

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

Susunan Pengelola Jurnal Ilmiah Patologi Klinik Indonesia
(Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory)
Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia Masa Bakti 2013–2016
(surat keputusan pengurus pusat PDSPATKLIN Nomor 008/PP-PATKLIN/III/2014)

Pelindung:

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Ketua:

Puspa Wardhani

Wakil Ketua:

Maimun Zulhaidah Arthamin

Sekretaris:

Dian Wahyu Utami

Bendahara:

Bastiana Bermawi

Anggota:

Osman D. Sianipar

Penelaah Ahli:

Riadi Wirawan, AAG. Sudewa, Rustadi Sosrosumihardjo, Rahayuningsih Dharma, Mansyur Arif

Penelaah Pelaksana:

Prihatini, July Kumalawati, Ida Parwati, Tahono, FM. Judajana, Krisnowati, Nurhayana Sennang Andi Nanggung, Aryati, Purwanto AP, Jusak Nugraha, Sidarti Soehita, Maimun Zulhaidah Arthamin, Endang Retnowati, Noormartany, Edi Widjajanto, Budi Mulyono, Adi Koesoema Aman, Uleng Bahrin, Ninik Sukartini, Kusworini Handono, JB. Soeparyatmo, M. Yolanda Probohoehsodo, Rismawati Yaswir

Berlangganan:

3 kali terbit per tahun

Anggota dan anggota muda PDSPATKLIN mulai Tahun 2011 gratis setelah melunasi iuran

Bukan Anggota PDSPATKLIN: Rp 175.000,-/tahun

Uang dikirim ke alamat:

Bastiana Bermawi dr, SpPK

Bank Mandiri KCP SBY PDAM No AC: 142-00-1079020-1

Alamat Redaksi:

d/a Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Jl. Mayjend. Prof. Dr Moestopo 6–8 Surabaya.
Telp/Fax. (031) 5042113, 085-733220600 E-mail: majalah.ijcp@yahoo.com

Akreditasi No. 66/DIKTI/KEP/2011

**INDONESIAN JOURNAL OF
CLINICAL PATHOLOGY AND
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Perbedaan Kolagen IV di Kerusakan Hati dan Infeksi Hepatitis C di Pasien Talasemia dengan Kelebihan Zat Besi (<i>Difference of Collagen IV in Liver Damage and Hepatitis C Infection in Iron Overload Thalassemia Patients</i>)	1-8
Nuri Dyah Indrasari, Ina Susanti Timan, Pustika Amalia	1-8
Pemeriksaan Tingkat sdLDL Serum Sebagai Petanda Diagnostik Stenosis Koroner (<i>Serum sdLDL Level as A Diagnostic Marker of Coronary Stenosis</i>)	9-15
Indranila K. Samsuria, Laily Adninta	9-15
Hubungan Glycated Albumin dengan Angka Banding Kolesterol LDL/HDL di Diabetes Melitus Tipe 2 (<i>Association of Glycated Albumin with LDL/HDL Cholesterol Ratio in Type 2 Diabetics</i>)	16-21
Tiwik Eriskawati, Tahono, M.I. Diah. P	16-21
Deteksi Clostridium Difficile Toksigenik Menggunakan Uji Cepat Toksin dan Real Time Polymerase Chain Reaction (<i>Toxigenic Clostridium Difficile Detection Using Toxin Rapid Test and Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)	22-26
Ika Yasma Yanti, Dalima Ari Wahono Astrawinata	22-26
Kloning dan Overekspresso Protein P24-Gag HIV (<i>Cloning and Overexpression P24-Gag of HIV</i>)	27-33
Efrida, Andani Eka Putra	27-33
Analisis Kadar Serum Feritin di Karsinoma Payudara (<i>Analysis of Feritin Levels in Carcinoma Mammapa</i>)	34-37
Sriwati Atjo, Uleng Bahrun, Hardjoeno	34-37
Turnaround Time Uji Cocok Serasi di Pelayanan Bank Darah (<i>Turnaround Time Cross Match in the Blood Bank</i>)	38-41
Glent Nurtanio, Rachmawati Muhiddin, Mansyur Arif	38-41
FcγII (CD32) Monosit di Infeksi Dengue Primer dan Sekunder { <i>FcγRII (CD32) Monocytes in Primary and Secondary Dengue Infection</i> }	42-47
Umi S. Intansari, Usi Sukorini, Shanti Ika Sari	42-47
Kesahihan Pemeriksaan Complex Specific Cocktail Antigen Tb (Esat-6, Cfp-10, Mpt-64) Metode Cepat Immunochromatography pada Cairan Serebrospinal Pasien Meningitis Tuberkulosis { <i>Validity of Rapid Immunochromatography Complex Specific Cocktail Antigen Tb (Esat-6, Cfp-10, Mpt-64) Using Cerebrospinal Fluid of Tuberculous Meningitis Patient</i> }	48-54
Livia Noviani, Ida Parwati, Ganiem AR, Turbawati DK	48-54

Kenasaban Kadar 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8-OHdG) Serum dengan Derajat Defisit Neurologis pada Strok Iskemik (<i>Correlation of Serum 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8-OHdG) with Neurological Deficits in Ischemic Stroke</i>)	55–59
Liza, Ida Parwati, Andi Basuki Prima Birawa, Sylvia Rachmayati	
LDL Teroksidasi dan Kepadatan Mineral Tulang (<i>Oxidized LDL Cholesterol and Bone Mineral Density</i>)	60–64
Sheila Febriana, Yurdiansyah, Siti Rafiah, Ruland DN Pakasi, Uleng Bahrun	
Perbedaan Kadar Prolylcarboxypeptidase di Pasien Sindrom Koroner Akut dengan Pasien Angina Stabil (<i>The Difference of Prolylcarboxypeptidase Level in Acute Coronary Syndrom and Stable Angina Patient</i>)	65–71
Maenaka Smaratungga, Rita C, Indrati AR, Martha JW	
Analisis Feritin dan AST to Platelet Ratio Index sebagai Petanda Derajat Fibrosis Penyakit Hati Kronis (<i>Analysis Ferritin and AST to Platelet Ratio Index As A Marker Degree of Fibrosis Chronic Liver Disease</i>)	72–76
Yulianti Yasin, Uleng Bahrun, Ibrahim Abdul Samad	
Neopterin dan Peroksida Serum Sebagai Petanda Makrofag Teraktivasi pada Tuberkulosis Paru Aktif dan Individu Berkebahanayaan Tinggi (<i>Serum Neopterin and Peroxide As Marker of Activated Macrophages on Active Pulmonary Tuberculosis and Individuals at High Risk</i>)	77–81
I Nyoman Wande, Ni Made Linawati, I Made Bagiada, IWP. Sutirta Yasa, AAN. Subawa	
Indeks Aterogenik Plasma di Penyakit Diabetes Melitus Tipe 2 (<i>Atherogenic Index of Plasma in Type 2 Diabetes Mellitus</i>)	82–86
Amarensi M Betaubun, Nurahmi, Uleng Bahrun, Ruland Pakasi	
Nitrit Oksida dan Volume Edema Otak pada Strok Perdarahan dalam Otak dengan Polimorfisme G894T (<i>Nitrit Oxide and Cerebral Edema Volume in Intracerebral Hemorrhagic Strok with G894T Polymorphism</i>)	87–91
Iskandar Zakaria, Arif Faisal, Sri Sutarni, Ahmad Hamim Sadewa, Imran	
TELAAH PUSTAKA	
Fungsi dan Pemeriksaan Limfosit T $\gamma\delta$ (<i>Functions and Examination of $\gamma\delta$T lymphocytes</i>)	92–98
Yulia Nadar Indrasari, Jusak Nugraha	
LAPORAN KASUS	
Mieloma Multipel Nonsecretory (<i>Nonsecretory Multiple Myeloma</i>)	99–103
Maimun Zulhaidah Arthamin, Nyi R. Wahidah, Boy A. Sihite	
INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU	104

Ucapan terimakasih kepada penyunting Vol 22 No. 1 November 2015

Purwanto AP, AAG. Sudewa, Rismawati Yaswir, July Kumalawati, Sidarti Soehita, Ninik Sukartini,
Maimun Z. Arthamin, Rustadi Sosrosumihardjo, Tahono, Prihatini, Jusak Nugraha, Aryati,
Kusworini Handono, Endang Retnowati, Edy Widjajanto, FM. Judajana

KLONING DAN OVEREKSPRESI PROTEIN P24-GAG HIV

(Cloning and Overexpression P24-Gag of HIV)

Efrida¹, Andani Eka Putra²

ABSTRACT

HIV diagnosis is confirmed by viral culture, but this process takes a long time. Another method used to detect HIV-specific antigens or antibodies is by immunoassay. Generally, antigen-antibody based methods are used as a screening test. Based on the stability of the sequences found in the first (1) study year, the researchers designed this study for the production of p24 recombinant protein. These proteins will be developed as diagnostic markers based on sero-immunology technique. The aim of this study was to know the construction and over expression of protein p24gag from local isolates and analysis of the diagnostic potential of doing design specific primers against p24gag protein, cloning and over expression of the gene, as well as to obtain a p24 protein that has been purified. This research results will be applied later to develop a method based on local isolates of HIV diagnosis. This research was a descriptive study, conducted over seven (7) months in the Biomedical Laboratory of the Faculty of Medicine, Andalas University and Department of Clinical Pathology, Dr. M. Djamil Hospital, Padang. This study was carried out by using samples of local isolates originating from the first year of research. Stages of the research were: 1) the design of primers for cloning, amplification and sequencing, 2) cloning into pDEST and pENT, 3) transformation of the target gene, 4) detection of fragment insertions, 5) protein expression and protein analysis by SDS-PAGE, immunoblotting and 6) purification. The conclusions of this study were: the design of specific primers against p24gag protein used fragments attb1, attb2, Shine Delgano and Kozac effective for protein expression. The results showed that the presence of protein 24kDa expression was identical to HIV p24gag protein. Further research needs to be conducted to identify potential immunological target protein.

Key words: HIV gag p24, recombinant protein, cloning, overexpression

ABSTRAK

Diagnosis HIV secara pasti ditetapkan dengan kultur virus. Namun, pengembangannya memerlukan waktu lama. Cara lain yang dipakai adalah imunoasai untuk mendeteksi antigen atau antibodi spesifik HIV. Umumnya metode berlandaskan antigen-antibodi digunakan sebagai uji penapisan. Berdasarkan stabilitas sekuen yang ditemukan pada penelitian tahun pertama (1), maka dirancanglah kajian untuk menghasilkan protein rekombinan p24. Protein ini selanjutnya akan dikembangkan sebagai petanda diagnostik berlandaskan seroimunologis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cara membangun dan overekspresi protein p24gag isolat lokal serta menganalisis kekuatan diagnostik dengan merancang primer spesifik terhadap protein p24gag, kloning dan overekspresi gen, serta mendapatkan protein p24 yang telah termurnikan. Penelitian ini merupakan kajian terkait terapan untuk mengembangkan cara mendiagnosis HIV yang berlandaskan isolat lokal. Penelitian ini bersifat deskriptif dan dilaksanakan selama tujuh (7) bulan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dan Laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. M. Djamil Padang. Penelitian ini menggunakan sampel isolat lokal yang berasal dari kajian tahun pertama. Tahapan penelitian adalah: rancangan primer untuk kloning, amplifikasi dan sekruensi, kloning ke pDEST dan pENT, transformasi gen target, deteksi fragmen sisipan, ekspresi protein dan menganalisisnya dengan SDS-PAGE serta imunoblotting dan pemurnian. Simpulan sementara yang dapat diambil dari penelitian ini adalah: rancangan primer spesifik terhadap protein p24gag menggunakan fragmen attb1, attb2, Shine Delgano dan Kozac yang tepat guna untuk kepentingan ekspresinya. Hasil ekspresi memperlihatkan ada protein 24kDa yang identik dengan protein p24gag HIV. Penelitian perlu dilanjutkan untuk identifikasi kekuatan imunologis protein target.

Kata kunci: p24 gag HIV, protein rekombinan, kloning, overekspresi

PENDAHULUAN

Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) bersifat pandemik, ditemukan di seluruh dunia dan diperkirakan telah menginfeksi 40 juta penduduk dunia. Sebagian besar kasus tersebar di Sub-Sahara Afrika, Asia (terutama di Asia Selatan dan Asia Tenggara), serta Amerika Selatan.

Kasus HIV/AIDS terus meningkat di Asia dan Afrika, sedangkan di sejumlah negara khususnya di Benua Amerika dan Eropa terjadi penurunan angka kejadian HIV/AIDS dalam lima (5) tahun terakhir. *World health organization* dan UNAIDS menyatakan bahwa Indonesia, India dan Cina adalah negara dengan jumlah pengidap dan peningkatan kasus HIV/

¹ Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas/RS. Dr. M. Djamil Padang. E-mail: efridasppk@yahoo.com

² Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

AIDS tertinggi di kawasan Asia Pasifik. Negara dengan tingkat infeksi tertinggi adalah India, Thailand, Myanmar dan Indonesia.

Kasus HIV/AIDS pertama di Indonesia ditemukan pada tahun 1987 di Bali. Selama kurun waktu antara 2001–2009, kasus HIV di Indonesia meningkat tiga kali lipat dan ditemukan di seluruh provinsi (33 provinsi) di Indonesia (pada tahun 2004 dilaporkan hanya di 11 provinsi). Statistik terakhir kasus HIV/AIDS di Indonesia dilaporkan pada bulan Juni 2013 oleh Ditjen PP & PL Kemenkes RI. Dalam triwulan Januari sampai Juni 2013 terdapat tambahan HIV positif 10.210 dan 780 AIDS sehingga secara bertumpuk mulai dari 1 April 1987–30 Juni 2013 terdapat 108.600 kasus HIV positif, 43.667 AIDS dan 8340 kematian. Angka ini kemungkinan lebih besar, karena banyak pengidap HIV/AIDS yang tidak melaporkan diri.

Provinsi dengan jumlah tumpukan kasus HIV/AIDS tertinggi di Indonesia sampai 30 Juni 2013 adalah di DKI Jakarta (24.807 HIV, 6.299 AIDS), diikuti oleh Jawa Timur (14.285 HIV, 6.900 AIDS) dan Papua (11.871 HIV, 7.795 AIDS). Sumatera Barat merupakan provinsi dengan kasus HIV/AIDS terbanyak ke-11 dari 33 provinsi di Indonesia yaitu 777 HIV positif dan 802 AIDS.

Peningkatan kasus HIV/AIDS antara lain disebabkan oleh uji penapisan yang tersedia belum dapat mendiagnosis infeksi HIV secara dini. Penelitian yang ada menunjukkan terdapat kecenderungan ragaman molekul (keragaman genetik) HIV yang berkaitan dengan rekombinasi dan perpindahan (penghapusan atau penyisipan). Rekombinasi menghasilkan galur virus baru penyebab infeksi yang berpengaruh terhadap penetapan diagnosis, resistensi terhadap pengobatan dan pengembangan vaksin. Sekitar 20% isolat yang ditemukan di seluruh dunia merupakan bentuk rekombinasi antar subkelompok/intersubtipe. Rekombinasi ini dikelompokkan menurut *Circulating recombinant form* (CRF) dan *Unique recombinant form* (URF). Sampai saat ini terdapat sekitar 40 CRF dan 100 URF. Berbagai ragaman berdasarkan molekul/ragaman genetik tersebut menyebabkan *pitfalls* deteksi HIV secara serologis (deteksi antigen dan antibodi spesifik terhadap protein virus maupun molekul).

Analisis terkait molekul memperlihatkan sekuen HIV memiliki genom dengan ukuran 9500–9700 bp yang terdiri dari 1500 bp gag, 3000 bp pol dan 2500 env. Gag, pol, dan env merupakan gen struktural dengan tata urutan 5'LTR gag – pol – env LTR 3'. Ketiganya merupakan protein fusi yang dipecah menggunakan protease. Gag dan env menyandi nukleokapsid dan glikoprotein membran virus, sedangkan pol menyandi protein *reverse transcriptase* dan *integrate*. Virus juga mempunyai tujuh (7) gen

pengatur, yaitu *tat*, *rev*, *tev*, *vpu*, *vpr*, *vif* dan *nef* dengan ukuran genom berkisar antara 250 – 750 bp.

Analisis gen *env* galur HIV dari berbagai region geografis menunjukkan bahwa HIV terdiri atas tiga (3) kelompok utama, yaitu M (*main*), O (*outlier*) dan N (*non-M/non-O*). Kelompok M merupakan gugus HIV terbanyak (>90% infeksi di dunia disebabkan oleh kelompok M). HIV-1 kelompok M terdiri atas 10 subtipen (A, B, C, D, E, F, G, H, I dan J) serta bentuk rekombinan CRF seperti AE, AG, AB, DF, BC, CD dan URF. Di samping itu terdapat subtipen A (A1, A2) dan sub-subtipen F (F1, F2). Kelompok O dan N secara genetik berbeda dengan yang M, terutama yang ditemukan di Afrika Barat. Kelompok O terdiri atas tiga (3) *clades* utama yaitu A, B dan C.

Tingkat keragaman genetik yang tinggi di region imunodominan HIV-1 terutama kelompok M dan O menimbulkan kesulitan dalam merancang pengujian yang dapat mendeteksi seluruh galur HIV-1. Beberapa temuan dilaporkan, bahwa antibodi terhadap beberapa ragaman HIV-1 kelompok O tidak dapat dideteksi oleh seluruh metode diagnostik komersial. Penelitian yang dilakukan oleh Koch terhadap tiga sampel HIV-1 kelompok M dan 2 sampel HIV-1 kelompok O menunjukkan reaktivitas antibodi yang rendah (S/CO <1) dengan satu atau lebih EIA dengan surat izin FDA. Setelah dianalisis sekuen kelima sampel terhadap region imunodominan gp41 ditemukan pengganti asam amino di *cluster I* (AA 581-615) dan *II* (AA 646-682) untuk ketiga kelompok M dan pengganti beberapa asam amino untuk kelompok O. Penelitian yang dilakukan oleh Simon berhasil mengidentifikasi galur baru HIV-1 yang berbeda dengan HIV-1 kelompok M dan O, yaitu YBF 30. EIA yang menggunakan antibodi untuk mendeteksi bahwa kelompok yang pertama (HIV-1 kelompok M) gagal untuk mendeteksi galur baru tersebut. Amplifikasi proviral DNA YBF 30 juga tidak dapat dilakukan menggunakan set primer dari gen *env*, *gag*, *pol* HIV-1 kelompok M dan primer *gag/env* HIV-1 kelompok O. Oleh karena itu diperlukan pengembangan metode diagnostik yang terus-menerus guna mendeteksi kemunculan ragaman baru HIV.

Hingga saat ini secara umum terdapat dua cara untuk mendiagnosis HIV, yaitu seroimunologis dan molekul. Pemeriksaan kultur virus pada dasarnya dianggap sebagai baku emas untuk pendiagnosisan pasti HIV. Namun, tidak digunakan karena memerlukan prasarana khusus, yaitu *Biosafety Level 3* (BSL3) dan memerlukan waktu lama.

Pemeriksaan seroimunologis HIV ditujukan untuk penapisan dan pemastian. Uji penapisan dapat dilakukan dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan imunokromatografi (uji cepat). Kedua cara ini dapat mendeteksi: antigen,

antibodi, atau gabungan keduanya. Saat ini telah dikembangkan cara mendiagnosis seroimunologis yang menggabungkan deteksi antibodi dan antigen (reagensia generasi keempat). Protein yang digunakan adalah p24 yang berasal dari gag (untuk mendeteksi antigen p24) dan envelope virus (untuk mendeteksi anti-HIV). Reagensia generasi keempat ini dapat memperkecil *window period* menjadi sekitar dua (2) minggu setelah infeksi. Namun, penggabungan ini menyebabkan penurunan kepekaan untuk mendeteksi antibodi dan menimbulkan lebih banyak hasil positif palsu. Umumnya metode berlandaskan antigen-antibodi digunakan sebagai uji penapisan, sehingga diperlukan kepekaan tinggi. Imunokromatografi merupakan metode imunoasai yang dapat mendeteksi antigen, antibodi dan gabungan keduanya dalam waktu yang relatif singkat. *World health organization* menyarankan penggunaan tiga uji cepat untuk penapisan HIV. Ketiga uji cepat tersebut masing-masing memiliki cara memeriksa atau persiapan antigen yang berbeda. Uji penapisan memerlukan pemeriksaan keabsahan dengan *western blotting* atau imunofluoresens.

Pemeriksaan *western blotting* dirancang terhadap 10 protein yang dibagi atas tiga (3) kelompok, yaitu env (gp41, gp120 dan gp160), gag (p18, p24/25 dan p55) serta pol (p34, p40, p52 dan p68). Pemeriksaan ini bernilai diagnostik baik karena dapat mendeteksi hampir semua virus protein. Namun demikian, pemeriksaan ini mempunyai kelemahan karena memerlukan keahlian khusus, peralatan lengkap dan ketelitian yang tinggi.

Pemeriksaan molekul menggunakan proviral DNA atau RNA sebagai target. Pemeriksaan proviral DNA dinilai sangat baik dalam penilaian pengobatan, karena dalam kondisi ini virus tidak dapat dihilangkan oleh ART. Pemeriksaan RNA virus dapat bersifat kualitatif atau kuantitatif dan dilakukan dengan berbagai metode, seperti *Real time PCR*, *Reverse transcription PCR* (RT-PCR), *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA). Pemeriksaan virus RNA umumnya ditujukan untuk mendiagnosis secara dini, menilai kemajuan penyakit dan menilai pengobatan. Namun, pemeriksaan ini biayanya mahal dan belum tersedia di semua pusat layanan kesehatan.

Semua cara memeriksa tersebut dapat memberikan reaksi negatif palsu. Hal tersebut terkait dengan perbedaan HIV itu sendiri. Keberadaan 40 CRF dan 100 URF menyebabkan tidak semua metode diagnostik dapat digunakan di daerah tertentu. Salah satu upaya terbaik dalam mendiagnosis HIV adalah mengetahui ciri genom HIV dan mengembangkan metode mendiagnosis sendiri berlandaskan pola sekuen dari isolat lokal tersebut. Penelitian yang berbasis molekuler membutuhkan analisis sekuen terlebih

dahulu sehingga dapat dirancang primer yang benar-benar khusus.

Berdasarkan stabilitas sekuen yang ditemukan pada penelitian tahun pertama (1), maka dalam kesempatan ini dirancang pengkajian untuk hasilan protein rekombinan p24. Protein ini selanjutnya akan dikembangkan sebagai petanda diagnostik berlandaskan seroimunologis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bentuk konstruksi dan overekspresi protein p24gag serta analisis kekuatan diagnostik dengan merancang primer spesifik protein p24gag. Di samping itu juga untuk mengetahui kloning dan overeksresi gen, serta mendapatkan protein p24 yang telah termurnikan. Penelitian ini merupakan pengkajian terapan untuk mengembangkan metode mendiagnosis HIV yang berlandaskan isolat lokal.

METODE

Penelitian ini bersifat deskriptif, dilaksanakan selama tujuh (7) bulan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dan Laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. M. Djamil Padang. Penelitian ini menggunakan sampel isolat lokal yang berasal dari penelitian tahun pertama.

Rancangan primer untuk metode *gateway* merupakan yang sangat penting dalam mendapatkan hasil mengkloning yang terbaik.

Forward Primer

Untuk mendapatkan primer *forward* yang baik diperlukan komponen berikut, yaitu:

4 residu *Guanin* (G) di ujung 5'

25 bp attB1 yang diikuti oleh 18 – 24 bp *template/gen specific sequences*.

Reverse

Hampir sama dengan *forward*, rancangan primer *reverse* juga harus mempunyai tiga (3) komponen, yaitu:

4 residu *Guanin* (G) di ujung 5'

25 bp attB2

18–25 bp sekuen primer gen target

Kloning dan transformasi menggunakan metode *gateway*. Tatalangkah ini memakai dua plasmid, yaitu pDON221 dan pDEST17. Plasmid pDON221 mengandung attP1 dan attP2 yang berikatan dengan attB1 dan attB2 yang terletak di kedua ujung gen target.

Mekanisme rekombinasi diperantarai oleh aktivitas enzim BP klonase. Pada tahap lebih lanjut attL1 dan attL2 berinteraksi dengan attR1 dan attR2

yang terdapat di pDEST17 dan menghasilkan klon eksresi yang mengandung attB1 dan attB2. Reaksi ini diperantara oleh enzim LR *Klonase*.

Kloning dan transformasi menggunakan metode satu tabung. Dalam cara ini reaksi klonase BP dan LR dilakukan secara berkesinambungan dalam satu tabung. Tahapan diawali dengan reaksi enzim klonasi BP yaitu 1 uL DNA hasil elusi ditambahkan dengan 1 uL pDON221, 6 uL bufer TE dan 2 uL klonase BP. Selanjutnya diinkubasi selama dua (2) jam pada suhu 25°C. Setelah inkubasi ditambahkan 1 uL enzim proteinase K dan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 15 menit. Hasil rekombinasi sebanyak 1 uL ditambahkan dengan 1 uL pDEST17, bufer dan klonase LR, kemudian diinkubasi selama dua (2) jam pada suhu 25°C. Setelah inkubasi ditambahkan 1 uL enzim proteinase K dan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 15 menit.

Tatalangkah transformasi dilakukan dengan metode *heat shock*. Pada saat pemanasan pori sel yang tangguh akan terbuka dan memungkinkan plasmid masuk. Saat pendinginan, sel menutup sehingga plasmid tersimpan di dalamnya. Untuk mempercepat pertumbuhan sel yang tangguh ditambahkan media SOC. Hasil transformasi dikultur di media *Luria Bertoni* (LB) yang padat.

Sebanyak 10 uL hasil rekombinasi ditransformasikan di *E.coli* DH5 alfa dan dikultur di media padat LB. Untuk memperbanyak koloni bakteri, dilakukan subkultur ke media LB cair dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Pada penelitian ini dilakukan subkultur ke dalam 10 tabung LB cair yang mengandung Ampisilin 50 ug/uL.

Plasmid isolasi menggunakan perangkat *Plasmid midiprep* (*Geneaid*). Hasil isolasi diamplifikasi menggunakan primer M13. Hasil PCR dianalisis menggunakan enzim agarose gel 0,8%. Penggunaan primer M13 menyebabkan ukuran fragmen bertambah sekitar 2500 bp.

Untuk ekspresi digunakan sel tangguh *E.coli* BL-21 (A1) yang sangat cocok dengan promotor T7. Pada ekspresi ditambahkan glukosa 1% untuk menekan ekspresi Basal T7 enzim polimerase RNA.

Eksresi protein dilakukan dengan menambahkan 500 uL LB cair yang telah berisi sel tangguh yang mengandung pDEST17 dengan gen target dalam 25 mL LB cair yang mengandung 50 ug/mL ampisilin dan 1% glukosa. Inkubasi selama dua (2) jam dalam *shaker* inkubator pada suhu 37°C. Identifikasi *Optical Density* (OD) dalam kisaran 0,4–0,6 menggunakan spektrofotometer setiap jam.

Optical Density (OD) 0,4–0,6 merupakan tahap *mid log* pertumbuhan *E.coli*, yaitu terdapat pertumbuhan terbaik bakteri. Pada penelitian ini tahap *mid log* ditemukan pada jam ke-4, yaitu 0,53. Sebanyak 25

mL cairan ditambahkan 125 uL IPTG 1 mM untuk mengimbas eksresi. Kemudian protein setiap jam dikumpulkan.

Pada setiap tahapan 5 mL suspensi bakteri kemudian dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C. Pelet bakteri diresuspensi dalam 1 mL PBS kemudian ditambahkan PBS sampai 10 mL, dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C. Kemudian dicuci sekali lagi (seperti langkah sebelumnya). Pelet dilarutkan dalam PBS 2,5 mL dan disonikasi 4 x 30 detik (dalam kondisi masuk es). Kemudian dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, pada suhu 4°C.

Protein rekombinan dianalisis menggunakan elektroforesis SDS-PAGE dan pengecatan *Comassie Blue*.

Data yang terkumpul akan disajikan secara deskriptif dalam bentuk gambar dan paparan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini tidak dilakukan amplifikasi gen target. Namun, primer dirancang sesuai dengan gagasan *gateway* dengan penambahan fragmen *Shine Delgano* dan *Kozac*. Penambahan komponen tersebut penting dilakukan karena p24gag HIV tidak mempunyai *start* kodon.

Rancangan primer *forward* dan *reverse* masing-masing adalah:

FGGGGACAGTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAG
GAGATAGAACCATGG
RGGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGTCCTA

Bagian yang dicetak tebal adalah attb1 dan attb2, sedangkan garis bawah di *forward* adalah fragmen *Shine delgano* dan *Kozac* yang mengandung *start* kodon. Di bagian *reverse* ditambahkan *stop* kodon di bagian ujungnya.

Sekuens p24gag yang digunakan pada penelitian ini dipilih berdasarkan hasil mensejajarkan kajian tahun pertama. Sekuens target adalah:

```
1 tatagtgcag aatgcacaag ggcaaatgg acaccagtcc
ttatcaccta ggacttggaa
61 tgcatggta aaagtaatag aagaaaaggc tttcagccca
gaagtaatac ccatgtttc
121agcattatca gaaggagcca cccacaaga tttaaatatg
atgtgaata tagtgggggg
181acaccaagca getatgc当地 tttaaaaga taccatcaat
gaggaagctg cagaatggg
241caggatacat ccagtacatg cagggcttat tccaccaggc
cagatgagag aaccaagggg
301aagtgcata gcaggaacta ctgttaccc tcaagagcaa
ataggatgga tgacaagcaa
```

361tccacctgct ccgggtggag aaatctatag aagatggata
 atcctaggat taaataagat
 421agtaagaatg tatagccctg ttagcatttt ggacataaga
 caagggccaa aagaaccctt
 481cagagactat gtatagatgt tctttaaatg tctcagagct
 gaacaagctt cacaggaagt
 541aaaaaaatgg atgacagaaa ccttgctggt ccaaaatgcg
 aatccagact gtaagtcat
 601tttaaaagca ttaggaatag gggctactat tagaagaaat
 gatgacageca tgccaggagg
 661tgggaggacc cggccat

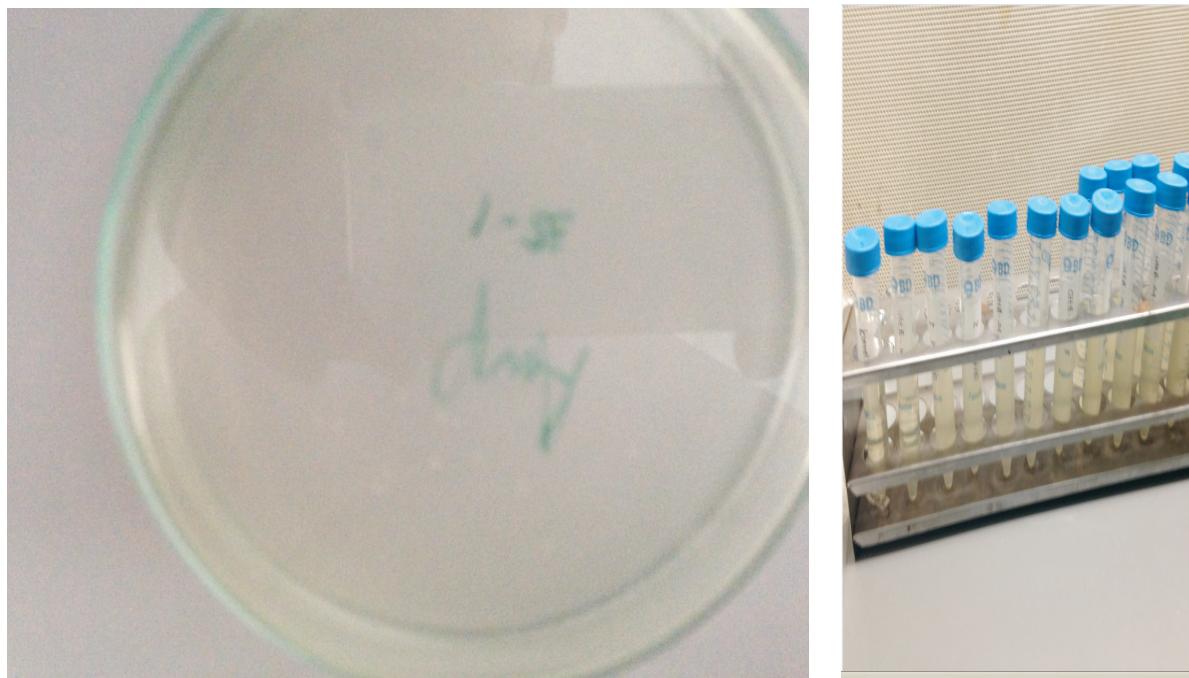
Pada tahap awal, oligonukleotida buatan disisipkan ke plasmid pDON221. Tahapan diawali dengan reaksi klonasi BP yaitu 1 uL DNA hasil elusi ditambahkan dengan 1 uL pDON221, 6 uL bufer TE dan 2 uL pasca klonase BP, lebih lanjut diinkubasi selama 12 jam pada suhu 25°C. Setelah inkubasi ditambahkan 1 uL proteinase K dan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 15 menit.

Sebanyak 1 uL hasil klonase BP dimasukkan ke dalam botol obat yang berisi 50 uL *E.coli* DH5 α . Transformasi ini menggunakan metode *heat shock*, dengan aturan 30 menit dalam es, 30 detik dalam *waterbath* bersuhu 42°C dan 2 menit dalam es lagi. Kemudian ditambahkan 250 uL SOC dan diinkubasi dengan *shaker* inkubator berputaran 150 rpm semalam (Gambar 1).

Pada tahapan ini dilakukan kloning ke plasmid pDEST17 menggunakan klonase LR. 1 uL plasmid DNA hasil elusi ditambahkan dengan 1 uL pDEST17, 6 uL buffer TE dan 2 uLLR klonase. Diinkubasi selama 12 jam pada suhu 25°C. Setelah inkubasi ditambahkan 1 uL Proteinase K dan diinkubasi lagi pada 37°C selama 15 menit. Hasil selanjutnya ditransformasi ke *E.coli* BL21A1 untuk kepentingan ekspresi. Transformasi dilakukan dengan penambahan glukosa 1% untuk menekan ekspresi Basal T7 RNA polimerase.

Deteksi fragmen sisipan di dalam plasmid pDEST17 dilakukan menggunakan teknik PCR. Komponen campuran terdiri dari pfx polimerase, primer M13-F dan M13-R, dNTP, bufer dan air DEPC. Tatalangkah terdiri dari dua tahapan, yaitu lisis sel dan amplifikasi gen target.

Lisis sel dilakukan menggunakan naik turunnya suhu, yaitu 96°C selama 5 menit, 50°C selama 1 menit 30 detik, 96°C selama 1 menit 30 detik, 45°C selama 1 menit 30 detik, 96°C selama 1 menit dan 40°C selama 1 menit. Program dihentikan untuk memasukkan campuran induk dan dilanjutkan dengan amplifikasi gen target. Tahapan PCR lanjutan terdiri dari denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 60°C selama 1 menit dan ekstensi 68°C selama 1 menit. Hasil PCR dielektroforesis untuk deteksi gen target.



Gambar 1. Pertumbuhan *E.coli* DH5 α dalam LB padat dan cair. Di LB cair kekeruhan terlihat di tabung ketiga



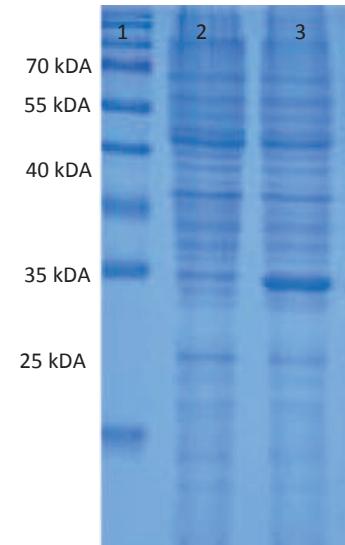
Gambar 2. Pertumbuhan bakteri *E.coli* BL21A1 dalam LB cair

Ekspresi protein dilakukan dengan menambahkan 500 μ L LB cair yang telah berisi sel tangguh yang mengandung pDES17 dengan gen yang menyandi protein PE-PGRS dalam 25 mL LB cair yang mengandung 50 μ g/mL ampisilin dan 1% glukosa (Gambar 2). Inkubasi dilakukan selama 3 jam dalam shaker inkubator pada suhu 37°C. Identifikasi OD dalam kisaran 0,4–0,6. Optical Density 0,4–0,6 merupakan tahap mid log pertumbuhan *E.coli* tempat pertumbuhan terbaik bakteri. Pada penelitian ini tahap mid log ditemukan pada jam ke-3, yaitu 0,45.

Sebanyak 25 mL cairan ditambahkan 125 μ L IPTG 1 mM untuk mengimbas ekspresi. Pengumpulan protein dilakukan setiap jam. Pada penelitian ini pengamatan dilakukan pada jam ke-2, 4 dan 6. Pada setiap tahapan 5 mL suspensi bakteri kemudian dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C. Pelet bakteri diresuspensi dalam 1 mL PBS kemudian ditambahkam PBS sampai 10 mL. Dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C. Dicuci sekali lagi (seperti langkah sebelumnya). Pelet dilisis dan dimurnikan menggunakan perangkat Magne His protein purification (Promega).

Protein rekombinan dianalisis menggunakan elektroforesis SDS-PAGE menggunakan pengecatan Comassie Blue. Komposisi gel tersebut penting, karena pola perpindahan protein akan berbeda di komposisi gel tidak sama dengan yang dilakukan oleh peneliti ini. Pada penelitian yang dilakukan ini gel poliakrilamid dibuat dengan komposisi sebagai berikut: Jarak tempuh molekul yang berpindah dalam gel bergantung ukuran pori dan ukuran molekul protein itu sendiri. Logaritmik mobilitas relatif protein tertentu berkurang secara linear jika jumlah keseluruhan kepekatan gel meningkat. Perpindahan makromolekul melalui membran banyak dipengaruhi oleh struktur akrilamid itu sendiri yang berpengaruh terhadap ukuran pori tempat molekul berpindah.

Komponen gel terdiri dari matriks polimer acrylamid, *N,N'-methylene-bis(acrylamide)*, tetramethylenediamine (TEMED) dan ammonium persulfat (amonium persulfat yang dilarutkan dalam air untuk membentuk radikal bebas (Tabel 1).



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE, terlihat protein PE=PGRS 45. Ladder dari Page Ruler Prestained protein ladder (Thermo). 1 = ladder; 2 = jam ke-2;3 = jam 6

Tabel 1. Komposisi pembuatan gel poliakrilamid

Komposisi	Pemecahan gel (12%)	Timbunan gel (3%)
Bis-acrylamid (g)	0,032	0,024
Acrylamide (g)	1,2	0,9
1,5M Tris, pH 8,8 (mL)	3	-
1,5M Tris, pH 6,8 (μ L)	-	2,52
10 % SDS (μ L)	0,12	0,3
dH ₂ O (mL)	8,88	17,18
TEMED (μ L)	8	2,5
Volume jumlah keseluruhan (mL)	\pm 20	\pm 21

Amonium persulfat bersentuhan dengan *acrylamid* dalam bentuk radikal bebas sehingga *acrylamid* menjadi reaktif dan dapat bereaksi dengan *acrylamid* lain membentuk rantai polimer. Untuk membentuk gel maka *acrylamid* harus membentuk hubungan silang dengan *N,N'-methylene-bis (acrylamide)*. TEMED atau *b-(dimethylamino) propionitrile* dan dapat ditambahkan sebanyak 0,4% sebagai katalisator pembentukan gel karena berkemampuan untuk membentuk radikal bebas. Ukuran pori gel ditentukan dengan dua (2) tolok ukur yaitu (1) jumlah *acrylamid* yang digunakan dan (2) derajat pembentukan ikatan silang. Rerata ukuran pori dapat diperoleh jika 5% jumlah keseluruhan *acrylamid* yang digunakan adalah *N,N'-methylene-bis(acrylamide)*. Ukuran pori yang digunakan dapat direkayasa melalui perkiraan perbandingan *acrylamid*.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian ini dapat diambil kesimpulan sementara sebagai berikut: Rancangan primer spesifik terhadap protein p24gag menggunakan fragmen attb1, attb2, *Shine Delgano* dan *Kozac* yang tepat guna untuk kepentingan ekspresi; Hasil ekspresi memperlihatkan keberadaan protein 24kDa yang identik dengan protein p24gag HIV

Para peneliti berpendapat perlu dilanjutkan kajian ini untuk identifikasi kekuatan imunologik protein target.

DAFTAR PUSTAKA

- Barroso H, Borrego P, Bartolo I, Marcelino JM, Familia C, Quintas A, et al. Evolutionary and Structural Features of the C2, V3 and C3 Envelope Regions Underlying the Differences in HIV-1 and HIV-2 Biology and Infection. *PLoS One*. 2011; 6(1): e14548.
- Cho YK, Jung YS and Foley BT. Phylogenetic Analysis of Full-Length pol Gene from Korean Hemophiliacs and Plasma Donors Infected with Korean Subclade B of HIV Type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27(6): 613 – 21.
- Ditjen PP & PL Kemenkes RI. Statistik Kasus HIV/AIDS di Indonesia. Jakarta, Kemenkes. 2014; 1 – 3.
- Geyer M and Peterlin BM. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS letters*. 2001; 496: 91 – 95.
- Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Victoriano AF, Takahashi N, Irie S, et al. A Single-Nucleotide Synonymous Mutation in the gag Gene Controlling Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion Production. *J Virol*. 2007; 81(3): 1528–33.
- Hu WS and Temin HM. Retroviral Recombination and Reverse Transcription. *Science*. 1990; 250(4985): 1227 - 33.
- Koch WH, Sullivan PS, Roberts C, Francis K, Downing R, Mastro TD, et al. Evaluation of United States-Licensed HIV Immunoassay for Detection of Group M Viral Variants. *JCM*. 2001; 39(3): 1017-20.
- Kraus MH, Parrish NF, Shaw KS, Decker JM, Keele BF, Salazar-Gonzalez JF, et al. A rev1-vpu polymorphism unique to HIV-1 subtype A and C strains impairs envelope glycoprotein expression from rev-vpu-env cassettes and reduces virion infectivity in pseudotyping assays. *Virology*. 2010; 397(2): 346 – 57.
- Moore JP, Willey RL, Lewis GK, Robinson J and Sodroski J. Immunological Evidence for Interactions between the First, Second, and Fifth Conserved Domains of the gpl20 Surface Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol*. 1994; 68(11): 6836-47.
- Qi M and Aiken C. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology*. 2008; 373(2): 287–97.
- Ono A, Orenstein JM and Freed EO. Role of the Gag Matrix Domain in Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J Virol*. 2000; 74(6): 2855–66.
- Simon F, Roques P, Loussert-Ajaka I, Barre-Sinoussi F, Saragosti S, et al. Identification of a new HIV-1 Distinct from Group M and Group O. *Nat Med*. 1998; 4(9): 1032-7.
- Su L, Graf M, Zhang Y, Von Briesen H, Xing H, Kostler J, et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol*. 2000; 74(23): 11367-76.
- Xin R, He X, Xing H, Sun F, Ni M, Zhang Y, et al. Genetic and temporal dynamics of human immunodeficiency virus type 1 CRF07_BC in Xinjiang, China. *J GenVirol*. 2009; 90(Pt 7): 1757–61.
- Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*. 2010; 7(25): 1-15.
- Zhu T, Corey L, Hwangbo Y, Lee JM, Learn GH, Mullins JI and McElrath MJ. Persistence of Extraordinarily Low Levels of Genetically Homogeneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Exposed Seronegative Individuals. *J Virol*. 2003; 77(11): 6108–16.