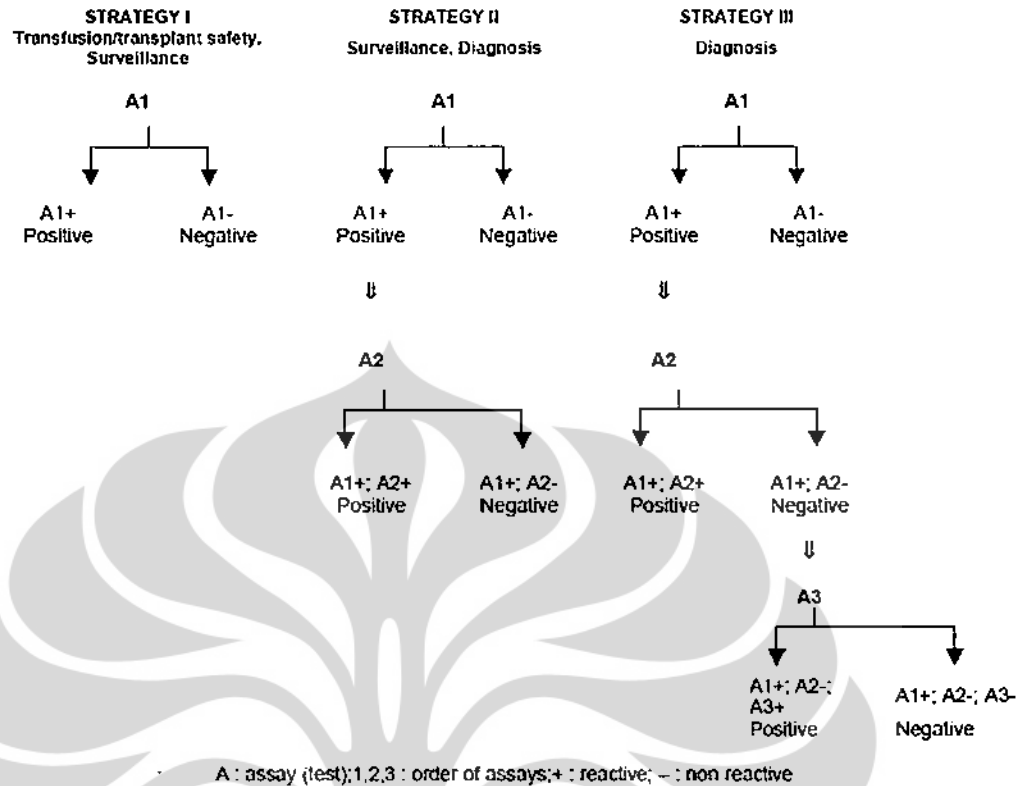
golongan umur 20-29 tahun yaitu 8.567 orang, diikuti golongan umur 30-39 tahun yaitu 4.997 orang.²⁰

Subtipe HIV-1 secara global mempunyai distribusi yang berbeda antara satu daerah dengan daerah lainnya, dan prevalensinya berubah dari waktu ke waktu. Hal tersebut terlihat dari laporan UNAIDS (*United Nation joint program on AIDS*) yang memperkirakan prevalensi subtipe HIV-1 pada tahun 2000 adalah 45% subtipe C, 25% subtipe A, 16% subtipe B, 4% subtipe D, 4% subtipe E dan 3% subtipe lainnya. Pada tahun 2002 didapatkan perubahan dimana subtipe A menjadi 35% dan subtipe C menjadi 30%, sedangkan subtipe lainnya relatif tetap. Sementara ini distribusi global Subtipe HIV-1 dipercaya lebih berhubungan dengan perubahan sosial ekonomi, imigrasi, dan perjalanan internasional dibandingkan dengan perbedaan sifat atau daya transmisi virus. Merati dkk (2008) melaporkan bahwa terdapat empat jenis subtipe HIV-1 yang beredar di Indonesia, yaitu *Circulating Recombinant Factors (CRF)01_AE* (90,7%), subtipe B(6,7%) dan subtipe C dan subtipe G (AG) 1,3%.⁵

2.1.6. Diagnosis HIV

Diagnosis infeksi HIV biasanya dibuat dengan berbasis deteksi antibodi terhadap HIV. Sebagian besar orang terdeteksi antibodinya dalam 3 bulan setelah infeksi. Uji serologi untuk deteksi antibodi terhadap HIV diklasifikasikan menjadi uji skrining dan uji konfirmasi. Uji skrining bertujuan untuk identifikasi adanya spesimen yang positif mengandung antibodi, sedangkan uji konfirmasi bertujuan untuk mengkonfirmasi adanya spesimen yang reaktif dengan uji skrining mengandung antibodi spesifik terhadap HIV.¹¹

WHO dan UNAIDS merekomendasikan tiga kriteria pemilihan strategi pemeriksaan HIV yaitu pertama tujuan tes (keamanan transfusi/transplantasi, surveilans, diagnosis infeksi HIV), kedua sensitivitas dan spesifisitas uji yang digunakan dan ketiga prevalensi HIV pada populasi yang diuji.¹¹



Gambar 2.4. Rekomendasi WHO dan UNAIDS untuk diagnosis HIV¹¹

Strategi I memerlukan 1 uji untuk diagnosis pada populasi dengan prevalensi HIV >30% orang dengan gejala klinis dan surveilans >10 %. Strategi II memerlukan 2 uji untuk diagnosis pada populasi dengan prevalensi HIV ≤ 30% orang dengan gejala klinis atau ≥ 10% asimtomatik atau surveilans pada populasi dengan prevalensi HIV ≤10%. Sedangkan strategi III memerlukan 3 uji untuk digunakan pada populasi dengan prevalensi HIV ≤10% diantara yang asimtomatik.¹¹

Enzyme immunoassay (EIA) dan *enzyme linked immunoassay* (ELISA) merupakan uji yang sering digunakan dalam uji skrining HIV. Uji ini dapat digunakan pada serum, plasma, urin, cairan tubuh dan bercak darah kering. Bila uji skrining reaktif atau tidak dapat disimpulkan maka diperlukan uji konfirmasi. Uji konfirmasi dapat mendeteksi antibodi terhadap HIV lebih spesifik, biasanya digunakan uji western blot. Selain itu, dapat juga digunakan *radio immuno precipitation assay* (RIPA), *immunofluorescent antibody assay* (IFA), *line immunoassay* (LIA) dan *polimerase chain reaction* (PCR).^{11,21}

Terdapat beberapa jenis antigen yang digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap HIV-1. Pertama, menggunakan lisat virus yang diperoleh dari galur sel yang terinfeksi virus. Antigen ini digunakan setelah dilakukan purifikasi dengan sentrifugasi bertingkat (digunakan dalam ELISA indirek maupun *western blot*) ataupun digunakan sebagai lisat virus yang murni (digunakan dalam *antigen capture* ELISA maupun *competitive* ELISA). Kedua, menggunakan antigen rekombinan dan peptida sintesis. Antigen jenis ini dapat digunakan untuk skrining HIV, untuk mengetahui respon imun humoral terhadap antigen tertentu, memonitor individu yang terinfeksi dan memonitor individu yang divaksinasi.¹¹

2.1.7. Sensitivitas dan spesifisitas sistem diagnosis serologi

Negara-negara berkembang mengambil kriteria diagnostik infeksi HIV-1 yang berbeda dengan negara-negara maju. Definisi kasus AIDS menurut *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) mensyaratkan adanya antibodi terhadap HIV melalui ELISA dan dikonfirmasi dengan uji *western blot* atau RNA HIV disamping adanya penurunan sel CD4+. Negara-negara di Afrika menggunakan uji serologi sebagai baku emas diagnosis HIV/AIDS di Afrika.²²

ELISA masih menjadi uji diagnostik yang paling banyak digunakan karena keterbatasan dana, peralatan dan sumber daya manusia untuk uji diagnostik yang lain.²² Sampai saat ini telah dikembangkan 4 generasi teknik ELISA. ELISA generasi pertama menggunakan lisat virus sebagai antigen, sedangkan generasi kedua menggunakan antigen yang telah dipurifikasi atau protein rekombinan sebagai antigen. ELISA generasi kedua ini yang paling banyak digunakan sebagai uji skrining di Amerika Serikat. ELISA generasi ketiga menggunakan mekanisme yang sama dengan generasi sebelumnya ditambah kemampuan mendeteksi IgM sehingga mengurangi *window period*. Generasi terbaru ELISA memiliki mekanisme yang sama dengan generasi ketiga ditambah antibodi yang mampu mendeteksi antigen p24 dalam serum pasien.⁹

Sensitivitas dan spesifisitas ELISA dilaporkan cukup tinggi. Dari 14 kit komersial yang beredar di pasaran, memiliki spesifisitas 99,2% sampai 100% terhadap serum donor di Swedia, sedangkan di Afrika spesifisitasnya lebih

rendah yaitu 99,1% sampai 99,6%.²² Urassa et al melaporkan alternatif uji konfirmasi dengan kombinasi penggunaan 2 jenis ELISA yaitu *recombinant antigen-based sandwich ELISA* dilanjutkan dengan *recombinant antigen-based competitive ELISA* menunjukkan sensitifitas dan spesifisitas 100%.²³

2.1.8. Protein rekombinan HIV-1

Antigen adalah setiap substansi yang dapat diikat secara spesifik oleh molekul antibodi atau reseptor sel T. Antibodi dapat mengenal hampir semua jenis molekul biologi sebagai antigen. Misalnya metabolit intermediet sederhana, gula, lemak, hormon maupun makromolekul yaitu karbohidrat kompleks, fosfolipid, asam nukleat dan protein.²⁴

Antigen rekombinan HIV-1 yang sering digunakan dalam uji diagnostik terdapat dalam 2 bentuk, yaitu peptida sintesis dan protein fusi rekombinan. Sekuens untuk peptida sintesis biasanya diidentifikasi dari area pada genom virus yang menginduksi respon imun. Identifikasi ini dilakukan dengan memasukkan data sekuens asam nukleat dari genom virus ke dalam program komputer yang kemudian memprediksi sekuens asam amino dan interaksi hidrofobik dan hidrofilik asam amino-asam amino tersebut. Regio hidrofilik biasanya lebih antigenik, sehingga peptida sintesis berhubungan dengan segmen pendek (10-20 asam amino) regio hidrofilik. Kemudian peptida sintesis ini disintesis dan diuji kemampuan untuk mengenal antibodi dengan mereaksikan dengan serum penderita HIV-1.¹⁰

Protein rekombinan seringkali dalam bentuk protein fusi, dibentuk dengan menyisipkan sekuens yang mengkode protein virus tertentu pada gen bakteriofag kemudian diekspresikan. Proses translasi dikontrol oleh gen bakteriofag. Segmen protein virus ditranslasikan sebagai salah satu bagian dari suatu protein yang besar, termasuk protein bakteri tempat gen virus tersebut disisipkan.¹⁰

Dalam proses pemurnian protein rekombinan salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan kromatografi afinitas. Pada protein rekombinan yang difusikan dengan his-tag, untuk purifikasi dapat digunakan Ni-NTA. His-tag adalah penggunaan 6 asam amino histidin pada ujung protein (N atau C

terminal). Teknik ini menggunakan kemampuan histidin untuk berikatan dengan nikel.²⁵

Secara umum antigen rekombinan aman diproduksi dalam jumlah besar tanpa risiko pertumbuhan virus. Namun untuk mengembangkan uji spesifik dengan menggunakan antigen rekombinan HIV perlu diketahui karakteristik antigen tersebut yaitu kemurnian, berat molekul, kelarutan, sistem ekspresi dan sebagainya. *diag HIV*.¹¹

2.1.9. Protein p24

Protein p24 diturunkan dari prekursor poliprotein HIV yaitu p55 yang membelah menjadi beberapa polipeptida yang lebih pendek. Polipeptida yang terbentuk adalah protein p24 (*core*), p17 (matriks) dan p7/p9 (nukleokapsid). Protein p24 tidak terglykosilasi, berukuran sekitar 24kD. Protein tersebut membentuk inti virus dan melindungi kode genetik virus.¹²

Antibodi terhadap p24 terbentuk pada fase awal infeksi dan titer antibodi tersebut pada fase serokonversi berhubungan dengan progresifitas penyakit. Pada infeksi fase lanjut penurunan kadar antibodi terhadap p24 berhubungan dengan fase AIDS.¹¹

2.2. Uji *Western blot*

Western blot merupakan metode deteksi serologi terhadap protein yang diimobilisasi. Pada teknik ini, komponen protein dipisahkan melalui elektroforesis kemudian ditransfer dari gel ke membrane nitroselulosa kemudian ditandai dengan antibodi yang bereaksi spesifik terhadap epitop protein target tersebut. Oleh sebab itu, uji *western blot* ini sangat bermanfaat dalam identifikasi dan kuantitasi protein tertentu dalam suatu campuran protein yang tidak dilabel dengan zat radioaktif. Teknik ini hampir sama sensitifitasnya dengan *radioimmunoassay* (RIA), namun tidak memerlukan zat radioaktif. Selanjutnya, karena pemisahan protein dengan elektroforesis memerlukan tahapan denaturasi protein maka masalah-masalah solubilisasi, agregasi dan kopresipitasi protein target dengan protein lain dapat diminimalkan. Namun

tidak setiap antibodi monoklonal dapat digunakan untuk petanda dalam uji *western blot* karena protein yang telah didenaturasi berbentuk linier.²⁶

Antiserum poliklonal biasanya dapat digunakan untuk mendeteksi epitop dari protein target yang telah didenaturasi walaupun spesifisitas, afinitas dan konsentrasinya tidak diketahui. Dalam prakteknya, penggunaan kontrol sangat penting dalam uji *western blot*, yaitu penggunaan antibodi yang tidak bereaksi dengan protein target.²⁶

Dalam uji *western blot*, sampel atau protein yang diperiksa dilarutkan dalam detergen dan zat pereduksi, dipisahkan dengan SDS-PAGE dan ditransfer ke bahan padat (biasanya digunakan membran nitroselulosa) yang kemudian dapat diwarnai. Membran kemudian direaksikan dengan antibodi spesifik terhadap protein target. Kemudian antibodi yang terikat dideteksi dengan salah satu dari beberapa reagen imunologi sekunder (protein A atau anti immunoglobulin berlabel iodium, anti immunoglobulin atau protein A yang diikat dengan HRP atau *alkalin fosfatase*). Protein berukuran 1-5 ng dapat dideteksi dengan *western blot*.²⁶

Untuk diagnosis infeksi HIV, beberapa organisasi dunia memberikan rekomendasi yang berbeda dalam interpretasi uji *western blot*. (Tabel..) Namun rekomendasi yang paling sering dipakai adalah rekomendasi WHO dan CDC.²⁷

Tabel 2.1. Rekomendasi untuk interpretasi uji *western blot*²⁷

Organisasi	Kriteria interpretasi
Center for Disease Control (CDC) dan ASTPHLD	Minimal satu ENV (gp41 dan gp120/160) dan p24
American Food and Drug Administration (FDA)	p24 dan p31 dan gp41 atau gp120/gp160
Center Nationale Transfusion Sanguine	Dua pita ENV dengan GAG atau POL
World Health Organization (WHO)	Dua pita ENV dengan atau tanpa GAG atau POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization	Satu pita p24 atau p31 dan ENV
American Red Cross	Masing-masing satu pita GAG, POL dan ENV
German Association for Control of Viral Diseases (DVV)	Satu ENV dan minimal satu pita GAG atau POL

2.3. Uji *dot blot*

Prinsip deteksi protein dengan uji *dot blot* hampir sama dengan uji *western blot*. Perbedaan utama uji *dot blot* dengan uji *western blot* adalah protein yang diperiksa tidak dipisahkan dengan elektroforesis. Protein hanya ditetaskan pada membran dan kemudian dihibridisasi dengan antibodi berlabel. Uji *dot blot* dapat digunakan sebagai uji semi kuantitatif.²⁸

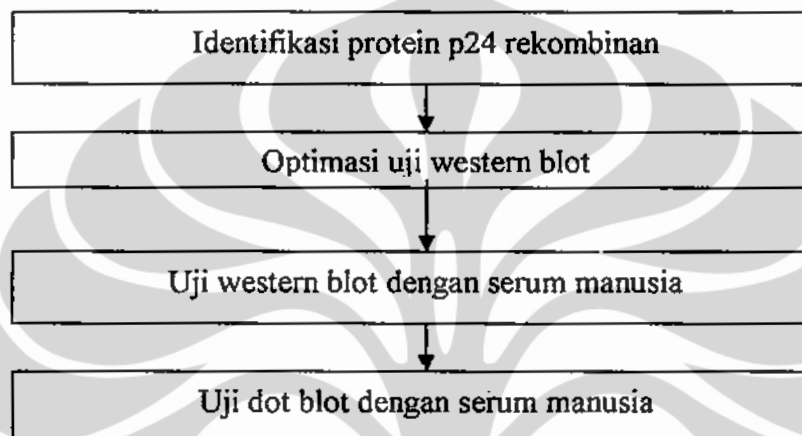


BAB III BAHAN DAN CARA KERJA

3.1. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di bagian Mikrobiologi FKUI pada bulan April-Juni 2009.

3.2. Alur penelitian



Gambar 3.1. Alur penelitian

3.3. Bahan

3.3.1. Protein p24 rekombinan HIV-1

Protein p24 rekombinan HIV-1 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari bagian Mikrobiologi FKUI. Protein p24 rekombinan HIV-1 ini sebelumnya telah diklonasi oleh Yasmon dkk (2007). Protein p24 diklonasi dari strain pNL43. Dilakukan amplifikasi menggunakan pasangan primer pNL-p24 + pNL-p24c. Purifikasi DNA menggunakan metode *Wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega). Restriksi dengan BamHI dan SalI untuk disisipkan pada vektor pQE. Kemudian pQE ditransformasikan pada *E. coli* T.10. Dari beberapa klon yang tumbuh, kemudian dilakukan PCR dengan primer spesifik pNLp24 dan pNLp24c. Selanjutnya klon dipotong dengan BamHI dan SalI. Kemudian dilakukan ekspresi pada *E. coli* strain BL21. Hasil ekspresi ini dipurifikasi dengan metode *Ni-NTA purification system*. Selanjutnya protein ini disimpan

pada *freezer* dengan suhu -80°C . Protein ini telah diukur konsentrasinya dengan metode Bradford, didapatkan konsentrasi $0,406 \mu\text{g/mL}$.

3.3.2. Spesimen

Serum PMI sebanyak 13 sampel (10 sampel positif HIV, 2 sampel negatif HIV, 1 sampel *indeterminate*) dan 20 sampel plasma *intravena drug users* (IDU), diperoleh dari bagian Mikrobiologi FKUI. Serum *indeterminate* yang digunakan sebanyak 20 sampel, diperoleh dari Yayasan IHVCB-UI.

Serum yang digunakan ini sebelumnya telah diuji dengan pemeriksaan *rapid test* oleh PMI. Bila pada pemeriksaan yang pertama serum tersebut reaktif maka dilanjutkan pemeriksaan kedua dengan menggunakan *rapid test* yang lain. Bila hasil *rapid test* kedua serum tersebut reaktif maka serum dikategorikan positif. Sedangkan bila dari *rapid test* pertama serum tidak reaktif maka serum dikategorikan negatif dan tidak dilakukan pemeriksaan lebih lanjut.

Bila serum reaktif terhadap *rapid test* pertama dan tidak reaktif terhadap *rapid test* kedua maka dilanjutkan pemeriksaan ketiga dengan mengulang pemeriksaan pertama dan kedua dengan kit sama yang digunakan sebelumnya. Bila hasil pemeriksaan ketiga menunjukkan reaktivitas serum terhadap kedua uji maka serum tersebut dikategorikan positif. Namun bila serum tidak reaktif terhadap salah satu uji maka serum dikategorikan *indeterminate*. Sedangkan bila serum tidak reaktif terhadap kedua uji maka serum dikategorikan negatif.

Pada serum PMI dan plasma IDU telah dilakukan uji RT-PCR oleh Yasmon dkk. Pada plasma IDU juga telah diketahui subtype virus HIV yang menginfeksi. Dari 20 plasma IDU semuanya terinfeksi CRF01_AE. Sedangkan pada serum *indeterminate* belum dilakukan uji konfirmasi dengan PCR maupun western blot.

Uji diagnostik yang digunakan untuk serum PMI sebagian besar adalah Murex (Abbott) dan Behring. Selain itu juga Determine dan Biomerieux. Sedangkan uji diagnostik yang digunakan untuk serum *indeterminate* adalah Vironostika (Biomerieux) dan Murex (Abbott).

Sampel yang digunakan ini merupakan sisa penelitian sebelumnya. Subyek penelitian telah setuju bahwa spesimen serumnya digunakan dalam

penelitian tersebut dan penelitian selanjutnya. Subyek penelitian telah menandatangani *informed consent*.

3.3.3. Preparasi spesimen

Spesimen yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disimpan pada *freezer* dengan suhu -80°C . Kemudian sampel *dialiquot* sebanyak $15\mu\text{L}$ dan disimpan pada *freezer* dengan suhu -20°C . Sebelum digunakan pada uji *western blot* dan *dot blot* spesimen dipanaskan pada 56°C selama 30 menit. Tujuan pemanasan ini adalah untuk melepaskan ikatan antigen-antibodi dalam serum, sehingga pada saat diinkubasi dengan protein p24 rekombinan antibodi dapat mengenali protein tersebut. Selain itu, juga bertujuan inaktivasi virus untuk keamanan peneliti dalam pengerjaan sampel.

3.4. Cara kerja

3.4.1. SDS PAGE

Prinsip elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid. Penggunaan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) yang merupakan detergen yang bersifat anion kuat dalam kombinasi dengan *reducing agent* dan pemanasan bertujuan untuk disosiasi protein sebelum diisikan ke dalam gel. Polipeptida yang telah terdenaturasi akan mengikat SDS dan menjadi bermuatan negatif. Kemudian kompleks SDS-polipeptida akan bermigrasi dalam gel poliakrilamid sesuai dengan ukuran polipeptida. Dengan menggunakan marker yang diketahui berat molekulnya maka dapat diperkirakan berat molekul polipeptida tersebut.

Untuk mengidentifikasi adanya protein p24 rekombinan, $5\mu\text{L}$ protein p24 rekombinan yang telah dipurifikasi dari stok ditambahkan dengan larutan 2x *loading dye* (100 mM Tris Cl pH 6,8, 200 mM *dithiothreitol*, 4% SDS, 0,2% *bromophenol blue*, 20% gliserol) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Setelah dipanaskan, protein rekombinan segera didinginkan dalam es selama 5 menit. Kemudian protein p24 rekombinan dianalisis dengan SDS-PAGE 12% (H_2O , 30% akrilamid, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% amonium persulfat, TEMED). SDS PAGE dilakukan dengan tegangan sebesar 100 volt selama 1 jam 30 menit menggunakan dapar elektroforesis (25 mM Tris,

250 mM glisin pH 8,3 dan SDS 0,1%). Dapar elektroforesis dalam penelitian ini digunakan 3 kali. Hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomassie (90 ml H₂O : metanol [1 : 1], 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan pemanasan 40°C selama 8 detik. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan penghilang warna biru Coomassie (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H₂O) juga dengan penggosokan pelan selama satu hari, setelah itu gel poliakrilamid dikeringkan untuk dokumentasi.

3.4.2. Transfer protein dengan metode *Transblot semi dry*

Proses transfer protein dari gel poliakrilamid ke membran nitroselulosa dilakukan dengan metode *Transblot semi dry*. Kertas Whatman 3MM dipotong sesuai ukuran gel. Kemudian membran nitroselulosa (Amersham Life Science) dipotong sesuai ukuran gel dengan menggunakan sarung tangan bersih. Kertas Whatman 3MM (BioRad) dan membran nitroselulosa direndam perlahan-lahan dalam dapar transfer (2,5 gr Glisin(Merck), 5,8 gram Tris Base (BioRad), 200 mL methanol (Merck) dan H₂O hingga volume akhir 1 L, pH 8,3) selama 15 menit untuk menghindari gelembung udara. Kemudian kertas disusun dengan urutan: kertas *Whatman* – membran nitroselulosa – gel – kertas *Whatman* dari arah kutub negatif ke kutub positif alat *Semi Dry Transfer* (BioRad). Tabung kaca digulung ke berbagai arah untuk menghindari gelembung udara, kemudian mesin transfer ditutup. Kemudian mesin transfer dihubungkan dengan listrik pada tegangan 15 volt selama 1 jam.

Setelah proses transfer selesai, kertas diangkat perlahan-lahan sesuai urutan kertas. Gel poliakrilamid dan kertas Whatman 3MM dibuang, sedangkan membran dicuci dengan dapar pencuci. Kemudian membran direndam dalam larutan *Ponceau S* (2 gr Ponceau S, 30 gr asam trikloroasetat, 30 gr asam sulfosalisilat dan H₂O hingga volume akhir 100 mL) selama 5 menit. Kemudian membran dicuci dengan akuades. Setelah pita protein terlihat, membran dipotong-potong sesuai ukuran lajur masing-masing protein dan dicuci dengan

dapar pencuci (0,05% Tween dalam larutan 1x PBS) hingga warna *Ponceau S* hilang.

3.4.3. Uji *western blot*

Protein p24 HIV-1 rekombinan yang telah dianalisis dengan SDS PAGE 12% dan ditransfer ke membran nitroselulosa diinkubasi dengan dapar pemblok (0,05 % Tween dan 0.5% gelatin (BioRad) dalam 1x PBS) selama 18 jam pada suhu 4 °C.

Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci selama 2x5 menit dilanjutkan dengan inkubasi membran menggunakan serum manusia selama 2 jam. Setelah melalui tahap pencucian dengan dapar pencuci selama 2 x 5 menit kemudian membran diinkubasi dengan larutan antibodi *anti human* berlabel biotin (Chemicon) dengan tingkat pengenceran 1:10.000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang dengan agitasi rendah. Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci selama 2 x 5 menit dilanjutkan dengan menambahkan konjugat streptavidin berlabel *Horseradish peroxidase* (HRP) dalam dapar pelarut dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dilakukan pencucian kembali selama 2x5 menit dan ditambahkan larutan substrat (3 mg *Diaminobenzidine* (Sigma-Aldrich) dalam 5 mL 1x PBS dan 5 µL 30% H₂O₂) dan selanjutnya diinkubasi. Setelah inkubasi, akan terlihat pita protein yang bereaksi dengan antibodi yang terdapat dalam serum manusia. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan H₂O.

a. Optimasi pengenceran serum manusia

Untuk mengetahui pengenceran optimal serum manusia yang akan diperiksa maka protein rekombinan dielektroforesis dengan konsentrasi 400 ng/sumur. Protein ini diuji *western blot* dengan serum manusia HIV + pada pengenceran 1/10, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2500, 1/5000 dan 1/10000.

b. Optimasi konsentrasi protein p24 rekombinan

Untuk mengetahui konsentrasi optimal protein yang akan digunakan dalam uji *western blot* maka dilakukan elektroforesis protein p24 rekombinan sebanyak 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng dan 25 ng per sumur. Protein ini kemudian diuji *western blot* terhadap serum manusia HIV + dengan pengenceran sesuai hasil optimasi pengenceran serum.

c. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP

Untuk mengetahui konsentrasi optimal konjugat streptavidin yang akan digunakan dalam uji *western blot* maka protein rekombinan dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi diuji *western blot* dengan serum manusia HIV + sesuai hasil optimasi pengenceran serum.

Konjugat Streptavidin-HRP terdapat dalam konsentrasi 1 mg/mL. Aktivitas enzimatis HRP didefinisikan dengan pirogalol. Satu unit akan membentuk 1 mg purpurogallin dari pirogalol dalam 20 detik pada pH 6.0 suhu 20°C. Aktifitas enzimatis konjugat streptavidin-HRP adalah 120 ± 30 unit/mL larutan. Sedangkan aktifitas pengikatan biotin adalah 10 ± 1 unit/mL larutan. Penambahan konjugat streptavidin-HRP adalah 0.06 unit (U), 0.12 U, 0.18 U, 0.24 U dan 0.3 U.

d. Optimasi waktu inkubasi substrat

Untuk mengetahui waktu inkubasi yang optimal yaitu didapatkan hasil dengan pita yang cukup terang namun *background* minimal maka dilakukan uji *western blot* protein p24 rekombinan pada konsentrasi sesuai optimasi terhadap serum HIV + dan serum *indeterminate* dengan pengenceran sesuai optimasi. Penambahan konjugat streptavidin-HRP sesuai dengan hasil optimasi. Waktu inkubasi yang digunakan adalah 1 menit, 2 menit dan 3 menit.

e. Analisis interaksi nonspesifik

Uji *western blot* dilakukan dengan menggunakan kontrol negatif yaitu dilakukan uji *western blot* protein p24 rekombinan terhadap dapar pelarut, kemudian kondisi yang lain sama dengan uji *western blot* pada sampel. Hal ini bertujuan mengetahui adanya interaksi nonspesifik antara antibodi berlabel biotin yang digunakan ataupun konjugat streptavidin-HRP yang digunakan terhadap protein p24 rekombinan dan E.coli kontaminan serta dapar pemblok.

3.4.4. Uji dot blot

Membran nitroselulosa (Amersham) dipotong-potong ukuran 1cm x 1cm, kemudian dimasukkan ke dalam plate kultur 24 well (Nunc) yang sebelumnya telah dicuci bersih dengan penambahan sodium hipoklorit dan dikeringkan. Sejumlah 1 μ L protein p24 rekombinan konsentrasi sesuai hasil optimasi pada uji western blot diteteskan pada membran nitroselulosa. Setelah kering, membran kemudian diinkubasi dengan larutan *blocking* (0,05 % Tween dan 0.5% gelatin(BioRad) dalam 1x PBS) selama 18 jam pada suhu 4 °C dengan agitasi rendah. Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan serum manusia selama 2 jam. Setelah melalui tahap pencucian dengan dapar pencuci kemudian membran diinkubasi dengan larutan antibodi anti *human* berlabel biotin dengan tingkat pengenceran 1:10.000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang dengan agitasi rendah. Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menambahkan konjugat streptavidin-HRP dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi dalam 5 mL dapar pelarut dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dilakukan pencucian kembali dan ditambahkan larutan substrat (3 mg Diaminobenzidine (Sigma Aldrich) dalam 5 mL 1x PBS dan 5 μ L 30% H₂O₂) dan diinkubasi. Setelah inkubasi, akan terlihat pada membran nitroselulosa, protein yang bereaksi dengan antibodi yang terdapat dalam serum manusia terbentuk titik berdiameter \pm 3mm. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan H₂O.

3.5. Analisis deskriptif

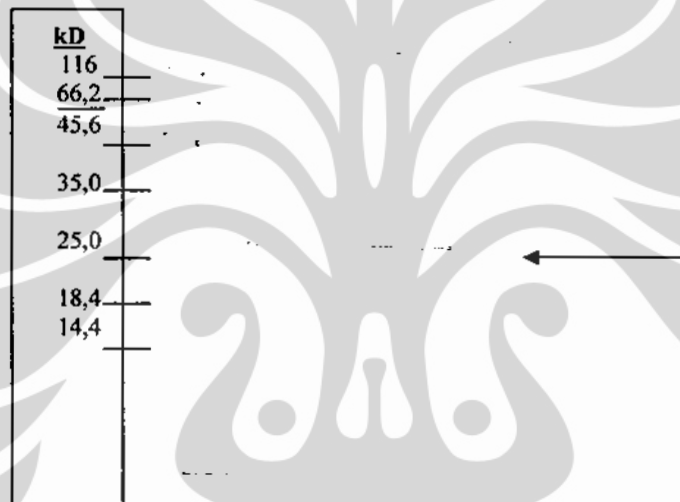
Perbandingan hasil uji western blot yang berbasis protein terdenaturasi dan uji dot blot yang berbasis protein nondenaturasi menunjukkan gambaran reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan terhadap serum uji.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1 Identifikasi adanya protein p24 rekombinan

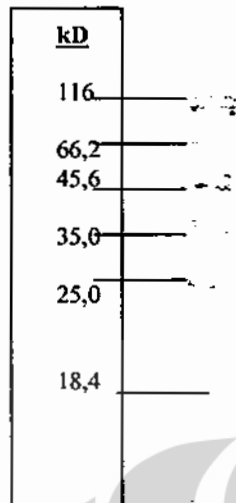
Sebelum digunakan dalam penelitian ini, beberapa tabung p24 rekombinan diidentifikasi dengan SDS PAGE menggunakan gel poliakrilamid 12%. Dari beberapa tabung p24 rekombinan yang telah dipurifikasi dilakukan elektroforesis. Hasil elektroforesis setelah diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomasie tampak protein bermigrasi pada berat molekul 24 kD (Gambar 4.1)



Gambar 4.1. Hasil SDS PAGE protein p24 rekombinan HIV-1

4.1.2. Transfer protein

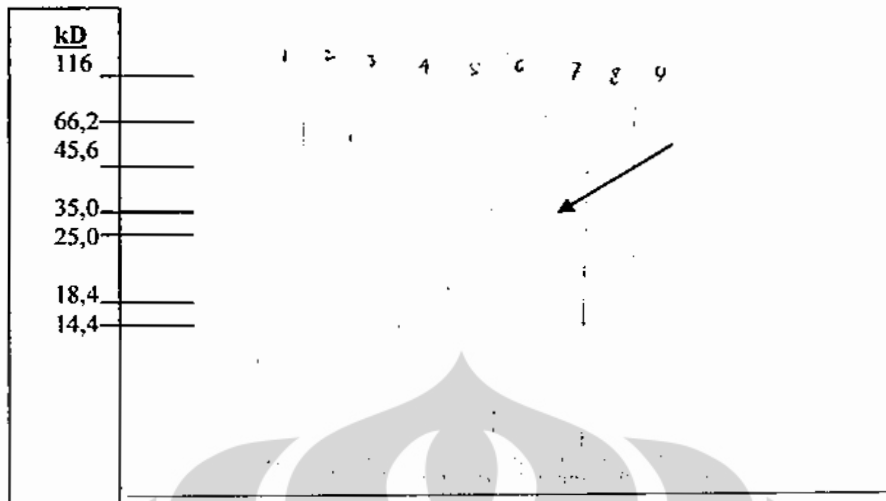
Setelah proses transfer selesai, untuk mengetahui bahwa protein telah berpindah dari gel ke membran nitroselulosa maka gel yang telah ditransfer kemudian diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomasie. Setelah gel poliakrilamid dikeringkan untuk dokumentasi, tampak bahwa tidak terdapat pita protein pada gel tersebut (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Gel poliakrilamid 12% setelah ditransfer ke membran nitroselulosa. Tidak tampak protein pada 24 kD.

4.1.3. Optimasi pengenceran serum manusia

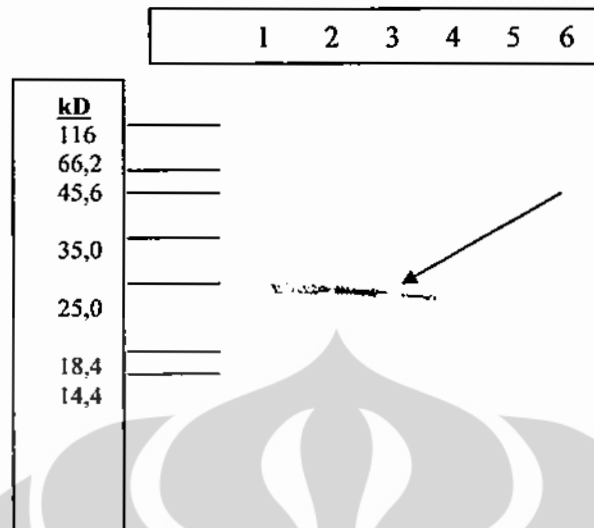
Hasil optimasi pengenceran serum manusia dapat ditunjukkan pada gambar 4.3. Pengenceran serum yang optimal adalah 1/2500, tampak pada gambar lajur 7. Penetapan ini berdasarkan intensitas warna yang tertinggi. Pada pengenceran paling rendah yaitu 1/10 tidak tampak pita. Sedangkan pada pengenceran lebih tinggi yaitu 1/50 dan 1/100 mulai tampak pita walaupun masih tipis. Pada pengenceran 1/5000 dan 1/10.000 pita yang terbentuk tampak lebih tipis. Untuk selanjutnya uji western blot menggunakan pengenceran 1/2500. Pada gambar tampak membran nitroselulosa berwarna coklat tebal.



Gambar 4.3. Optimasi pengenceran serum pada uji western blot. Keterangan: Marka protein, 1. Serum dengan pengenceran 1/10, 2. Serum dengan pengenceran 1/50, 3. Serum dengan pengenceran 1/100, 4. Serum dengan pengenceran 1/250, 5. Serum dengan pengenceran 1/500, 6. Serum dengan pengenceran 1/1000, 7. Serum dengan pengenceran 1/2500, 8. Serum dengan pengenceran 1/5000, 9. Serum dengan pengenceran 1/10.000.

4.1.4. Optimasi protein p24 HIV-1 rekombinan

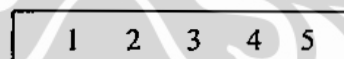
Hasil optimasi konsentrasi protein p24 rekombinan dapat dilihat pada gambar 4.4. Konsentrasi protein yang optimal adalah 100 ng/sumur, tampak pada lajur 4. Dari uji western blot yang dilakukan tampak pita sangat tebal pada p24r 400 ng dan 200 ng. Selain itu, antara 45,6kD dan 66,2 kD tampak pita positif yang cukup jelas. Sedangkan pada p24r 100 ng, 50 ng dan konsentrasi 25 ng tampak pita positif pada 25 kD dan tidak tampak protein kontaminan. Untuk selanjutnya uji western blot menggunakan p24r 100 ng yang menghasilkan pita cukup jelas dan tidak tampak adanya protein kontaminan.



Gambar 4.4. Optimasi konsentrasi protein p24 reombinan HIV-1 pada uji western blot. Keterangan: 1. Marka protein, 2. p24r 400 ng, 3. p24r 200 ng, 4. p24r 100 ng, 5. p24r 50 ng, 6. p24r 25 ng

4.1.5. Optimasi konsentrasi streptavidin-HRP

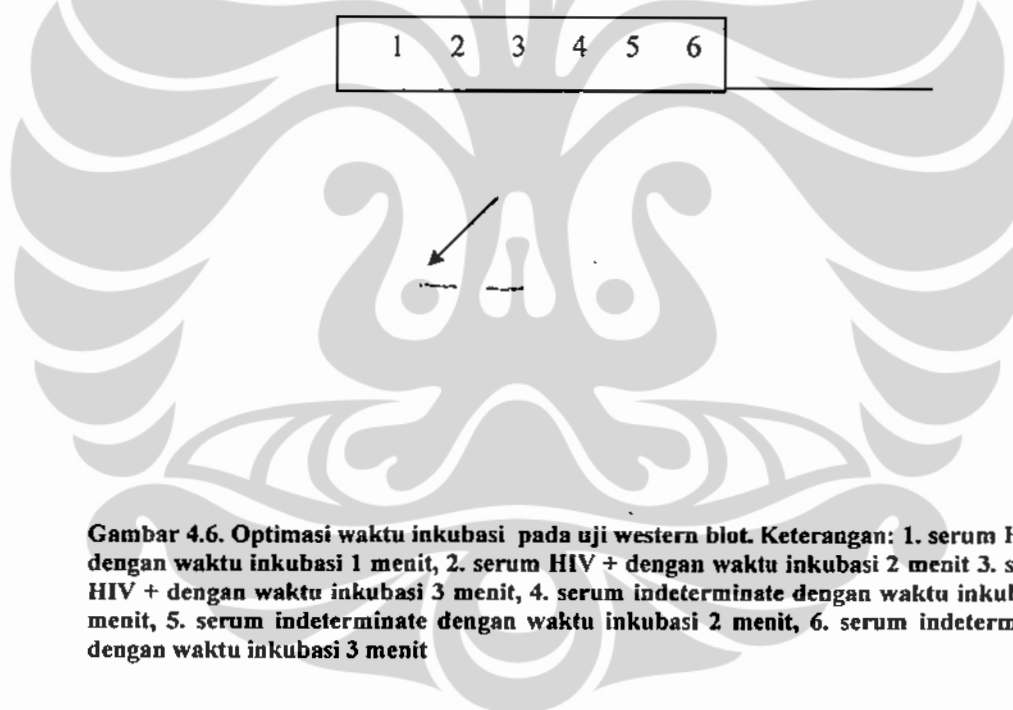
Hasil optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP dapat dilihat pada gambar 4.5. Dari uji yang dilakukan tidak tampak perbedaan signifikan pada lajur 2 dengan lajur 3,4 dan 5. Sedangkan pada lajur 1 tampak pita yang terbentuk lebih tipis. Untuk selanjutnya uji *western blot* dilakukan dengan penambahan streptavidin pada konsentrasi terendah yang masih menunjukkan pita yang optimal (0.12 U), yaitu 1 μ L.



Gambar 4.5. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin pada uji western blot. Keterangan: 1. streptavidin-HRP 0.06 U, 2. streptavidin-HRP 0.12 U, 3. streptavidin-HRP 0.18 U, 4. streptavidin-HRP 0.24 U, 5. streptavidin-HRP 0.3 U

4.1.6. Optimasi waktu inkubasi substrat

Substrat yang digunakan pada uji western blot ini adalah diamino benzidin (DAB). Optimasi waktu inkubasi substrat ditunjukkan pada gambar 4.6. Pada lajur 1,2,dan 3 dengan serum HIV + yang diinkubasi pada 1 menit, 2 menit dan 3 menit tampak ada gradasi pita yang terbentuk. Pada lajur 1 pita yang terbentuk kurang terang, sedangkan pada lajur 2 dan 3 tampak pita yang terbentuk sama terang. Pada serum *indeterminate* yang terlihat pada lajur 4,5, dan 6 tidak tampak gradasi pita yang terbentuk akibat waktu inkubasi yang berbeda.Oleh sebab itu ditetapkan bahwa waktu inkubasi optimal substrat adalah 2 menit.

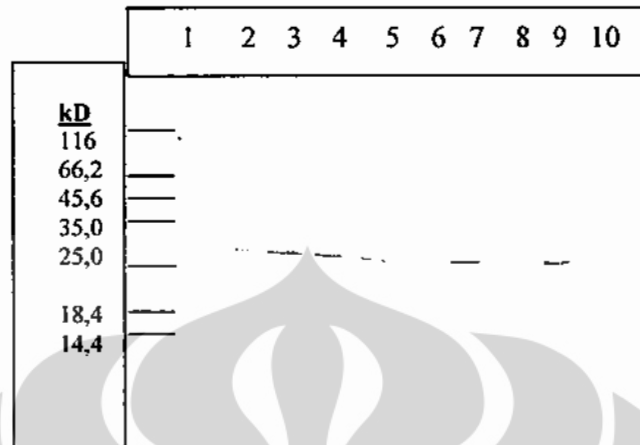


Gambar 4.6. Optimasi waktu inkubasi pada uji western blot. Keterangan: 1. serum HIV + dengan waktu inkubasi 1 menit, 2. serum HIV + dengan waktu inkubasi 2 menit 3. serum HIV + dengan waktu inkubasi 3 menit, 4. serum indeterminate dengan waktu inkubasi 1 menit, 5. serum indeterminate dengan waktu inkubasi 2 menit, 6. serum indeterminate dengan waktu inkubasi 3 menit

4.1.7. Analisis interaksi nonspesifik

Hasil analisis uji western blot tidak tampak adanya interaksi nonspesifik terhadap protein p24 rekombinan dan protein kontaminan. Hal ini ditunjukkan pada gambar 4.7. Pada kontrol negatif yang menggunakan dapar pelarut tanpa serum uji yaitu lajur 10 tidak tampak pita positif, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat reaksi nonspesifik antara antibodi berlabel

biotin maupun konjugat streptavidin-HRP terhadap protein p24 rekombinan, protein kontaminan serta dapat pemblok.



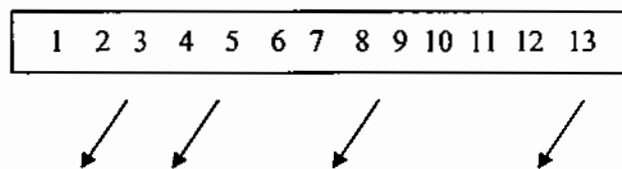
Gambar 4.7. Uji western blot pada serum HIV +.Keterangan: 1. Marka protein, 2-9 Serum HIV+, 10. Kontrol negatif

4.1.8. Uji *western blot* dan uji *dot blot*

a. Uji *western blot* dan uji *dot blot* dengan serum PMI dan plasma IDU

Uji western blot dengan serum PMI dan plasma IDU

Berdasarkan hasil uji *western blot*, dari seluruh sampel serum PMI yang diuji protein p24r reaktif terhadap 12 sampel ditandai dengan tampak pita cukup tebal pada 24 kD. p24r juga reaktif terhadap seluruh plasma IDU yang berjumlah 20 sampel. Namun pada beberapa sampel, misalnya pada gambar 4.8. lajur 2, 4, 7 dan 12 terlihat pita lain yang cukup tebal pada berat molekul antara 45 kD dan 66,2 kD. Pita ini diduga protein kontaminan E.coli yang bereaksi dengan antibodi terhadap E.coli yang terdapat dalam serum manusia. Protein p24r tidak reaktif terhadap 1 serum uji yaitu pada gambar 4.8 lajur 6. Selain itu, pada beberapa lajur tampak pita yang terbentuk cukup tebal dengan beberapa pita nonspesifik pada bagian bawah.



Gambar 4.8. Hasil uji western blot dengan serum PMI. Keterangan : tanda → : pita kontaminan

Uji dot blot dengan serum PMI dan plasma IDU

Pada uji dot blot tampak bahwa dari 13 serum PMI, protein p24r reaktif terhadap 10 sampel ditandai dengan terbentuknya titik berdiameter 3 mm sedangkan protein p24r tidak reaktif terhadap 3 sampel. p24r reaktif terhadap seluruh sampel plasma IDU yang berjumlah 20 sampel. Tampak bahwa intensitas titik yang terbentuk bervariasi, mulai dari sangat jelas sampai samar-samar.

Serum HIV +			
1.	6.	11.	16.
2.	7.	12.	17.
3.	8.	13.	18.
4.	9.	14.	19.
5.	10.	15.	20.

Gambar 4.9. Hasil uji dot blot dengan serum PMI

Perbandingan antara hasil uji rapid tes, uji western blot dan uji dot blot serta hasil uji RT-PCR yang telah dilakukan pada serum PMI, tampak pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Uji western blot dan dot blot pada serum PMI

Keterangan	p24r western blot		p24r dot blot		RT-PCR	
	+	-	+	-	+	-
	Uji rapid test positif (n=30)	10	-	10	-	8
Uji rapid test negative (n=2)	2	-	-	2	-	2
Uji rapid test <i>indeterminate</i> (n=1)	-	1	-	1	-	1
Jumlah	12	1	10	3	8	5

Sedangkan perbandingan antara hasil uji rapid tes, uji western blot dan uji dot blot serta hasil uji RT-PCR yang telah dilakukan pada plasma IDU, tampak pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Uji western blot dan uji dot blot pada plasma IDU

Jumlah sampel	p24r western blot		p24r dot blot		RT-PCR	
	+	-	+	-	+	-
	20	20	-	20	-	20

b. Uji western blot dan uji dot blot dengan serum *indeterminate*

Uji western blot dengan serum indeterminate

Berdasarkan hasil uji *western blot*, protein p24r reaktif terhadap 9 sampel serum *indeterminate* dengan terbentuknya pita tipis pada 24 kD. Pada gambar 4.10 lajur 2, 4, 5 dan 6 tampak pita positif tipis. Selain itu juga tampak pita non spesifik pada bagian bawah lajur 2, 4 dan 6. Pada kontrol positif tampak pita yang terbentuk intensitasnya tinggi, sedangkan pada kontrol negatif tidak tampak gambaran pita.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---



Gambar 4.10. Hasil uji western blot dengan serum indeterminate. Keterangan :1.Marka protein, 2-7. serum indeterminate, 8. kontrol positif, 9. kontrol negatif, tanda→ pita positif

Uji dot blot pada serum indeterminate

Pada gambar tampak bahwa protein p24 rekombinan yang diuji tidak reaktif terhadap 20 serum *indeterminate*. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya titik kecil di tengah membran nitroselulosa, sedangkan pada kontrol positif tampak jelas titik berdiameter lebih kurang 3 mm dan kontrol negatif tidak terbentuk titik.

Serum indeterminate			
1.	6.	11.	16.
2.	7.	12.	17.
3.	8.	13.	18.
4.	9.	14.	19.
5.	10.	15.	20.

Gambar 4.11. Hasil uji dot blot pada serum indeterminate

Perbandingan antara hasil uji western blot dengan protein p24 rekombinan dan uji dot blot menggunakan protein p24 rekombinan serum *indeterminate* dapat ditunjukkan pada tabel 4.3.

Tabel.4.3. Uji western blot dan dot blot pada serum indeterminate

Jumlah sampel	Uji western blot		Uji dot blot	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif
20	9	11	0	20

4.2. Pembahasan

4.2.1. Optimasi pengenceran serum manusia

Pengenceran optimal serum manusia yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1/2500. Pada pengenceran yang lebih rendah tampak pita yang terbentuk tidak optimal. Sedangkan pada pengenceran lebih dari 1/2500 tampak pita yang terbentuk lebih tipis. Pada pengenceran optimal, konsentrasi antigen dan antibodi seimbang sehingga pita positif yang terbentuk juga optimal.

Pada gambar 4.3 tampak membran nitroselulosa berwarna coklat merata. Hal ini bisa disebabkan proses *blocking* yang kurang optimal. Selain itu, dapat juga disebabkan proses pencucian yang belum optimal maupun konsentrasi antibodi primer/sekunder yang terlalu tinggi.²⁸

Pada penambahan konsentrasi Tween-20 dalam dapar pencuci dari 0.02% menjadi 0.05% uji western blot selanjutnya tampak *background* pada membran nitroselulosa menurun (Gambar 4.4). Pengaruh penggunaan Tween-20 dengan konsentrasi lebih tinggi masih perlu dibuktikan dengan membandingkan prosedur pencucian dengan konsentrasi 0,02% dan 0,05%.

4.2.2. Optimasi protein p24 rekombinan

Jumlah total protein yang optimal pada penelitian ini adalah 100 ng/sumur. Pada gambar 4.4 lajur 2 dan 3 tampak pita nonspesifik antara 45,6 kD dan 66,2 kD. Pita ini diduga protein *E.coli* yang mengkontaminasi protein p24 HIV-1 rekombinan yang bereaksi dengan antibodi anti *E.coli* yang terdapat dalam serum manusia. *E.coli* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit endemik di Indonesia. Bila sebelum diperiksa pasien HIV + tersebut menderita

infeksi oleh *E.coli* maka serum pasien tersebut pada saat diuji mengandung antibodi terhadap komponen protein bakteri *E.coli*. Pada p24r 400 ng, juga tampak pita positif antara 14,4 kD dan 18,4 kD. Pita ini diduga adalah protein kontaminan komponen bakteri *E.coli*.

Konsentrasi optimal pada lajur 4 ini dipilih dengan mempertimbangkan bahwa serum manusia yang mengandung antibodi terhadap protein p24 HIV-1 pada saat diperiksa belum diketahui fase perjalanan penyakitnya. Pada serum yang berasal dari individu dalam fase serokonversi dan fase AIDS hanya mengandung antibodi terhadap p24 dengan kadar rendah. Sedangkan pada serum yang berasal dari individu dalam fase akut dan laten klinis maka biasanya mengandung antibodi terhadap p24 dalam jumlah cukup banyak.¹¹ Dengan konsentrasi p24 yang cukup diharapkan akan mengurangi kemungkinan terjadinya hasil negatif palsu.

Pada gambar tampak beberapa garis non spesifik yang bersambungan antara membran nitroselulosa yang digunakan. Hal ini mungkin disebabkan penggunaan dapar elektroforesis yang berulang.²⁸

4.2.3. Optimasi konsentrasi konjugat streptavidin-HRP dan waktu inkubasi

Konjugat streptavidin-HRP tampak optimal pada 0.12 U. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.5, sedangkan pada gambar 4.6 tampak bahwa pita yang terbentuk dengan waktu inkubasi substrat selama 2 menit dan 3 menit tidak berbeda bermakna, sedangkan pada pita yang terbentuk dengan waktu inkubasi substrat selama 1 menit tampak lebih tipis. Pada lajur 4, 5 dan 6 tampak pita positif yang tipis. Waktu inkubasi substrat tidak mempengaruhi terbentuknya pita pada serum *indeterminate*. Namun pada protein p24r yang direaksikan dengan serum *indeterminate* tampak pita lain selain p24. Pita ini kemungkinan merupakan reaksi spesifik dan nonspesifik serum *indeterminate* dengan komponen protein kontaminan.

Kelemahan penelitian ini, tahapan dalam optimasi uji western blot jumlah sampel yang digunakan adalah satu serum dengan HIV +. Idealnya untuk optimasi digunakan minimal 3 sampel dari serum HIV + dengan titer antibodi tinggi, menengah dan rendah. Dari hasil optimasi tersebut diharapkan dapat

mendeteksi semua serum yang positif mengandung antibodi terhadap virus HIV-1.

4.2.4. Pengaruh penggunaan dapar elektroforesis

Hilangnya reaksi nonspesifik pada membran nitroselulosa tidak hanya disebabkan karena peningkatan konsentrasi Tween-20, namun pengaruh penggunaan dapar elektroforesis yang kedua dan ketiga dapat memberikan karakteristik yang berbeda. Pada gambar 4.4 tampak bahwa dapar elektroforesis pada penggunaan yang ketiga memberikan gambaran garis yang menyerupai pita nonspesifik. Hal ini disebabkan kandungan kotoran akibat penggunaan dapar elektroforesis yang berulang tersebut.

4.2.5. Uji *western blot* dan uji *dot blot* pada serum PMI dan plasma IDU

Untuk menentukan interpretasi uji *western blot* diperlukan kriteria tertentu. Rekomendasi yang paling sering dipakai yaitu WHO dan CDC mensyaratkan adanya reaktivitas terhadap protein *env* (gp41 dan gp 120/160).²⁷ Adanya pita berukuran 24 kD pada uji *western blot* terhadap serum PMI dengan hasil *rapid test* negatif, belum dapat disimpulkan sebagai reaksi positif palsu dalam deteksi infeksi HIV-1.

Kleinman melaporkan bahwa angka positif palsu pada uji *western blot* adalah 4,8% dari serum yang bereaksi positif dengan uji *western blot*. Dari serum yang diuji, seluruh serum yang bereaksi positif dengan adanya pita *envelop* saja saat dikonfirmasi dengan uji PCR ternyata merupakan positif palsu. Sedangkan serum yang bereaksi positif dengan satu protein *envelop* ditambah satu pita tambahan (terutama p24, p17 dan p66) ternyata saat dikonfirmasi menunjukkan hasil positif palsu. Hal ini disebabkan adanya reaksi silang terhadap protein *env* p41, protein p24 dan adanya infeksi oleh varian HIV yang lain (misalnya HIV-2 dan HIV-1 grup O). Selain itu juga dilaporkan hasil positif palsu pada individu yang mengikuti studi eksperimental vaksinasi HIV.²⁹

Jamjoom dkk melaporkan bahwa angka kejadian *indeterminate* dapat disebabkan kontaminasi silang dalam kadar rendah antar sampel. Hal ini dapat terjadi karena aliran balik cairan pada saat aspirasi dalam prosedur pencucian. Kontaminasi silang ini dapat diatasi dengan pemeriksaan ulang uji *western blot* dengan cara memisahkan sampel dengan hasil EIA tinggi dan EIA rendah serta

memberi jarak antar sampel. Hal ini dapat menurunkan interpretasi *indeterminate* dari 21 % menjadi 8,5%.³⁰

Dalam penelitian ini hanya digunakan satu antigen yaitu p24r untuk uji western blot, oleh sebab itu masih perlu dikaji lebih lanjut. Serum PMI yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya telah dilakukan uji sandwich ELISA dengan reagen Murex (Abbot), Vironostika (bioMerieux) dan Behring. Antigen yang digunakan pada *Murex HIV Ag/Ab combination* adalah protein rekombinan *env* dan *pol* HIV-1, *env* HIV-2 dan peptida untuk HIV-1 grup O. Sedangkan antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal terhadap p24. Pada *Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab* antigen yang digunakan adalah gp160 HIV-1, ANT70 HIV-1, peptida *env* HIV-2 serta antibodi monoklonal terhadap p24.³¹ Oleh sebab itu diduga reaksi silang antara antibodi terhadap p24 dengan varian HIV yang lain tampaknya tidak sesuai. Sedangkan studi eksperimental dengan vaksinasi HIV belum dikembangkan di Indonesia.

Adanya kontaminasi silang antar sampel dalam prosedur pencucian tampaknya tidak sesuai dengan penelitian ini. Pada uji dot blot dengan prosedur yang sama pun tidak tampak adanya kontaminasi antar sampel. Diduga reaktivitas protein p24r terhadap serum negatif HIV ini disebabkan reaksi silang antibodi non spesifik terhadap epitop p24. Hal ini dapat diamati pada gambar 4.8 lajur 1 dan 2, tampak bahwa pita yang terbentuk tipis menunjukkan reaktivitas yang lemah.

Satu serum PMI yaitu pada gambar 4.8. lajur 6 yang telah diperiksa *rapid test* dengan hasil tidak dapat disimpulkan, pada uji *western blot* dengan p24r menunjukkan hasil negatif dengan tidak tampak pita. Pada uji dot blot juga didapatkan hasil negatif. Sedangkan pada uji RT-PCR untuk konfirmasi hasilnya pun negatif. Mungkin pada serum ini memang tidak mengandung virus HIV-1 maupun antibodi terhadap virus HIV-1. Uji *rapid test* yang dilakukan kemungkinan merupakan positif palsu. Hal ini sesuai dengan Everett DB dkk yang melaporkan bahwa Murex generasi keempat memiliki spesifisitas rendah (91.5%).³²

Pada 2 serum yang menghasilkan reaksi positif pada uji *western blot* ternyata menunjukkan hasil negatif pada uji *dot blot*. Hal ini perlu diteliti lebih

lanjut manfaat protein p24 rekombinan dalam bentuk tidak terdenaturasi dengan uji dot blot, menjadi prediktor untuk menilai kelayakan uji serologi ulangan.

Pada uji dot blot tampak titik yang terbentuk juga bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang terdapat dalam serum berbeda-beda, tergantung dari fase perjalanan penyakit yang dialami individu tersebut. Uji dot blot ini juga dapat digunakan sebagai uji semikuantitatif dengan mengukur densitas titik yang terbentuk menggunakan densitometer. Namun dalam penelitian ini tidak dapat diukur densitasnya karena tidak menggunakan alat *dot blotter*. Antigen p24r hanya diteteskan pada membran nitroselulosa. Hasil uji dot blot berbentuk titik berdiameter sekitar 3mm, bila diukur dengan densitometer akan menghasilkan *optical density* yang bias.

Bila dibandingkan antara uji western blot dan uji dot blot pada serum (lampiran 3 dan 4) tampak pada beberapa lajur terdapat reaktivitas yang bervariasi pada antigen yang digunakan. Pada umumnya protein p24 rekombinan dalam bentuk terdenaturasi maupun tidak terdenaturasi reaktif terhadap serum dengan HIV+. Namun tampaknya antigen yang tidak terdenaturasi lebih reaktif. Kelemahan uji dot blot dengan p24r pada penelitian ini adalah adanya data dari uji western blot terdapat pita-pita kontaminan *E.coli*. Hal ini dapat berpengaruh pada hasil uji dot blot, karena adanya antibodi terhadap komponen protein *E.coli* dapat meningkatkan intensitas sinyal yang terbentuk sehingga dapat menimbulkan reaksi positif palsu.

Adanya keragaman genetik HIV-1 diduga berpengaruh dalam metode diagnosis. Subtipe sebagian besar strain HIV-1 dapat diidentifikasi dengan analisis sekuens bagian utama genom. Perbedaan sekuens nukleotida antar subtipe sekitar 20, 15 dan 25 persen pada *gag*, *pol* dan *env*.⁴ Protein p24 rekombinan yang dikembangkan ini berasal dari subtipe B, sedangkan saat ini subtipe yang dominan ada di Indonesia adalah CRF01_AE.⁵ Hal ini perlu dikaji lebih lanjut dengan pengembangan protein p24 rekombinan subtipe CRF01_AE dan menilai reaktivitasnya terhadap serum HIV + yang sama. Perbandingan ini diharapkan dapat memberikan gambaran ada atau tidaknya permasalahan dalam uji diagnostik dengan menggunakan antigen dari subtipe yang berbeda dengan serum yang diperiksa.

Terdapat hasil positif palsu pada uji dot blot dengan p24r pada 2 serum positif HIV dengan *rapid test*. Saat dikonfirmasi dengan hasil uji RT-PCR ternyata kedua serum tersebut negatif HIV. Hal ini diduga karena adanya protein kontaminan pada antigen yang digunakan. Pada uji western blot telah diketahui adanya protein kontaminan yang diduga komponen bakteri *E.coli* sebagai pengeksresi protein p24r, menyebabkan antibodi terhadap *E.coli* dalam serum manusia mengenali protein tersebut sehingga terbentuk sinyal positif.

4.2.6. Uji *western blot* dan uji *dot blot* pada serum *indeterminate*

Uji western blot dengan protein p24r pada penelitian ini menunjukkan adanya reaktivitas lemah terhadap serum uji, ditandai dengan terbentuknya pita sangat tipis. Hal ini mungkin disebabkan antibodi dengan kadar rendah terhadap p24 yang terdapat dalam serum ataupun ada reaksi silang antara protein p24r dengan antibodi nonspesifik. Sedangkan uji dot blot dalam penelitian tidak dapat mendeteksi adanya antibodi terhadap p24 (Tabel 4.2). Diduga antibodi ini mengenali epitop p24r dalam bentuk terdenaturasi pada uji western blot namun tidak mengenali epitop dalam bentuk non denaturasi pada uji dot blot. Proses denaturasi protein menjadi polipeptida sebelum elektroforesis mungkin dapat membuka epitop-epitop yang tertutup oleh struktur protein p24r sehingga dikenali oleh antibodi non spesifik ataupun spesifik terhadap p24. Untuk menentukan status serum *indeterminate* tersebut diperlukan uji konfirmasi dengan deteksi RNA virus melalui PCR dan uji *western blot* ulangan untuk mendeteksi antibodi terhadap protein *envelop* serta kultur virus. Penyebab dan kondisi yang berhubungan dengan serum *indeterminate* antara lain adanya infeksi HIV pada serokonversi awal, infeksi HIV-2, imunosilent AIDS, infeksi oleh retrovirus lain (HTLV, CAEV), adanya penyakit autoimun, keganasan dan lain-lain.³³

Dalam penelitian ini, ekspresi protein pada *E.coli* telah dilakukan dalam penelitian Apriliana (2008). Protein p24r hasil ekspresi dipurifikasi setelah sel bakteri *E.coli* dilisis dengan teknik sonikasi. Purifikasi dilakukan dengan menggunakan *Ni-NTA Purification System*. Mahboudi dkk mengekspresikan protein p24-gp41 rekombinan pada *E.coli*, kemudian dipurifikasi melalui 3 tahapan purifikasi yaitu dengan Ni-NTA, kolom filtrasi gel dan kromatografi ion-exchange. Hasil purifikasi ini didapatkan protein rekombinan dengan kemurnian

lebih dari 98%.³⁴ Sedangkan Bhardwaj mengembang protein p24 rekombinan dan dilakukan purifikasi melalui 3 tahap yaitu *Q-sepharose column*, *Mono Q column* dan metode gel filtrasi menggunakan *Sephadex*. Kemurnian hasil purifikasi ini lebih dari 95%.¹² Diduga proses purifikasi pada penelitian Apriliana belum menghasilkan protein p24 HIV-1 rekombinan yang 100% murni. Adanya kontaminasi ini perlu diperhatikan karena penggunaan protein rekombinan yang terkontaminasi dalam pengembangan uji western blot dapat menghasilkan pita non spesifik. Pada uji dot blot maupun ELISA protein kontaminan dapat memberikan sinyal positif yang bukan disebabkan adanya antibodi spesifik terhadap protein p24 sehingga dapat menyebabkan reaksi positif palsu. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan kondisi optimal protein rekombinan yang murni tidak terkontaminasi. Perlu dipertimbangkan kombinasi penggunaan Ni-NTA dengan metode purifikasi yang lain sehingga dapat meningkatkan kemurnian protein rekombinan yang dihasilkan.



BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

- 1.1. Kondisi optimal uji western blot untuk menilai reaktivitas serum orang dengan HIV/AIDS (ODHA) terhadap antigen rekombinan p24 HIV-1 adalah dengan pengenceran serum manusia 1/2500, konsentrasi protein p24 rekombinan yang digunakan adalah 100 ng/ μ L, konjugat streptavidin-HRP yang digunakan adalah 0.12 U dan waktu inkubasi substrat adalah 2 menit.
- 1.2. Protein p24 rekombinan HIV-1 yang telah dikembangkan reaktif terhadap serum ODHA dan plasma IDU dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia.
- 1.3. Terdapat perbedaan reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan sub tipe B terhadap serum *indeterminate* dalam bentuk terdenaturasi dan non denaturasi.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain:

- 2.1. Perlu dilakukan purifikasi protein p24 HIV-1 rekombinan yang telah dikembangkan, dengan mempertimbangkan kombinasi beberapa metode purifikasi.
- 2.2. Perlu dilakukan uji konfirmasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), kultur dan uji western blot untuk mengetahui gambaran serum *indeterminate* di Indonesia
- 2.3. Perlu dikembangkan dan dilakukan uji reaktivitas protein p24 rekombinan sub tipe CRF01_AE untuk mengetahui pengaruh perbedaan sub tipe dalam uji diagnostik.
- 2.4. Dapar elektroforesis sebaiknya tidak digunakan berulang untuk menghindari kesalahan interpretasi akibat adanya reaksi non spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS et al. 2007. *AIDS and Lentivirus. Dalam: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 24th ed. Mc.Graw Hill.
2. *Report on global epidemic*. UNAIDS. 2008. Diunduh dari <http://www.unaids.org> Diakses tanggal 27 Mei 2009.
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik Mj. *Acquired immunodeficiency syndromes*. In: *Immunobiology the immune system in health and disease*. 6th ed. Churchill livingstone
4. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. *Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development*. Indian J Med Res April 2005;121:287-314.
5. Merati TP, Ryan C, Turnbull S, Wirawan DS, Otto B, Bakta IM dkk. *Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia dan perannya sebagai petunjuk dinamika epidemic HIV*.
6. Protto JP, Plaschaert S, Sartor F, Walkiers D. *Biological testing for HIV, hepatitis B and C infections*. Epidemiology Unit, Scientific Institute of Public Health. 2004.
7. Elemuwa CO, Basseyy BE, Olaleyey BO. *The problems of indeterminate HIV result in blood transfuse servises in Nigeria*. Trop doc 2005;35 (3):166-7 (abstract)
8. Tebourski F, Slim A, Elgaaid A. *The significant of combining WHO and CDC criteria to resolve indeterminate HIV type 1 western blot result*. Diagnostic microbiology and infectious disease 2004;48:59-61.
9. Marques C, Zetola NM, Klausner JD. *HIV testing: an update*. In: Medical Laboratory Observer Feb 2008;40(2):12-20
10. Valerie LNg. *Serological diagnosis with recombinant peptides/proteins*. Clin Chem. 1991;37(10):1667-8.
11. Popov RC, Constantine NT, and Weber J. *Humoral immune respons and detection during HIV infection*. In: Karn J, editor. HIV A Practical Approach vol.1 Virology and Immunology. Oxford: IRL Press; 1998:191-209.

12. Bhardwaj D, Bhatt S, Khamar BM, Modi, Ghosh PK. *Recombinant HIV1 p24 protein: cloning, expression, purification and use in the development of ELISA kit. Current Science October 2006; 91(7): 913-17.*
13. Kline RL, McNairn D, Holodniy M, Mole L, Margolis D, Blattner W et al. *Evaluation of Chiron HIV-1/HIV-2 recombinant immunoblot assay. Journal of clinical microbiology. 1996; 34(11): 2650-3.*
14. Gutierrez M, Soriano V, Martiane AP, Polito A, Fumanal F, Baquero M et al. *Recombinant immunoblot assay (RIBA) versus conventional western blot analysis for the diagnosis and distinction of HIV-1 and HIV-2 infections. Int Conf AIDS. 1992; 8(22): 19-24. (abstract)*
15. Houfbauer JM, Schulz TF, Hengster P, Larcher C, Zangerle R, Kofler H et al. *Comparison of western blot (immunoblot) based on recombinant derived p-41 with conventional test for serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus infections. Journal of Microbiology. 1988; 26(1): 116-20.*
16. Koblavi-Deme S, Maurice C, Yavo D, Sibaily TS, N'guesan K, Kamelan-Tano Y et al. *Sensitivity and specificity of HIV rapid serologic assay and testing algorithms in an antenatal clinic in Abidjan, Ivory Coast. J Clin Microbiol 2001; 39: 1808-12*
17. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. 2007. *HIV disease and Complication of Immunodeficiency.* Di dalam: *Microbiology a Human Perspective.* McGraw-Hill Companies. New York. p733-57
18. Hunt NC. *Human Immunodeficiency Virus.* Di dalam: *Medical Microbiology PAMB 650/720.* p.1-10
19. Pantaleo G, Gohen O, Graziosi C, Vaccarezza M, Paolucci S, Demarest JF et al. *Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection.* Dalam: *AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and preventions . 4th ed.* 1996. Lippincott-Raven. p75-85
20. *Statistik kasus HIV/AIDS di Indonesia.* Sumber Ditjen PPM&PL Depkes RI.
21. Metcalf JA, Dvey Jr RT, Lane HC. *Acquired immunodeficiency syndrome: Serologic and virologic test.* In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA.

- editors. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 177-93
22. Katzeinstein D. *Vertical transmission of HIV in Africa: Diagnostic Testing and New Intervention*. HIV Clin. Trial. 2000;1(3):51-7
 23. Urassa W, Godoy K, Killewo J, Kwesigabo G, Mbakileki A, Mhalu F et al. *The accuracy of an alternative confirmatory strategy for detection of antibodies to HIV-1: experience from a regional laboratory in Kagera, Tanzania*. Journal of clinical virology. 1999.14.25-9.(abstract)
 24. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. Updated ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005.43-64
 25. *Nickel affinity chromatography protocol/guide*
 26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbour Laboratory Press
 27. Genelabs Diagnostics. HIV Blot 2.2. Western blot assay
 28. Dot blot protocol. Dunduh dari : <http://www.westernblotting.org> . Diakses tanggal 8 Juni 2009
 29. Kleinnman S, Busch MP, Hall L, Thomson R, Glynn S, Gallahan D. *False positif HIV-1 test in low risk screening setting of voluntary blood donation*. JAMA September 1998;280(12):1080-5.
 30. Jamjoom GA, Maatuk J, Gazal M, Damanhour L, Awlia A, Ruwaih N et al. *Follow up of HIV western blot indeterminate result*. Ann Saudi Med 1997;17(5):518-21
 31. *HIV assay. Operational Characteristic*. Report 14. 2004. Diunduh dari: <http://www.who.int>. Diakses tanggal 24 Juni 2009
 32. Everett DB, Weiss HA, Changaluca J, Anemona A, Chirwa T, Ross DA et al. *Low specificity of Murex fourth generation HIV enzyme immunoassay in Tanzanian adolescent*. Tropical medicine and international health Oct 2007.12(11):1023-26
 33. Guan M. *Frequency, causes and new challenges of indeterminate result in western blot confirmatory testing for antibodies to Human Immunodeficiency Virus*. Clin. Vaccin. Immunol. 2007;14 (6).649-59

34. Mahboudi F, Irina NA, Chevalier A, Galier A, Ghadiri A, Adeli A et al. *A serological assay of human immunodeficiency virus tipe 1 antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in E.coli.* Journal of Biotechnology.2006;125 (2).(abstract)



DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Nama : Febriana Catur Iswanti
Tempat/Tanggal Lahir : Sukoharjo, 9 Februari 1979
Alamat : Jl. Bambu Duri IV No.4 Pondok Bambu,
Duren Sawit, Jakarta Timur

Riwayat Pendidikan:

1985-1991 SDN Kagokan I, Sukoharjo

1991-1994 SMPN 1 Gatak, Sukoharjo

1994-1997 SMAN Kartasura, Sukoharjo

1997-2001 Strata I- FKUI Jakarta

2001-2003 Dokter Umum- FKUI Jakarta

2006-sekarang Strata II-Biomedik FKUI Jakarta

Lampiran I

Tabel uji western blot dan dot blot dengan serum PMI dan plasma IDU

N O	KODE SAMPEL	UJI WESTERN BLOT		UJI DOT BLOT	RT- PCR	RAPID TEST
		PITA SPESIFIK	PITA NON SPESIFIK			
1	03/02/21/07/06/15.00	+	+	+	+	+
2	05/01/27/07/06/10.30	+	+	+	+	+
3	02/02/27/07/06/11.59	+	+	+	+	+
4	03/04/28/07/06/14.00	+	-	+	+	+
5	01/02/31/07/06/10.00	+	+	+	+	+
6	04/01/08/08/06/09.30	+	-	+	+	+
7	04/02/08/08/06/09.50	+	+	+	+	+
8	02/04/11/08/06/11.49	+	-	+	+	+
9	03/07/16/08/06/11.00	+	-	+	+	+
10	02/07/12/09/06/13.12	+	+	+	+	+
11	02/08/12/09/06/13.23	+	+	+	+	+
12	03/18/21/09/06/13.05	+	+	+	+	+
13	03/19/22/09/06/13.00	+	-	+	+	+
14	03/20/22/09/06/13.30	+	+	+	+	+
15	03/23/22/09/06/13.45	+	+	+	+	+
16	04/07/28/09/06/11.30	+	-	+	+	+
17	05/04/02/10/06/12.00	+	-	+	+	+
18	05/05/03/10/06/13.00	+	+	+	+	+
19	05/06/11/10/06/10.47	+	-	+	+	+
20	04/08/12/10/06/09.00	+	+	+	+	+
21	HIV-1	+	-	-	-	-
22	HIV-2	+	+	+	+	+
23	HIV-3	+	+	-	-	-
24	HIV-4	+	+	+	+	+
25	HIV-5	+	-	+	+	+
26	HIV-6	-	-	-	-	-
27	HIV-7	+	+	+	+	+
28	HIV-8	+	-	+	+	+
29	HIV-9	+	+	+	+	+
30	HIV-10	+	+	+	-	+
31	HIV-11	+	-	+	-	+
32	HIV-12	+	+	+	+	+
33	HIV-13	+	+	+	+	+

Lampiran 2.

Tabel. Uji western blot dan dot blot dengan serum indeterminate

NO	KODE SAMPEL	UJI WESTERN BLOT		UJI DOT BLOT	RAPID TEST
		PITA SPESIFIK	PITA NON SPESIFIK		
1	MOU G 145 1986/O	+	-	-	Indeterminate
2	U 105 3919/O	-	-	-	Indeterminate
3	U 405 3288/O	-	-	-	Indeterminate
4	C 527 5568/O	-	-	-	Indeterminate
5	S 257 5568/O	-	-	-	Indeterminate
6	S 357 7215/B	+	-	-	Indeterminate
7	U 205 3514/A	+	-	-	Indeterminate
8	U 405 3251/A	-	-	-	Indeterminate
9	1700-9501/O	+	-	-	Indeterminate
10	2390-7089/A	-	-	-	Indeterminate
11	27646389/O	+	-	-	Indeterminate
12	523 K 7854/B	+	-	-	Indeterminate
13	5013/G 447 0656/AB	+	-	-	Indeterminate
14	5094/P144 3775/O	+	-	-	Indeterminate
15	5499/G 347 1079/AB	-	-	-	Indeterminate
16	S256 2299/O	+	-	-	Indeterminate
17	G 3266627/AB	-	-	-	Indeterminate
18	S 255 6105/A	-	-	-	Indeterminate
19	P 239 4943/A	-	-	-	Indeterminate
20	S 282 0999/A	-	-	-	Indeterminate

Lampiran 3

Gambar hasil uji western blot dan dot blot dengan serum PMI, plasma IDU dan serum *indeterminate*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----

Keterangan : 1. Marka protein, 2-13 uji western blot dan uji dot blot pada plasma IDU sampel no.1-12 (kode sampel sesuai lampiran 1), 14. kontrol negatif

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Keterangan : 1. Marka protein, 2-9 uji western blot dan uji dot blot pada plasma IDU sampel no.13-20 (kode sampel sesuai lampiran 1), 10. kontrol negatif

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----

Keterangan : 1-13 uji western blot dan uji dot blot pada serum PMI sampel no.21-33(kode sampel sesuai lampiran 1)

Hasil uji western blot dan dot blot dengan serum indeterminate

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----



Keterangan : 1. Marka protein, 2-9 uji western blot dan uji dot blot pada serum indeterminate sampel no.1-8 (kode sampel sesuai lampiran 2), 10. kontrol negatif

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---



Keterangan : 1. Marka protein, 2-7 uji western blot dan uji dot blot pada serum indeterminate sampel no.9-14 (kode sampel sesuai lampiran 2), 8. kontrol positif, 9. kontrol negatif

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---



Keterangan : 1-6 uji western blot dan uji dot blot pada serum indeterminate sampel no.15 20 (kode sampel sesuai lampiran 2), 7. kontrol positif

Studi Awal Reaktivitas Protein p24 HIV-1 Rekombinan Subtipe B terhadap Serum ODHA dari Jakarta dan Beberapa Propinsi di Indonesia

Febriana Catur Iswanti¹, Budiman Bela², Andi Yasmon², Eti Apriliana¹

1. Mahasiswa Program Studi Ilmu Biomedik, FKUI

2. Staf pengajar bagian Mikrobiologi, FKUI

Abstrak

Uji diagnostik dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi untuk deteksi infeksi HIV sangat penting dikembangkan untuk mengontrol infeksi HIV. Uji diagnostik berbasis serologi yang digunakan untuk deteksi infeksi HIV di Indonesia seharusnya dapat mengenali epitop virus HIV subtipe CRF01_AE karena subtipe ini dominan (90%) di Indonesia. Penggunaan antigen rekombinan dilaporkan meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji serologi dan antigen murni dapat diproduksi dengan lebih mudah dan lebih aman. Pada studi ini, antigen p24 HIV-1 rekombinan digunakan untuk mendapatkan data awal tentang reaktivitas antigen p24 HIV-1 subtipe B dengan serum yang diduga terinfeksi HIV/AIDS dan plasma terinfeksi HIV/AIDS subtipe CRF01_AE dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia. Reaktivitas plasma dan serum terhadap antigen p24 rekombinan dalam bentuk terdenaturasi dan non-denaturasi diuji dengan dot blot (DB) dan western blot (WB). Hasil penelitian ini menunjukkan 33 dari 33 (100%) serum/plasma dengan HIV + reaktif dengan uji WB dan DB, sedangkan dari 21 serum indeterminate 43% sampel reaktif dengan uji WB dan tidak ada (0%) yang reaktif dengan uji dot blot. Dua sampel serum negatif HIV reaktif dengan uji WB tapi tidak reaktif dengan DB. Studi ini menunjukkan bahwa antigen p24 subtipe B bereaksi silang dengan serum/plasma individu dengan CRF01_AE. Hasil yang tidak konsisten tampak pada reaktivitas protein p24 rekombinan terhadap sampel indeterminate dan negatif. Diperlukan studi lebih lanjut dengan jumlah sampel lebih besar dan lokasi geografis lebih luas dengan pemeriksaan PCR dan kultur untuk menjelaskan fenomena ini.

Kata kunci: protein p24 rekombinan HIV-1 subtipe B, uji western blot, uji dot blot

Diagnostic system with high sensitivity and specificity for detection of HIV infection is important to develop for control of HIV infection. It is however important that the immunoassays used for detection of HIV infection in Indonesia should involve the recognition of epitopes belonging to HIV-1 AE_CRF01 subtype since this particular subtype constitutes approximately 90% of the circulating HIV-1 strains in Indonesia. The use of recombinant antigen has been shown to improve the sensitivity and specificity of in serology diagnostic and large scale production of pure antigen can be performed with relatively less technical difficulties and more safely.

In this study, His-Tagged recombinant P24 HIV-1 antigen was utilized to obtain initial data concerning the reactivity of p24 antigen of HIV-1 subtype B with sera of HIV-AIDS suspected individuals and plasma of AE_CRF01 infected individuals from Jakarta and several other provinces in Indonesia. The

reactivity of the plasma and sera with native and linearized form of the recombinant p24 antigen were respectively assessed by dot blot (DB) and Western blot (WB) assays.

The results of this study showed that 33 of 33 (100%) of HIV positive sera/plasma is reactive with both WB and dot blot assay, while of the 21 indeterminate sera/plasma samples 43% reactivity was observed by WB and none (0%) by DB. The two negative sera/plasma samples from suspected HIV-AIDS infected individuals were both reactive by WB but non-reactive by DB. This study showed that the p24 antigen of HIV-1 subtype B cross-react with sera/plasma from AE_CRF01 infected individuals. The inconsistent result shown by DB and WB in the reactivity of recombinant p24 reactivity with plasma and sera of individuals with indeterminate and negative infection status needs calls for a study using expanded number of samples from a wider geographical location in order involving other methods for detection of HIV-1 infection such as PCR and culture, in order to obtain a statistically representative data concerning this phenomenon.

Keywords: recombinant p24 HIV-1 subtype B, western blot, dot blot

Pendahuluan

Infeksi Human immunodeficiency virus (HIV) telah menjadi pandemi di seluruh dunia, dengan dominasi HIV-1.¹ Subtipe HIV-1 yang dominan di Indonesia adalah CRF01_AE (90 %).² Diagnosis infeksi HIV umumnya berbasis uji serologi dengan deteksi antibodi terhadap HIV. *Enzyme immunoassay* (EIA) merupakan uji yang sering digunakan dalam uji skrining HIV. Bila uji skrining reaktif atau tidak dapat disimpulkan maka diperlukan uji konfirmasi.³ Namun tahapan uji diagnostik ini dapat menimbulkan masalah tersendiri, yaitu tingginya hasil yang tidak dapat disimpulkan (*indeterminate*).⁴

Protein p24 merupakan salah satu antigen kapsid HIV yang sering digunakan dalam uji diagnostik karena antigenisitas yang tinggi. Selain itu, antibodi terhadap p24 terbentuk pada tahap awal fase serokonversi dan kinetiknya berhubungan dengan peningkatan stadium penyakit.⁵

Penggunaan antigen rekombinan dalam uji serologi dilaporkan dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas.⁶ Penggunaan p24 rekombinan memberikan sensitivitas dan spesifisitas tinggi pada uji diagnostik yang dikembangkan.⁷ Antigen dalam bentuk protein rekombinan lebih aman dan mudah diproduksi dalam skala besar dengan risiko minimal dibandingkan kultur virus yang infeksius. Pada studi ini, antigen p24 HIV-1 rekombinan digunakan untuk mendapatkan data awal tentang reaktivitas antigen p24 HIV-1 subtipe B dengan serum yang diduga terinfeksi HIV/AIDS dan plasma terinfeksi HIV/AIDS subtipe CRF01_AE dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia.

Metode

Bahan

Protein fusi his-tag p24 HIV-1 rekombinan subtipe B diperoleh dari bagian Mikrobiologi FKUI. Protein ini telah diklonasi oleh Yasmon dkk (2007) dan kemudian diekspresikan pada *E. coli* oleh Apriliani dkk (2008). Selanjutnya

protein ini disimpan pada -80°C . Protein ini telah diukur konsentrasinya dengan metode Bradford, dengan konsentrasi $0,406 \mu\text{g/mL}$.

Serum PMI yang digunakan merupakan koleksi bagian Mikrobiologi FKUI, sebelumnya telah diuji dengan pemeriksaan sandwich ELISA. Dari 13 serum, 10 sampel + HIV, 2 sampel - HIV dan 1 sampel indeterminate. Uji diagnostik yang digunakan untuk serum PMI sebagian besar adalah Murex (Abbott) dan Behring. Selain itu juga Determine dan Biomerieux. Plasma *intravena drug users* (IDU) sebanyak 20 sampel, telah diperiksa dengan RT-PCR (Yasmon dkk) dengan hasil +, dan subtype virus yang menginfeksi adalah CRF01_AE.

Sedangkan serum *indeterminate* diperoleh dari Yayasan IHVCB-UI, sebelumnya telah diuji dengan rapid tes 3 kali dan serum dikategorikan tidak dapat disimpulkan (*indeterminate*).

Sampel yang digunakan ini merupakan sisa penelitian sebelumnya. Subyek penelitian telah setuju bahwa spesimen serumnya digunakan dalam penelitian tersebut dan penelitian selanjutnya. Subyek penelitian telah menandatangani *informed consent*.

SDS PAGE

Protein p24 HIV-1 rekombinan ditambahkan dengan larutan 2x *loading dye* (100 mM Tris Cl pH 6,8, 200 mM *dithiothreitol*, 4% SDS, 0,2% *bromophenol blue*, 20% gliserol) yang mengandung 200 mM DTT kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, protein rekombinan segera diinkubasi di dalam es selama 5 menit untuk kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE 12% (H_2O , 30% akrilamid, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% amonium persulfat, TEMED) dengan tegangan sebesar 100 volt selama 1 jam 30 menit menggunakan dapar elektroforesis (25 mM Tris, 250 mM glisin pH 8,3 dan SDS 0,1%). Hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomasie (90 ml H_2O : metanol [1 : 1], 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan pemanasan 40°C selama 8 detik. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan penghilang warna biru Coomasie (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H_2O) juga dengan penggosokan pelan selama satu hari, setelah itu gel poliakrilamid dikeringkan untuk dokumentasi.

Transfer protein dengan metode Transblot semi dry

Proses transfer protein dari gel poliakrilamid ke membran nitroselulosa dilakukan dengan metode *Transblot semi dry*. Kertas Whatman 3MM dipotong sesuai ukuran gel. Kemudian membran nitroselulosa (Amersham Life Science) dipotong sesuai ukuran gel dengan menggunakan sarung tangan bersih. Kertas Whatman 3MM (BioRad) dan membran nitroselulosa direndam perlahan-lahan dalam dapar transfer (2,5 gr Glisin (Merck), 5,8 gram Tris Base (BioRad), 200 mL methanol (Merck) dan H_2O hingga volume akhir 1 L, pH 8,3) selama 15 menit untuk menghindari gelembung udara. Kemudian kertas disusun dengan urutan: kertas *Whatman* – membran nitroselulosa – gel – kertas *Whatman* dari arah kutub negatif ke kutub positif alat *Semi Dry Transfer* (BioRad). Tabung kaca digulung ke berbagai arah untuk menghindari gelembung udara, kemudian

mesin transfer ditutup. Selanjutnya mesin transfer dihubungkan dengan listrik pada tegangan 15 volt selama 1 jam.

Setelah proses transfer selesai, kertas diangkat perlahan-lahan sesuai urutan kertas. Gel poliakrilamid dan kertas Whatman 3MM dibuang, sedangkan membran dicuci dengan dapar pencuci. Kemudian membran direndam dalam larutan *Ponceau S* (2 gr Ponceau S, 30 gr asam trikloroasetat, 30 gr asam sulfosalisilat dan H₂O hingga volume akhir 100 mL) selama 5 menit. Kemudian membran dicuci dengan akuades. Setelah pita protein terlihat, membran dipotong-potong sesuai ukuran lajur masing-masing protein dan dicuci dengan dapar pencuci (0,05% Tween dalam larutan 1x PBS) hingga warna *Ponceau S* hilang.

Uji western blot

Protein p24 HIV-1 rekombinan yang telah dianalisis dengan SDS PAGE 12% dan ditransfer ke membran nitroselulosa diinkubasi dengan dapar pemblok (0,05 % Tween dan 0.5% gelatin (BioRad) dalam 1x PBS) selama 18 jam pada suhu 4 °C.

Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci selama 2x5 menit dilanjutkan dengan inkubasi membran menggunakan serum manusia pengenceran 1/2500 selama 2 jam. Setelah melalui tahap pencucian dengan dapar pencuci selama 2 x 5 menit kemudian membran diinkubasi dengan larutan antibodi *anti human* berlabel biotin (Chemicon) dengan tingkat pengenceran 1:10.000.

Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang dengan agitasi rendah. Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci selama 2 x 5 menit dilanjutkan dengan menambahkan konjugat streptavidin berlabel *Horseradish peroxidase* (HRP) 0.12 U dalam dapar pelarut dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dilakukan pencucian kembali selama 2x5 menit dan ditambahkan larutan substrat (3 mg *Diaminobenzidine* (Sigma-Aldrich) dalam 5 mL 1x PBS dan 5 µL 30% H₂O₂) dan selanjutnya diinkubasi selama 2 menit. Setelah inkubasi, akan terlihat pita protein yang bereaksi dengan antibodi yang terdapat dalam serum manusia. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan H₂O.

Uji dot blot

Membran nitroselulosa dipotong-potong ukuran 1cmx1cm, kemudian dimasukkan ke dalam plate kultur 24 well (Nunc) yang sebelumnya telah dicuci bersih dengan penambahan sodium hipoklorit dan dikeringkan. Sejumlah 1 µL protein p24 rekombinan konsentrasi 100 ng/µL ditetaskan pada membran nitroselulosa. Setelah kering, membran kemudian diinkubasi dengan larutan *blocking* (0,05 % Tween dan 0.5% gelatin(BioRad) dalam 1x PBS) selama 18 jam pada suhu 4 °C dengan agitasi rendah. Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci (0.05% Tween 20 dalam 1 x PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan serum manusia dengan pengenceran 1/2500 selama 2 jam.

Setelah melalui tahap pencucian dengan dapar pencuci kemudian membran diinkubasi dengan larutan antibodi *anti human* berlabel biotin dengan tingkat pengenceran 1:10.000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu

ruang dengan agitasi rendah. Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menambahkan konjugat streptavidin-HRP dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dilakukan pencucian kembali dan ditambahkan larutan substrat (3 mg Diaminobenzidine dalam 5 mL 1x PBS dan 5 μ L 30% H₂O₂) dan diinkubasi selama 2 menit. Setelah inkubasi, akan terlihat pita protein yang bereaksi dengan antibodi yang terdapat dalam serum manusia. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan H₂O.

Hasil

Uji western blot dan uji dot blot dengan serum PMI dan plasma IDU

Perbandingan antara hasil uji rapid tes, uji western blot dan uji dot blot serta hasil uji RT-PCR yang telah dilakukan pada serum PMI, tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji western blot dan dot blot pada serum PMI

Keterangan	p24r western blot		p24r dot blot		RT-PCR	
	+	-	+	-	+	-
Uji rapid test positif (n=30)	10	-	10	-	8	2
Uji rapid test negative (n=2)	2	-	-	2	-	2
Uji rapid test <i>indeterminate</i> (n=1)	-	1	-	1	-	1
Jumlah	12	1	10	3	8	5

Sedangkan perbandingan antara hasil uji rapid tes, uji western blot dan uji dot blot serta hasil uji RT-PCR yang telah dilakukan pada plasma IDU, tampak pada Tabel 2.

Uji western blot dan uji dot blot dengan serum indeterminate

Berdasarkan hasil uji *western blot*, protein p24r reaktif terhadap 9 sampel serum indeterminate dengan terbentuknya pita tipis pada 24 kD. Pada gambar 1 lajur 2, 4, 5 dan 6 tampak pita positif tipis. Pada kontrol positif tampak pita yang terbentuk intensitasnya tinggi, sedangkan pada kontrol negatif tidak tampak gambaran pita.

Protein p24 rekombinan yang diuji tidak reaktif terhadap 20 serum *indeterminate*. Perbandingan antara hasil uji western blot dengan protein p24 rekombinan dan uji dot blot menggunakan protein p24 rekombinan serum *indeterminate* dapat ditunjukkan pada tabel 3.

Diskusi

Untuk menentukan interpretasi uji western blot diperlukan kriteria tertentu. Rekomendasi yang paling sering dipakai yaitu WHO dan CDC mensyaratkan adanya reaktivitas terhadap protein env (gp41 dan gp 120/160).⁸ Adanya pita berukuran 24 kD pada uji *western blot* terhadap serum PMI dengan hasil *rapid test* negatif, belum dapat disimpulkan sebagai reaksi positif palsu dalam deteksi infeksi HIV-1.

Kleinman melaporkan bahwa angka positif palsu pada uji *western blot* adalah 4,8% dari serum yang bereaksi positif dengan uji *western blot*. Dari serum yang diuji, seluruh serum yang bereaksi positif dengan adanya pita *envelop* saja saat dikonfirmasi dengan uji PCR ternyata merupakan positif palsu. Sedangkan serum yang bereaksi positif dengan satu protein *envelop* dan satu pita tambahan (terutama p24, p17 dan p66) ternyata saat dikonfirmasi 80% menunjukkan hasil positif palsu. Hal ini disebabkan adanya reaksi silang terhadap protein env p41, protein 24 dan adanya infeksi oleh varian HIV yang lain (misalnya HIV-2 dan HIV-1 grup O). Selain itu juga dilaporkan hasil positif palsu pada individu yang mengikuti studi eksperimental vaksinasi HIV.⁹

Jamjoom dkk melaporkan bahwa angka kejadian *indeterminate* dapat disebabkan kontaminasi silang dalam kadar rendah antar sampel. Hal ini dapat terjadi karena aliran balik cairan pada saat aspirasi dalam prosedur pencucian. Kontaminasi silang ini dapat diatasi dengan pemeriksaan ulang uji *western blot* dengan cara memisahkan sampel dengan hasil EIA tinggi dan EIA rendah serta memberi jarak antar sampel. Hal ini dapat menurunkan interpretasi *indeterminate* dari 21 % menjadi 8,5%.¹⁰

Tabel 2. Uji western blot dan uji dot blot pada plasma IDU

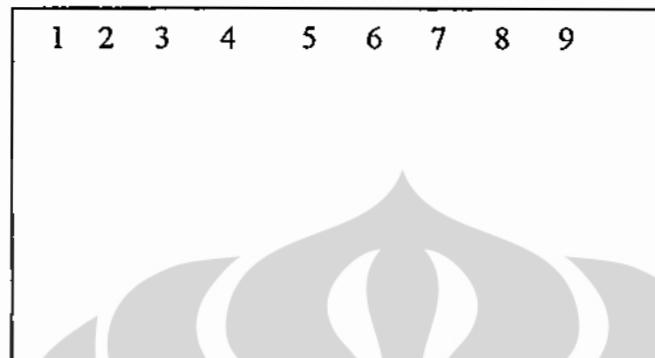
Jumlah sampel	p24r western blot		p24r dot blot		RT-PCR	
	+	-	+	-	+	-
20	20	-	20	-	20	-

Dalam penelitian ini hanya digunakan satu antigen yaitu p24r untuk uji *western blot*, oleh sebab itu masih perlu dikaji lebih lanjut. Serum PMI yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya telah dilakukan uji sandwich ELISA dengan reagen Murex (Abbot), Vironostika (bioMerieux) dan Behring. Antigen yang digunakan pada *Murex HIV Ag/Ab combination* adalah protein rekombinan *env* dan *pol* HIV-1, *env* HIV-2 dan peptida untuk HIV-1 grup O. Sedangkan antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal terhadap p24. Pada *Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab* antigen yang digunakan adalah gp160 HIV-1, ANT70 HIV-1, peptida *env* HIV-2 serta antibodi monoklonal terhadap p24.¹¹ Oleh sebab itu reaksi silang antara antibodi terhadap p24 dengan varian HIV yang lain tampaknya tidak sesuai. Sedangkan studi eksperimental dengan vaksinasi HIV belum dikembangkan di Indonesia.

Adanya kontaminasi silang antar sampel dalam prosedur pencucian tidak sesuai dengan penelitian ini. Pada uji dot blot dengan prosedur yang sama pun tidak tampak adanya kontaminasi antar sampel. Diduga reaktivitas protein p24r terhadap serum negatif HIV ini disebabkan reaksi silang antibodi non spesifik terhadap epitop p24. Hal ini dapat diamati bahwa pita yang terbentuk tipis menunjukkan reaktivitas yang lemah.

Satu serum PMI yang telah diperiksa *rapid test* dengan hasil tidak dapat disimpulkan, pada uji *western blot* dengan p24r menunjukkan hasil negatif dengan tidak tampak pita. Pada uji dot blot juga didapatkan hasil negatif. Sedangkan pada uji RT-PCR untuk konfirmasi hasilnya pun negatif. Mungkin pada serum ini memang tidak mengandung virus HIV-1 maupun antibodi terhadap virus HIV-1. Uji *rapid test* yang dilakukan kemungkinan merupakan

positif palsu. Hal ini sesuai dengan Everett DB dkk yang melaporkan bahwa Murex generasi keempat memiliki spesifisitas rendah (91.5%).¹²



Gambar 1. Hasil uji western blot dengan serum indeterminate. Keterangan :1.Marka protein, 2-7. serum indeterminate, 8. kontrol positif, 9. kontrol negatif, tanda→ pita positif

Pada 2 serum yang menghasilkan reaksi positif pada uji *western blot* ternyata menunjukkan hasil negatif pada uji *dot blot*. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut manfaat protein p24 rekombinan dalam bentuk tidak terdenaturasi dengan uji dot blot, menjadi prediktor untuk menilai kelayakan uji serologi ulangan.

Pada uji dot blot tampak titik yang terbentuk juga bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang terdapat dalam serum berbeda-beda, tergantung dari fase perjalanan penyakit yang dialami individu tersebut. Uji dot blot ini juga dapat digunakan sebagai uji semikuantitatif dengan mengukur densitas titik yang terbentuk menggunakan densitometer. Namun dalam penelitian ini tidak dapat diukur densitasnya karena volume antigen yang digunakan sangat kecil yaitu 1 μ L, sehingga bila diukur dengan densitometer akan menghasilkan *optical density* yang bias.

Bila dibandingkan antara uji western blot dan uji dot blot pada serum terdapat reaktivitas yang bervariasi pada antigen yang digunakan. Pada umumnya protein p24 rekombinan dalam bentuk terdenaturasi maupun tidak terdenaturasi reaktif terhadap serum dengan HIV+. Namun tampaknya antigen yang tidak terdenaturasi lebih reaktif. Kelemahan uji dot blot dengan p24r pada penelitian ini adalah adanya data dari uji western blot terdapat pita-pita kontaminan E.coli. Hal ini dapat berpengaruh pada hasil uji dot blot, karena adanya antibodi terhadap komponen protein E.coli dapat meningkatkan intensitas sinyal yang terbentuk sehingga dapat menimbulkan reaksi positif palsu.

Adanya keragaman genetik HIV-1 diduga berpengaruh dalam metode diagnosis. Subtipe sebagian besar strain HIV-1 dapat diidentifikasi dengan analisis sekuens bagian utama genom. Perbedaan sekuens nukleotida antar subtipe sekitar 20, 15 dan 25 persen pada *gag*, *pol* dan *env*.¹³ Protein p24 rekombinan yang dikembangkan ini berasal dari subtipe B, sedangkan saat ini subtipe yang dominan ada di Indonesia adalah CRF01_AE.² Hal ini perlu dikaji

lebih lanjut dengan pengembangan protein p24 rekombinan sub tipe CRF01_AE dan menilai reaktivitasnya terhadap serum HIV + yang sama. Perbandingan ini diharapkan dapat memberikan gambaran ada atau tidaknya permasalahan dalam uji diagnostik dengan menggunakan antigen dari sub tipe yang berbeda dengan serum yang diperiksa.

Terdapat hasil positif palsu pada uji dot blot dengan p24r pada 2 serum positif HIV dengan *rapid test*. Saat dikonfirmasi dengan hasil uji RT-PCR ternyata kedua serum tersebut negatif HIV. Hal ini diduga karena adanya protein kontaminan pada antigen yang digunakan. Pada uji western blot telah diketahui adanya protein kontaminan yang diduga komponen bakteri *E.coli* sebagai pengeksresi protein p24r, menyebabkan antibodi terhadap *E.coli* dalam serum manusia mengenali protein tersebut sehingga terbentuk sinyal positif.

Tabel 3. Uji western blot dan dot blot pada serum indeterminate

Jumlah sampel	Uji western blot		Uji dot blot	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif
20	9	11	0	20

Uji western blot dengan protein p24r pada penelitian ini menunjukkan adanya reaktivitas lemah terhadap serum uji, ditandai dengan terbentuknya pita sangat tipis. Hal ini mungkin disebabkan antibodi dengan kadar rendah terhadap p24 yang terdapat dalam serum ataupun ada reaksi silang antara protein p24r dengan antibodi nonspesifik. Sedangkan uji dot blot dalam penelitian tidak mendeteksi adanya antibodi terhadap p24 (Tabel 2). Diduga antibodi ini mengenali epitop p24r dalam bentuk terdenaturasi pada uji western blot namun tidak mengenali epitop dalam bentuk non denaturasi pada uji dot blot. Proses denaturasi protein menjadi polipeptida sebelum elektroforesis mungkin dapat membuka epitop-epitop yang tertutup oleh struktur protein p24r sehingga dikenali oleh antibodi non spesifik ataupun spesifik terhadap p24. Untuk menentukan status serum *indeterminate* tersebut diperlukan uji konfirmasi dengan deteksi RNA virus melalui PCR dan uji *western blot* ulangan untuk mendeteksi antibodi terhadap protein *envelop*. Penyebab dan kondisi yang berhubungan dengan serum indeterminate antara lain adanya infeksi HIV pada serokonversi awal, infeksi HIV-2, imunosilent AIDS, infeksi oleh retrovirus lain (HTLV, CAEV), adanya penyakit autoimun, keganasan dan lain-lain.¹⁴

Kesimpulan

Protein p24 HIV-1 rekombinan sub tipe B yang telah dikembangkan reaktif terhadap serum/plasma ODHA dari Jakarta dan beberapa propinsi di Indonesia yang terinfeksi HIV-1 sub tipe CRF01_AE. Terdapat perbedaan reaktivitas protein p24 HIV-1 rekombinan sub tipe B terhadap serum *indeterminate* dalam bentuk terdenaturasi dan non denaturasi. Diperlukan studi lebih lanjut dengan jumlah sampel lebih besar dan lokasi geografis lebih luas dengan pemeriksaan PCR dan kultur untuk menjelaskan fenomena ini.

Daftar pustaka

1. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. 2007. *HIV disease and Complication of Immunodeficiency*. Di dalam: *Microbiology a Human Perspective*. McGraw-Hill Companies. New York. p733-57
2. Merati TP, Ryan C, Turnbull S, Wirawan DS, Otto B, Bakta IM dkk. *Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia dan perannya sebagai petunjuk dinamika epidemic HIV*.
3. Marques C, Zetola NM, Klausner JD. *HIV testing: an update*. In: *Medical Laboratory Observer* Feb 2008;40(2):12-20
4. Elemuwa CO, Basseley BE, Olaleyey BO. *The problems of indeterminate HIV result in blood transfuse servises in Nigeria*. *Trop doc* 2005;35 (3):166-7 (abstract)
5. Popov RC, Constantine NT, and Weber J. *Humoral immune respons and detection during HIV infection*. In: Karn J, editor. *HIV A Practical Approach* vol.1 Virology and Immunology. Oxford: IRL Press; 1998:191-209.
6. Kline RL, McNairn D, Holodniy M, Mole L, Margolis D, Blattner W et al. *Evaluation of Chiron HIV-1/HIV-2 recombinant imunoblot assay*. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(11):2650-3.
7. Bhardwaj D, Bhatt S, Khamar BM, Modi, Ghosh PK. *Recombinant HIV1 p24 protein: cloning, expression, purification and use in the development of ELISA kit*. *Current Science* October 2006; 91(7): 913-17.
8. Genelabs Diagnostics. HIV Blot 2.2. Western blot assay
9. Kleinman S, Busch MP, Hall L, Thomson R, Glynn S, Gallahan D. *False positif HIV-1 test in low risk screening setting of voluntary blood donation*. *JAMA* September 1998;280(12):1080-5.
10. Jamjoom GA, Maatuk J, Gazal M, Damanhour L, Awlia A, Ruwaih N et al. *Follow up of HIV western blot indeterminate result*. *Ann Saudi Med* 1997;17(5):518-21
11. *HIV assay. Operational Characteristic*. Report 15. 2004. Diunduh dari: <http://www.who.int>. Diakses tanggal 24 Juni 2009
12. Everett DB, Weiss HA, Changaluka J, Anemona A, Chirwa T, Ross DA et al. *Low specificity of Murex fourth generation HIV enzyme immunoassay in Tanzanian adolescent*. *Tropical medicine and international health* Oct 2007.12(11):1023-26
13. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. *Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development*. *Indian J Med Res* April 2005;121:287-314.
14. Guan M. *Frequency, causes adan new challenges of indeterminate result in western blot confirmatory testing for antibodies to Human Immunodeficiency Virus*. *Clin. Vaccin. Immunol.* 2007;14 (6).649-59