

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR  
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**



16

**IDENTIFIKASI MUTASI TERKAIT *DRUG RESISTANCE* PADA  
GEN PROTEASE DAN REVERSE TRANSCRIPTASE HIV-1 PADA  
PASIEN *TREATMENT NAÏVE* DAN *TREATED* DENGAN  
BERBAGAI MANIFESTASI KLINIS DI  
KABUPATEN BULELENG, BALI**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Prof. SOETJIPTO, dr., M.S., Ph.D**

**Prof. Dr. NASRONUDIN, dr., Sp.PD-KPTI, FINASIM**

**NI LUH AYU MEGASARI, S.Gz., M.Ked.Trop**

**0017025004**

**0003115608**

**011617017347**

**DIBIYAI OLEH:**

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN  
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR  
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**



**IDENTIFIKASI MUTASI TERKAIT *DRUG RESISTANCE* PADA  
GEN PROTEASE DAN REVERSE TRANSCRIPTASE HIV-1 PADA  
PASIEN *TREATMENT NAÏVE* DAN *TREATED* DENGAN  
BERBAGAI MANIFESTASI KLINIS DI  
KABUPATEN BULELENG, BALI**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Prof. SOETJIPTO, dr., M.S., Ph.D**

**Prof. Dr. NASRONUDIN, dr., Sp.PD-KPTI, FINASIM**

**NI LUH AYU MEGASARI, S.Gz., M.Ked.Trop**

**0017025004**

**0003115608**

**011617017347**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN  
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

Judul : Identifikasi mutasi terkait drug resistance pada Gen Protease dan Reverse Transcriptase HIV-1 pada pasien treatment naïve dan treated dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0017025004  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Ilmu Kedokteran  
Nomor HP : 08165416908  
Alamat surel (e-mail) : soetjiptojtbr@sby.centrin.net.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD-KPTI, FINASIM  
NIDN : 0003115608  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : Ni Luh Ayu Megasari, S.Gz  
NIDN :  
Perguruan Tinggi :

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 170,500,000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran



(Prof. Dr. dr. Sbetoyo, Sp. U (K))  
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018  
Ketua,

(Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D)  
NIP/NIK 195002171978031002

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M. Si.Ph.D)  
NIP/NIK 196705071991021001



## RINGKASAN

**NI LUH AYU MEGASARI. Identifikasi Mutasi Terkait *Drug Resistance* Pada Gen Protease Dan Reverse Transcriptase HIV-1 pada Pasien *Treatment Naïve* dan *Treated* dengan Berbagai Manifestasi Klinis di Kabupaten Buleleng, Bali**

Human Immunodeficiency Virus (HIV) merupakan penyebab dari *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS). Sejak tahun 1987 hingga 2014, jumlah kumulatif kasus infeksi HIV di Indonesia mencapai 150.296 orang. Bali merupakan provinsi dengan jumlah kumulatif kasus HIV terbanyak kelima di Indonesia, yang mana pada tahun 2014, jumlah kumulatif kasus HIV di Bali mencapai 9.637 kasus (Pusdatin Kemenkes RI, 2014). Buleleng merupakan kabupaten dengan jumlah kasus HIV terbanyak kedua di Provinsi Bali. Pada tahun 2012, jumlah kasus HIV di Kabupaten Buleleng mencapai 211 kasus, yang mana 74 diantaranya adalah kasus AIDS (Dinas Kesehatan Provinsi Bali, 2014).

HIV-1 Grup M merupakan penyebab pandemi HIV di dunia (Korber *et al.*, 2001). Grup M dibagi ke dalam sembilan *subtype*, dari A hingga K, dan tambahan subtype berupa *circulating recombinant forms* (CRF) dan *unique recombinant forms* (URF) (Rajarapu, 2014; Widiyanti *et al.*, 2014). Subtipe berhubungan dengan tingkat transmisi seksual dan transmisi vertikal, serta progresi infeksi menjadi AIDS, sehingga dapat berimplikasi pada manajemen infeksi (Renjifo *et al.*, 2004, John-Stewart *et al.*, 2005; dan Kiwanuka *et al.*, 2008).

Salah satu terapi yang diberikan bagi pasien HIV-1 adalah pengobatan dengan *antiretroviral* (ARV). Terapi ARV yang saat ini diterapkan secara luas adalah penggunaan gabungan beberapa jenis obat dengan target kerja berupa enzim *protease* (PR) dan *reverse transcriptase* (RT) dan pada HIV-1 (Kemenkes RI, 2012; Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014). Meskipun lebih efektif dibandingkan dengan terapi tunggal, penggunaan ARV kombinasi berdampak pada munculnya strain HIV-1 yang resisten (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Identifikasi subtipe dan resistensi dari HIV-1 akan dapat berkontribusi pada manajemen terapi HIV-1 pada pasien. Salah satu upaya untuk mengidentifikasi subtipe dan resistensi adalah dengan melakukan *genotyping*, utamanya pada gen pengkode enzim PR dan RT yang menjadi target ARV (Moore *et al.*, 2001; Van den Eede *et al.*, 2013).

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah yang diekstraksi dari darah (*whole blood*) pasien HIV-positif, baik *treatment naïve* maupun *treated* manifestasi klinis berbeda-beda, yang berkunjung ke RSUD Kabupaten Buleleng, Bali. Dari sampel plasma tersebut akan dilakukan ekstraksi RNA yang akan digunakan untuk *genotyping* dalam beberapa tahapan, meliputi amplifikasi asam nukleat dengan menggunakan *nested PCR* (kombinasi RT-PCR dan PCR) dan sekuensing. Hasil sekuensing gen PR dan RT kemudian dibandingkan dengan *database* HIV Standford, sehingga dapat diketahui subtipe dari HIV-1 dan dapat dilakukan identifikasi mutasi terkait *drug resistance*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat.

## PRAKATA

Puji sukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas segala bimbingannya penulis dapat menyelesaikan laporan kemajuan untuk penelitian dengan judul “Identifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada Gen Protease dan Reverse Transcriptase HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali”.

Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan melalui skema beasiswa PMDSU dan memberikan pendanaan untuk penelitian ini;
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE; Mt., Ak., CMA selaku Rektor Universitas Airlangga;
3. Prof. H. Hery Purnobasuki, M. Si.Ph.D selaku Ketua LPI Universitas Airlangga;
4. Prof. Dr. dr. Soetojo, Sp. U (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga;
5. Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR. KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor;
6. Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D selaku ketua peneliti dan promotor;
7. Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD-KPTI, FINASIM selaku ko-promotor;
8. Seluruh *staff* Rumah Sakit Umum Daerah Kabupaten Buleleng yang telah membantu selama proses pengumpulan sampel;
9. Seluruh *staff Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga yang membantu proses penelitian;
10. Semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun selama berlangsungnya penelitian ini. Semoga nantinya penelitian ini dapat memberikan manfaat dan kebaikan bagi banyak pihak demi kebaikan bersama serta bernilai ibadah di hadapan Tuhan Yang Maha Esa.

Surabaya, 09 November 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Permasalahan.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
<i>Human Immuno-deficiency Virus – 1 (HIV-1)</i> .....	5
1. Klasifikasi dan Epidemiologi HIV-1.....	5
2. Morfologi dan Organisasi Genom HIV-1.....	6
3. Perjalanan alamiah infeksi HIV-1.....	7
4. Manifestasi Klinis Infeksi HIV-1.....	9
Terapi Infeksi HIV-1 dengan Menggunakan Obat-obatan Antiretroviral (ARV).....	10
1. ARV dan Indikasi Pemberian ARV.....	10
2. Resistensi ARV.....	13
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
Tujuan .....	18
Tujuan umum.....	18
Tujuan khusus.....	18
Manfaat.....	18
Manfaat teoritis.....	18
Manfaat praktis.....	19
BAB 4. METODE PENELITIAN	
Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
Bahan Penelitian.....	20
Alat Penelitian.....	21
Prosedur Penelitian.....	21
Tahap Persiapan Penelitian.....	21
Tahap Pelaksanaan Penelitian.....	22
Variabel Penelitian.....	24
Tahapan Penelitian.....	24
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	
Pengumpulan sampel dari pasien <i>treatment</i> dan <i>treated</i> .....	26
Genotyping sampel.....	27
Subtipe HIV-1 berdasarkan sekuens gen <i>protease</i> dan <i>reverse transcriptase</i> .....	28

<i>Analisa mutasi terkait drug resistance berdasarkan sekuens gen protease dan reverse transcriptase pada pasien treatment naïve dan treated</i> .....	30
Hubungan antara subtype HIV-1, manifestasi klinis, dan mutasi terkait <i>drug resistance</i> .....	32
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
Kesimpulan.....	33
Saran.....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	35

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Distribusi sub tipe dan <i>recombinant form</i> HIV-1 secara global.....	5
Gambar 2	Kondisi-kondisi imunologis dan virologis pada perjalanan alamiah infeksi HIV-1.....	8
Gambar 3	Skema siklus replikasi HIV-1 dan target-target kerja <i>antiretroviral</i> (ARV) pada siklus replikasi.....	11
Gambar 4	Diagram skematis yang menggambarkan distribusi mutasi terkait <i>drug resistance</i> pada gen PR dan RT HIV-1.....	15
Gambar 5	Mutasi pada gen RT yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan NNRTI.....	15
Gambar 6	Mutasi pada gen RT yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan NRTI.....	16
Gambar 7	Mutasi pada gen PR yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan inhibitor <i>protease</i> .....	16
Gambar 8	Kerangka Konseptual Penelitian.....	17
Gambar 9	Alur Penelitian.....	25
Gambar 10	Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien <i>treated</i> (n=59).....	28
Gambar 11	Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien <i>treatment naive</i> (n=33).....	29
Gambar 12	Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien <i>treatment naive</i> dan <i>treated</i> (n=89).....	29



## DAFTAR TABEL

Tabel 1	Stadium Klinis Infeksi HIV.....	9
Tabel 2	Kombinasi terapi lini pertama yang dianjurkan.....	13
Tabel 3	Primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen PR pada HIV-1.....	21
Tabel 4	Primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen RT pada HIV-1.....	21
Tabel 5	Karakteristik pasien <i>treatment naive</i> .....	26
Tabel 6	Karakteristik pasien <i>treated</i> .....	27
Tabel 7	Mutasi terkait <i>drug resistance</i> pada gen <i>reverse transcriptase</i> pasien <i>treated</i> .....	30
Tabel 8	Mutasi terkait <i>drug resistance</i> pada gen <i>protease</i> pasien <i>treated</i> ...	31
Tabel 9	Mutasi terkait <i>drug resistance</i> pada gen <i>reverse transcriptase</i> pasien <i>treatment naive</i> .....	31
Tabel 10	Mutasi terkait <i>drug resistance</i> pada gen <i>protease</i> pasien <i>treatment naive</i> .....	32

BAB 1  
PENDAHULUAN**Latar Belakang**

*Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan penyebab dari *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) (Widiyanti *et al*, 2014). HIV memiliki target utama berupa sel limfosit T CD4, yang berperan penting dalam regulasi sistem imun. Pengrusakan oleh HIV menyebabkan penurunan jumlah sel limfosit T CD4 secara gradual dan progresif, sehingga sistem imun menjadi tidak kompeten dan rentan terhadap berbagai infeksi (WHO, 2007).

Jumlah individu yang terinfeksi HIV cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2005, terdapat 31,8 juta individu yang terinfeksi HIV secara global. Jumlah tersebut meningkat menjadi 33,3 juta pada tahun 2010 dan 36,7 juta pada tahun 2015 (UNAIDS, 2016). Data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa hingga tahun 2014, jumlah kumulatif penderita HIV sejak tahun 1987 mencapai 150.296 orang, sedangkan total kumulatif kasus AIDS adalah sebanyak 55.799 orang (Pusdatin Kemenkes RI, 2014).

Bali merupakan provinsi dengan jumlah kumulatif kasus HIV terbanyak kelima di Indonesia. Pada tahun 2014, jumlah kumulatif kasus HIV di Bali mencapai 9.637 kasus (Pusdatin Kemenkes RI, 2014). Kabupaten dengan jumlah kasus HIV terbanyak kedua di Provinsi Bali adalah Kabupaten Buleleng. Pada tahun 2012, jumlah kasus HIV di Kabupaten Buleleng mencapai 211 kasus, yang mana 74 diantaranya adalah kasus AIDS (Dinas Kesehatan Provinsi Bali, 2014).

Terdapat dua tipe HIV, yaitu HIV-1 dan HIV-2. HIV-1 dikaitkan dengan pandemi infeksi HIV yang terjadi di dunia (Dougan *et al.*, 2005). HIV-1 diklasifikasikan ke dalam tiga grup utama, yaitu M (main), N (non-M non-O), dan O (*outlier*). Grup M merupakan grup yang paling banyak ditemukan pada individu yang terinfeksi HIV-1. Grup M dibagi ke dalam sembilan subtipe, dari A hingga K, dan tambahan berupa *circulating recombinant forms* (CRF) dan *unique recombinant forms* (URF) (Korber *et al*, 2001; Hemelaar *et al.*, 2006; Hemelaar *et al.*, 2011; Rajarapu, 2014).

Subtipe HIV-1 yang bersirkulasi berbeda-beda secara global maupun regional (Hemelaar *et al.*, 2011). Pada tahun 2004-2007, subtipe C merupakan subtipe yang paling dominan terdistribusi secara global, dengan persentase mencapai 48% total

infeksi (Hemelaar *et al.*, 2011). Di regio Asia Tenggara, termasuk Indonesia, subtipe yang banyak ditemukan adalah CRF01\_AE (Taylor, 2008; Merati *et al.*, 2012; Kotaki *et al.*, 2013; Khairunisa *et al.*, 2014; Kotaki *et al.*, 2015) terhadap pasien HIV-positif di Kota Surabaya juga menunjukkan bahwa subtipe yang paling banyak bersirkulasi adalah CRF01\_AE.

Subtipe HIV-1 diketahui berhubungan dengan progresi infeksi menjadi AIDS (Renjifo *et al.*, 2004, John-Stewart *et al.*, 2005; dan Kiwanuka *et al.*, 2008). Salah satu penanda progresi penyakit akibat infeksi HIV-1 yang dipengaruhi oleh subtipe adalah kadar *viral load*. Individu yang terinfeksi oleh subtipe D memiliki tingkat *virological rebound* ( $> 400$  kopi/ml) setelah enam bulan terapi menggunakan obat *antiretroviral* (ARV) yang lebih tinggi dibandingkan subtipe C, tetapi infeksi subtipe C dapat menyebabkan *virological rebound* yang lebih cepat dibandingkan subtipe A dan B (Geretti *et al.*, 2009; Easterbrook *et al.*, 2010). Individu terinfeksi subtipe C diketahui memiliki kadar *viral load* plasma yang paling tinggi dibandingkan dengan subtipe A ataupun D (Neilson *et al.*, 1999).

Infeksi HIV-1 menyebabkan timbulnya tanda dan gejala yang bervariasi, mulai dari asimtomatik dan non-spesifik, hingga tanda dan gejala yang berat akibat adanya ko-infeksi. Manifestasi klinis infeksi HIV-1 dapat diklasifikasikan dengan menggunakan stadium klinis atau *clinical staging* (I-IV). Pada stadium klinis yang makin tinggi, biasanya berhubungan dengan jumlah CD4 yang semakin rendah dan *viral load* yang semakin tinggi (WHO, 2005; Kemenkes RI, 2012).

Berbeda dengan tren kasus HIV yang meningkat, jumlah kasus AIDS di Indonesia menunjukkan kecenderungan menurun sejak tahun 2012. Fenomena tersebut terkait dengan penatalaksanaan yang diberikan kepada pasien HIV, utamanya pemberian obat-obatan *antiretroviral* (ARV). Pemberian ARV bertujuan untuk mencegah percepatan progresi menjadi AIDS. Pengobatan dengan ARV yang saat ini banyak diterapkan adalah penggunaan beberapa jenis obat dengan target kerja berupa enzim *protease* (PR) dan *reverse transcriptase* (RT) dan pada HIV-1. Terapi dengan ARV kombinasi tersebut bersifat cukup poten dalam mensupresi *viral loads* dan tingkat penularan HIV (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014; Pusdatin Kemenkes RI, 2014).

Meskipun lebih efektif dibandingkan dengan terapi tunggal, penggunaan beberapa jenis ARV berdampak pada munculnya strain HIV-1 yang resisten. Adanya resistensi

terhadap ARV akan dapat menurunkan efektivitas terapi yang diberikan, sehingga mempengaruhi *quality of life* pasien (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Salah satu upaya untuk mengetahui adanya resistensi adalah dengan mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada HIV-1, utamanya pada gen pengkode enzim PR dan RT yang menjadi target HAART. Metode yang dapat digunakan adalah *genotyping*, yang terdiri dari amplifikasi materi genetik dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing nukleotida. Dengan *genotyping*, akan dapat dilakukan karakterisasi strain HIV-1 berdasarkan materi genetiknya, sehingga selain untuk identifikasi mutasi pada gen tertentu, juga dapat digunakan untuk identifikasi sub tipe (Moore *et al.*, 2001; Van-den Eede *et al.*, 2013).

Dalam penelitian ini, akan dilakukan *genotyping* terhadap gen PR dan RT HIV-1, pada pasien HIV-positif yang berkunjung ke RSUD Kabupaten Buleleng, Bali. Pasien yang menjadi subjek meliputi pasien belum pernah mendapatkan pengobatan (*treatment naïve*) maupun yang sudah mendapat pengobatan (*treated*), dengan berbagai manifestasi klinis. Hasil *genotyping* akan digunakan untuk mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT, serta untuk identifikasi sub tipe HIV-1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi terkait mutasi terkait *drug resistance* pada HIV-1 dan distribusi sub tipe HIV-1 di Indonesia, khususnya di Kabupaten Buleleng, Bali,

### Permasalahan

Berdasarkan latar belakang pemikiran tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apa saja sub tipe HIV-1 yang teridentifikasi pada pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali?
2. Apakah ditemukan adanya mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali?
3. Apakah ditemukan adanya mutasi terkait *drug resistance* pada Gen RT HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali?
4. Apakah ada keterkaitan antara sub tipe HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali?

5. Apakah ada keterkaitan antara sub tipe HIV-1 dengan mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali?
6. Apakah ada keterkaitan antara mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali?

contohnya, transmisi vertikal lebih tinggi ditemukan pada subtipe C dibandingkan A dan D. Infeksi subtipe D memiliki progresi AIDS yang lebih cepat dibandingkan subtipe A (Renjifo *et al.*, 2004, John-Stewart *et al.*, 2005; Baeten *et al.*, 2007; Kiwanuka *et al.*, 2008).

Pada pasien yang mendapat terapi dengan ARV, Beberapa subtipe diketahui dapat menyebabkan tingkat *virological rebound* ( $> 400$  kopi/ml) yang lebih tinggi, ataupun dapat terjadi lebih cepat. Infeksi oleh subtipe D berisiko lebih tinggi untuk *virological rebound* setelah enam bulan terapi ARV dibandingkan subtipe C, tetapi infeksi subtipe C dapat menyebabkan *virological rebound* yang lebih cepat dibandingkan subtipe A dan B (Geretti *et al.*, 2009; Easterbrook *et al.*, 2010). Pada pasien tanpa ARV, subtipe C diketahui menyebabkan kadar *viral load* plasma yang paling tinggi dibandingkan dengan subtipe A ataupun D. Tingginya kadar *viral load plasma* dihubungkan dengan progresi penyakit yang lebih cepat (Neilson *et al.*, 1999).

## 2. Morfologi dan Organisasi Genom HIV-1

Partikel virion HIV-1 memiliki diameter kurang lebih 100 nm. Terdapat 7 jenis protein internal HIV, yang mana 4 diantaranya merupakan protein struktural sedangkan 3 lainnya berupa protein enzimatik. Tiga jenis protein enzimatik HIV antara lain reverse transcriptase (RT), integrase (IN), dan protease (PR), dikelilingi oleh protein struktural yang disebut sebagai protein matriks (MA), atau p17. Pada permukaan lipoprotein HIV, terdapat *envelope knob* atau *spike-like protein* yang terdiri dari glikoprotein gp120 (*surface protein*) dan gp41 (protein transmembran) (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Rajarapu, 2014).

Materi genetik HIV-1 yang berupa dua *single stranded* RNA yang identik, masing-masing memiliki genom dengan panjang kurang lebih 9.5 kilo base pairs (kbps). Genom HIV dikarakterisasi oleh gen struktural seperti *gag*, *pol*, dan *env*. Genom ataupun region gen HIV-1 dapat digunakan untuk identifikasi subtipe maupun identifikasi mutasi (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Rajarapu, 2014).

Seperti *retrovirus* lainnya, gen *gag* HIV berperan dalam mengkode protein struktural bagian inti atau *core* (p24, p7, dan p6) dan protein struktural matriks (p17). Gen *env* mengkode glikoprotein *envelope* virus, yaitu gp120 dan gp41. Gen *env* merupakan region genom dengan tingkat diversitas paling tinggi. Gen *pol* mengkode protein enzimatik yang berperan dalam replikasi virus, antara lain *reverse transcriptase*

yang mengkonversi RNA virus menjadi DNA. *integrase* yang mengkorporasikan DNA virus ke DNA kromosomal host (provirus), dan *protease* yang berperan dalam maturasi prekursor protein Gag and Pol di dalam partikel virus setelah mengalami *release* dari sel host (Lindström dan Albert, 2003; Delwart dalam Jacobs, 2005).

Gen *pol* pada genom HIV-1 merupakan gen yang *highly conserved* diantara berbagai group dan subtype HIV-1. Hal tersebut berhubungan dengan fungsinya dalam mengkode protein-protein enzimatis, sehingga mutasi yang eksemis pada region *pol* akan dapat mengganggu kemampuan HIV-1 untuk bereplikasi dalam sel *host*. Hal inilah yang menyebabkan banyaknya ARV yang memiliki target untuk menghambat enzim-enzim yang dikode oleh gen *pol* (Lindström dan Albert, 2003).

### 3. Perjalanan alamiah infeksi HIV-1

Perjalanan alamiah infeksi HIV-1 meliputi fase akut/primer yang berlangsung selama beberapa bulan, diikuti oleh fase laten yang berlangsung selama beberapa tahun, dan diakhiri dengan fase AIDS yang dikarakterisasi oleh disfungsi sistem imun. Pola respon imun dan kadar RNA virus pada plasma saat terjadi infeksi HIV-1 dimuat pada Gambar 1.

Fase pertama infeksi HIV-1 adalah fase akut atau periode jendela (*window period*). Antibodi anti-HIV biasanya baru muncul setelah tiga hingga enam minggu sejak awal terjadinya infeksi pada *host*. Periode inilah yang disebut sebagai *window period*. Uji diagnostik yang mendeteksi antibodi anti-HIV akan memberikan hasil negatif jika dilakukan pada periode ini (WHO, 2007).

Pada fase akut terjadi peningkatan viremia secara tiba-tiba, yang mana *viral load* plasma akan mencapai puncaknya dalam dua hingga minggu, sementara hilangnya sel *T-helper* menyebabkan penurunan sementara limfosit T CD4 yang bersirkulasi. Pada periode ini, akan muncul respon imun *host* sebagai usaha untuk mengendalikan multiplikasi virus, sehingga menimbulkan penurunan viremia plasma secara tajam (WHO, 2007).

Beberapa individu yang terinfeksi akan menunjukkan gejala seperti flu (*flu like symptom*) pada fase akut. Individu tersebut biasanya mengalami demam, sakit kepala, *arthralgia*, ruam, dan gejala-gejala non-spesifik lainnya. Setelah empat hingga bulan pasca terjadinya infeksi, viremia akan terjadi secara konstan, atau disebut sebagai *virologic set point*. *Set point* dari *viral load* biasanya dijadikan sebagai prognosis

kandidiasis oral dan esofageal. Aktivasi Herpes zoster dan malignansi seperti limfoma non-Hodgkin's juga biasa ditemukan pada fase AIDS. Gejala-gejala penyerta lainnya seperti berkeringat di malam hari (*night sweat*), demam, diare, penurunan berat badan dalam jumlah besar, dan *fatigue* (WHO, 2007).

#### 4. Manifestasi Klinis Infeksi HIV-1

Infeksi HIV-1 menyebabkan timbulnya tanda dan gejala yang bervariasi, mulai dari asimtomatik dan non-spesifik, hingga tanda dan gejala yang berat akibat adanya ko-infeksi dan progresi menjadi *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) (Engelman dan Cherepanov, 2012).

Manifestasi klinis infeksi HIV-1 merupakan gejala dan tanda pada tubuh *host* akibat adanya gangguan oleh HIV-1 (Nasronudin, 2014). Klasifikasi tanda dan gejala klinis disebut sebagai stadium klinis atau *clinical staging*. Terdapat 4 stadium klinis infeksi HIV-1. Pada stadium klinis yang makin tinggi, biasanya berhubungan dengan jumlah CD4 yang semakin rendah dan *viral load* yang semakin tinggi. (WHO, 2005; Kemenkes RI, 2012).

**Tabel 1 Stadium Klinis Infeksi HIV (WHO, 2005; Kemenkes RI, 2012)**

<b>Stadium 1</b>
- Tidak ada gejala - Limfadenopati generalisata persisten
<b>Stadium 2</b>
- Penurunan berat badan bersifat sedang yang tak diketahui penyebabnya (<10% dari perkiraan berat badan atau berat badan sebelumnya) - Infeksi saluran pernafasan yang berulang (sinusitis, tonsillitis, otitis media, faringitis) - Herpes zoster - Keilitis angularis - Ulkus mulut yang berulang - Ruam kulit berupa papul yang gatal ( <i>Papular pruritic eruption</i> ) - Dermatitis seboroik - Infeksi jamur pada kuku
<b>Stadium 3</b>
- Penurunan berat badan bersifat berat yang tak diketahui penyebabnya (lebih dari 10% dari perkiraan berat badan atau berat badan sebelumnya) - Diare kronis yang tak diketahui penyebabnya selama lebih dari 1 bulan - Demam menetap yang tak diketahui penyebabnya - Kandidiasis pada mulut yang menetap - Oral hairy leukoplakia - Tuberkulosis paru - Infeksi bakteri yang berat (contoh: pneumonia, empiema, meningitis, piomiositis, infeksi



tulang atau sendi, bakteraemia, penyakit inflamasi panggul yang berat) - Stomatitis nekrotikans ulserative akut, gingivitis atau periodontitis - Anenii yang tak diketahui penyebabnya (<8g/dl), netropeni (<0.5 x 10 <sup>9</sup> /l) dan/atau trombositopeni kronis (<50 x 10 <sup>9</sup> /l)	
Stadium 4	
- Sindrom wasting HIV - Pneumonia <i>Pneumocystis jiroveci</i> - Pneumonia bakteri berat yang berulang - Infeksi herpes simplex kronis (orolabial, genital, atau anorektal selama lebih dari 1 bulan atau viseral di bagian manapun) - Kandidiasis esofageal (atau kandidiasis trakea, bronkus atau paru) - Tuberkulosis ekstra paru - Sarkoma Kaposi - Penyakit Cytomegalovirus (retinitis atau infeksi organ lain, tidak termasuk hati, limpa dan kelenjar getah bening) - Toksoplasmosis di sistem saraf pusat - Pneumonia Kriptokokus ekstrapulmoner, termasuk meningitis	- Ensefalopati HIV - Infeksi mycobacteria non tuberkulosis yang menyebar - Leukoencephalopathy multifocal progresif - Cyrptosporidiosis kronis - Isosporiasis kronis - Mikosis diseminata (histoplasmosis, coccidiomycosis) - Septikemi yang berulang (termasuk Salmonella non-tifoid) - Limfoma (serebral atau Sel B non-Hodgkin) - Karsinoma serviks invasif - Leishmaniasis diseminata atipikal - Nefropati atau kardiomiopati terkait HIV yang simptomatis

## Terapi Infeksi HIV-1 dengan Menggunakan Obat-obatan Antiretroviral (ARV)

### 1. ARV dan Indikasi Pemberian ARV

Tujuan dari terapi dengan ARV adalah untuk dapat menekan secara maksimal dan terus-menerus replikasi virus, mencegah terjadinya resistensi obat, mengembalikan fungsi imun, mencegah infeksi oportunistik dan meminimisasi ROTD (reaksi obat tidak diinginkan). *Treatment naïve* merupakan istilah yang diberikan bagi pasien yang sama sekali belum pernah memperoleh terapi ARV. *Treated* merupakan istilah bagi pasien yang sudah mendapat terapi ARV, baik yang masih menggunakan terapi lini pertama, ataupun yang sudah mengalami penggantian ataupun pemberhentian terapi (Kantor dan Katzenstein, 2004; Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Menurut Kcmenkes RI (2012), indikasi untuk dimulainya pemberian ARV pada pasien HIV-1 positif disesuaikan dengan manifestasi klinis atau stadium klinis dari infeksi. Indikasinya adalah sebagai berikut:

1. Pasien tanpa gejala klinis (stadium klinis 1) dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*), ARV diberikan jika  $CD4 \leq 350 \text{ sel/mm}^3$
2. Pasien dengan gejala klinis dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*), ARV diberikan jika  $CD4 \leq 350 \text{ sel/mm}^3$  pada pasien

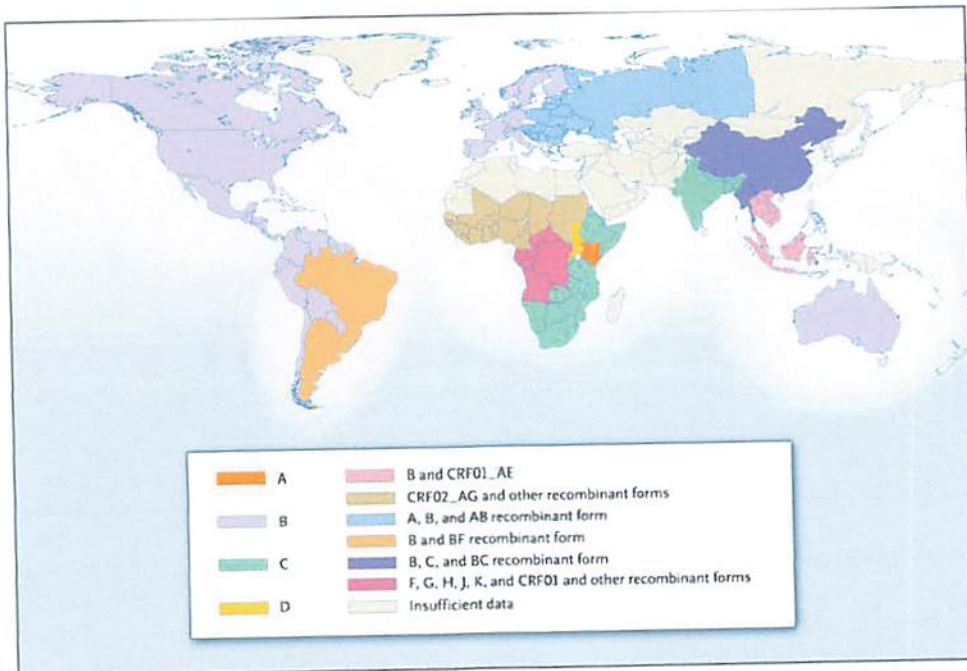
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### *Human Immuno-deficiency Virus – 1 (HIV-1)*

##### 1. Klasifikasi dan Epidemiologi HIV-1

Human Immunodeficiency Virus (HIV) termasuk dalam genus *Lentivirus*, family *Retroviridae* (retrovirus). Terdapat dua tipe HIV, yaitu HIV-1 dan HIV-2 (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Engelman dan Cherepanov). HIV-1 diklasifikasikan ke dalam tiga grup utama, yaitu M (main), N (non-M non-O), dan O (outlier). Grup M dibagi ke dalam sembilan subtipe, yaitu A, B, C, D, F, G, H, J and K, dan tambahan subtipe berupa *circulating recombinant forms* (CRF) dan *unique recombinant forms* (URF) (Rajarapu, 2014; Widiyanti *et al.*, 2014).



**Gambar 1** Distribusi subtipe dan *recombinant form* HIV-1 secara global (Taylor, 2008)

Subtipe yang bersirkulasi secara dominan cenderung berbeda-beda secara geografis. Di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, subtipe yang banyak ditemukan adalah CRF01\_AE. Di Amerika Utara dan Eropa Barat, subtipe yang dominan adalah subtipe B. di Afrika Selatan dan Asia Selatan, utamanya India, subtipe yang banyak ditemukan adalah subtipe C (Taylor, 2008). Subtipe berhubungan dengan tingkat transmisi seksual dan transmisi vertikal, serta progresi infeksi menjadi AIDS. Sebagai

contohnya, transmisi vertikal lebih tinggi ditemukan pada subtipe C dibandingkan A dan D. Infeksi subtipe D memiliki progresi AIDS yang lebih cepat dibandingkan subtipe A (Renjifo *et al.*, 2004, John-Stewart *et al.*, 2005; Baeten *et al.*, 2007; Kiwanuka *et al.*, 2008).

Pada pasien yang mendapat terapi dengan ARV, Beberapa subtipe diketahui dapat menyebabkan tingkat *virological rebound* (> 400 kopi/ml) yang lebih tinggi, ataupun dapat terjadi lebih cepat. Infeksi oleh subtipe D berisiko lebih tinggi untuk *virological rebound* setelah enam bulan terapi ARV dibandingkan subtipe C, tetapi infeksi subtipe C dapat menyebabkan *virological rebound* yang lebih cepat dibandingkan subtipe A dan B (Geretti *et al.*, 2009; Easterbrook *et al.*, 2010). Pada pasien tanpa ARV, subtipe C diketahui menyebabkan kadar *viral load* plasma yang paling tinggi dibandingkan dengan subtipe A ataupun D. Tingginya kadar *viral load* plasma dihubungkan dengan progresi penyakit yang lebih cepat (Neilson *et al.*, 1999).

## 2. Morfologi dan Organisasi Genom HIV-1

Partikel virion HIV-1 memiliki diameter kurang lebih 100 nm. Terdapat 7 jenis protein internal HIV, yang mana 4 diantaranya merupakan protein struktural sedangkan 3 lainnya berupa protein enzimatik. Tiga jenis protein enzimatik HIV antara lain reverse transcriptase (RT), integrase (IN), dan protease (PR), dikelilingi oleh protein struktural yang disebut sebagai protein matriks (MA), atau p17. Pada permukaan lipoprotein HIV, terdapat *envelope knob* atau *spike-like protein* yang terdiri dari glikoprotein gp120 (*surface protein*) dan gp41 (protein transmembran) (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Rajarapu, 2014).

Materi genetik HIV-1 yang berupa dua *single stranded* RNA yang identik, masing-masing memiliki genom dengan panjang kurang lebih 9.5 kilo base pairs (kbps). Genom HIV dikarakterisasi oleh gen struktural seperti *gag*, *pol*, dan *env*. Genom ataupun region gen HIV-1 dapat digunakan untuk identifikasi subtipe maupun identifikasi mutasi (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Rajarapu, 2014).

Seperti *retrovirus* lainnya, gen *gag* HIV berperan dalam mengkode protein struktural bagian inti atau *core* (p24, p7, dan p6) dan protein struktural matriks (p17). Gen *env* mengkode glikoprotein *envelope* virus, yaitu gp120 dan gp41. Gen *env* merupakan region genom dengan tingkat diversitas paling tinggi. Gen *pol* mengkode protein enzimatik yang berperan dalam replikasi virus, antara lain *reverse transcriptase*

yang mengkonversi RNA virus menjadi DNA, *integrase* yang mengkorporasikan DNA virus ke DNA kromosomal host (provirus), dan *protease* yang berperan dalam maturasi prekursor protein Gag and Pol di dalam partikel virus setelah mengalami *release* dari sel host (Lindström dan Albert, 2003; Delwart dalam Jacobs, 2005).

Gen *pol* pada genom HIV-1 merupakan gen yang *highly conserved* diantara berbagai group dan subtype HIV-1. Hal tersebut berhubungan dengan fungsinya dalam mengkode protein-protein enzimatik, sehingga mutasi yang eksemik pada region *pol* akan dapat mengganggu kemampuan HIV-1 untuk bereplikasi dalam sel *host*. Hal inilah yang menyebabkan banyaknya ARV yang memiliki target untuk menghambat enzim-enzim yang dikode oleh gen *pol* (Lindström dan Albert, 2003).

### 3. Perjalanan alamiah infeksi HIV-1

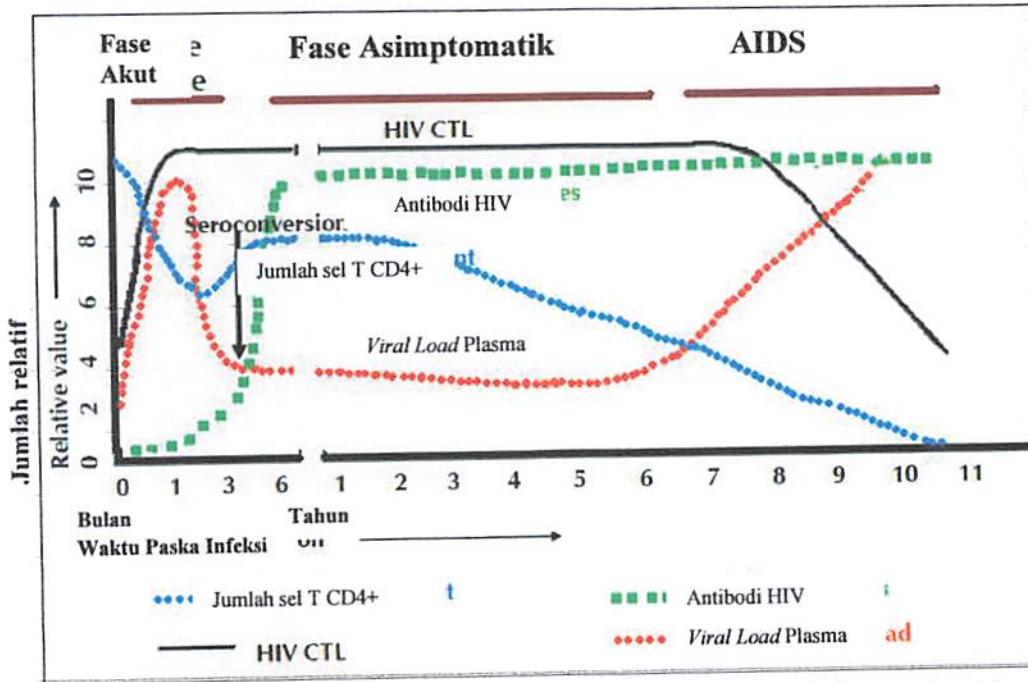
Perjalanan alamiah infeksi HIV-1 meliputi fase akut/primer yang berlangsung selama beberapa bulan, diikuti oleh fase laten yang berlangsung selama beberapa tahun, dan diakhiri dengan fase AIDS yang dikarakterisasi oleh disfungsi sistem imun. Pola respon imun dan kadar RNA virus pada plasma saat terjadi infeksi HIV-1 dimuat pada **Gambar 1**.

Fase pertama infeksi HIV-1 adalah fase akut atau periode jendela (*window period*). Antibodi anti-HIV biasanya baru muncul setelah tiga hingga enam minggu sejak awal terjadinya infeksi pada *host*. Periode inilah yang disebut sebagai *window period*. Uji diagnostik yang mendeteksi antibodi anti-HIV akan memberikan hasil negatif jika dilakukan pada periode ini (WHO, 2007).

Pada fase akut terjadi peningkatan viremia secara tiba-tiba, yang mana *viral load* plasma akan mencapai puncaknya dalam dua hingga minggu, sementara hilangnya sel T-helper menyebabkan penurunan sementara limfosit T CD4 yang bersirkulasi. Pada periode ini, akan muncul respon imun *host* sebagai usaha untuk mengendalikan multiplikasi virus, sehingga menimbulkan penurunan viremia plasma secara tajam (WHO, 2007).

Beberapa individu yang terinfeksi akan menunjukkan gejala seperti flu (*flu like symptom*) pada fase akut. Individu tersebut biasanya mengalami demam, sakit kepala, *arthralgia*, ruam, dan gejala-gejala non-spesifik lainnya. Setelah empat hingga bulan pasca terjadinya infeksi, viremia akan terjadi secara konstan, atau disebut sebagai *virologic set point*. *Set point* dari *viral load* biasanya dijadikan sebagai prognosis

berkembangnya penyakit, yang mana *viral load* plasma yang rendah dikaitkan dengan progresi penyakit yang lebih lambat (WHO, 2007).



**Gambar 2** Kondisi-kondisi imunologis dan virologis pada perjalanan alamiah infeksi HIV-1 (WHO, 2007)

Fase selanjutnya adalah fase laten atau fase asimptomatik post-serokonversi (*post-seroconversion asymptomatic*). Beberapa tahun setelah *virologic set point*, *viral load* plasma cenderung stabil. Individu yang terinfeksi biasanya tidak menunjukkan tanda dan gejala apapun pada fase laten. Meskipun kadar *viral load* plasma tidak mengalami peningkatan, terjadi multiplikasi virus secara konstan, sehingga menyebabkan destruksi sel limfosit T CD4. Produksi sel limfosit T CD4 baru tidak sebanding dengan jumlah limfosit yang rusak. Hal tersebut mengakibatkan penurunan jumlah sel limfosit T CD4 secara bertahap pada sirkulasi perifer. Adanya kondisi tersebut menjadikan kadar *viral load* plasma dan jumlah sel limfosit T CD4 sebagai parameter progresi penyakit yang penting (WHO, 2007).

Fase terakhir atau terminal dari infeksi HIV-1 adalah AIDS. Penurunan jumlah sel limfosit T CD4 yang terjadi secara gradual, hingga kurang dari  $200 \text{ sel/mm}^3$ , akan mengakibatkan hilangnya kontrol terhadap respon imun dan disertai dengan munculnya berbagai infeksi oportunistik. Infeksi oportunistik yang biasa muncul pada fase ini antara lain pnemumonia akibat *Pneumocystis carinii*, meningitis *cryptococcal*, serta

kandidiasis oral dan esofageal. Aktivasi Herpes zoster dan malignansi seperti limfoma non-Hodgkin's juga biasa ditemukan pada fase AIDS. Gejala-gejala penyerta lainnya seperti berkeringat di malam hari (*night sweat*), demam, diare, penurunan berat badan dalam jumlah besar, dan *fatigue* (WHO, 2007).

#### 4. Manifestasi Klinis Infeksi HIV-1

Infeksi HIV-1 menyebabkan timbulnya tanda dan gejala yang bervariasi, mulai dari asimtomatik dan non-spesifik, hingga tanda dan gejala yang berat akibat adanya ko-infeksi dan progresi menjadi *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) (Engelman dan Cherepanov, 2012).

Manifestasi klinis infeksi HIV-1 merupakan gejala dan tanda pada tubuh *host* akibat adanya gangguan oleh HIV-1 (Nasronudin, 2014). Klasifikasi tanda dan gejala klinis disebut sebagai stadium klinis atau *clinical staging*. Terdapat 4 stadium klinis infeksi HIV-1. Pada stadium klinis yang makin tinggi, biasanya berhubungan dengan jumlah CD4 yang semakin rendah dan *viral load* yang semakin tinggi. (WHO, 2005; Kemenkes RI, 2012).

**Tabel 1 Stadium Klinis Infeksi HIV (WHO, 2005; Kemenkes RI, 2012)**

<b>Stadium 1</b>
- Tidak ada gejala - Limfadenopati generalisata persisten
<b>Stadium 2</b>
- Penurunan berat badan bersifat sedang yang tak diketahui penyebabnya (<10% dari perkiraan berat badan atau berat badan sebelumnya) - Infeksi saluran pernafasan yang berulang (sinusitis, tonsillitis, otitis media, faringitis) - Herpes zoster - Keilitis angularis - Ulkus mulut yang berulang - Ruam kulit berupa papul yang gatal ( <i>Papular pruritic eruption</i> ) - Dermatitis seboroik - Infeksi jamur pada kuku
<b>Stadium 3</b>
- Penurunan berat badan bersifat berat yang tak diketahui penyebabnya (lebih dari 10% dari perkiraan berat badan atau berat badan sebelumnya) - Diare kronis yang tak diketahui penyebabnya selama lebih dari 1 bulan - Demam menetap yang tak diketahui penyebabnya - Kandidiasis pada mulut yang menetap - Oral hairy leukoplakia - Tuberkulosis paru - Infeksi bakteri yang berat (contoh: pneumonia, empiema, meningitis, piomiositis, infeksi

tulang atau sendi, bakteraemia, penyakit inflamasi panggul yang berat) - Stomatitis nekrotikans ulserative akut, gingivitis atau periodontitis - Anemi yang tak diketahui penyebabnya (<8g/dl), netropeni (<0.5 x 10 <sup>9</sup> /l) dan/atau trombositopeni kronis (<50 x 10 <sup>9</sup> /l)	
Stadium 4	
- Sindrom wasting HIV - Pneumonia <i>Pneumocystis jiroveci</i> - Pneumonia bakteri berat yang berulang - Infeksi herpes simplex kronis (orolabial, genital, atau anorektal selama lebih dari 1 bulan atau viseral di bagian manapun) - Kandidiasis esofageal (atau kandidiasis trakea, bronkus atau paru) - Tuberkulosis ekstra paru - Sarkoma Kaposi - Penyakit Cytomegalovirus (retinitis atau infeksi organ lain, tidak termasuk hati, limpa dan kelenjar getah bening) - Toksoplasmosis di sistem saraf pusat - Pneumonia Kriptokokus ekstrapulmoner, termasuk meningitis	- Ensefalopati HIV - Infeksi mycobacteria non tuberkulosis yang menyebar - Leukoencephalopathy multifocal progresif - Cyrptosporidiosis kronis - Isosporiasis kronis - Mikosis diseminata (histoplasmosis, coccidiomycosis) - Septikemi yang berulang (termasuk Salmonella non-tifoid) - Limfoma (serebral atau Sel B non-Hodgkin) - Karsinoma serviks invasif - Leishmaniasis diseminata atipikal - Nefropati atau kardiomiopati terkait HIV yang simtomatis

## Terapi Infeksi HIV-1 dengan Menggunakan Obat-obatan Antiretroviral (ARV)

### 1. ARV dan Indikasi Pemberian ARV

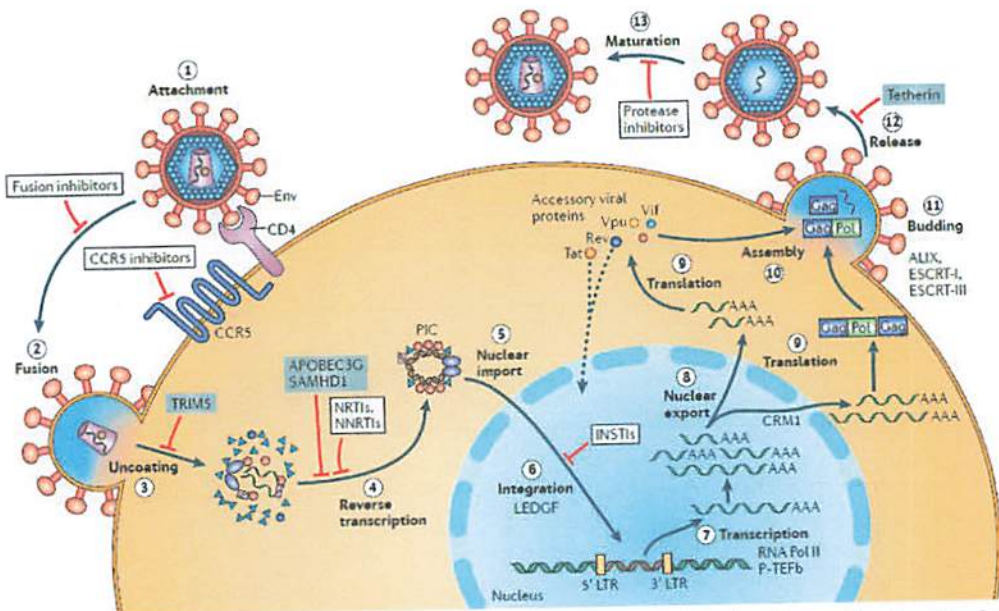
Tujuan dari terapi dengan ARV adalah untuk dapat menekan secara maksimal dan terus-menerus replikasi virus, mencegah terjadinya resistensi obat, mengembalikan fungsi imun, mencegah infeksi oportunistik dan meminimisasi ROTD (reaksi obat tidak diinginkan). *Treatment naïve* merupakan istilah yang diberikan bagi pasien yang sama sekali belum pernah memperoleh terapi ARV. *Treated* merupakan istilah bagi pasien yang sudah mendapat terapi ARV, baik yang masih menggunakan terapi lini pertama, ataupun yang sudah mengalami penggantian ataupun pemberhentian terapi (Kantor dan Katzenstein, 2004; Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Menurut Kemenkes RI (2012), indikasi untuk dimulainya pemberian ARV pada pasien HIV-1 positif disesuaikan dengan manifestasi klinis atau stadium klinis dari infeksi. Indikasinya adalah sebagai berikut:

1. Pasien tanpa gejala klinis (stadium klinis 1) dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*), ARV diberikan jika  $CD4 \leq 350 \text{ sel/mm}^3$
2. Pasien dengan gejala klinis dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*), ARV diberikan jika  $CD4 \leq 350 \text{ sel/mm}^3$  pada pasien

- dengan stadium klinis 2, atau berapapun jumlah CD4 jika pasien sudah memasuki stadium klinis 3 atau 4
3. Semua wanita hamil dengan HIV perlu diberi ARV tanpa memandang jumlah CD4 ataupun stadium klinisnya
  4. Pasien dengan koinfeksi tuberkulosis dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*) perlu diberi ARV berapapun jumlah CD4
  5. Pasien dengan koinfeksi Hepatitis B (HBV) kronis aktif dan belum pernah mendapat terapi ARV (*treatment naïve*) perlu diberi ARV berapapun jumlah CD4

Lebih dari dua puluh lima obat terlisensi yang dapat menghambat replikasi HIV-1, dengan target kerja seperti yang nampak pada **Gambar 2**. *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NRTIs) dan *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NNRTIs) berperan dalam menghambat tahap transkripsi balik atau *reverse transcription*. Terdapat delapan jenis ARV yang tergolong sebagai NRTI, antara lain: zidovudine, didanosine, zalcitabine, stavudine, lamivudine, abacavir, emtricitabine, dan tenofovir. Empat jenis ARV yang termasuk dalam golongan NNRTI antara lain nevirapine, delavirdine, efavirenz, dan etravirine (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).



**Gambar 3** Skema siklus replikasi HIV-1 dan target-target kerja *antiretroviral* (ARV) pada siklus replikasi (Engelman dan Cherepanov, 2012)



*Nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NRTIs) dan *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NNRTIs) berperan dalam menghambat tahap transkripsi balik atau *reverse transcription*. Terdapat delapan jenis ARV yang tergolong sebagai NRTI, antara lain: zidovudine, didanosine, zalcitabine, stavudine, lamivudine, abacavir, emtricitabine, dan tenofovir. Empat jenis ARV yang termasuk dalam golongan NNRTI antara lain nevirapine, delavirdine, efavirenz, dan etravirine (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Inhibitor *protease* (PI) yang berperan dalam menghambat aktivitas protease dalam proses maturasi partikel virus antara lain sawinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, dan darunavir. Sedangkan dua jenis inhibitor dapat mencegah masuknya virus ke dalam target sel yang baru, baik dengan menghambat interaksi antara viral envelope glycoprotein gp120 dengan CCR5, yaitu maraviroc, atau dengan menghambat fusi antara virus dengan membran seluler yang melibatkan glikoprotein 41 (gp41), yaitu enfuvirtide. Satu-satunya *integrase strand transfer inhibitor* (INSTI), raltegravir, menghambat aktivitas *strand transfer* dari integrase (Engelman dan Cherepanov, 2012; Rajarapu, 2014).

Terapi ARV lini pertama yang direkomendasikan di Indonesia adalah kombinasi antara 2 *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NRTI) dengan 1 *Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NNRTI). Kombinasi terapi lini pertama yang dianjurkan bagi pasien HIV-positif Tabel 2 (Kemenkes RI, 2012; WHO, 2013). ARV yang berperan sebagai inhibitor protease dianjurkan untuk terapi lini kedua. Terapi lini kedua yang dianjurkan adalah kombinasi dari 2 NRTI dan 1 *boosted* PI. *Boosted* PI merupakan obat golongan inhibitor *protease* yang telah ditambah dengan Ritonafir, yang bertujuan untuk mengurangi dosis PI yang dibutuhkan. Terapi lini kedua yang direkomendasikan dan disediakan gratis oleh pemerintah Indonesia adalah kombinasi Tenofovir (TDF) atau Zidovudine (AZT) dan Lamivudine (3TC), ditambah dengan inhibitor *protease* berupa Lopinavir yang di-*booster* menggunakan Ritonavir (LPV/r) (Kemenkes RI, 2012).

**Tabel 2** Kombinasi terapi lini pertama yang dianjurkan

AZT + 3TC + NVP	(Zidovudine + Lamivudine + Nevirapine)
AZT + 3TC + EFV	(Zidovudine + Lamivudine + Efavirenz)
TDF + 3TC (atau FTC) + NVP	(Tenofovir + Lamivudine (atau Emtricitabine) + Nevirapine)
TDF + 3TC (atau FTC) + EFV	(Tenofovir + Lamivudine (atau Emtricitabine) + Efavirenz)

Sumber: Kemenkes RI, 2012

## 2. Resistensi ARV

Terdapat dua jenis resistensi terhadap ARV, yaitu resistensi primer (*primary resistance/transmitted resistance*) dan resistensi sekunder (*secondary resistance/acquired resistance*). Resistensi primer merefleksikan akuisisi *drug-resistant strain* pada individu yang baru terinfeksi dan belum pernah mendapat terapi (*treatment naïve*). Resistensi sekunder terjadi setelah adanya terapi dengan menggunakan ARV (Kantor dan Katzenstein, 2004).

Prevalensi *drug resistance* yang tinggi pada suatu populasi (>5%) mengindikasikan bahwa terapi lini pertama yang diberikan kurang adekuat. Karenanya, identifikasi mutasi terkait *drug resistance* tidak hanya dapat membantu menyusun terapi yang sesuai bagi pasien, tetapi juga memberi evaluasi kebijakan terkait ARV (Yerly *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008).

Resistensi ARV, utamanya golongan NRTI, NNRTI, dan inhibitor protease disebabkan oleh inhibisi secara terus-menerus terhadap enzim PR dan RT HIV-1. Akibatnya, akan terjadi mutasi pada gen PR dan RT di region *pol* yang berperan dalam mengkode enzim PR dan RT. Mutasi tersebut bertujuan untuk mempertahankan kemampuan HIV-1 dalam memproduksi protein-protein enzimatik yang penting bagi kelangsungan siklus hidupnya (Lindström dan Albert, 2003).

Terdapat dua jenis pendekatan untuk mengidentifikasi resistensi HIV-1 terhadap ARV. Pendekatan yang pertama adalah pemeriksaan genotipik, yang dilakukan dengan cara membandingkan sekuens gen, umumnya *protease* dan *reverse transcriptase*, dari HIV-1 pasien terhadap sekuens HIV-1 *wild type* yang sensitif terhadap ARV (Vella dan Palmisano, 2005).

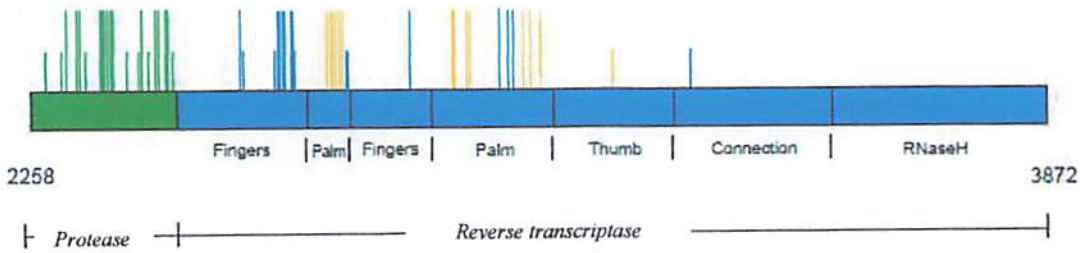
Pendekatan yang kedua adalah pemeriksaan fenotipik, yang dilakukan dengan cara menguji sensitivitas HIV-1 pasien terhadap ARV secara *in vitro*, kemudian dibandingkan dengan sensitivitas dari HIV-1 *wild type*. Sensitivitas atau suseptibilitas

terhadap ARV dilaporkan berdasarkan perubahan dari *inhibitory concentration* (IC 50). Pemeriksaan fenotipik umumnya hanya dapat dilakukan untuk mengetahui resistensi terhadap gen PR dan RT saja, karena sangat bergantung pada kit komersial yang tersedia. Hal tersebut menjadikan pemeriksaan genotipik sebagai pendekatan atau metode yang lebih baik untuk mengidentifikasi resistensi HIV-1 terhadap ARV (Vella dan Palmisano, 2005).

Studi terkait mutasi yang berhubungan dengan *drug resistance* masih cenderung terbatas pada isolat HIV-1 sub tipe B. Tetapi, secara general, diasumsikan bahwa mutasi yang terjadi pada isolat sub tipe B akan menghasilkan efek fenotipik yang sama pada semua sub tipe HIV-1. Di beberapa penelitian, terobservasi bahwa mutasi pada HIV-1 sub tipe B juga terjadi pada sub tipe non-B yang terpapar oleh obat-obatan ARV (Shafer *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2005; Kearney *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2014; Wensing *et al.*, 2014).

Penelitian yang membandingkan antara genotip dan fenotip pada >30 sub tipe non-B menunjukkan bahwa tidak ada resistensi alami terhadap ARV pada sub tipe non-B. Mutasi yang terjadi antara sub tipe non-B dengan sub tipe B juga tidak berbeda ketika pasien memiliki riwayat terapi yang serupa. Karenanya, database mutasi terkait *drug resistance* untuk sub tipe B dapat digunakan untuk mengidentifikasi mutasi pada sub tipe non-B (Shafer *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2005; Kearney *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2014; Wensing *et al.*, 2014).

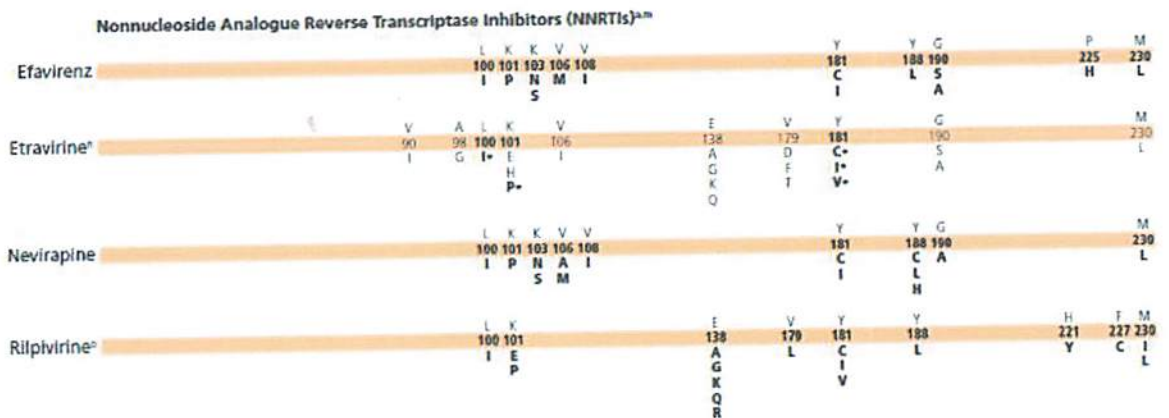
Untuk studi genotipik, tahap pertama dari interpretasi mutasi terkait *drug resistance* adalah dengan membuat daftar perbedaan asam amino antara sekuens pada sampel dengan sekuens *wildtype* yang menjadi referensi (*subtype B consensus sequence*). Mutasi didefinisikan sebagai perbedaan terhadap *wildtype consensus B subtype*, dan diklasifikasikan sebagai mutasi *major* ataupun minor. Mutasi terkait *drug resistance* dikategorikan sebagai mutasi *major* jika dapat menurunkan kepekaan terhadap ARV secara substansial. Mutasi minor tidak memiliki efek substansial terhadap fenotip dari virus. Mutasi minor hanya dapat meningkatkan kemampuan replikasi virus yang memiliki mutasi *major*. Tahap kedua adalah menggunakan daftar mutasi yang teridentifikasi untuk memperkirakan kepekaan terhadap ARV tertentu (Shafer *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2005; Kearney *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2014; Wensing *et al.*, 2014).



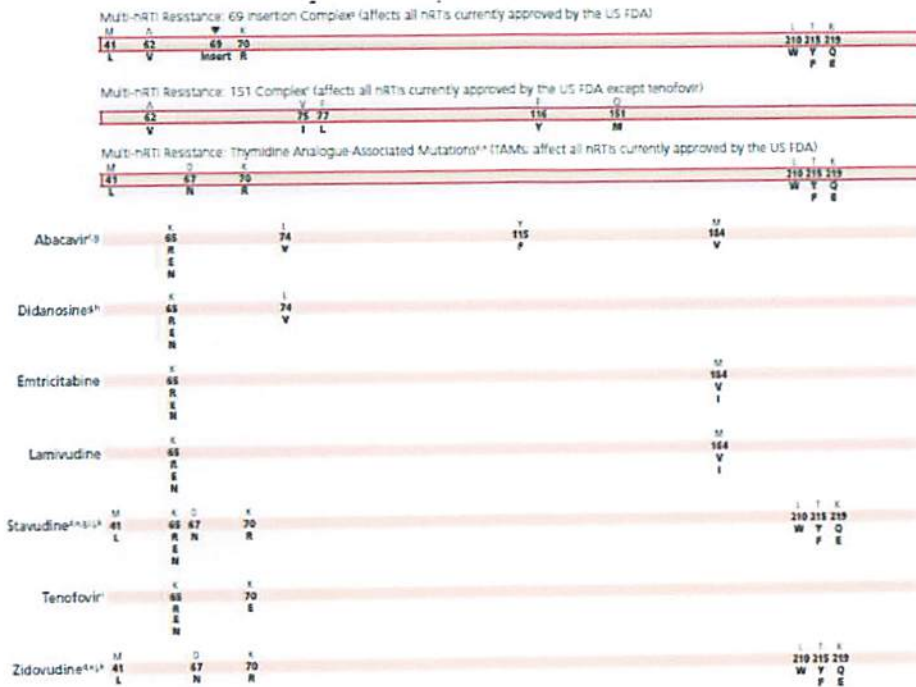
**Gambar 4** Diagram skematis yang menggambarkan distribusi mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT HIV-1 (Brown *et al.*, 2000)

**Gambar 4** menunjukkan distribusi mutasi terkait *drug-resistance* pada gen PT dan RT HIV-1. Mutasi yang menyebabkan resistensi pada satu atau beberapa obat direpresentasikan oleh garis tinggi. *Accessory mutation* yang menyebabkan timbulnya resistensi hanya dengan adanya mutasi lain direpresentasikan oleh garis yang lebih pendek. Mutasi terkait resistensi terhadap inhibitor *protease* digambarkan oleh garis warna hijau, resistensi terhadap NRTI digambarkan oleh warna biru, sedangkan resistensi terhadap NNRTI digambarkan oleh warna kuning kecoklatan (Brown *et al.*, 2000).

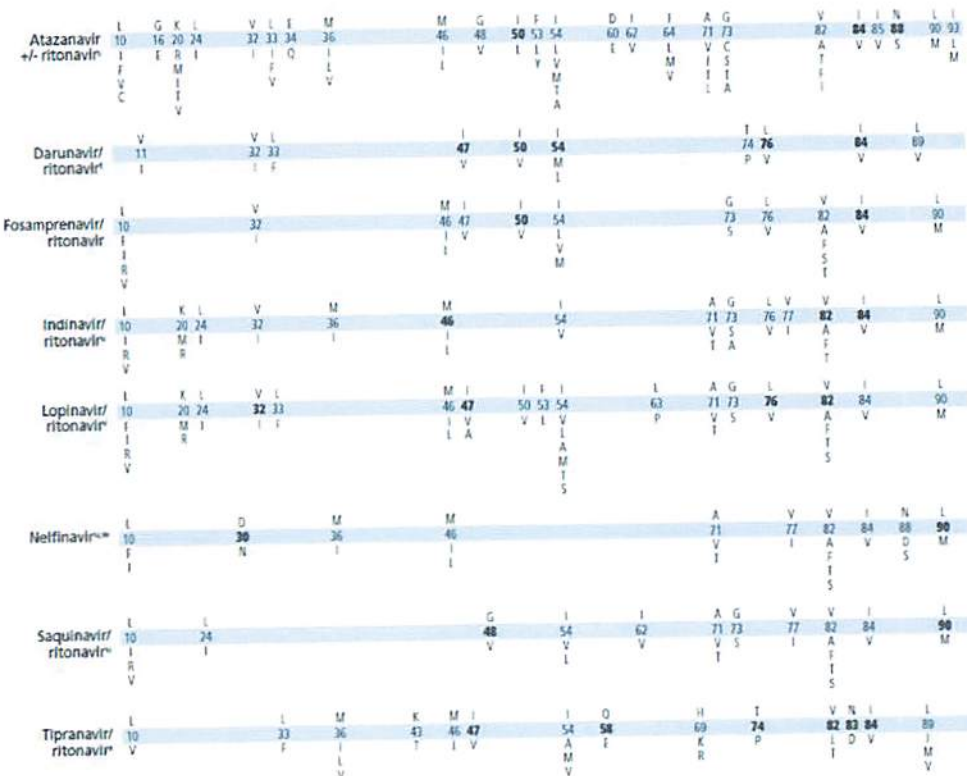
Beberapa contoh mutasi pada gen RT yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan NNRTI dimuat dalam **Gambar 5**, sedangkan resistensi terhadap ARV dari golongan NRTI dimuat dalam **Gambar 6**. Mutasi pada gen PR yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan inhibitor *protease* dimuat dalam **Gambar 7**.



**Gambar 5** Mutasi pada gen RT yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan NNRTI (Wensing *et al.*, 2014)



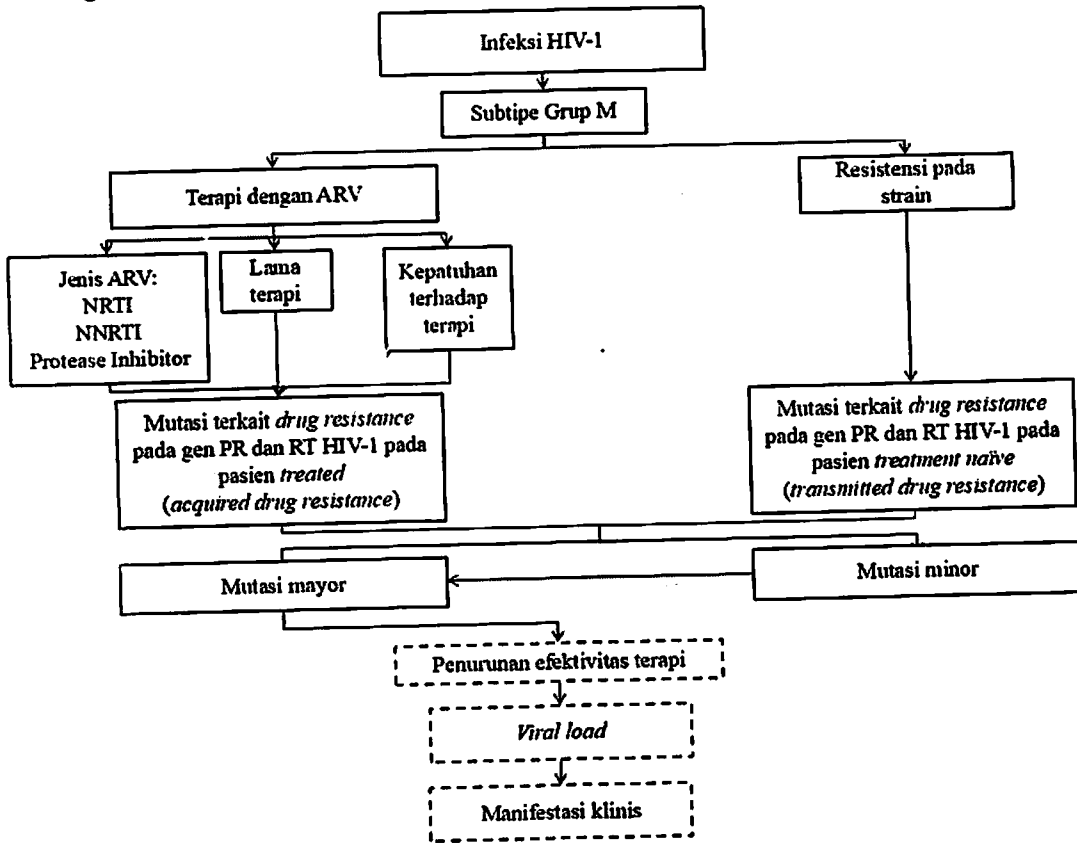
**Gambar 6** Mutasi pada gen RT yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan NRTI (Wensing *et al.*, 2014)



**Gambar 7** Mutasi pada gen PR yang berhubungan dengan resistensi terhadap ARV dari golongan inhibitor protease (Wensing *et al.*, 2014)

Huruf di baris atas menunjukkan asam amino pada *wildtype*, sedangkan huruf di baris bawah menunjukkan substitusi asam amino yang menyebabkan terjadinya resistensi. Angka menunjukkan posisi asam amino pada gen, sedangkan tanda panah mengindikasikan adanya insersi (Wensing *et al.*, 2014).

**Kerangka konsep penelitian**



Keterangan : - - - - - = Aspek yang tidak diteliti

**Gambar 8 Kerangka Konseptual Penelitian**

## BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

## Tujuan Penelitian

## 1. Tujuan Umum

Mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* dan *reverse transcriptase* pada pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kota Surabaya dan Kabupaten Buleleng, Bali.

## 2. Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi sub tipe HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.
2. Mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali.
3. Mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada Gen RT HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated* dengan berbagai manifestasi klinis di Kabupaten Buleleng, Bali?
4. Mengetahui keterkaitan antara sub tipe HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.
5. Mengetahui keterkaitan antara sub tipe HIV-1 dengan mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.
6. Mengetahui keterkaitan antara mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.

## Manfaat Penelitian

## 1. Manfaat teoritis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran teoritis mengenai hubungan antara sub tipe HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treatment naïve* dan *treated*.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran teoritis mengenai hubungan antara *drug resistance* pada gen *protease* dan *reverse*

*transcriptase* HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treatment naïve* dan *treated*.

## 2. Manfaat praktis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait sub tipe HIV-1 yang bersirkulasi di Kabupaten Buleleng, Bali, sehingga dapat dijadikan salah satu bahan pertimbangan untuk pengembangan terapi HIV/AIDS berbasis sub tipe virus yang menginfeksi.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1 pada pasien *treatment naïve* dan *treated*, sehingga dapat dijadikan salah satu bahan pertimbangan dalam pemberian terapi dengan obat-obatan *anti-retroviral* (ARV).
3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pertimbangan untuk pembuatan produk kebijakan terkait pemeriksaan dan terapi HIV berbasis sub tipe virus yang menginfeksi dan mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* dan *reverse transcriptase* HIV-1.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan studi observasional analitik, dengan pendekatan *cross sectional study*, yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengetahui persentase subtype HIV-1 yang bersirkulasi serta mengetahui mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* dan *reverse transcriptase* pada pasien HIV-1 positif *treatment naive* maupun *treated*.

Pengambilan sampel penelitian dilakukan di RSUD Kabupaten Buleleng Bali. Isolasi DNA sampel dan tahapan *genotyping* berupa amplifikasi dengan PCR dilakukan di *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya, sedangkan sekuensing dilakukan di *Macrogen*, Jepang. Penelitian ini akan dimulai pada tahun 2016 dan berakhir pada tahun 2019.

### Bahan Penelitian

bahan untuk pengambilan sampel darah meliputi *disposable syringe* 3 mL steril, *handscoen*, *alcohol swab*, masker, dan lembar *informed consent*. Bahan yang digunakan untuk preparasi sampel darah antara lain tabung EDTA (*lavender top*), tabung *Falcon* 15 mL, *yellow tip* (200  $\mu$ L), tabung mikrosentrifus 1,5 mL, dan sampel darah (*whole blood*). Transportasi sampel darah dari RSUD Kabupaten Buleleng, Bali, dilakukan dengan menggunakan *dry ice* dan *ice pack*.

Isolasi DNA dilakukan dengan bahan berupa sampel darah, dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (*Promega*, Amerika Serikat, no. katalog Z3100). Bahan habis pakai yang diperlukan antara lain *yellow tip* (200  $\mu$ L), *blue tip* (1.000  $\mu$ L), dan tabung mikrosentrifus 1,5 mL.

Untuk amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR, diperlukan primer seperti yang tertera pada **Tabel 3** dan **Tabel 4**, hasil isolasi DNA, dan *GoTaq Green Master Mix* (*Promega*, no. katalog M7122). Bahan habis pakai yang diperlukan antara lain *white tip* (10 $\mu$ L), *yellow tip* (200  $\mu$ L), dan *PCR tube*. Alat dan bahan yang diperlukan untuk elektroforesis antara lain *white tip* (10  $\mu$ L), 1,5% agarose (dalam larutan TAE 0,5X), *buffer* TAE 0,5X, dan *ethidium bromide* untuk *gel staining*. Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*

(Promega, no. katalog A9281). Produk PCR yang telah dipurifikasi kemudian dikirim untuk sekuensing dengan menggunakan *tube* PCR dan *ice pack*.

**Tabel 3** Primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen PR pada HIV-1

Primer	Sekuens (5' ke 3')	Posisi HXB2	Panjang Amplikon
DRPRO5	5'-AGACAGGYTAATTTTTAGGGA-3'	2074-2095	642 bp
DRPRO2L	5'-TATGGATTTTCAGGCCCAATTTTTGA-3'	2716-2691	
DRPRO1M	5'-AGAGCCAACAGCCCCACCAG-3'	2148-2167	463 bp
DRPRO6	5'-ACTTTTGGGCCATCCATTCC-3'	2611-2592	

Sumber: Kotaki *et al.*, 2013

**Tabel 4** Primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen RT pada HIV-1

Primer	Sekuens (5' ke 3')	Posisi HXB2	Panjang Amplikon
RT1L	5'-ATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT-3'	2388-2410	2.014 bp
GPR2M	5'-GGACTACAGTCYACTTGTCCATG-3'	4402-4380	
RT7L	5'-GACCTACACCTGTCAACATAATTGG-3'	2485-2509	1.824 bp
GPR3L	5'-TTAAAATCACTARCCATTGYTCTCC-3'	4309-4285	

Sumber: Kotaki *et al.*, 2013

### Alat Penelitian

Transportasi sampel plasma dilakukan dengan menggunakan *cooling box*. Isolasi DNA dilakukan dengan instrumen antara lain sentrifugator, *micropipettor*, dan *bio-safety cabinet*. Sampel DNA yang belum terpakai disimpan dalam *freezer -80°C*. Amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR, dilakukan dengan *micropipettor* dan *thermal cycler*. Sedangkan untuk elektroforesis, digunakan apparatus gel elektroforesis dan *transilluminator* sinar UV.

### Prosedur Penelitian

#### Tahap persiapan penelitian

1. Penandatanganan *informed consent* dan pengambilan sampel darah (*whole blood*)

Pengambilan sampel hanya dilakukan kepada pasien HIV-positif yang berkunjung ke klinik RSUD Kabupaten Buleleng, Bali, yang bersedia terlibat dalam penelitian dan bersedia menandatangani *informed consent* sebelum pengambilan sampel darah. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan menggunakan spuit 5 mL, dengan

prosedur yang berlaku di RSUD Kabupaten Buleleng. Darah yang dikumpulkan kurang lebih sebanyak 5 mL.

## 2. Pengumpulan data sekunder

Data dasar pasien, data riwayat penyakit pasien yang memuat manifestasi klinis infeksi HIV, dan data riwayat pengobatan pasien diperoleh dari rekam medis.

## 3. Transportasi sampel plasma dari Kabupaten Buleleng

Sampel darah ditransportasikan dari Kabupaten Buleleng, Bali, ke ITD Universitas Airlangga, Surabaya, dengan menggunakan *cool box* yang berisi *dry ice* dan *cool pack*. Tabung penyimpanan dipastikan tertutup rapat, sedangkan *cool box* diberi penanda *biohazard*.

### Tahap pelaksanaan penelitian

#### 1. Genotyping gen PR dan RT

Metode *genotyping* tidak hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada gen RT dan PR, tetapi juga untuk mengidentifikasi subtype dari HIV-1. Prosesnya meliputi amplifikasi materi genetik dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing nukleotida.

##### 1.1 Isolasi DNA dan amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR

*Proviral-DNA* HIV-1 diekstraksi dari sampel darah dengan menggunakan *Promega Genomic DNA Purification Kit*, sesuai dengan prosedur yang dianjurkan oleh produsen. Amplifikasi materi genetik HIV-1 dilakukan dengan metode *nested PCR*, yang meliputi *first round* dan *second round PCR*.

Untuk *first PCR*, 12,5  $\mu\text{L}$  *GoTaq® Green Master Mix 2X*, 1  $\mu\text{L}$  primer *forward*, 1  $\mu\text{L}$  primer *reverse*, 5  $\mu\text{L}$  cDNA, dan 5,5  $\mu\text{L}$  *Nuclease-Free Water* dicampurkan pada tabung PCR. Untuk *second PCR*, 12,5  $\mu\text{L}$  *GoTaq® Green Master Mix 2X*, 1  $\mu\text{L}$  primer *forward*, 1  $\mu\text{L}$  primer *reverse*, 2  $\mu\text{L}$  produk *first PCR*, dan 8,5  $\mu\text{L}$  *Nuclease-Free Water* dicampurkan pada tabung PCR.

*First PCR* dan *second PCR* dilakukan dengan *thermal cycler* yang diprogram sebagai berikut:

<i>Protease</i>				
	<i>First PCR</i>		<i>Second PCR</i>	
<i>Initial denaturation</i>	94°C 1 menit		94°C 1 menit	
	94°C 1 menit	35 siklus	94°C 30 detik	35 siklus
	52°C 30 detik		57°C 30 detik	
	72°C 1 menit		72°C 30 detik	
<i>Final extension</i>	72°C 5 menit		72°C 5 menit	

<i>Reverse transcriptase</i>				
	<i>First PCR</i>		<i>Second PCR</i>	
<i>Initial denaturation</i>	94°C 1 menit		94°C 1 menit	
	94°C 30 detik	35 siklus	94°C 30 detik	35 siklus
	57°C 30 detik		52°C 30 detik	
	72°C 2 menit		72°C 2 menit	
<i>Final extension</i>	72°C 5 menit		72°C 5 menit	

Tabung PCR diletakkan ke dalam *thermal cycler* dan jalankan program *cycling*. Setelah amplifikasi, produk PCR dapat disimpan semalam pada suhu 4°C, atau pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka panjang.

## 2.2 Elektroforesis

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis untuk memastikan keberhasilan amplifikasi materi genetik virus. Media yang digunakan adalah gel agarose 0.8% pada buffer TBE. *Ethidium bromide* (0.5 µg/mL) dan *marker* ditambahkan pada gel agarose. Sebelum dimasukkan ke dalam *pre-formed wells* agarose, dilakukan penambahan *loading dye* ke dalam produk PCR. Pita DNA kemudian divisualisasi di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 302 nm (Jacobs, 2005).

### 1.2 Sekuensing

Sekuensing dilakukan terhadap produk PCR yang hasil elektroforesisnya positif. Sebelum sekuensing, dilakukan purifikasi produk PCR. Purifikasi produk PCR dengan menggunakan *Promega Wizard Gel and PCR Clean-Up System*, sesuai dengan prosedur yang dianjurkan manufaktur. Hasil purifikasi produk PCR kemudian dielektroforesis untuk mengetahui keberhasilan tahap purifikasi. Apabila elektroforesis menunjukkan

hasil positif, maka produk PCR yang telah dipurifikasi dikirim ke *Macrogen*, Korea Selatan, untuk dilakukan sekuensing dengan menggunakan salah satu primer *second* PCR. Produk yang telah dipurifikasi sebanyak 10  $\mu$ L dalam PCR *tube* dikirimkan dalam wadah tertutup berisi *ice pack*. Elektroferogram dan sekuens DNA hasil sekuensing yang diperoleh dari *Macrogen* kemudian digunakan untuk analisis data.

## 2. Identifikasi subtipe dan mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT

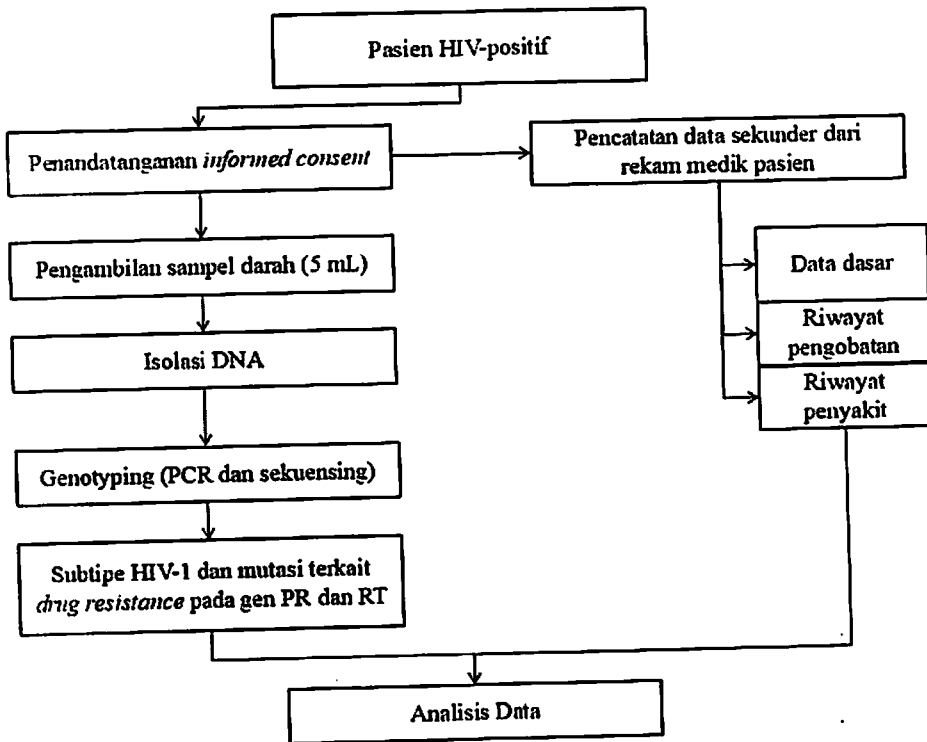
Database yang akan digunakan untuk mengidentifikasi mutasi terkait *drug resistance* pada gen PT dan RT adalah database *International AIDS Society United States of America* (IAS-USA) (Wensing *et al.*, 2017). Identifikasi subtipe dilakukan dengan menggunakan *Recombinant Identification Program* yang tersedia secara *online* pada *website database* sekuens HIV ([www.hiv.lanl.gov/](http://www.hiv.lanl.gov/)) (Khairunisa *et al.*, 2014).

### Variabel Penelitian

Variabel yang akan diteliti antara lain pasien HIV-positif (*treatment naïve* dan *treated*), mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT HIV-1, subtipe HIV-1, serta manifestasi klinis pasien (ko-infeksi).

### Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian secara skematis yang diawali dengan persiapan penelitian hingga pengolahan data dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 9 Alur Penelitian

## BAB 5

## HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

**Pengumpulan sampel dari pasien *treatment naive* dan *treated***

Pengumpulan sampel *whole blood* dari pasien *treated* dilakukan pada bulan Agustus 2017, sementara pengumpulan sampel dari pasien *treatment naive* dilakukan selama bulan Februari hingga Maret 2018 di RSUD Kabupaten Buleleng, Bali. Sebanyak 63 pasien *treated* dan 36 pasien *treatment naive* bersedia terlibat dalam penelitian ini dan telah menandatangani *informed consent* sebagai bentuk persetujuan tertulis. Karakteristik pasien yang menjadi partisipan penelitian ini dimuat dalam Tabel 5 untuk pasien *treatment naive* dan Tabel 6 untuk pasien *treated*.

Kriteria inklusi pasien yang terlibat dalam penelitian ini antara sebagai berikut:

1. Pasien telah dikonfirmasi HIV-positif melalui pemeriksaan oleh tenaga kesehatan yang berwenang, sesuai prosedur yang berlaku di RSUD Kabupaten Buleleng.
2. Pasien berusia lebih dari 15 tahun.
3. Pasien *treatment naive* belum pernah sama sekali memperoleh terapi dengan obat-obatan *anti-retroviral* (ARV).
4. Pasien memiliki catatan medik yang memuat riwayat pemeriksaan dan pengobatan.
5. Pasien bersedia menjadi subjek penelitian dan menandatangani *informed consent*.

**Tabel 5** Karakteristik pasien *treatment naive*

Variabel	Parameter	Jumlah	Persentase
Jenis Kelamin	L	22	61,11%
	P	14	38,89%
Usia	15-19	4	11,11%
	20-24	6	16,67%
	25-29	8	22,22%
	30-34	8	22,22%
	35-39	6	16,67%
	40-44	3	8,33%
	45-49	1	2,78%

Tabel 6 Karakteristik pasien *treated*

Variabel	Parameter	Jumlah	Persentase
Jenis Kelamin	L	35	55,6%
	P	28	44,4%
Usia	15-19	1	1,59%
	20-24	6	9,52%
	25-29	13	20,63%
	30-34	11	17,46%
	35-39	11	17,46%
	40-44	11	17,46%
	45-49	6	9,52%
	50-54	2	3,17%
	55-59	1	1,59%
	≥60	1	1,59%
Jenis ARV	AZT 3TC NVP	36	57,14%
	AZT 3TC EFV	3	4,76%
	TDF 3TC EFV	3	4,76%
	3TC/NVP/d4T	21	33,33%
Lama terapi dengan ARV	<6 bulan	5	7,94%
	6-12 bulan	11	17,46%
	13-24 bulan	12	19,05%
	25-36 bulan	9	14,29%
	37-48 bulan	10	15,87%
	49-60 bulan	4	6,35%
	>60 bulan	12	19,05%
Riwayat ko-Infeksi <i>Tuberculosis</i> (Tb)	Riwayat ko-infeksi	18	28,57%
	Tidak ada riwayat ko-infeksi	45	71,43%

### Genotyping sampel

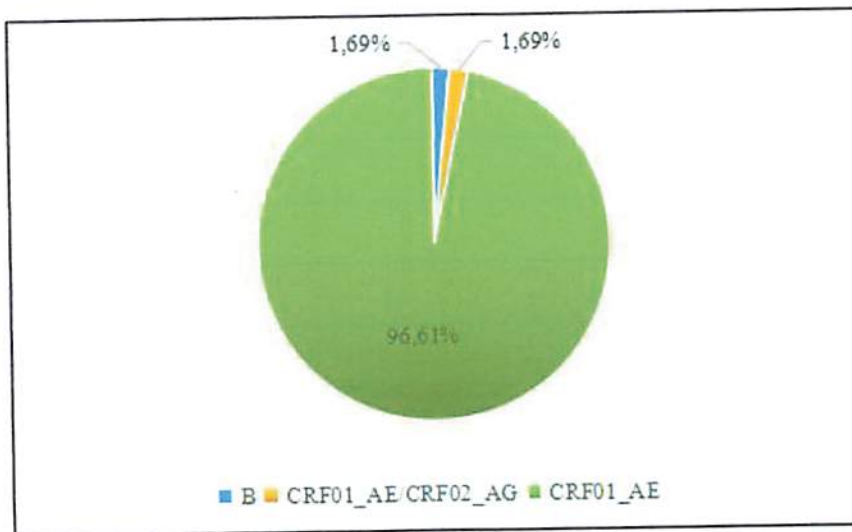
*Genotyping* berupa amplifikasi dengan PCR dan dilanjutkan dengan sekuensing dilakukan terhadap semua sampel yang diperoleh dari partisipan penelitian. Dari keseluruhan sampel yang diperoleh, 51 gen PR dan 45 gen RT dari 59 pasien *treated* serta 23 gen PR dan 29 gen RT dari 33 pasien *treated* berhasil diamplifikasi dan disekuensing. Keberhasilan amplifikasi dengan menggunakan PCR dibuktikan oleh hasil elektroforesis positif, yang mana hasil elektroforesis beberapa sampel dapat dilihat pada Lampiran 1. Elektroferogram hasil sekuensing beberapa sampel dapat dilihat pada Lampiran 2, yang mana sampel dengan hasil sekuensing yang baik akan menampilkan elektroferogram dengan *noise* yang minimal dan *peak* yang jelas. Hasil



sekuensing kemudian digunakan untuk identifikasi sub tipe dan mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT HIV-1.

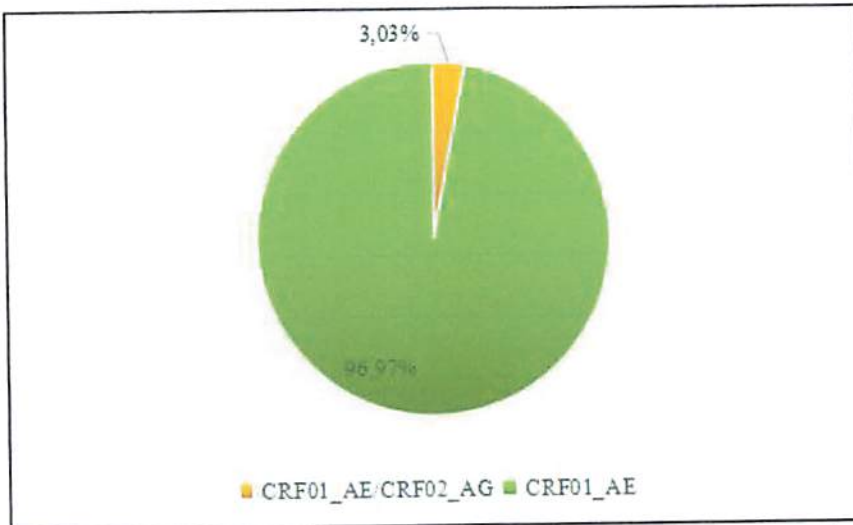
### Subtipe HIV-1 berdasarkan sekuens gen *protease* dan *reverse transcriptase*

*Subtyping* terhadap gen PR dan RT dilakukan dengan menggunakan *Recombinant Identification Program* (<http://hivdb.stanford.edu/hiv>), yang menunjukkan CRF01\_AE sebagai rekombinan yang dominan bersirkulasi di Kabupaten Buleleng, Bali. Rekombinan dan sub tipe lain yang teridentifikasi adalah kombinasi CRF02\_AG dan CRF01\_AE serta sub tipe B. Dari 59 pasien *treated*, 57 pasien (96,61%) terinfeksi CRF01\_AE, sedangkan 2 orang pasien masing-masing terinfeksi CRF01\_AE/CRF02\_AG (1,69%) dan sub tipe B (1,69%). Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien *treated* dapat dilihat pada **Gambar 6**.

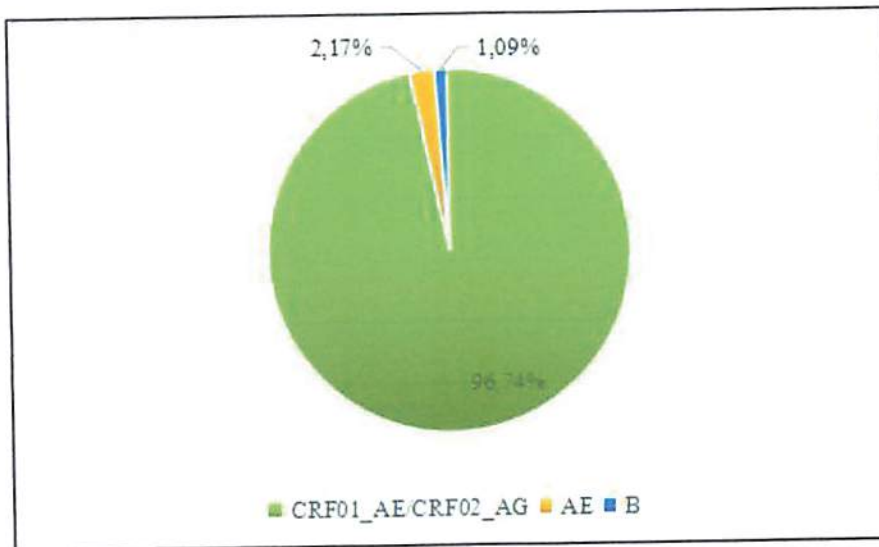


**Gambar 10** Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien *treated* (n=59)

Pada pasien *treatment naive*, dari 33 pasien, diketahui bahwa 32 pasien (96,97%) terinfeksi CRF01\_AE, sedangkan 1 pasien (3,03%) terinfeksi CRF01\_AE/CRF02\_AG. Secara keseluruhan, CRF01\_AE diketahui menginfeksi 89 pasien (96,47%), sedangkan CRF01\_AE/CRF02\_AG dan sub tipe B masing-masing menginfeksi 2 (2,17%) dan 1 pasien (1,09%). Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien *treatment naive* dan distribusi sub tipe HIV-1 pada keseluruhan pasien dapat dilihat pada **Gambar 7** dan **Gambar 8**.



**Gambar 11** Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien *treatment naive* (n=33)



**Gambar 12** Distribusi sub tipe HIV-1 pada pasien *treatment naive* dan *treated* (n=89)

Selain melakukan *subtyping* dengan menggunakan *Recombinant Identification Program*, juga dilakukan pembuatan pohon filogenetik (*neighbour joining tree*) berdasarkan sekuens gen PR dan RT. Pohon filogenetik sekuens gen PR dan RT pasien *treated* dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Hasil *subtyping* pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang sebelumnya telah dilakukan di Indonesia, antara oleh Kotaki *et al.* (2015) dan Khairunisa *et al.* (2015) di Surabaya, Witaningrum *et al.* (2016) di Papua Barat dan Yunifiar *et al.* (2017) di Papua, serta penelitian oleh Khairunisa *et al.* (2018) di Kepulauan Riau. Penelitian tersebut menunjukkan CRF01\_AE sebagai rekombinan yang paling dominan

bersirkulasi di Indonesia. Rekombinan CRF01\_AE juga merupakan rekombinan paling dominan di Asia Tenggara (Taylor *et al.*, 2008; Hemelaar *et al.*, 2011).

#### Analisis mutasi terkait *drug resistance* berdasarkan sekuens gen *protease* dan *reverse transcriptase* pada pasien *treatment naive* dan *treated*

Sekuens gen PR maupun RT dibandingkan dengan *database* dari IAS-USA tahun 2017, untuk mengetahui adanya mutasi mayor ataupun minor. Mutasi terkait *drug resistance* dikategorikan sebagai mutasi *major* jika dapat menurunkan kepekaan terhadap ARV secara substansial. Mutasi minor tidak memiliki efek substansial terhadap fenotip dari virus. Mutasi minor hanya dapat meningkatkan kemampuan replikasi virus yang memiliki mutasi *major*. Tahap kedua adalah menggunakan daftar mutasi yang teridentifikasi untuk memperkirakan kepekaan terhadap ARV tertentu (Shafer *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2005; Wensing *et al.*, 2014).

Seluruh sekuens gen PR pasien *treated* (51 pasien) diketahui memiliki mutasi minor, baik mutasi yang bersifat polimorfik pada subtype non-B maupun mutasi non-polimorfik yang terkait dengan resistensi terhadap ARV golongan inhibitor *protease*. Enam dari 45 pasien *treated* (13,33%) diketahui memiliki mutasi pada gen RT, yang mana empat (8,89%) diantaranya teridentifikasi memiliki mutasi mayor. Mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR maupun RT pada pasien *treated* dimuat pada Tabel 7 dan Tabel 8.

**Tabel 7** Mutasi terkait *drug resistance* pada gen *reverse transcriptase* pasien *treated*

Mutasi	Jenis Mutasi	Jumlah (n)/ Persentase
K65R	Major	1 (2.2%)
D67N	Major	1 (2.2%)
K70R	Major	1 (2.2%)
V90I	Minor	1 (2.2%)
A98G	Minor	1 (2.2%)
K101E	Major	1 (2.2%)
E138A	Major	1 (2.2%)
Y181C	Major	1 (2.2%)
M184V	Major	2 (4.44%)
Y188L	Major	1 (2.2%)
G190A	Major	3 (6.6%)
V106I	Minor	1 (2.2%)
V179D	Minor	1 (2.2%)

**Tabel 8** Mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* pasien *treated*

Mutasi	Jenis Mutasi	Jumlah (n)/ Persentase
L10I/F	Minor	7 (13,73%)
G16E	Minor	17 (33,33%)
K20R/I	Minor	24 (47,06%)
L33F	Minor	2 (3,92%)
M36I	Minor (polimorfik)	50 (98,04%)
I62V	Minor	3 (5,88%)
L63P	Minor	10 (19,61%)
H69K	Minor (polimorfik)	47 (92,16%)
V77I	Minor	8 (15,69%)
V82I	Minor	10 (19,61%)
L89MI	Minor	47 (92,16)
I93L	Minor	12 (23,53%)

Seperti halnya pada pasien *treated*, seluruh sekuens gen PR pasien *treatment naive* (23 pasien) diketahui memiliki mutasi minor, baik mutasi yang bersifat polimorfik pada subtype non-B maupun mutasi non-polimorfik yang terkait dengan resistensi terhadap ARV golongan inhibitor *protease*. Sembilan dari 29 pasien *treatment naive* (31,03%) diketahui memiliki mutasi pada gen RT, yang mana lima (17,2%) diantaranya teridentifikasi memiliki mutasi mayor. Mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR maupun RT pada pasien *treated* dimuat pada Tabel 9 dan Tabel 10.

**Tabel 9** Mutasi terkait *drug resistance* pada gen *reverse transcriptase* pasien *treatment naive*

Mutasi	Jenis Mutasi	Jumlah (n)/ Persentase
K219Q	Major	1 (3,44%)
V90I	Minor	1 (3,44%)
K103N	Major	1 (3,44%)
V106I	Minor	1 (3,44%)
E138G/A	Major	2 (6,89%)
V179D/F	Minor	2 (6,89%)
G190A	Major	1 (3,44%)

**Tabel 10** Mutasi terkait *drug resistance* pada gen *protease* pasien *treatment naive*

Mutasi	Jenis Mutasi	Jumlah (n)/ Persentase
L10I/V	Minor	9 (39,13%)
G16E	Minor	11 (47,82%)
K20R/I	Minor	9 (39,13%)
M36I	Minor (polimorfik)	23 (100%)
D60E	Minor	1 (4,34%)
L63P	Minor	6 (26,08%)
H69K	Minor (polimorfik)	21 (91,3%)
A71V	Minor	1 (4,34%)
V82I	Minor	3 (13,04%)
L89M/I	Minor	23 (100%)
I93L	Minor	8 (34,78%)

### Hubungan antara subtipe HIV-1, manifestasi klinis, dan mutasi terkait *drug resistance*

Delapan belas pasien *treated* (28,57%) diketahui memiliki riwayat manifestasi klinis berupa ko-infeksi *tuberculosis* (Tb). Berdasarkan hasil uji *Chi-Square*, diketahui bahwa manifestasi klinis berupa ko-infeksi Tb tidak berhubungan dengan subtipe HIV-1 yang menginfeksi pasien ( $p > 0,05$ ). Jika dihubungkan dengan adanya resistensi terkait *drug resistance* mayor pada gen RT, hasil uji *Spearman* menunjukkan bahwa ko-infeksi Tb juga tidak memiliki keterkaitan dengan resistensi mayor pada gen RT ( $p > 0,05$ ).

Dalam penelitian ini, semua sekuens gen RT diketahui merupakan CRF01\_AE, sehingga tidak dilakukan uji hubungan antara subtipe dengan adanya resistensi pada gen RT. Uji *Chi-square* menunjukkan bahwa subtipe HIV-1 tidak memiliki keterkaitan dengan adanya mutasi minor pada gen PR ( $p > 0,05$ ), utamanya karena semua sampel pasien (100%) diketahui memiliki mutasi minor pada gen PR.



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Secara keseluruhan, subtype HIV-1 yang teridentifikasi pada pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali, antara lain CRF01\_AE (96,47%), CRF01\_AE/CRF02\_AG (2,17%), dan subtype B (1,09%).
2. Ditemukan adanya mutasi minor terkait *drug resistance* pada Gen PR HIV-1 pada seluruh sampel pasien *treatment naïve* dan *treated*.
3. Ditemukan adanya mutasi mayor maupun minor terkait *drug resistance* pada Gen RT HIV-1 pada pasien *treatment naïve* maupun *treated*. Enam dari 45 pasien *treated* (13,33%) diketahui memiliki mutasi pada gen RT, yang mana empat (8,89%) diantaranya teridentifikasi memiliki mutasi mayor. Sembilan dari 29 pasien *treatment naïve* (31,03%) diketahui memiliki mutasi pada gen RT, yang mana lima (17,2%) diantaranya teridentifikasi memiliki mutasi mayor.
4. Tidak ditemukan adanya keterkaitan antara subtype HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.
5. Tidak ditemukan adanya keterkaitan antara subtype HIV-1 dengan mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 pasien *treatment naïve* dan *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali.
6. Tidak ditemukan adanya keterkaitan antara mutasi terkait *drug resistance* pada Gen PR dan RT HIV-1 dengan manifestasi klinis pasien *treated* di Kabupaten Buleleng, Bali?

### Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besar dan secara berkelanjutan, sehingga dapat diperoleh gambaran yang lebih akurat mengenai adanya mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT HIV-1, karena jumlah kumulatif infeksi HIV-1 yang masih terus meningkat tiap tahunnya.
2. Dalam penelitian ini, usia inklusi adalah  $\geq 15$  tahun. Perlu dilakukan penelitian terhadap pasien yang berusia  $< 15$  tahun, termasuk pasien infeksi HIV-1

pediatrik, sehingga dapat dilakukan identifikasi adanya mutasi terkait *drug resistance* pada gen PR dan RT HIV-1 pada populasi tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baeten, JM, Chohan, B, Lavreys, L, Chohan, V, McClelland, RM, Certain, L, Mandaliya, K, Jaoko, W, Overbaugh, J, 2007, 'HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads', *J Infect Dis*, vol. 195, pp.1177–1180.
- Baveja, UK, Verghese, A, Chattopadhyaya, D, Shivilal, 2008, 'Evaluation of levels of p24 antigen in HIV/AIDS cases and correlation with CD4 T cell counts', *JACM*, vol. 9, no. 2, pp. 103-107.
- Bonard, D, Rouet, F, Toni, TA, Minga, A, Huet, C, Ekouevi, DK, Dabis, F, Salamon, R, Rouzioux, C, 2003, 'Field evaluation of an improved assay using a heat-dissociated p24 antigen for adults mainly infected with HIV-1 CRF02\_AG strains in Co'te d'Ivoire, West Africa', *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 34, pp. 267–273.
- Burgisser, P, Vernazza, P, Flepp, M, Boni, J, Tomasik, Z, Hummel, U, Pantaleo, G, Schupbach, J, 2000, 'Performance of five different assays for the quantification of viral load in persons infected with various subtypes of HIV-1', *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 23, pp.138–144.
- Dinas Kesehatan Provinsi Bali 2013, 2014, *Profil kesehatan Provinsi Bali*, Dinas Kesehatan Provinsi Bali, Denpasar.
- Dougan, S, Patel, B, Tosswill, GH, Sinka, K, 2005, 'Diagnosis of HIV-1 and HIV-2 in England, Wales, and Northern Ireland associated with West Africa', *Sex Transm Infect*, vol.81, pp. 338–341.
- Easterbrook, PJ, Smith, M, Mullen, J, O'Shea, S, Chrystie, I, de Ruiter, A, Tatt, ID, Geretti, AM, Zuckerman, M, 2010, 'Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy', *Journal of the International AIDS Society*, vol. 13.
- Engelman, A, Cherepanov, P, 2012, 'The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights', *Microbiology*, vol.10, pp. 279-290.
- Fanale-Belasio, E, Raimondo, M, Suligo, B, Butto, S, 2010, 'HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview', *Ann Ist Super Sanità*, vol. 46, no. 1, pp. 5-14.
- Geretti, AM, Harrison, L, Green, H, Sabin, C, Hill, T, Fearnhill, E, Pillay, D, Dunn, D, 2009, 'Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy', *CID*, vol. 48, pp. 1296-1305.
- Hemelaar, J, Gouws, E, Ghys, PD, Osmanov, S, 2011, 'Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007', *AIDS*, vol. 25, pp. 679–689.
- Hemelaar, J, Gouws, E, Ghys, PD, Osmanov, S, 2006, 'Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004', *AIDS*, vol. 20, no. 16, pp. W13-W23.
- Ispas, D, Comanici, M, 2010, 'P24 antigen (detected by hypersensitive assays), a technical solution in HIV infection monitoring: review', *Revista Romana de Boli Infectioase*, vol. XII, no. 4, pp. 203-209.
- Jacobs, GB, 2005, 'Investigation of the molecular epidemiology of HIV-1 in Khayelitsha, Cape Town, using serotyping and genotyping techniques', *Thesis*, University of Stellenbosch.



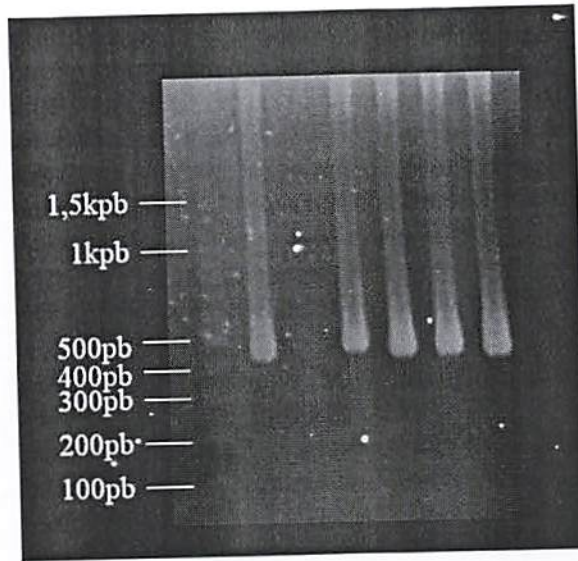


- John-Stewart GC, Nduati RW, Rousseau CM, Mbori-Ngacha, DA, Richardson, BA, Rainwater, S, Panteleeff, DD, Overbaugh, J, 2005, 'Subtype C is associated with increased vaginal shedding of HIV-1', *J Infect Dis*, vol. 192, no. 3, pp. 492-496.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2016, *Fact Sheet 2016*, diakses 13 Juli 2016, [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf).
- Kantor, R. dan Katzenstein, D. 2004. 'Drug resistance in non-subtype B HIV-1', *J Clin Virol* Vol.29: hlm.152-159.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI), 2012, *Pedoman nasional tatalaksana klinis infeksi HIV dan terapi antiretroviral pada orang dewasa dan remaja*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Khairunisa, SQ, Kotaki, T, Witaningrum, AM, Yunifiar M, MQ, Sukartiningrum, SD, Nasronudin, Kameoka, M, 2014, 'Appearance of drug resistance-associated mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 protease and reverse transcriptase derived from drug-treated Indonesian patients', *Aids Research and Human Retroviruses*, vol. 30, no. 00, pp. 1-5.
- Khairunisa S.Q., Kotaki T., Witaningrum A.M., Yunifiar M.Q., Sukartiningrum S.D., Nasronudin, Kameoka M. 2015. Appearance of Drug Resistance-Associated Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Reverse Transcriptase Derived from Drug-Treated Indonesian Patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. Vol.31(2). <http://doi.org/10.1089/aid.2014.0221>.
- Khairunisa S.Q., Masyeni S., Witaningrum A.M., Yunifiar M.Q., Indriati D.W., Kotaki T., Ueda S., Budiya D.G., Nasronudin, Kameoka M. 2018. Genotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolated in Bali, Indonesia in 2016. *HIV AIDS Rev*. Vol. 17(2). hal: 81-90.
- Khairunisa S.Q., Ueda S., Witaningrum A.M., Matondang M.Q.Y., Indriati D.W., Kotaki T., Nasronudin, Kameoka M. 2018. Genotypic Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Prevalent in Kepulauan Riau, Indonesia. *AIDS Research and Human Retroviruses*. Vol. 34(6) <http://doi.org/10.1089/aid.2018.0040>.
- Kiwanuka, N, Laeyendecker, O, Robb, M, Kigozi, G, Arroyo, M, McCutchan, F, Eller, LA, Eller, M, Makumbi, F, Birx, D, Wabwire-Mangen, F, Serwadda, D, Sewankambo, NK, Quinn, TC, Wawer, M, Gray, R, 2008, 'Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection', *J Infect Dis*, vol. 197, pp. 707-713.
- Korber, B, Gaschen, B, Yusim, K, Thakallapally, R, Kesmir, C, Detours, V, 2001, 'Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation', *Br Med Bull*, vol. 58, no. 19, pp. 19-42.
- Kotaki, T, Khairunisa, SQ, Sukartiningrum, SD, Arfijanto, M, Utsumi, T, Normalina, I, Handajani, R, Widiyanti, P, Rusli, M, Rahayu, RP, Lusida, MI, Hayashi, Y, Nasronudin, Kameoka, M, 2013, 'High prevalence of HIV-1 CRF01\_AE viruses among female commercial sex workers residing in Surabaya, Indonesia', *PLoS One*, vol. 8, no. 12.
- Kotaki, T, Khairunisa, SQ, Witaningrum, AM, Yunifiar M, MQ, Sukartiningrum, SD, Diansyah, MN, Rahayu, RP, Nasronudin, Kameoka, M, 2015, 'HIV-1 transmitted drug resistance mutations among antiretroviral therapy-naïve individuals in Surabaya, Indonesia', *AIDS Res Ther*, vol. 12, no. 5.

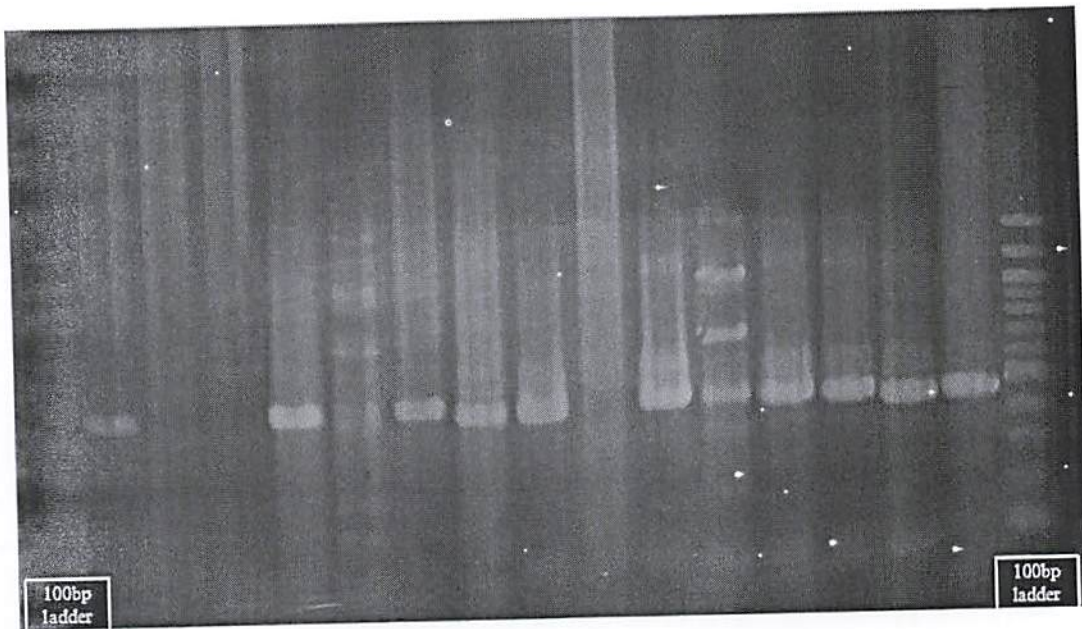
- Ledergerber, B, Flepp, M, Boni, J, Tomasik, Z, Cone, RW, Luthy, R, Schupbach, J, 2000, 'Human Immunodeficiency Virus type 1 p24 concentration measured by boosted ELISA of heat-denatured plasma correlates with decline in CD4 cells, progression to AIDS, and survival: comparison with Viral RNA measurement', *Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, pp. 1280-1287.
- Lindstrom, A, Albert, J, 2003, 'A simple and sensitive 'in-house' method for determining genotype drug resistance in HIV-1', *J Virol. Methods*, vol. 107, pp. 45-51.
- Merati, TP, Ryan, CE, Spelman, T, Wirawan, DN, Bakta, IM, Otto, B, Oelrichs, RB, Crowe, SM, 2012, 'CRF01\_AE dominates the HIV-1 epidemic in Indonesia', *Sexual Health*, vol. 9, no. 5, pp. 414-421.
- Moore, JP, Parren, PW, Barton, DR, 2001, 'Genetic subtypes humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development', *J Virol*, vol. 75, pp. 5721-5729.
- Nasronudin, 2014; *HIV & AIDS; Pendekatan biologi molekuler, klinis, dan sosial edisi 2*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Nasronudin, Lusida, MI, Handajani, R, Lindawati, Efendi, F, Utsumi, T, 2010, 'Analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada pasien di Surabaya, Jawa Timur', *Maj Kedokt Indon*, vol. 60, no. 4, pp. 172-177.
- Neilson, JR, John, GC, Carr, JK, Lewis, P, Kreiss, JK, Jackson, S, Nduati, RW, Mbori-Ngacha, D, Panteleeff, DD, Bodrug, S, Giachetti, C, Bott, MA, Richardson, BA, Bwayo, J, Ndinya-Achola, J, Overbaugh, J, 1999. 'Subtypes of Human Immunodeficiency Virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya', *J Virol*, vol. 73, no. 5, pp. 4393-4403.
- Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI (Pusdatin Kemenkes RI), 2014, *Situasi dan Analisis HIV AIDS*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta Selatan.
- Rajarapu, G, 2014, 'Genes and genome of HIV-1', *J Phylogen Evolution Biol*, vol. 2, no. Issue 1.
- Renjifo, B, Gilbert, P, Chaplin, B, Msamanga, G, Mwakagile, Fawzi, W, Essex, M, 2004, 'Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D', *AIDS*, vol. 18, pp.1629-1636.
- Taylor, BS, Sobieszczyk, ME, McCutchan, FE, Hammer, SM, 2008, 'The challenge of HIV-1 subtype diversity', *N Engl J Med*, vol. 358, no. 15, pp. 1590-1602.
- Tehe, A, Maurice, C, Hanson, DL, Borget, MY, Abiola, N, Marana, M, Yavo, D, Tomasik, Z, Boni, J, Schupbach, J, Nkengasong, JN, 2006, 'Quantification of HIV-1 p24 by a highly improved ELISA: an alternative to HIV-1 RNA based treatment monitoring in patients from Abidjan, Cote d'Ivoire', *Journal of Clinical Virology*, vol. 37, pp. 199-205.
- Thermo Fisher Scientific, 2011, *Assessment of Nucleic Acid Purity*, diakses 26 Oktober 2016, [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com).
- Van den Eede, P, Van Wesenbeeck, L, Verlinden, Y, Feyarts, M, Smits, V, Verheyen, A, Vanhooren, L, Deloof, A, Villacian, J, Pattery, T, 2013, 'HIV-1 genotyping of the protease-reverse transcriptase and integrase genes to detect mutations that confer antiretroviral resistance', *Antiviral Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, vol. 1030, pp. 37-55.
- Widiyanti, M, Wibawa, T, Wibowo, HA, 2014, 'Subtypes and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus-1 in Jayapura', *Universa Medicina*, vol.33, no. 1, pp. 150-157.

- Witaningrum A.M., Kotaki T., Khairunisa S.Q., Yunifiar M.Q., Indriati D.W., Bramanthi R., Nasronudin, Kameoka M. 2016. Genotypic Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derived from Antiretroviral Therapy-Naive Individuals Residing in Sorong, West Papua. *AIDS Research and Human Retroviruses*. Vol. 32(8). <http://doi.org/10.1089/aid.2016.0054>.
- World Health Organization (WHO), 2005, *Interim WHO clinical staging of HIV/AIDS and HIV/AIDS case definitions for surveillance*, WHO African Region.
- World Health Organization (WHO), 2007, *Laboratory guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS*, WHO Regional Office for South-East Asia, New Delhi.
- Yang, C, Liu, S, Zhang, T, Hou, Y, Liu, X, Gao, Y, Yang, G, Wang, Z, Chen, H, Li, M, Zhu, Z, 2012, 'Transmitted antiretroviral drug resistance and thumb subdomain polymorphisms among newly HIV type 1 diagnosed patients infected with CRF01\_AE and CRF07\_BC virus in Guangdong Province', China, *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 28, no. 12, pp. 1723-1728.
- Yerly, S, von Wyl, V., Ledergerber, B., et al. 2007. 'Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey', *AIDS* Vol.21(Issue 16): hlm. 2223-2229.
- Yunifiar M.Q., Kotaki T., Witaningrum A.M, Khairunisa S.Q., Indriati D.W., Meilani, Yeheskiel T., Ueda S., Nasronudin, Kameoka M. 2017. Sero- and Molecular Epidemiology of HIV-1 in Papua Province, Indonesia. *Acta Medica Indonesiana*. Vol. 49(3).

LAMPIRAN 1

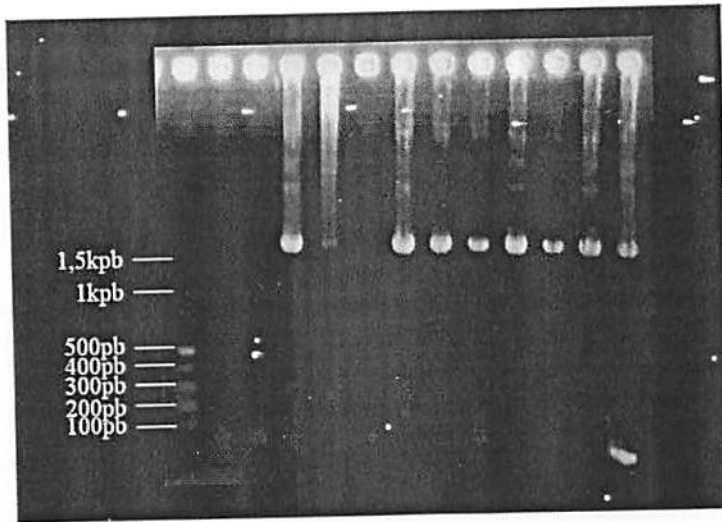


Elektroforesis hasil amplifikasi PCR gen *protease* (463 bp) pasien *treatment naive*



Elektroforesis hasil amplifikasi PCR gen *protease* (463 bp) pasien *treated*

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

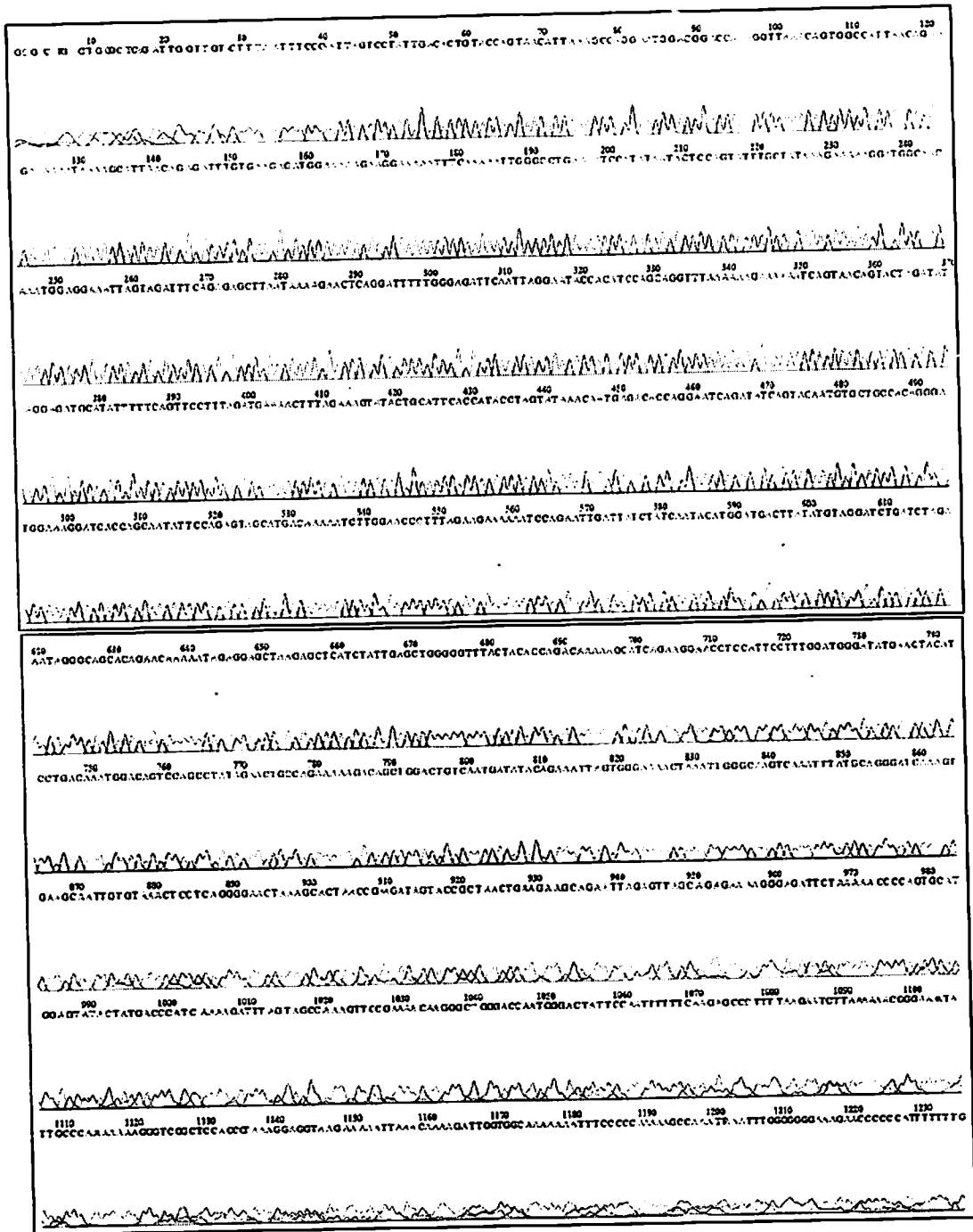


Elektroforesis hasil amplifikasi PCR gen *reverse transcriptase* (1824 bp) pasien *treatment naive*

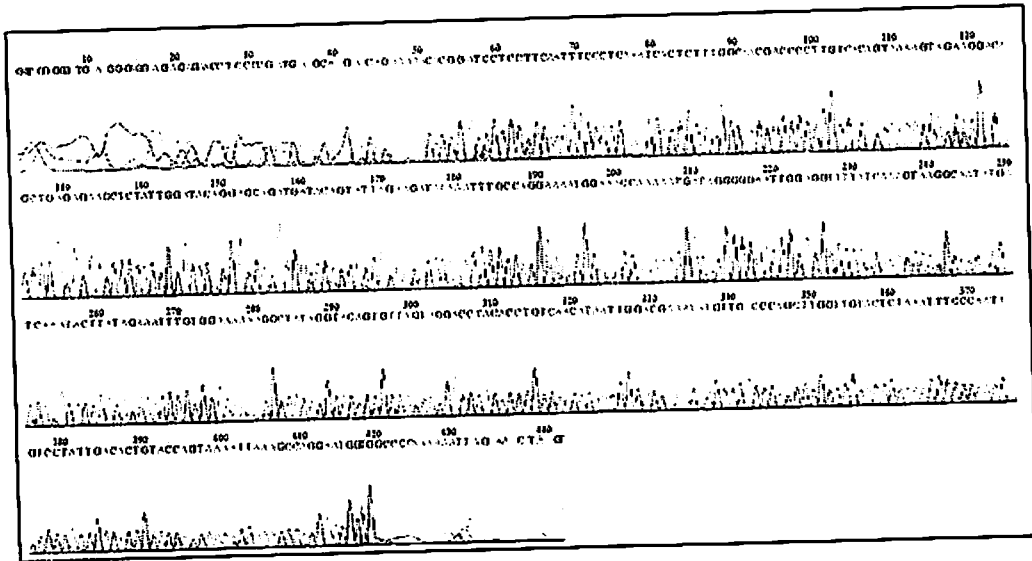


Elektroforesis hasil amplifikasi PCR gen *reverse transcriptase* (1824 bp) pasien *treated*

LAMPIRAN 2

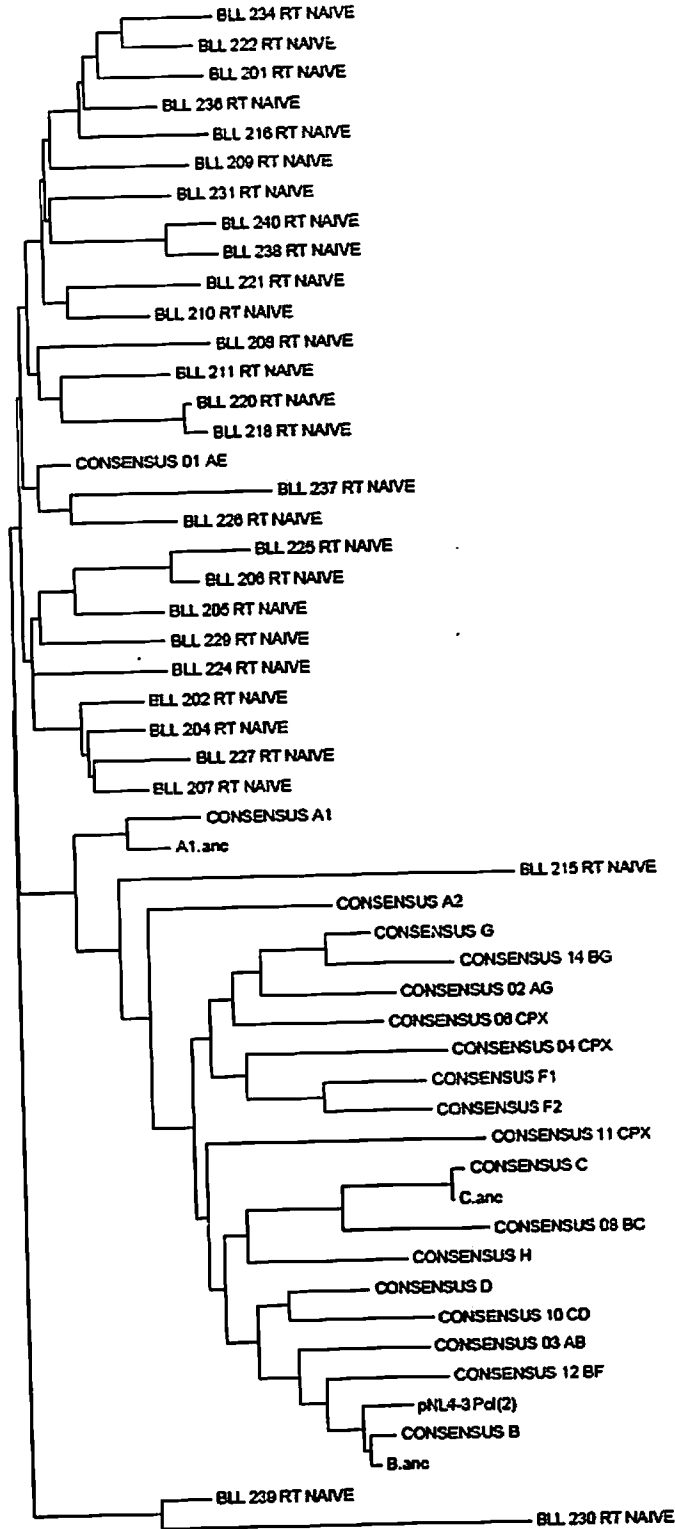


Hasil sekuensing gen reverse transcriptase terhadap sampel dengan kode nomor 213



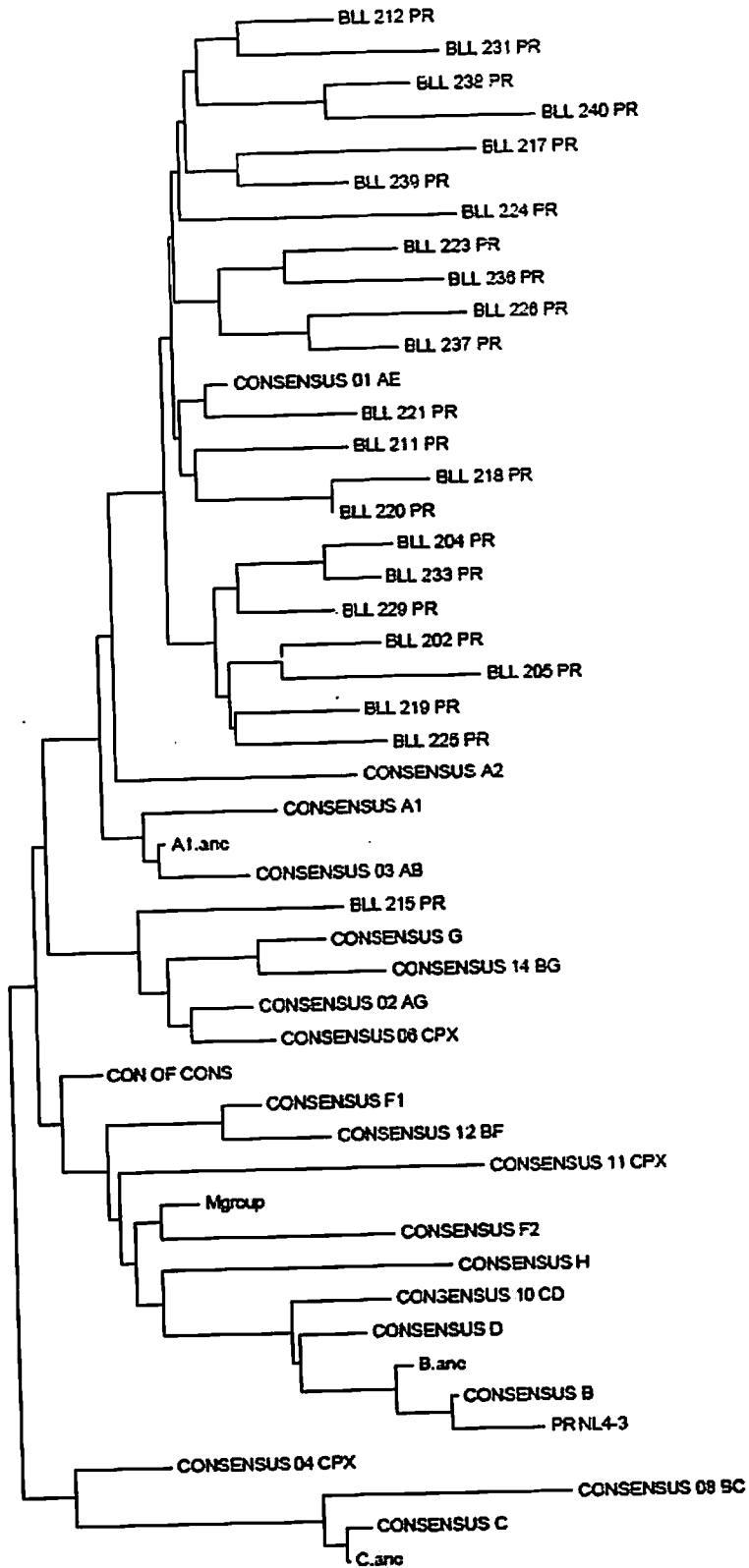
Hasil sekuensing gen *protease* terhadap sampel dengan kode nomor 213

LAMPIRAN 3

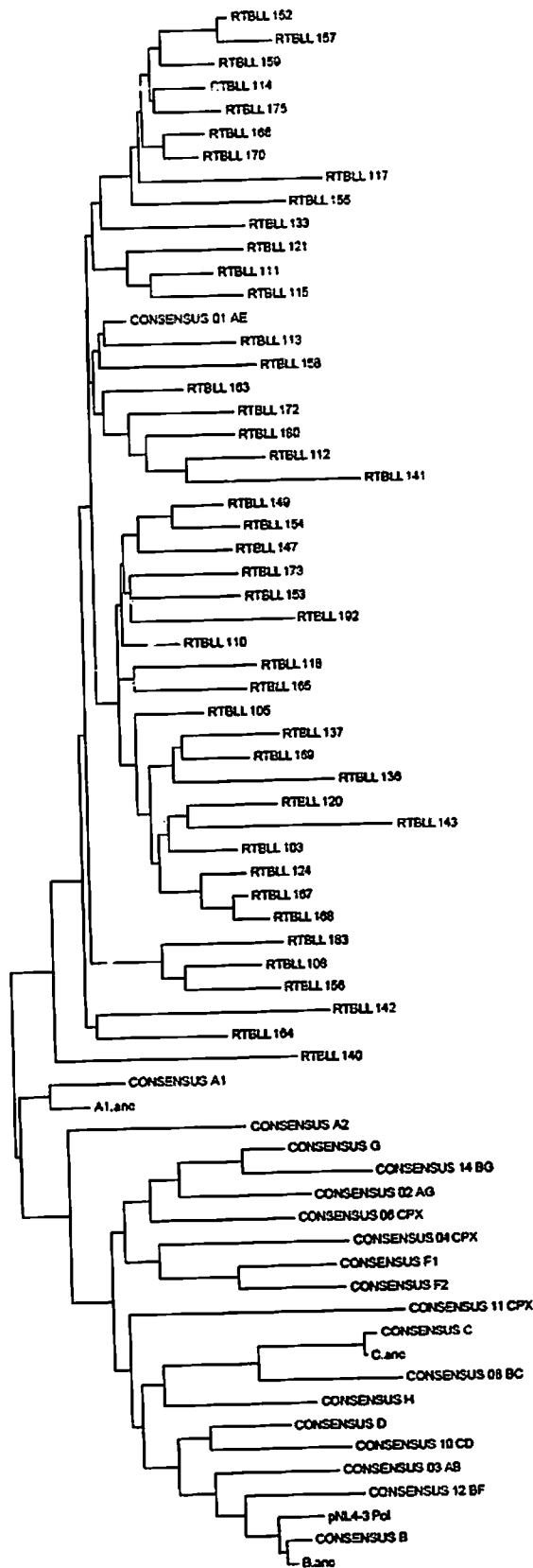


Pohon filogenetik gen reverse transcriptase HIV-1 pasien treatment naive

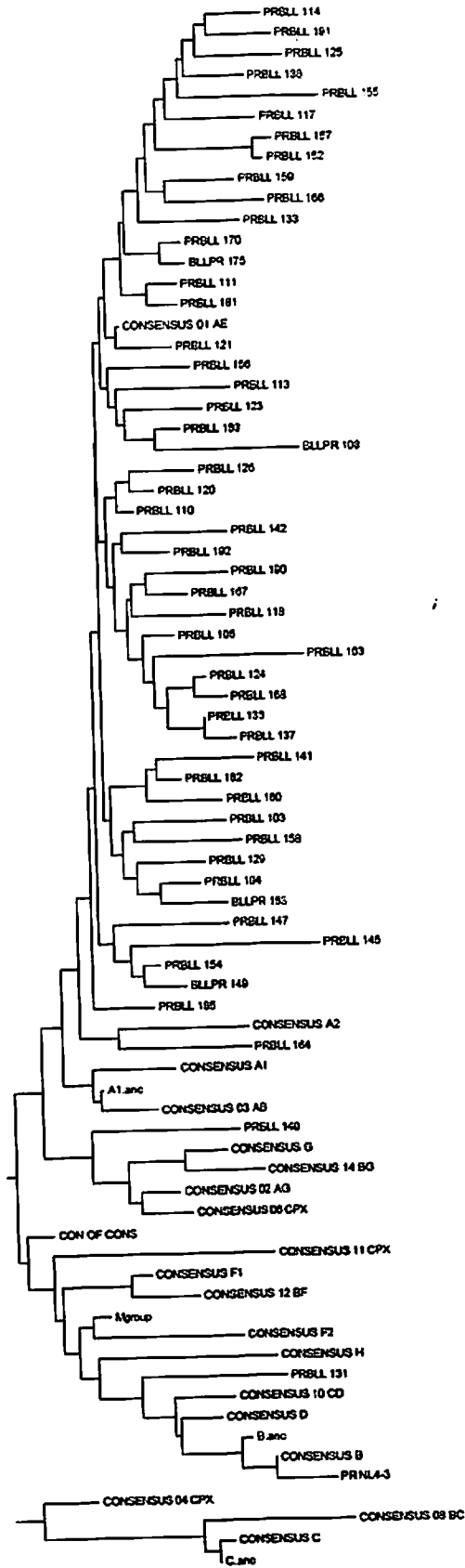




Pohon filogenetik gen *protease* HIV-1 pasien *treatment naive*



Pohon filogenetik gen reverse transcriptase HIV-1 pasien treated



Pohon filogenetik gen *protease* HIV-1 pasien *treated*

