

FAA
FK
LP/59/10

Ana

LAPORAN PENELITIAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL
BATH III
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ANALISIS MOLEKULER *PHYLOGENETIC*
HUMAN IMMUNODEFICINCY VIRUS (HIV)
DARI PENDERITA YANG TERINFEKSI HIV
DI SURABAYA JAWA TIMUR

Maria Inge Lusida
Nasronudin
Retno Handajani
Lindawati
Ferry Efendi
Takako Utsumi

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif
Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch III,
Nomor: 690/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 26 Oktober 2009

INSTITUTE OF TROPICAL DISEASE
UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Analisis Molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada Penderita Yang Terinfeksi HIV Di Surabaya Jawa Timur

Ketua Peneliti

- a. Nama : dr. Maria Inge Lusida, M.Kes, Ph.D, SpMK
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 1958 09 17 1986 03 20 01
- d. Jabatan struktural : Sekretaris Institute of Tropical Disease Unair
- e. Jabatan Fungsional : 1. Dosen di Dep. Mikrobiologi
2. Peneliti di Institute of Tropical Disease
- f. Unit Kerja : 1. FK UNAIR / Pascasarjana Ilmu Kedokteran Tropis
2. Institute of Tropical Disease (ITD) UNAIR, Surabaya
- g. Alamat surat : Institute of Tropical Disease Kampus C Unair,
Jl.Mulyorejo, Surabaya
- h. Telepon/Fax : (031) 5992445 – (031) 5992446 Fax. (031) 5992445
- i. Alamat Rumah : Jl. Mojoarum VI / 17-D Surabaya.
- j. Telpon/Faks/E-mail : 081 230 37 884,
e-mail: ingelsd@sby.centin.net.id

b Mitra Kerjasama Internasional

Nama : Takako Utsumi, Ph.D
Institusi : Kobe University, Jepang

c Jangka Waktu Penelitian: 1 tahun

d Pembiayaan

Jumlah biaya yang diberikan Dikti : Rp 140.000.000,-

Surabaya, 1 Desember 2009

Mengetahui,
Kepala
Institute of Tropical Disease



Dr.dr.Nasronudin,Sp.PD-KPTI
NIP : 140 159 073

Ketua Peneliti,



dr. Maria Inge Lusida, M.Kes, PhD, Sp.MK
NIP : 1958 09 17 1986 03 20 01

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan
Pengabdian kepada Masyarakat Unair



Prof.Dr.Bambang Sektiari L.,DEA,drh
NIP : 131 837 004

I. IDENTITAS PENELITIAN

1. **Judul Penelitian** : Analisis Molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada Penderita Yang Terinfeksi HIV Di Surabaya Jawa Timur.

2. Ketua Peneliti

- a. Nama : dr. Maria Inge Lusida, M.Kes, Ph.D, SpMK
b. Bidang Keahlian : Mikrobiologi
c. Jabatan struktural : Sekretaris Institute of Tropical Disease Unair
d. Jabatan Fungsional : 1. Dosen di Dep. Mikrobiologi
2. Peneliti di Institute of Tropical Disease
e. Unit Kerja : 1. FK UNAIR / Pascasarjana Ilmu Kedokteran Tropis
2. Institute of Tropical Disease (ITD) UNAIR, Surabaya
f. Alamat surat : Institute of Tropical Disease Kampus C Unair,
Jl.Mulyorejo, Surabaya
g. Telepon/Fax : (031) 5992445 – (031) 5992446 Fax. (031) 5992445
h. Alamat Rumah : Jl. Mojoarum VI / 17-D Surabaya.
i. Telpon/Faks/E-mail : 081 230 37 884,
e-mail: ingelsd@sby.centin.net.id

3. Anggota peneliti

No.	Nama dan Gelar Akademik Tim Peneliti Indonesia	Bidang Keahlian	Fak / Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr.dr.Nasronudin,Sp.PD-KPTI	Dokter Spesialis Penyakit Dalam	FK / ITD	Unair
2.	Prof. Retno Handajani, dr, MS, PhD	Biologi Molekuler	FK / ITD	Unair
3.	dr. Lindawati A.S., M.Kes, SpMK	Ahli Mikrobiologi	FK / ITD	Unair
4.	Ferry Efendi, S.Kep, Ns	Keperawatan	F. Keperawatan	Unair
5.	Takako Utsumi, Ph.D	Biologi Molekuler	School of Medicine	Kobe University

4. **Objek penelitian** : darah penderita HIV koleksi ITD Unair, Surabaya.

5. Masa pelaksanaan penelitian:

- Mulai : September 2009
- Berakhir : 12 Bulan setelah usulan penelitian ini diterima

6. Anggaran yang diusulkan:

- Jumlah biaya yang diusulkan ke Dikti : Rp 200.000.000,-
Jumlah biaya yang disetujui Dikti : Rp 140.000.000,-

RINGKASAN

ANALISIS MOLEKULER *PHYLOGENETIC HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS* (HIV) PADA PENDERITA YANG TERINFEKSI HIV DI SURABAYA, JAWA TIMUR

Maria Inge Lusida^{1,5}, Nasronudin Lusida^{2,5}, Retno Handajani^{3,5},

Lindawati Lusida^{1,5}, Ferry Efendi^{4,5}, Takako Utsumi⁶.

Department of Microbiology¹, Department of Internal Medicine², and Department of Biochemistry³ Faculty of Medicine, Faculty of Nursery⁴, and Tropical Disease Center⁵, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, and Kobe University, Japan⁶.

Latar belakang: *Human Immunodeficiency Virus type 1* (HIV-1) diklasifikasikan kedalam 3 grup: **grup M** (*main*), **grup O** (*outlier*) dan **grup N** (*non-M/non-O*). Penyebab utama epidemi infeksi HIV di dunia adalah grup M, yang dalam *phylogenetic* selanjutnya dibagi menjadi 10 sub tipe atau clades, yaitu: A– D and F-K. Klasifikasi *phylogenetic* HIV-1 dapat dilakukan berdasar antara lain analisis sekuens daerah genom *gag p17* atau genom utuh HIV. Belum diketahui distribusi sub tipe HIV pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya, Jawa Timur.

Tujuan: Mendapatkan hasil analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya, Jawa Timur.

Metoda: Deteksi antibodi terhadap HIV-1 dilakukan dengan 3 teknik, yaitu: *paper strip*, dan *EIA (Acon)* serta *ELISA (Axiom)* dilakukan pada 51 sampel plasma penderita *suspect* HIV di Surabaya, Jawa Timur. Deteksi RNA HIV dilakukan dengan *One Step Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR) Test (Invirogen)* menggunakan pasangan *primer* berdasar gen *gag* daerah *p17*. Hasil pemeriksaan PCR HIV yang positif di *sequencing* dan dianalisis menggunakan program *Genetyx 9 Version* untuk menentukan sub tipe HIV.

Hasil: *Antibody* terhadap HIV terdeteksi pada 96,08% (49/51) penderita *suspect* HIV dan RNA HIV terdeteksi pada 57,14% (28/49). Pada analisis selanjutnya dari 21 nukleotida gen *gag p17* HIV yang dianalisis, semua adalah CRF, terutama HIV sub tipe CRF01_AE, yang menempati satu cabang dengan HIV CRF01_AE yang berasal dari Asia, yaitu Thailand, Jepang, Malaysia, Cina dan Hongkong, kecuali satu sampel. Satu sampel tersebut mempunyai insersi 18 nukleotida nampaknya seperti sub tipe HIV yang baru, namun masih perlu diteliti lebih lanjut.

Kesimpulan: Dari gen *gag p17* HIV dalam penelitian ini, satu HIV mempunyai insersi 18 nukleotida dan sub tipe HIV di Surabaya, Jawa Timur terutama adalah CRF01-AE yang menempati cabang yang sama dengan sub tipe CRF01-AE HIV di Asia pada umumnya.

Kata kunci: Sub tipe HIV, gen *gag p17*, Surabaya, Indonesia.

SUMMARY

PHYLOGENETIC MOLECULAR ANALYSIS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) IN PATIENTS WITH HIV INFECTION, IN SURABAYA, EAST JAVA

Maria Inge Lusida^{1,5}, Nasronudin Lusida^{2,5}, Retno Handajani^{3,5},
Lindawati Lusida^{1,5}, Ferry Efendi^{4,5}, Takako Utsumi⁶.

Department of Microbiology¹, Department of Internal Medicine², and Department of Biochemistry³ Faculty of Medicine, Faculty of Nursery⁴, and Tropical Disease Center⁵, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, and Kobe University, Japan⁶.

Back ground: The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) isolates are classified in three main groups: **group M** (main), a **group O** (outlier) as well as a **group N** (non-M/non-O). The HIV-1 M group, responsible for the majority of infections in the HIV-1 worldwide epidemic, can be further subdivided into 10 recognized phylogenetic subtypes or clades, A – D and F-K. HIV-1 phylogenetic classifications are currently based on nucleotide sequences derived from such as *gag p17* region of the same isolates or on full-length genome sequence analysis. We do not know HIV subtype distribution in HIV suspected patients, in Surabaya, East Java.

The aims of this study was to do molecular analysis HIV in patients with HIV infection, in Surabaya, East Java.

Methods: Antibody to HIV were detected using 3 methods, paper and EIA (Acon) and ELISA (Axiom) techniques from 51 plasma obtained from the patients suspected HIV infection, in Surabaya, Indonesia. All of the samples were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) using pairs of primers based on HIV *gag p17* genes. The PCR positive samples were sequenced and analysed to identify the HIV subtype using Genetic Version 9 program.

Results: Forty nine (96,08%) HIV antibody were detected from 51 patients suspected HIV infection and 57,14,% (28/49) HIV DNA determination were positives. All of 21 positives HIV DNA except one sample that have been analyzed was CRFs of HIV with majority CRF01_AE subtype similar with HIV CRF01_AE subtype in Asia countries, e.g. Thailand, Japan, Malaysia, Cina and Hongkong. Those one sample has 18 nucleotides insertion look like a HIV new subtype but it is needed to confirm further.

Conclusions: From *gag p17* HIV gen in this study, one HIV has and CRF01-AE is majority HIV subtype in Surabaya, East Java which is located in the same branch with HIV common CRF01-AE HIV subtype in Asia.

Key words: HIV subtype, *gag p17* gene, Surabaya, Indonesia.

KATA PENGANTAR

Dengan tersusunnya laporan penelitian ini, penulis mengucapkan syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah memperkenankan penulis menyelesaikan penelitian judul penelitian: “Analisis Molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus (HIV)* pada Penderita Yang Terinfeksi HIV Di Surabaya Jawa Timur”.

Penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk bahan pertimbangan dalam upaya penanganan lebih lanjut maupun membatasi penyebaran dari infeksi HIV di Surabaya pada khususnya, maupun di Jawa Timur atau di Indonesia pada umumnya.

Atas terlaksananya penelitian ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt selaku Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA, Drh, selaku Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair, dan Dr. Nasronudin, Sp.PD, K-PTI, selaku ketua Lembaga Penyakit Tropis UNAIR dan yang memberikan materi penelitian, atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih yang tulus kepada semua anggota peneliti dan teknisi di Lembaga Penyakit Tropis UNAIR serta semua pihak yang telah memberikan bantuan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semua kebaikan-kebaikan ini.

Penulis

SISTEMATIKA LAPORAN PENELITIAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL
BATH III
TAHUN ANGGARAN 2009

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR IDENTITAS	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN	iii
<i>SUMMARY</i>	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
B. DAFTAR PUBLIKASI ILMIAH:	ix
Sedang dipersiapkan	

DAFTAR ISI

I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	2
II.1. Epidemiologi HIV/AIDS	2
II.2. Struktur HIV	3
II.3. Genoma HIV	3
II.4. Variabilitas Genetik HIV	5
II.5. Perkembangbiakan HIV	6
II.6. Pohon <i>Phylogenetic</i>	8
III. RUMUSAN MASALAH, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
III.1. RUMUSAN MASALAH	9
III.1. TUJUAN PENELITIAN	9
III.2. MANFAAT PENELITIAN	9
IV. METODE PENELITIAN	10
IV.1. Sampel darah	10
IV.2. Pemeriksaan laboratorium	10
IV.2.1. Pemeriksaan Anti HIV	10
IV.2.2. Pemeriksaan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) HIV	10
IV.2.2.1. Ekstraksi RNA HIV dari serum dan sintesis cDNA HIV	11
IV.2.2.2. Reaksi amplifikasi dengan PCR.	11
IV.2.2.3. Elektroforesis agar.	12
IV.2.2.4. Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis.	12
IV.2.3. Sequencing	12
IV.2.3.1. Purifikasi DNA HIV hasil PCR	12
IV.2.3.2. Elektroforesis agar hasil purifikasi DNA	12
IV.2.3.3. Purifikasi DNA HIV dari <i>low melting</i> agarosa	12
IV.2.3.4. <i>Labeling</i> DNA murni dengan PCR pro sequencing	13
IV.2.3.5. Purifikasi DNA hasil PCR <i>labeling</i> pro sequencing	13
IV.2.3.6. Elektroforesis dengan mesin <i>Sequencer</i> ABI 310	13
IV.3. Analisis <i>phylogenetic</i> hasil <i>sequencing</i>	13
IV.4. Lokasi penelitian	14
IV.5. Skema operasional penelitian	14
V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	15
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	24

VI.1. KESIMPULAN	24
VI.2. SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	28
LAMPIRAN 1. SARANA PENELITIAN	28
LAMPIRAN 1. 1. Laboratorium	28
LAMPIRAN 1. 2. Instrument yang dibutuhkan	28
LAMPIRAN 2. PERSONALIA DAN KUALIFIKASI TENAGA PENELITI	29
LAMPIRAN 3. DATA PASIEN PENELITIAN RISET STRANAS 2009	32
DAFTAR TABEL	
Tabel. 1 : Jenis kelamin dan umur penderita	15
Tabel. 2 : Pemeriksaan HBs Ag dan PCR	16
DAFTAR GAMBAR	
Gambar 1. Struktur HIV (Thaker HK, Snow MH, 2003)	3
Gambar 2. Genoma HIV (Wikipedia, 2009)	4
Gambar 3. Pohon <i>phylogenetic</i> SIV dan HIV (Wikipedia, 2009)	6
Gambar 4. Analisis molekuler HIV dalam tampilan pohon <i>phylogenetic</i>	20
Gambar 5. <i>Multiple Alignment</i> urutan nukleotida sampel HIV yang diperoleh	22

BAB. I

PENDAHULUAN

Perjalanan infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) sangat bervariasi antara orang yang satu dengan yang lainnya dan belum sepenuhnya dimengerti. Faktor imunologi dan virologis telah banyak diketahui berhubungan dengan progresifitas penyakit, tetapi *survival* penderita untuk jangka panjang masih sulit dipertahankan. Kompleksnya faktor yang melatar belakangi kejadian HIV/AIDS ini mendorong pengembangan epidemiologi klinik yang mencoba menganalisis evolusi dari virus HIV itu sendiri. Pohon *phylogenetic* atau molekuler *phylogenetic* dapat menjelaskan hal tersebut (Luigi Buonaguro, 2007).

Analisis *phylogenetic* pada umumnya digunakan di semua cabang ilmu biologi untuk mengetahui asal mula manusia dan sebagai investigasi pola epidemiologi dan penularan dari *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (McCutchan FE, 2006). Beberapa penelitian menunjukkan asal muasal dari HIV dapat diketahui baik mengikuti pola lokal maupun global dengan analisis pohon *phylogenetic*. Beberapa metode penyimpulan *phylogenetic* telah dikembangkan dan akurasi dalam menjelaskan hubungan *phylogenetic* telah bisa diketahui dengan simulasi komputer dan studi penelitian *phylogenetic* (Peeters M, 2000). Genom virus RNA yang dalam hal ini HIV, mengalami perkembangan satu juta kali lebih cepat dibandingkan dengan genom organisme tingkat tinggi yang berpeluang untuk dipelajari riwayat populasinya (Leitner, 1995). HIV-1 terbagi menjadi group M, O dan N (Antunes 2003), dimana HIV grup M merupakan penyebab utama dari HIV. HIV-1 grup M dibagi menjadi 10 subtipe, yaitu: HIV-1 subtype A, B, C, D, F, G, H, I, J dan K (Bounaguro 2007). Juga dikemukakan adanya bentuk rekombinan subtipe virus dalam sirkulasi (Circulating Recombinant Forms = CRFs) yang merupakan rekombinasi dua atau lebih subtipe HIV yang berbeda, yang jumlahnya kian bertambah (Wilbe 2003, Leitner 2005, Tebit 2007, Bounaguro 2007, Khamadi, 2009).

Genoma HIV terdiri dari bagian yang menyandi struktur, ekspresi dan regulasi. Bagian genoma yang menyandi protein struktural atau protein struktural utama diantaranya *gag*, *pol* dan *env* memiliki peran dominan dalam membuat protein struktural untuk membentuk partikel virus baru (Chan DC, 2008). Thomas Leitner et al. (1996) menyatakan bahwa penggunaan sequence *gag p17* lebih sesuai digunakan untuk menganalisis *phylogenetic* dibandingkan dengan *env*. Hal ini berdasarkan pada matriks protein yang mengkode *gag p17* kurang direspon oleh sistem imun host sehingga terjadi *selection* melawan perubahan asam amino (*negative selection*) di regio *p17*.

Dalam penelitian ini akan dilakukan analisis molekuler *phylogenetic* HIV pada penderita HIV khususnya di Jawa Timur berdasar gen *gag p17* dari HIV.

BAB II. STUDI PUSTAKA

II.1. Epidemiologi HIV/AIDS

AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) dikenal sejak tahun 1981 pada lima orang pria homoseksual di Los Angeles, Amerika Serikat yang menderita infeksi *Pneumocystis carinii* dan infeksi lain yang tidak biasa terjadi pada orang normal. Penyakit yang kemudian dikenal dengan nama sindrom imunodefisiensi itu, ditemukan juga pada 26 orang di California dan Haiti. Penyakit yang sama bermunculan, terutama di Amerika dan Afrika, semuanya memiliki gejala khas, yaitu adanya infeksi yang tidak terjadi pada orang yang imunokompeten (Sepkowitz, 2001).

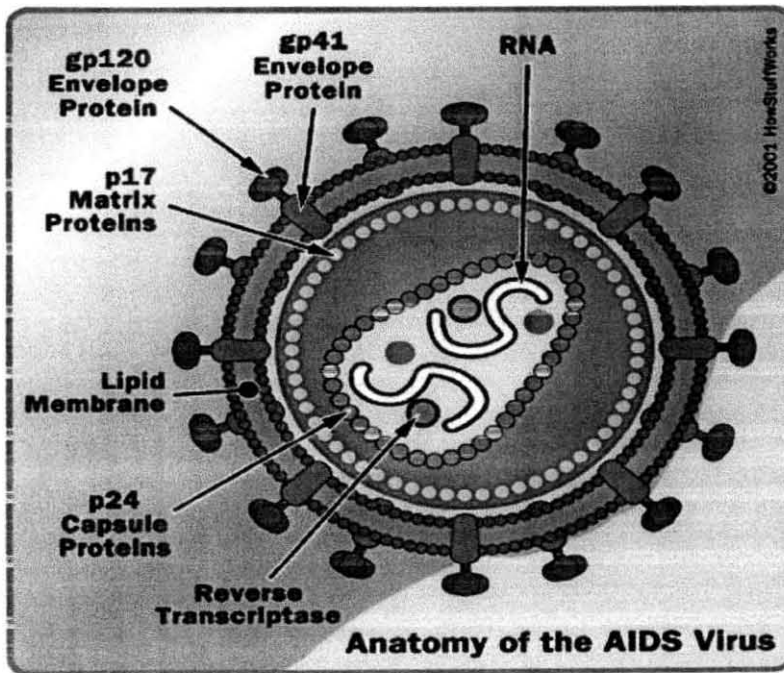
Pada tahun 2000, jumlah orang yang terinfeksi HIV di dunia diperkirakan 42 juta orang, dimana dua pertiganya tinggal di Afrika. HIV menginfeksi laki-laki maupun perempuan, tua maupun muda, bahkan bayi, semua warna kulit dan ras, dan berbagai orientasi seksual. Dari jumlah tersebut, 20 juta orang telah meninggal akibat AIDS pada Desember 2000, dan 3 juta diantaranya adalah anak-anak. Di Indonesia, menurut data Departemen Kesehatan (Depkes) Agustus 2004, diperkirakan terdapat 90.000 sampai 130.000 orang dengan HIV positif yang umumnya terpusat di tujuh propinsi, yakni DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Papua, Riau dan Bali (Depkes, 2004).

Penyebab AIDS diketahui pada tahun 1983, yaitu *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), suatu *Retrovirus* yang termasuk dalam famili *Lentivirus*. Dua virus HIV yang berbeda secara genetik namun antigennya berkaitan adalah HIV subtipe 1 (HIV-1) dan HIV subtipe 2 (HIV-2) yang dapat bereaksi silang pada uji serologik (Mitchell and Kumar, 2003; Jawetz *et al.*, 1996). AIDS pada dasarnya adalah kumpulan gejala penyakit yang timbul akibat menurunnya kekebalan tubuh, disebabkan oleh HIV (Sepkowitz, 2001).

II.2. Struktur HIV

Virion HIV berbentuk sferis dan memiliki inti berbentuk kerucut, dikelilingi oleh selubung lipid yang berasal dari membran sel hospes. Inti virus mengandung protein kapsid terbesar yaitu protein 24 (p24), protein nukleokapsid p7/p9, *single stranded* RNA, dan tiga

enzim virus yaitu *protease*, *reverse transcriptase* dan *integrase* (Gambar 1). Protein p24 adalah antigen virus yang cepat terdeteksi dan merupakan target antibodi dalam tes *screening* HIV. Inti virus dikelilingi oleh matriks protein dinamakan p17, yang merupakan lapisan dibawah selubung lipid. Sedangkan selubung lipid virus mengandung dua glikoprotein yang sangat penting dalam proses infeksi HIV dalam sel yaitu gp120 dan gp41. Genom virus berisi gen *gag*, *pol*, dan *env* yang akan mengkode protein virus. Hasil translasi berupa protein prekursor yang besar dan harus dipotong oleh *protease* menjadi protein yang *mature* (Mitchell and Kumar, 2003).

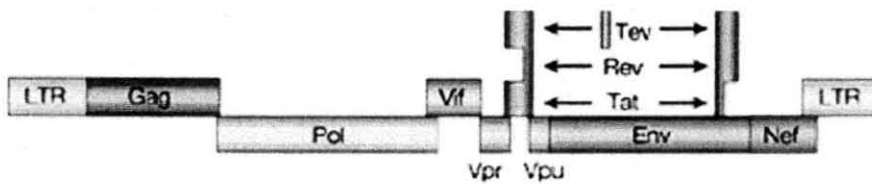


Gambar 1. Struktur HIV (Thaker HK, Snow MH, 2003)

II.3. Genoma HIV

HIV memiliki beberapa gen utama yang mengkode struktur protein yang ditemukan pada semua jenis retrovirus dan beberapa gen nonstruktural ("*accessory*") yang merupakan keunikan dari HIV. Gen *gag* merupakan penentu struktur dasar fisik virus dan gen *pol* bekerja di mekanisme dasar bagaimana reproduksi retrovirus sedangkan yang lainnya membantu HIV masuk ke dalam sel host dan meningkatkan pembelahannya. Meskipun kemungkinan terjadi perubahan mutasi, semua gen di bawah ini kecuali *tev* dapat ditemukan pada semua varian HIV diantaranya :

- *gag* (*Group-specific antigen*): mengkode p24, kapsul viral; p6 and p7, protein nukleokapsid; dan matrix protein p17.
- *pol*: mengkode enzime virus, yang terpenting adalah reverse transcriptase, integrase, dan protease yang memecah turunan protein dari gag and pol menjadi protein fungsional.
- *env* ("envelope") : mengkode gp160, prekursor untuk gp120 and gp41 yaitu protein yang menempel pada selubung virus yang memungkinkan virus menempel dan menginfeksi sel target.
- *Transactivators*: *tat*, *rev*, *vpr*
- Regulator lain: *vif*, *nef*, *vpu*
- *tev*: gen ini hanya ditemukan pada sedikit isolat HIV-1. Gen ini merupakan bagian fusi dari gen *tat*, *env*, dan *rev* genes, serta mengkode protein dengan beberapa sifat dari *tat*, tetapi sedikit atau tidak sama sekali dari kandungan *rev*.



Gambar 2. Genoma HIV (Wikipedia, 2009)

Genoma HIV terdiri dari bagian yang menyandi struktur, ekspresi dan regulasi. Bagian genoma yang menyandi protein struktural atau protein struktural utama diantaranya *gag*, *pol* dan *env* memiliki peran dominan dalam membuat protein struktural untuk membentuk partikel virus baru (Chan DC, 2008). Thomas Leitner et al. (1996) menyatakan bahwa penggunaan sequence *gag p17* lebih sesuai digunakan untuk menganalisis *phylogenetic* dibandingkan dengan *env*. Hal ini berdasarkan pada matriks protein yang mengkode *gag p17* kurang direspon oleh sistem imun host sehingga terjadi *selection* melawan perubahan asam amino (*negative selection*) di regio *p17*.

II.4. Variabilitas Genetik HIV

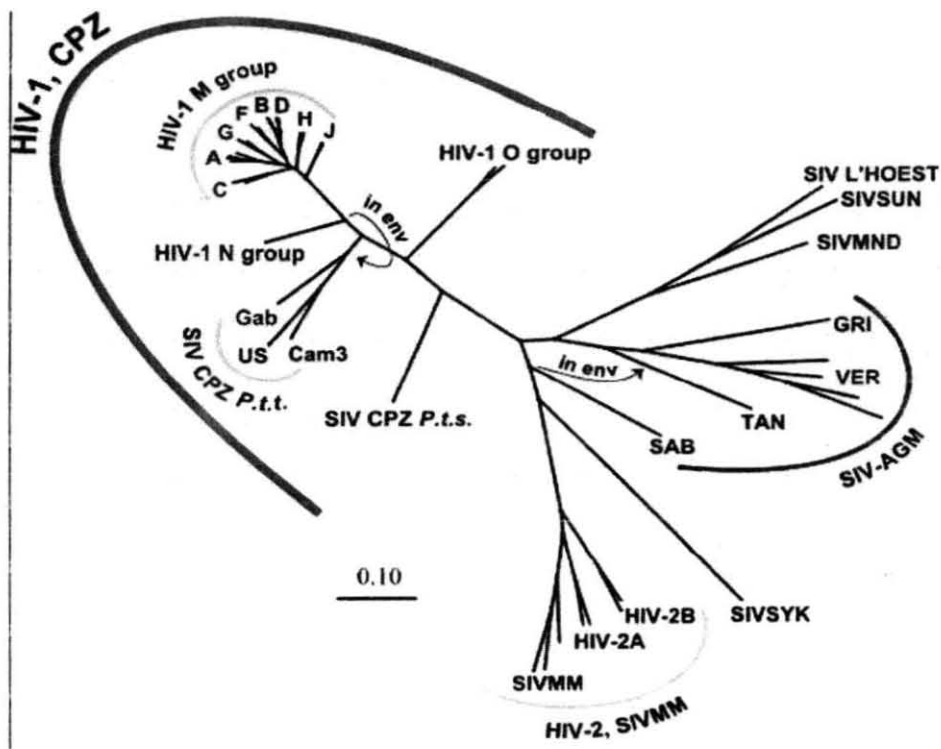
HIV berbeda dari banyak virus lainnya terutama pada tingginya variabilitas genetik. Perbedaan ini mengakibatkan siklus replikasi yang cepat dengan produksi dari 10^9 sampai 10^{10} virion per hari, berpasangan dengan laju mutasi yang tinggi sekitar 3×10^{-5} basa nukleotida per siklus dari replikasi dan kandungan rekombinogenik *reverse transcriptase*. Skenario yang kompleks ini menyebabkan produksi berbagai varian HIV pada pasien yang terinfeksi tunggal dalam perjalanannya tiap hari. Variabilitas ini terbentuk ketika sel tunggal secara langsung terinfeksi dengan dua atau lebih jenis virus HIV. Ketika hal ini terjadi, genom dari virion *progeny* kemungkinan tersusun dari untai RNA dari dua jenis yang berbeda. Virion gabungan ini kemudian menginfeksi sel baru dan kemudian bereplikasi (Robertson DL, 1995).

Simian immunodeficiency virus (SIV) adalah virus yang paling berhubungan dekat dengan HIV tetapi berbeda perilaku, host alaminya adalah kera hijau Afrika dan *sooty mangabeys*. Keberadaan retrovirus ini berada pada level tinggi dalam darah tetapi hanya menimbulkan respon imun yang ringan dan tidak menyebabkan terjadinya simian AIDS serta tidak mengalami mutasi dan rekombinasi seperti HIV (Baier M, 1991).

Saat ini, telah diidentifikasi adanya kelompok HIV sebagai penyebab *Acquired Immunodeficiency Syndromes (AIDS)*, yaitu strain HIV-1 dan strain HIV-2, namun dikemukakan bahwa sebagian besar AIDS disebabkan oleh HIV-1 (Reeves, 2002). HIV-1 terbagi menjadi group M, O dan N (Carr, J. K, 1998, Antunes 2003), dimana HIV grup M merupakan penyebab utama dari HIV. HIV-1 grup M dibagi menjadi 9 subtipe, yaitu: HIV-1 subtype A, B, C, D, F, G, H, J dan K (Robertson, 2005; Oliveira, 2005; dan Tebit 2007) sedangkan Bounaguro (2007) mengemukakan adanya 10 subtipe HIV, dimana Gao 1998 juga mengemukakan adanya HIV subtipe I.

Subtipe HIV-1 ini selanjutnya dibagi lagi menjadi subsubtipe, yaitu A1, A2, F1 dan F2 (Antunes, 2003). Dikemukakan bahwa subtipe HIV yang berbeda dapat berbeda pula pada efek transmisi (penularannya), timbulnya resistensi obat maupun perogresifitas penyakit (Ndembu, 2009). Variasi genetik antar subtipe HIV ini berkisar 25-35% dan didalam subtipe berkisar 15-20%.

Prevalen terbanyak adalah subtipe B (ditemukan terutama di Amerika Utara dan Eropa), A dan D (Afrika), C (Afrika dan Asia). Subtipe tersebut membentuk cabang dalam pohon genetik yang menggambarkan keturunan dari kelompok M dari HIV-1. Koinfeksi dengan subtipe yang berbeda menyebabkan peningkatan *circulating recombinant forms* (CRFs). Pada tahun 2000, dibuat analisis global subtipe prevalen, yaitu: 47,2% infeksi di seluruh dunia adalah subtipe C, 26,7% adalah subtipe A/ CRF02_AG, 12,3% adalah subtipe B, 5,3% adalah subtipe D, 3,2% adalah CRF_AE, dan sisanya 5,3% terdiri dari subtipe lain dan CRFs (Osmanov S, 2000). Sebagian besar penelitian HIV-1 berfokus pada subtipe B, sedangkan sedikit yang lainnya berfokus pada subtipe lain (Perrin L, 2003).



Gambar 3. Pohon *phylogenetic* SIV dan HIV (Wikipedia, 2009)

II.5. Perkembangbiakan HIV

Meskipun berbagai sel dapat menjadi target dari HIV, ada dua target utama infeksi HIV yaitu sistem imunitas tubuh dan sistem saraf pusat (Mitchell and Kumar, 2003; Fauci *et al.*, 2001; Cornain dkk., 2001), namun virion HIV cenderung menyerang sel limfosit T. Jumlah limfosit T penting untuk menentukan progresivitas penyakit infeksi HIV ke AIDS (McCloskey, 1998; Drew, 2001). Sel T yang terinfeksi tidak akan berfungsi lagi dan akhirnya

mati. Infeksi HIV ditandai dengan adanya penurunan drastis sel T dari darah tepi (Mitchell and Kumar, 2003; Fauci *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2001).

Limfosit T menjadi sasaran utama HIV karena memiliki reseptor CD4+ (sel T CD4+) yang merupakan pasangan ideal bagi gp120 permukaan (*surface glycoprotein 120*) pada HIV (*enveloped*) (Schols, 1996; McCloskey, 1998). Molekul CD4+ merupakan reseptor dengan afinitas tinggi terhadap HIV. Hal tersebut menjelaskan adanya kecenderungan selektif virus terhadap sel T CD4+ dan sel CD4+ lainnya, yaitu makrofag dan sel dendritik. Selain berikatan dengan sel CD4+, glikoprotein pada *envelope* HIV, yaitu gp120 akan berikatan dengan koreseptor pada permukaan sel untuk memfasilitasi masuknya virus ke dalam sel tersebut. Dua macam reseptor kemokin pada permukaan sel CD4+, adalah CCR5 dan CXCR4, dikenal berperan dalam memfasilitasi masuknya HIV. Reseptor CCR5 banyak terdapat pada makrofag dan reseptor CXCR4 banyak terdapat pada sel T. Glikoprotein 120 dari *envelope* HIV berikatan dengan gp41 akan menempel pada permukaan molekul CD4+. Pengikatan tersebut akan mengakibatkan perubahan yang menyebabkan timbulnya daerah pengenalan terhadap gp120 pada CXCR4 dan CCR5. Glikoprotein 41 akan mengalami perubahan yang mendorong masuknya sekuens peptida gp41 ke dalam membran sel target yang akan memfasilitasi fusi virus (Mitchell and Kumar, 2003; Fauci *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2001).

Dengan gp41 transmembran (*transmembrane glycoprotein 41*), maka akan terjadi fusi antara permukaan luar dari HIV dengan membran limfosit T CD4+, sedangkan inti (*core*) HIV melanjutkan masuk sel sambil membawa *enzim reverse transcriptase* (Pavlikis, 1997). Bagian inti HIV yang mengandung RNA (*single stranded RNA*) akan berusaha membentuk *double stranded DNA* dengan bantuan *enzim reverse transcriptase* yang telah dipersiapkan tersebut, kemudian dengan bantuan *DNA polimerase* terbentuklah cDNA yang merupakan *proviral DNA*. Proses berikutnya adalah upaya masuk ke dalam inti limfosit T dengan bantuan *enzim integrase*, sehingga terjadilah rangkaian proses integrasi, transkripsi yang dilanjutkan dengan translasi protein virus, serta replikasi HIV yang berlipat ganda yang nantinya akan meninggalkan inti. Setelah mengalami modifikasi, kemudian HIV berusaha keluar menembus membran limfosit (proses *budding*) dan virion baru yang terbentuk siap menginfeksi limfosit T CD4+ berikutnya. Sel yang pecah akan mati, demikian proses ini terus berlangsung sehingga jumlah limfosit T CD4+ cenderung terus menurun dan perjalanan penyakit cenderung progresif (Drew, 2001). Selain menyerang sistem imunitas tubuh, HIV juga menyerang sistem saraf pusat manusia melalui sel makrofag dan monosit pada otak dan sumsum tulang yaitu sel glia. Gangguan neurologis pada infeksi HIV disebabkan oleh produk

virus dan produk sel glia, yaitu sitokin yang bersifat neurotoksik (Mitchell *and* Kumar, 2003; Fauci *et al.*, 2001; Saloojee *and* Violari, 2001).

II.6. Pohon *Phylogenetic*

Phylogenetic merupakan studi evolusi yang berhubungan dengan berbagai kelompok organisme (spesies, populasi) yang ditemukan melalui data *sequencing* molekuler dan data matrik morfologi. Istilah *phylogenetics* berasal dari Yunani dari istilah *phyle/phylon* yang berarti “suku/ras” dan *genetikos* yang berarti “berhubungan dengan kelahiran (Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL, 1964). Bidang ini tumpang tindih dengan ilmu sistematik *phylogenetic* atau *cladism*, dimana hanya pohon *phylogenetic* yang digunakan untuk membatasi takson, yang masing-masing menggambarkan kelompok yang diwarisi mempunyai hubungan dengan individu.

Pendekatan yang paling sering digunakan adalah perbandingan urutan dari gen menggunakan teknik *sequence alignment* untuk mengidentifikasi kesamaan. Aplikasi lainnya dari molekuler *phylogeny* adalah *DNA barcoding*, dimana spesies dari organisme individu diidentifikasi menggunakan bagian kecil mitokondria DNA. Aplikasi lainnya dari teknik yang memungkinkan untuk dilihat terbatas pada bidang genetika manusia seperti pemeriksaan genetik untuk menentukan paternitas anak dan juga pada kasus *forensic criminal* yang dikenal sebagai sidik jari genetika (Wikipedia, 2009).

Dengan pertimbangan bahwa sampai saat ini belum pernah dilakukan analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita yang terinfeksi HIV Di Surabaya, Jawa Timur, maka dirasakan perlu dilakukan penelitian: analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita yang terinfeksi HIV Di Surabaya, Jawa Timur

III. RUMUSAN MASALAH, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III.1. Rumusan Masalah

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas maka timbul permasalahan :

Bagaimanakan hasil analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita Yang Terinfeksi HIV Di Surabaya, Jawa Timur?

III.2. Tujuan Penelitian

Mendapatkan hasil analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya, Jawa Timur.

III.3. Manfaat Penelitian.

1. Dari penelitian ini akan diperoleh data tentang:
 - a. RNA HIV dengan tehnik PCR yang positif pada penderita HIV di Surabaya, Indonesia.
 - b. Pola gambaran distribusi HIV dari hasil analisis molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya Jawa Timur.
2. Diketuainya pohon *phylogenetic* HIV di Surabaya, Indonesia, dapat menjelaskan pola kekerabatan, pola penularan dan penyebaran HIV sehingga dapat disarankan tindakan preventif dan promotif. Selain itu akan didapatkan gambaran molekuler *phylogenetic* HIV yang ada di Indonesia sehingga bisa memperkaya *databases* molekuler *phylogenetic* global.
3. Data dari hasil penelitian ini dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk penanganan lebih lanjut dan membatasi penyebaran dari infeksi HIV pada penderita yang sedang menjalani hemodialisis.
4. Penelitian ini merupakan penelitian yang menunjang eksistensi kegiatan penelitian di *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, disamping penelitian-penelitian kerjasama dengan fihak Jepang.
5. Hasil penelitian ini layak untuk dipublikasikan secara Nasional maupun Internasional

IV. METODE PENELITIAN

IV.1. SAMPEL DARAH

Penelitian ini merupakan *Cross sectional study*. Lima puluh satu (51) sampel darah di Institute of Tropical Disease yang berasal dari penderita yang dicurigai menderita HIV . pada periode 2009. Pada sampel darah akan dilakukan pemeriksaan antibodi terhadap HIV dengan 3 metoda, yaitu: strip test, EIA dan *ELISA test* dan pemeriksaan PCR terhadap RNA HIV dan hasil PCR HIV yang positif akan disequencing untuk penelitian “Analisis Molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada Penderita Yang Terinfeksi HIV Di Surabaya Jawa Timur” .

Plasma darah yang digunakan adalah sisa pemeriksaan rutin, yang saat pengambilan darah ditempatkan dalam tabung pemusing steril dengan anti-koagulan, kemudian dilakukan pemusingan untuk mendapatkan plasmanya. Plasma yang telah dipisah, dipindahkan kedalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80° C sampai saat pemeriksaan Anti-HIV dan RNA HIV dilakukan.

IV.2. PEMERIKSAAN LABORATORIUM

IV.2.1. Pemeriksaan Anti-HIV :

Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan anti-HIV dalam plasma darah penderita tersebut, dengan pemeriksaan antibodi menggunakan *Tri-line HIV Rapid test Device* dari Acon untuk HIV 1/2/O berupa strip, *Foresight HIV 1/2/O Antibody EIA Test Kit* dari Acon serta *Anti-HIV 1+2/Subtype O ELISA* dari Axiom.

IV.2.2. Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) HIV

Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan PC HIV untuk mendeteksi cDNA HIV, dengan tahapan: Ekstraksi RNA HIV dari serum dan sintesis cDNA HIV, Reaksi amplifikasi dengan PCR, Elektroforesis agar, Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis.

IV.2.2.1. Ekstraksi RNA HIV dari serum dan sintesis cDNA HIV

Ekstraksi RNA HIV ditujukan pada daerah genom HIV : *gag p17*.

RNA HIV diekstraksi dari serum dengan metoda ekstraksi menggunakan reagen *One Step Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR) Test (Invitrogen)* sesuai petunjuk pada kit. Apabila sampai saat deteksi hasil PCR dengan elektroforesis diperoleh hasil yang masih negatif, maka ekstraksi RNA HIV diulang menggunakan RNAzol sesuai petunjuk pada kit yang dilanjutkan, menggunakan *primer antisense* tersebut diatas

IV.2.2.2. Reaksi amplifikasi dengan PCR.

Pada reaksi *One Step* PCR digunakan pasangan *primer*: JA-152 5' - ATC TCT AGC AGT GGC GCC CGA ACA G -3'' dan JA- 155 5' - CTG ATA ATG CTG AAA ACA TGG GTA T - 3' yang apabila diperoleh hasil yang negatif, dilanjutkan dengan *second round* PCR HIV menggunakan pasangan *primer Invitrogen*, yaitu: JA-153 5' - CTC TCG ACG CAG GAC TCG GCT TGC T - 3' dan JA-154 5' - CCC ATG CAT TCA AAG TTC TAG GTG A - 3' (Albert, 1994; Leitner 1995; Leitner 1996 dan Leitner, 2000). Demikian juga ulangan ekstraksi PCR, digunakan *primer* yang sama. Ulangan PCR ini juga ditujukan pada daerah genom HIV : *gag p17* dan dilakukan sebagai upaya menjaring hasil positif yang lebih banyak.

Primer lain yang digunakan dalam upaya menjaring kepositifan pemeriksaan PCR RNA HIV yang lebih banyak adalah *primer* dari *Invitrogen*: JA-114: 5' -TCT CTT CTA CTA CTT TTA CCC ATG C- 3', JA-115: 5'-GGC TCC TTC TGA TAA TGC TGA AAA C- 3' dan JA-117: 5'-GCA TTT AAA GTT CTA GTT CTA GT/GT GA -3' (Albert, 1994).

Untuk reaksi amplifikasi pada PCR HIV ini juga digunakan Kit PCR *mixed Fermentas* untuk pemeriksaan *second round* PCR dan pada PCR I apabila ekstraksi RNA HIV menggunakan *Fermentas*. PCR (1 tahap maupun 2 tahap) masing-masing dikerjakan sebanyak 40 siklus dan digunakan suhu pendahuluan 94°C selama 5 menit, kemudian untuk masing-masing siklus : 94°C untuk denaturasi selama 1 menit, 60°C untuk *annealing* selama 1 menit dan 72°C untuk ekstensi selama 3 menit. Untuk keperluan PCR ini digunakan *primer* daerah genom *gag p17* HIV tersebut diatas dapat digunakan untuk pemeriksaan *phylogenetic* HIV (Leitner, 1996).

IV.2.2.3. Elektroforesis agar.

Pada hasil amplifikasi DNA VHB dilakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa 2% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang mengandung ethidium bromide. cDNA HIV dari sampel-sampel, kontrol negatif (digunakan akuades), kontrol positif serta marka (Φ x174 / Hae III digest) yang sudah diseparasi dapat dilihat dibawah sinar *ultraviolet*.

IV.2.2.4. Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis.

Untuk dokumentasi hasil, dilakukan pengambilan foto dengan menggunakan kamera digital.

IV. 2.3. Sequencing.

Pada hasil PCR yang positif, selanjutnya dilakukan sequencing dengan tahapan: Purifikasi DNA HIV hasil PCR, Elektroforesis agar pada hasil purifikasi DNA, *Labeling* DNA murni dengan PCR pro sequencing, Purifikasi DNA hasil PCR *labeling* pro sequencing, Electroforesis dengan mesin Sequencer ABI 310, sebagai berikut:

IV.2.3.1. Purifikasi DNA HIV hasil PCR

Purifikasi DNA HIV hasil PCR dilakukan dengan *QIAquick-spin PCR purification kit* dari *Qiagen* atau dengan metode *phenol-chloroform purification* dan setelah diperoleh DNA HIV murni diaplikasikan pada *low melting agarose*.

IV.2.3.2. Elektroforesis agar hasil purifikasi DNA

Pada semua DNA HIV murni hasil PCR yang positif dari sampel dilakukan elektroforesis dengan diaplikasikan pada agarose *low melting* 2% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang mengandung *ethidium bromide*. DNA HIV dari sampel-sampel (tanpa control positif dan negatif) yang di elektroforesis dan sudah diseparasi dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet *long wave*. Tahap ini dilakukan untuk melihat keberhasilan proses purifikasi.

IV.2.3.3. Purifikasi DNA HIV dari *low melting* agarosa.

Selanjutnya, *band* yang dikehendaki dipotong dari agarosa *low melting* dilakukan purifikasi DNA lagi dengan menggunakan *QIAquick Gel Extraction kit* dari *Qiagen*, sesuai dengan prosedur yang terlampir pada kit..

IV.2.3.4. Labeling DNA murni dengan PCR pro sequencing

Hasil purifikasi DNA menggunakan *QIAquick Gel Extraction kit* dari *Qiagen*, dilakukan PCR pro sekuensing (untuk *labeling*) menggunakan salah satu primer yang dipakai dalam PCR sebelumnya. Pada tahap ini dilakukan *labeling* dengan *dye dideoxy* nukleotida trifosfat yang sudah dilabel, yaitu menggunakan *Bigdye Termination Kit V1.1* dari *Applied Biosystem*.

IV.2.3.5. Purifikasi DNA hasil PCR *labeling* pro sequencing

Purifikasi DNA hasil PCR *labeling* pro sequencing dilakukan dengan proses presipitasi menggunakan etanol dan sodium asetat, selanjutnya DNA kering disimpan sampai saatnya diaplikasikan pada mesin *sequencer* setelah dicampur dengan reagen-reagen sequencing dari *Applied Biosystem*.

IV.2.3.6. Elektroforesis dengan mesin *Sequencer* ABI 310.

Pada hasil PCR *labeling* pro sequencing yang sudah dimurnikan, berisi fragmen-fragmen nukleotida yang telah diamplifikasikan dari daerah genom HIV yang dituju, selanjutnya dilakukan analisis sekuens nukleotida dengan metoda *direct sequencing* dengandiaplikasikan pada mesin *ABI 310 sequencer DNA* dari *Applied Biosystems, Inc*.

Pada proses ini melibatkan penggunaan *capiller buffer with Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA)*, *HiDi formamide*, tube untuk sequencing 0,5 ml dengan septa, dari *Applied Biosystems, Inc*.

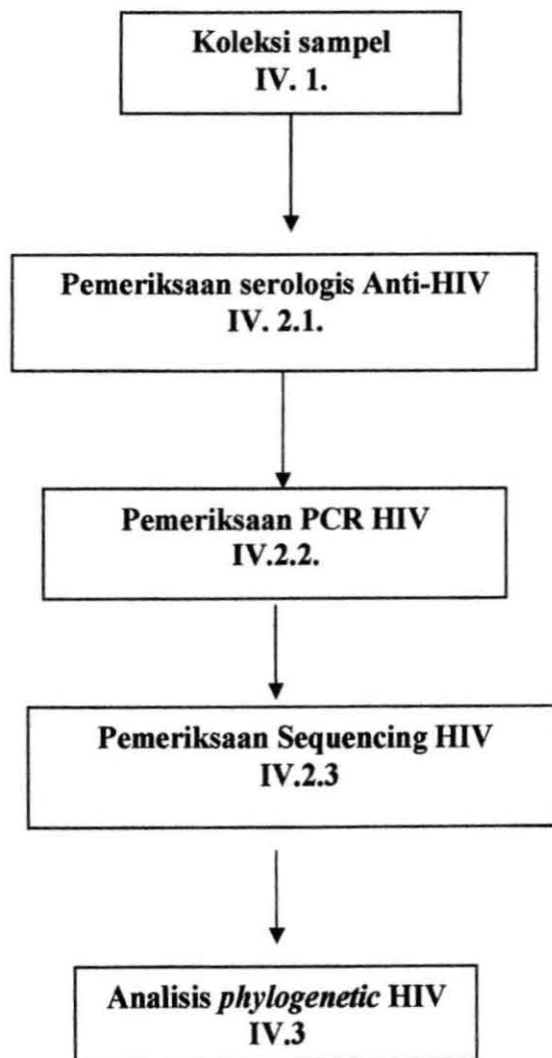
IV.3. Analisis *phylogenetic* hasil sequencing.

Selanjutnya dilakukan analisis molekuler sekuens nukleotida *hasil sequencing* DNA HIV yang diperoleh dari serum sampel penderita, serta dibandingkan pula dengan sekuens nukleotida dari genotipe HIV yang pernah dipublikasi sebelumnya, dengan program *Genetyx Ver.9* menggunakan komputer, untuk mengetahui urutan nukleotida/variasi dan genotipe VHB pada penderita tersebut.

IV. 4. Lokasi penelitian.

Pelaksanaan pemeriksaan laboratorium dari sisi molekuler (IV.2.2 s/d IV.3) semua dilaksanakan di Laboratorium HIV, *Institute of Tropical Disease (ITD)*, Universitas Airlangga sedangkan untuk pemeriksaan serologi (IV.1.), dilakukan di laboratorium swasta.

IV. 5. Skema operasional penelitian.



V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan pembahasan yang ditulis dalam laporan ini merupakan hasil dan pembahasan akhir dari Penelitian Kerjasama Bath III 2009.

Dalam penelitian ini digunakan 51 sampel sera yang berasal dari penderita *suspect* terinfeksi *Human Acquired Immunodeficiency Virus* (HIV) yang berobat di praktek dokter Swasta dan memeriksakan darahnya dilaboratorium di Lembaga Penyakit Tropis.

Tabel. 1 : Jenis kelamin dan umur sampel penderita

Jenis Kelamin	Jumlah Penderita (%)	Rerata dan Kisaran Umur (Tahun)
Pria	35 (68,63%)	33,5 (23- 53)
Wanita	16 (31,37%)	32,3 (24 – 56)
Total	51 (100%)	32,9 (23 – 56)

Limapuluh satu (51) penderita dengan *suspect* terinfeksi HIV ini di RSUD Dr Soetomo dalam penelitian ini dengan rerata umur 32,9 tahun dan kisaran umur 23 sampai dengan 56 tahun. Penderita dengan *suspect* terinfeksi HIV ini terdiri dari 35 (tiga puluh lima) orang laki-laki dengan dengan rerata umur 32,9 tahun dan kisaran umur 23 tahun sampai dengan 53 tahun serta 16 (enam belas) orang perempuan dengan rerata umur 32,9 tahun dan kisaran umur 24 tahun sampai dengan 56 tahun. Rangkuman data jenis kelamin dan umur penderita dengan *suspect* terinfeksi HIV ditampilkan pada tabel 1 tersebut di atas.

Pada ke 51 plasma penderita tersebut semua diperiksa antibodi terhadap HIV, yaitu dengan pemeriksaan antibodi menggunakan *Tri-line HIV Rapid test Device* dari *Acon* untuk HIV 1/2/O berupa strip, *Foresight HIV 1/2/O Antibody EIA Test Kit* dari *Acon* serta *Anti-HIV 1+2/Subtype O ELISA* dari *Axiom*. Penggunaan ke 3 macam pemeriksaan untuk antibodi terhadap HIV ini dimaksudkan untuk menghindari kesalahan dalam pembuatan diagnosis, mengingat diagnosis terinfeksi HIV merupakan diagnosis yang berdampak sangat luas, tidak hanya terhadap penderita, namun juga terhadap lingkungan sekitarnya maupun upaya pengendalian yang dilakukan pemerintah.

Hasil pemeriksaan antibodi terhadap HIV pada ke 51 plasma penderita tersebut didapatkan 2 plasma penderita memberikan hasil pemeriksaan antibodi yang negatif dan 48 serum penderita memberikan hasil yang positif terhadap ke 3 macam pemeriksaan antibodi terhadap HIV tersebut diatas. Pada hasil pemeriksaan antibodi terhadap HIV yang positif maupun negatif ini dilakukan PCR untuk daerah gen *gag* HIV.

Deteksi asam nukleat HIV dengan PCR merupakan pilihan metoda pilihan untuk diagnosis infeksi HIV pada keadaan dimana deteksi antibodi masih memberikan hasil yang negatif. Deteksi HIV (Panteleeff, 1999). Pada pemeriksaan PCR dalam penelitian ini, digunakan pasangan-pasangan primer yang telah digunakan dan dipublikasikan dalam jurnal internasional (Leitner, 1995; Leitner 2000). Dari ke 51 sampel berasal penderita dengan *suspect* HIV tersebut, pada pemeriksaan PCR dari gen *gag* p17 HIV didapatkan hasil pemeriksaan PCR positif pada 28 sampel, yang semuanya berasal dari sampel penderita *suspect* HIV dengan antibodi positif. Pada sampel dengan pemeriksaan antibodi terhadap HIV positif dan pemeriksaan PCR HIV positif pada penderita *suspect* HIV tersebut masih mengandung RNA HIV, sehingga masih mempunyai potensi untuk menularkan virus HIV tersebut. Pada sampel yang negatif pada penggunaan pasangan *primer* dalam penelitian ini kemungkinan terjadi perubahan/mutasi urutan nukleotida pada tempat melekat/*annealing primer*, sehingga *primer* tidak bisa melekat/*annealing* yang berakibat hasil PCR yang negatif. Pasangan *primer* dalam penelitian ini merupakan pasangan *primer* yang apabila dipakai PCR dan dapat memberikan amplifikasi nukleotida yang positif, maka setelah dilakukan *sequencing*, urutan nukleotida yang didapat akan dapat digunakan untuk mengetahui genotip HIV. Untuk mengetahui genotip HIV, urutan nukleotida yang didapat pada penelitian ini kemudian dibandingkan dengan urutan nukleotida yang sudah dipublikasi. Tabel selengkapnya sampel dengan antibodi dan PCR yang positif dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini.

Tabel. 2 : Hasil amplifikasi PCR HIV pada penderita penderita suspect HIV

	Antibodi HIV	PCR HIV
Positif	49 / 51 (96,08%)	28 / 49 (57,14%)
Negatif	2 / 51 (3,92%)	0 / 2 (0%)
Total	51/51 (100%)	28 / 51 (54,90%)

DNA HIV hasil amplifikasi PCR ini selanjutnya dimurnikan dan dilakukan *sequencing* dengan menggunakan mesin *sequencer* ABI-310. Dari hasil *sequencing* yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis molekuler untuk mengetahui genotip HIV dan homologi urutan nukleotida yang didapat. Untuk mengetahui genotipe HIV, urutan nukleotida hasil *sequencing* yang diperoleh dalam penelitian ini dibandingkan dengan urutan nukleotida VHB genotipe lain yang telah dipublikasi (Robertson, 1995; Antunes, 2003; Ndembu, 2008; Khamadi, 2009), kemudian dianalisis dan dibuat pohon *phylogenetic*. Urutan nukleotida hasil *sequencing* yang diperoleh dari sampel penderita *suspect* HIV ini akan dipakai untuk mengetahui adanya variasi genetik ataupun mutasi pada DNA HIV hasil PCR dalam penelitian ini.

Telah dikemukakan bahwa identifikasi HIV-1 yang berbeda dalam env menyebabkan HIV dikelompokkan menjadi: M, N dan O. Kelompok M adalah yang paling sering dijumpai dan terbagi menjadi 9 subtipe / *clade* berdasarkan keseluruhan genom yang secara geografis berbeda (Robertson, 2000; Antunes, 2003; Ndembu, 2008; Khamadi, 2009), yaitu subtipe A, B, C, D, F, G, H, J dan K. Subtipe HIV ini selanjutnya dibagi lagi menjadi subsubtipe, yaitu antara lain A1, A2, F1 dan F2 (Antunes, 2003). Dikemukakan bahwa subtipe HIV yang berbeda dapat berbeda pula pada efek transmisi (penularannya), timbulnya resistensi obat maupun perogresifitas penyakit (Ndembu, 2009). Variasi genetik antar subtipe HIV-1 pada gen gag berkisar 20% (Tebit 2007) dan menurut Ndembu 2009, berkisar ini berkisar 25-35% dan didalam subtipe berkisar 15-20%.

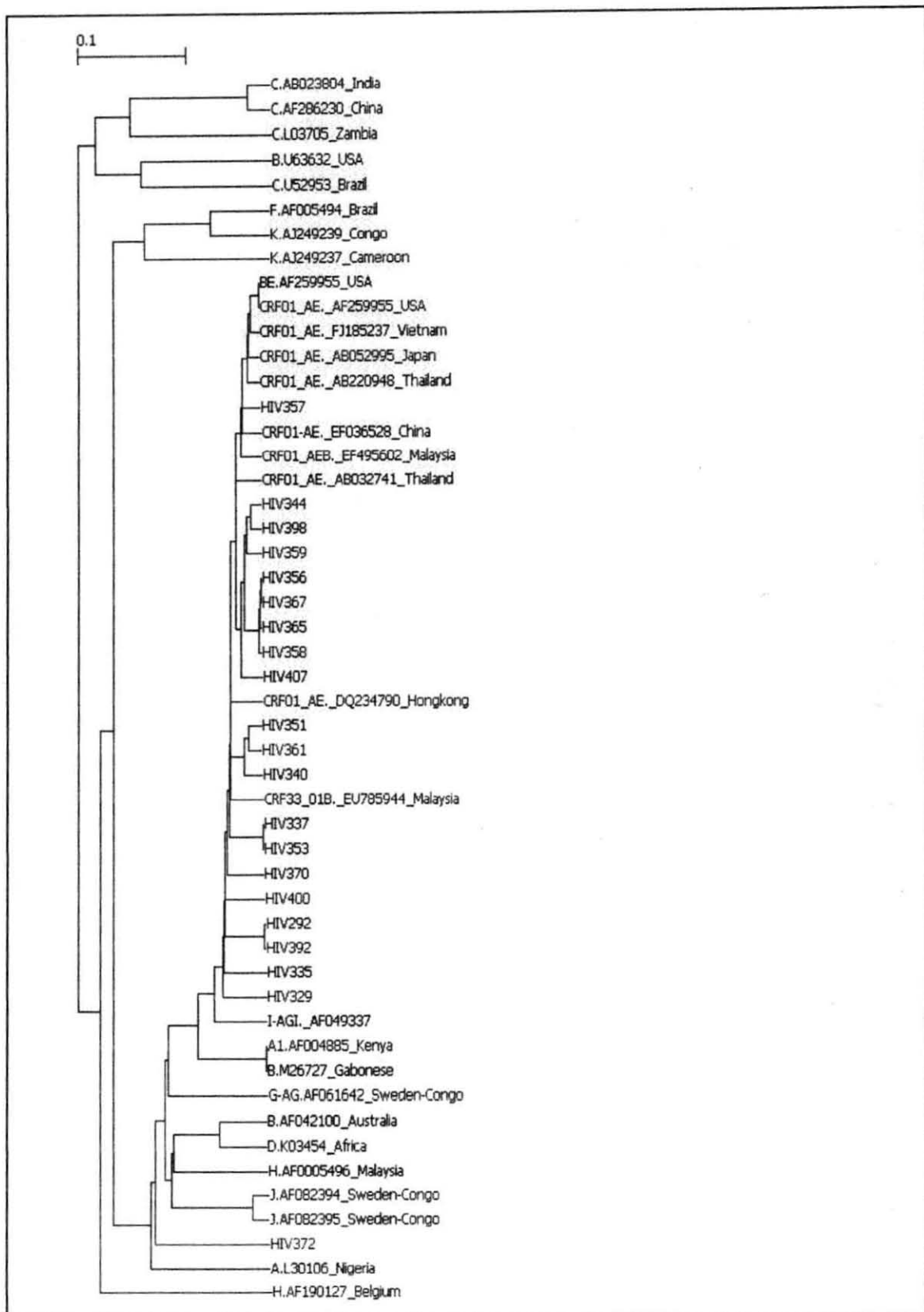
Telah dikemukakan pula bahwa prevalen terbanyak adalah subtipe B (ditemukan terutama di Amerika Utara dan Eropa), A dan D (Afrika), C (Afrika dan Asia). Subtipe tersebut membentuk cabang dalam pohon genetik yang menggambarkan keturunan dari kelompok M dari HIV-1. Koinfeksi dengan subtipe yang berbeda menyebabkan peningkatan *circulating recombinant forms* (CRFs). Pada tahun 2000, dibuat analisis global subtipe prevalen, yaitu: 47,2% infeksi di seluruh dunia adalah subtipe C, 26,7% adalah subtipe A/CRF02_AG, 12,3% adalah subtipe B, 5,3% adalah subtipe D, 3,2% adalah CRF_AE, dan sisanya 5,3% terdiri dari subtipe lain dan CRFs (Osmanov S, 2000). Sebagian besar penelitian HIV-1 berfokus pada subtipe B, sedangkan sedikit yang lainnya berfokus pada subtipe lain (Perrin L, 2003).

Dari sekuens nukleotida HIV yang diperoleh dan sudah siap dianalisis (sebanyak 21 dari 29 sekuens yang diharapkan), dilakukan analisis molekuler *phylogenetic* nukleotida HIV tersebut dan disusun pohon *phylogenetic* dengan program komputer *Genetyx Ver 9*, bersama 29 nukleotida HIV dengan berbagai sub tipe, yang sudah dipublikasi sebelumnya. Hasil yang diperoleh, ternyata HIV dari penderita *suspect* HIV dalam penelitian ini (21 sampel) semua terletak dalam satu kelompok *Circulating Recombinant Forms* (CRFs), dan terutama CRF_01AE yang berasal dari Asia, kecuali 1 sampel, yaitu sampel no 372 dengan insersi 18 nukleotida, yang membuat percabangan sendiri. Apakah satu sampel ini merupakan sub tipe baru atau sub tipe yang sama namun mengalami mutasi/insersi, perlu diteliti dan dianalisis lebih lanjut.

Saat ini dikemukakan bahwa terdapat 9 sub tipe HIV-1, yaitu sub tipe A, B, C, D, F, G, H, J dan K (Robertson, 2005; Oliveira, 2005; dan Tebit 2007) sedangkan Bounaguro (2007) mengemukakan adanya 10 sub tipe HIV (A s/d D dan F s/d K), dimana Gao 1998 juga mengemukakan adanya HIV sub tipe I. Dikemukakan pula banyaknya Kelompok *Circulating Recombinant Forms* (CRFs) (Leitner, 2005) dan Khadi (2008) mengemukakan adanya 43 kelompok CRFs HIV.

Hasil analisis molekuler dalam rangka menentukan sub tipe HIV dalam bentuk pohon *phylogenetic* nukleotida sepanjang 417 nuklotida (gen *gag* p17 dan awal p24) dari 21 sampel hasil penelitian ini dan sub tipe HIV (A, B, C, D, , F, G, H, I, J dan K) maupun berbagai CRFs yang telah dipublikasikan, dalam bentuk suatu pohon *phylogenetic* dari sub tipe HIV ditampilkan pada gambar 3. dibawah ini..

Hasil analisis molekuler hasil 21 *sequencing* HIV penelitian ini dalam bentuk *multiple alignment* nukleotida sepanjang 516 nuklotida ditampilkan pada gambar 4 dibawah ini. Nampak jelas adanya insersi 18 nukleotida (6 asam amino) yang terletak setelah nukleotida ke 444 hasil tampilan dari sampel nomor 372.



Gambar 4. Analisis molekuler HIV dalam tampilan pohon *phylogenetic*

Untitled1.emf

HIV292	1	GTGCACACAGCAAGAGCGAGAGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAATTTTGACTAGCGGAG	60
HIV329	1	60
HIV335	1	60
HIV337	1	60
HIV340	1	60
HIV344	1	60
HIV351	1	60
HIV353	1	60
HIV356	1	60
HIV357	1	60
HIV358	1	60
HIV359	1	60
HIV361	1	60
HIV365	1	60
HIV367	1	60
HIV370	1	60
HIV372	1	60
HIV392	1	60
HIV398	1	60
HIV400	1	60
HIV407	1	60

HIV292	61	GCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGTGGGGGAAAATTAGATGCA	120
HIV329	61	120
HIV335	61	120
HIV337	61	120
HIV340	61	120
HIV344	61	120
HIV351	61	120
HIV353	61	120
HIV356	61	120
HIV357	61	120
HIV358	61	120
HIV359	61	120
HIV361	61	120
HIV365	61	120
HIV367	61	120
HIV370	61	120
HIV372	61	120
HIV392	61	120
HIV398	61	120
HIV400	61	120
HIV407	61	120

HIV292	121	TGGGAAAAAATTCGGTTACGGCCAGGGGGAAAACAAAAGATATAAGTTGAAACATATAGTA	180
HIV329	121	180
HIV335	121	180
HIV337	121	180
HIV340	121	180
HIV344	121	180
HIV351	121	180
HIV353	121	180
HIV356	121	180
HIV357	121	180
HIV358	121	180
HIV359	121	180
HIV361	121	180
HIV365	121	180
HIV367	121	180
HIV370	121	180
HIV372	121	180
HIV392	121	180
HIV398	121	180
HIV400	121	180
HIV407	121	180

Untitled2.emf

HIV292	181	TGGGCAAGCAGAGAGATTGGAAAGATTGCGCACTTAACCCTGGCCTTTTAGAAACAGCAGAA	240
HIV329	181G.....	240
HIV335	181C.A.....T.....G	240
HIV337	181A.....T.....T.....G	240
HIV340	181A.....	240
HIV344	181	240
HIV351	181	240
HIV353	181T.....T.....G	240
HIV356	181	240
HIV357	181	240
HIV358	181	240
HIV359	181	240
HIV361	181	240
HIV365	181	240
HIV367	181	240
HIV370	181T.....G.....T.....A	240
HIV372	181T.....G.....	240
HIV392	181	240
HIV398	181T.....A.....AG	240
HIV400	181T.....	240
HIV407	181A.....	240

HIV292	241	GGATGTCAACAAATAATAGAACAGTTACAGCCAACTCTCAAGACAGGATCAGAGGAACTT	300
HIV329	241GGC.....T.....T.....A.....G	300
HIV335	241C.....T.....T.....A.....G	300
HIV337	241T.....AT.....A.....G	300
HIV340	241G.....T.....AT.....A.....	300
HIV344	241G.....T.....AT.....A.....	300
HIV351	241G.....C.....AT.....A.....G	300
HIV353	241T.....T.....A.....G	300
HIV356	241T.....T.....A.....	300
HIV357	241T.....T.....A.....	300
HIV358	241T.....T.....A.....	300
HIV359	241T.....T.....A.....	300
HIV361	241T.....AT.....A.....	300
HIV365	241T.....T.....A.....	300
HIV367	241T.....T.....A.....	300
HIV370	241G.....C.....CAT.....A.....	300
HIV372	241T.....T.....A.....	300
HIV392	241T.....T.....A.....	300
HIV398	241T.....T.....A.....	300
HIV400	241G.....T.....AT.....A.....	300
HIV407	241G.....T.....T.....A.....	300

HIV292	301	AGATCATTATTTAATACAGTAGCAACCCTATGGTGGTCCATCAAAAGATAGAGGTA AAA	360
HIV329	301A.....C.....C.....A.....G.....	360
HIV335	301A.....CA.....G.....T.....GT.....C.....A.....C.....G.....A.....G	360
HIV337	301A.....A.....T.....T.....C.....T.....A.....C.....GA.....T.....	360
HIV340	301A.....C.....C.....T.....A.....C.....G.....T.....	360
HIV344	301A.....C.....C.....A.....C.....G.....G	360
HIV351	301A.....TT.....A.....T.....C.....T.....A.....C.....G.....	360
HIV353	301A.....A.....T.....T.....C.....T.....A.....C.....GA.....T.....	360
HIV356	301A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....T.....G	360
HIV357	301A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....C.....G	360
HIV358	301A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....T.....G	360
HIV359	301A.....T.....GT.....C.....T.....A.....C.....G.....C	360
HIV361	301A.....G.....T.....T.....C.....T.....A.....C.....G.....	360
HIV365	301A.....A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....T.....G	360
HIV367	301A.....A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....T.....G	360
HIV370	301A.....A.....T.....C.....T.....A.....C.....G.....G.....G	360
HIV372	301A.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....G.....G	360
HIV392	301A.....C.....A.....C.....G.....G.....G	360
HIV398	301A.....C.....A.....C.....G.....G.....G	360
HIV400	301A.....C.....A.....C.....G.....G.....G	360
HIV407	301A.....T.....C.....T.....A.....C.....G.....C.....G	360

Untitled2.emf

HIV292	361	GACACCAAGGAAGCTGTAGATAAAAATAGAGGAAATGC AAAAGAAAAGCCAGCAAAAAGACA	420
HIV329	361T.....C.G.....G.A.C.CT.G.A.....A.C.....	420
HIV335	361T.....C.G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV337	361T.....C.G.....G.A.....T.GGAA.....A.....	420
HIV340	361T.....C.G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV344	361T.....GC.G.....G.A.....GT.G.A.....A.....	420
HIV351	361T.....G.G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV353	361T.....C.G.....G.A.....T.GGAA.....A.....	420
HIV356	361T.....GC.G.....G.A.....T.GAG.....A.....	420
HIV357	361T.....G.G.....G.A.....T.G.....A.....	420
HIV358	361T.....GC.G.....G.A.....T.GAG.....C.....A.....	420
HIV359	361T.....C.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV361	361T.....C.G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV365	361T.....GC.G.....G.A.....T.GAG.....A.....	420
HIV367	361T.....GC.G.....G.A.....T.GAG.....A.....	420
HIV370	361T.....C.....G.T.....T.G.....A.....	420
HIV372	361T.....GC.G.....GCA.....G.....A.....	420
HIV392	361T.....G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV398	361T.....GC.G.....G.A.....T.G.A.....A.....	420
HIV400	361A.....T.....C.....G.A.....G.A.....A.....	420
HIV407	361T.....GC.....T.....G.A.....A.....	420

HIV292	421	CAGCAGGCAGCAGCTGACACAGGA-----AGCAGCAGCAAAGTCAGC	462
HIV329	421G.....CC.....T.....	462
HIV335	421G.....A.....	462
HIV337	421G.....T.....	462
HIV340	421G.....T.....	462
HIV344	421A.....G.....	462
HIV351	421G.....	462
HIV353	421G.....	462
HIV356	421A.....	462
HIV357	421A.....	462
HIV358	421A.....G.....	462
HIV359	421A.....G.....	462
HIV361	421A.....	462
HIV365	421A.....	462
HIV367	421A.....	462
HIV370	421AGTAGCAGCTGCACAGGC.....G.....G.....C.....T.....	480
HIV372	421A.....	462
HIV392	421G.....	462
HIV398	421A.....G.....G.....	462
HIV400	421A.....TC.....T.....	462
HIV407	421A.....T.....	462

HIV292	463	CACAAATTACCCTATAGTGC AAAATGCACAAGGGCAATGGACACATCAGTCTTTA	516
HIV329	463A.....T.....G.....A.....T.....C.....G.....	516
HIV335	463A.....AT.GT.....C.C.C.....G.....	516
HIV337	463A.....CAT.GT.....C.....	516
HIV340	463A.....T.GT.....TC.....	516
HIV344	463A.....AT.GT.....	516
HIV351	463A.....AT.GT.....AC.....	516
HIV353	463A.....CAT.GT.....C.....	516
HIV356	463A.....AT.GT.....	516
HIV357	463A.....AT.GT.....G.....	516
HIV358	463A.....AT.GT.....	516
HIV359	463A.....AT.GT.....	516
HIV361	463A.....AT.GT.....AC.....G.....	516
HIV365	463A.....AT.GT.....	516
HIV367	463A.....AT.GT.....	516
HIV370	463A.....AT.GT.....C.....	516
HIV372	481A.....AT.GT.....T.....	534
HIV392	463A.....AT.GT.....	516
HIV398	463A.....AT.GT.....	516
HIV400	463A.....AT.GT.....C.....G.....	516
HIV407	463A.....AT.GT.....	516

Gambar 5. Multiple Alignment urutan nukleotida sampel HIV yang diperoleh.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN.

VI.1. KESIMPULAN

Dari penelitian dengan judul “Analisis Molekuler *Phylogenetic Human Immunodeficiency Virus (HIV)*” ini berdasar urutan nukleotida daerah *gag p17*, dapat disimpulkan:

1. HIV di Surabaya, Jawa Timur sebagian besar terdapat dalam satu kelompok dengan kelompok *Circulating Recombinant Forms* dan terutama adalah *CRF01_AE* yang juga terdapat di berbagai negara di Asia.
2. Satu sampel HIV mempunyai insersi 18 nukleotida yang masih perlu diteliti lebih lanjut apakah memang merupakan subtipe HIV yang baru.

VI.2. SARAN

Untuk mendapatkan memastikan bahwa subtipe satu sampel HIV tersebut adalah subtipe HIV yang baru, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan PCR dan *sequencing* menggunakan primer daerah gene yang lain dan yang selanjutnya dilakukan analisis molekuler phylogenetic.

Mengingat data molekuler HIV di Surabaya masih sangat terbatas, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, baik dalam hal menambah jumlah sampel atau menganalisis daerah gen HIV yang lain maupun melakukan penelitian lain yang berkaitan dengan respon terapi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Albert J. I., J. Wahlber, T. Leitner, D. Escanilla, and M. Uhlen. 1994. Analysis of A Rape Case by Direct Sequencing of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pol and Gag Genes. *Journal of Virology*, Sept. 1994, Vol. 68, No. 9; p. 5918-5924.
2. Antunes, R., S. Figueiredo, I. S. Ba'rtolo, M. Pinheiro, L. Rosado, I. Soares, H. Lourenc,O, and N. Taveira1. 2003. Plasma Samples from A Pediatric Population Predominantly Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype G and BG Recombinant Forms. *Journal of Clinical Microbiology*, July, Vol. 41, No. 7, p. 3361-3367.
3. Baier M, Dittmar Mt, Cichutek K, Kurth R (1991). "Development Of Vivo Of Genetic Variability Of Simian Immunodeficiency Virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (18): 8126-30.
4. Carr, J. K.; Foley, B. T., Leitner, T., Salminen, M., Korber, B. And Mccutchan, F. (1998). "Reference Sequences Representing The Principal Genetic Diversity Of Hiv-1 In The Pandemic". In Los Alamos National Laboratory (Ed.) (Pdf Format). *Hiv Sequence Compendium. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory.* Pp. 10-19.
5. Chan Dc. 2008. Hiv Sequence Compendium 2008 Introduction. *Nat. Med.* 2 (3): 338-42.
6. Edwards Awf, Cavalli-Sforza Ll *Phylogenetics* Is That Branch Of Life Science, Which Deals With The Study Of Evolutionary Relation Among Various Groups Of Organisms, Through Molecular Sequencing Data. (1964). *Systematics Assoc. Publ. No. 6: Phenetic And Phylogenetic Classification.* Ed. *Reconstruction Of Evolutionary Trees.* Pp. 67-76.
7. Fauci As And Lane Hc. 2001. *Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Disease: Aids And Related Disorder.* Usa: Mcgraw-Hill. Hal. 1852-912
8. Hogan Cm, Hammer Sm. 2001. Host Determinants In Hiv Infection And Disease. Part I: Cellular And Humoral Immune Responses. *Journal Of Intern Med*; 134:761-76.
9. Gao,F., Robertson,D.L., Carruthers, C.D., Li,Y., Jian,B., Salminen,M.O., Kostrikis,L.G., Ho,D.D., Shaw,G.M., Sharp,P.M. and Hahn, B.H. 1998. An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex

- mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J. of Virol.* 72 (12), 10234-10241.
10. Khamdi, S.A., R. W. Lihana, S. Osman, J. Mwangi, J. Muriuki, N. Lagat, J. Kinyua, M. Mwau, S. Kageha, V. Okoth, W. Ochieng, and F. A. Okoth. 2009. Genetic Diversity of HIV Type 1 along the Coastal Strip of Kenya. *Aid Research and Human Retroviruses.* Vol. 25, No. 9, p. 919-923.
 11. Leitner T., D. Escanillat, S. Marquinq, J. Wahlberg, C. Brostrom., H. B. Hasson, M. Uhlen, and J. Albert. 1995. Biological And Molecular Characterization Of Subtype D, G, And A/D Recombinant Hiv-1 Transmission In Sweden. *Virology* 1995, 209:136-146.
 12. Leitner T., D. Escanillat, C. Franzent, M. Uhlen, and J. Albert. 1996. Accurate Reconstruction Of A Known Hiv-1 Transmission History by Phylogenetic Tree Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* October, Vol. 93, p. 10864-10869.
 13. Leitner T., B. Korber, M. Daniels, C. Calef, B. Foley. 2005. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences Review.
 14. Luigi Buonaguro. 2007. Genetic And Phylogenetic Evolution Of Hiv-1 In A Low Subtype Heterogeneity Epidemic: The Italian Example. Dalam [Www.Retrovirology.Com](http://www.Retrovirology.Com) (Akses Tanggal 23 Januari 2008)
 15. Mitchell Rn And Kumar V. 2003. *Diseases Of Immunity.* Usa: Wb Saunders Company. Hal. 103-64
 16. Mc Cutchan Fe: Global Epidemiology Of Hiv. *J Med Virol* 2006, 78 Suppl 1:S7-S12.
 17. Oliveira. de T., K. Deforche, S. Cassol, M. Salminen, D. Paraskevis, C. Seebregts, J. Snoeck, E. J. V Rensburg, A. M. J. Wensing⁶, D. A. V. de Vijver⁶, C. A. Boucher⁶, Camacho R., and A-M. Vandamme. 2005. *Phylogenetics an Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. Bioinformatics Applications Note Vol. 21 No. 19 2005, p. 3797-3800*
 18. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwarlander B, Esparza J; Who-Unaid Network For Hiv Isolation And Characterization. (2002). "Estimated Global Distribution And Regional Spread Of Hiv-1 Genetic Subtypes In The Year 2000". *Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 29 (2): 184-190
 19. Panteleeff, D. Dev., G. John, R. Nduati, D.Mbori-Ngacha, B. Richardson, J. Kreiss And J. Overbaugh. 10=999. Rapid Method For Screening Dried Blood Samples On Filter

Paper For Screening Dried Blood Samples On Filter Paper For Human Immunodeficiency Virus Type 1 Dna. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vo. 37, N0.2, P. 350-353.

20. Perrin L, Kaiser L, Yerly S. (2003). "Travel And The Spread Of Hiv-1 Genetic Variants". *Lancet Infect Dis*. 3 (1): 22–27.
21. Peeters M: Recombinant Hiv Sequences: Their Role In The Global Epidemic. [[Http://Www.Hiv.Lanl.Gov/Content/Immunology/Pdf/2000/1/Peeters.Pdf](http://Www.Hiv.Lanl.Gov/Content/Immunology/Pdf/2000/1/Peeters.Pdf)] In *Hiv Sequence Compendium 2000* Edited By: Kuiken C, Foley B, Hahn B, Mccutchan Fe, Mellors Jw, Mullins Ji, Sodroski J, Wolinsky S And Korber B. Los Alamos, Theoretical Biology And Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory; 2001, 54-72. .
22. **Reeves, J., D., and Robert W. Doms. 2002. Human immunodeficiency virus type 2. *Journal of General Virology* 83, 1253–1265**
23. Robertson Dl, Hahn Bh, Sharp Pm. (1995). "Recombination In Aids Viruses". *J Mol Evol*. 40 (3): 249–59.
24. (Robertson, 1995; Antunes, 2003; Ndembi, 2008; Khamadi, 2009),
25. Saloojee H, Violari A. 2001. Hiv Infection In Children. *Brit Med J*; 323:670-4
26. Sepkowitz Ka. 2001. Aids: The First 20 Years. *N Engl J Med*; 344:1764-72.
27. Tebit D.M., I. Nankya, E. J. Arts and Y. Gao. 2007. Hiv Diversity, Recombination And Disease Progression: How Does Fitness “Fit” Into The Puzzle? *Aids Reviews* 2007;9:75-87
28. Thaker Hk, Snow Mh. 2003. Hiv Viral Suppresion In The Era Of Antiretrovirus Therapy. *Postgraduate Med J*; 79:36-42
29. Wilbe,K., M. Salminen, T. Laukkanen, F. McCutchan, S. C. Ray, J. Albert, and T. Leitner, 2003. Characterization of novel recombinant HIV-1 genomes using the branching index. *Virology*, 316; p.116-125.
30. Wikipedia. 2009. HIV and *Phylogenetic*. Dalam Www.En.Wikipedia.Com (Akses Tanggal 23 Januari 2009)

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Sarana Penelitian

LAMPIRAN 1. 1. Laboratorium:

Laboratorium Hepatitis, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga

LAMPIRAN 1. 2. Instrument yang dibutuhkan :

1. Sarung tangan steril disposable
2. Sduit Disposable
3. Tabung pusing disposable steril 15 ml
4. Tabung Eppendorf 1,5 ml disposable steril
5. Blue and Yellow tipe
6. Parafilm
7. Micropipet 20, 200 dan 1000 mikroliter
8. Inkubator
9. Fine Pippette Gilson
10. National Refrigerator, Type NR-D43A1 - W-A3017247
11. Deep Freeze - 80° C Sanyo-Ultra Low-model CFCF
12. Hettich Universal Refrigerated Centrifuge
13. Sanyo Bio Clean Bench
14. Tomy High Speed, Micro Refrigerated Centrifuge, MRX-150
15. Vaccum Dryer Sunplatec Corp Excicator
16. Perkin Elmer DNA DNA Thermal Cyclcer
17. Micro Centrifuge Type Millipore
18. Mini Mupid-2 Electrophoresis
19. Tomy Autoclave, Type SS-325
20. Kamera Digital Nikon
21. ABI310 Sequencer IMB.Inc

LAMPIRAN 2. PERSONALIA DAN KUALIFIKASI TENAGA PENELITI

Ketua Peneliti :

Nama : dr. Maria Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D, Sp.MK
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan : / Gol. IV b
NIP : 1958 09 17 1986 03 20 01
Jabatan sekarang : Dosen di Departemen Mikrobiologi Kedokteran
: Sekretaris di Lembaga penyakit Tropis Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Kedokteran / Lembaga Penyakit Tropis
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

1. PENELITI I :

Nama Lengkap : Dr. Nasronudin, dr., SpPD, K-PTI
Pangkat / Golongan : Pembina / Gol IVc
NIP : 140 159 073
Jabatan sekarang : Kepala Unit Perawatan Intermediet Penyakit Infeksi (UPIPI)
di Departemen Penyakit Dalam FKUnair
: Ketua Lembaga Penyakit Tropis
Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Kedokteran / Lembaga Penyakit Tropis
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

2. PENELITI II :

Nama : Prof. Retno Handajani, dr., M.S., Ph.D
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan : Pembina Utama Madya / IV e
NIP : 130 541 984
Jabatan sekarang : Dosen di Departemen Biokimia Kedokteran
: Peneliti di Lembaga penyakit Tropis Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Kedokteran / Lembaga Penyakit Tropis
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

3. PENELITI III :

Nama : dr. Lindawati Alim Sardjono, dr., M.Kes., Sp.MK
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan : Penata Muda Tk. I / III b
NIP : 131 569 375
Jabatan sekarang : Dosen di Departemen Mikrobiologi Kedokteran
: Peneliti di Lembaga penyakit Tropis Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Kedokteran / Lembaga Penyakit Tropis
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

4. PENELITI IV :

Nama : Ferry Efendi, S.Kep., Ns
Jenis Kelamin : Laki-laki
Pangkat/Golongan :
NIP :
Jabatan sekarang : Dosen di Fakultas Keperawatan Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Keperawatan
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

5. TEHNISI I :

Nama Lengkap : Ny. Koen Pudjiati
Pangkat / Golongan : Analis
NIP : ----
Jabatan sekarang : Teknisi di Lembaga Penyakit Tropis Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Lembaga penyakit Tropis Unair
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

6. TEHNISI II :

Nama Lengkap : Mochamad Amin
Pangkat / Golongan : Tenaga Peneliti
NIP : 132 296 039
Jabatan sekarang : Teknisi di Lembaga penyakit Tropis Unair
Fakultas / Jurusan / Puslit : Lembaga penyakit Tropis Unair
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

5. TENAGA ADMINISTRASI :

Nama Lengkap : Ismulawati
Pangkat / Golongan :
NIP :
Jabatan sekarang : Tenaga Lembaga Penyakit Tropis
Fakultas / Jurusan / Puslit : Lembaga Penyakit Tropis
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

**LAMPIRAN 3. DATA PENDERITA HIV PENELITIAN RISET KOMPETITIF
PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL
BATH III 2009.**

No Asli	No Urut	Sex		Umur (Tahun)		Pemeriksaan anti-HIV			PCR		SEQ
						Strip (Acon)	EIA (Acon)	ELISA (Axiom)			
		L	P	L	P		+ > 0,210	+ > 1,69	+	-	
292	1		1		32	Reaktif	2,962	2,999	1		ok
325	2	1		34		Reaktif	3,424	3,066		1	
326	3	1		33		Reaktif	3,530	3,044	1		Jelek
327	4	1		36		Reaktif	3,228	3,228	1		Jelek
328	5	1		41		Reaktif	4,040	3,091		1	
329	6	1		45		Reaktif	3,656	3,002	1		ok
330	7	1		38		Reaktif	4,810	3,085		1	
332	8	1		29		Reaktif	3,950	3,036		1	
335	9	1		53		Reaktif	4,904	3,087	1		ok
336	10	1		35		Reaktif	5,280	3,666		1	
337	11	1		44		Reaktif	5,132	3,518	1		ok
338	12		1		30	Reaktif	5,546	3,535		1	
340	13	1		31		Reaktif	5,702	3,387	1		ok
341	14		1		24	Reaktif	5,786	3,543		1	
342	15	1		31		Reaktif	5,750	3,520		1	
343	16		1		28	Reaktif	5,692	3,598	1		Jelek
344	17		1		34	Reaktif	5,110	3,545	1		ok
345	18	1		30		Reaktif	4,034	3,222		1	
346	19	1		35		Reaktif	2,992	2,966		1	
350	20	1		23		Reaktif	4,524	3,366		1	
Subtotoal		15	5						9	11	6 ok

No Asli	No Urut	Sex		Umur (Tahun)		Pemeriksaan anti-HIV			PCR		SEQ
						Strip (Acon)	EIA (Acon)	ELISA (Axiom)			
		L	P	L	P		+ > 0,210	+ > 1,69	+	-	
351	21	1		27		Reaktif	4,250	3,568	1		ok
352	22	1		39		Reaktif	5,272	3,556		1	
353	23	1		30		Reaktif	4,100	3,597	1		ok
354	24	1		27		Reaktif	4,426	3,522		1	
355	25	1		29		Reaktif	4,342	3,544		1	
356	26	1		31		Reaktif	3,758	3,503	1		ok
357	27		1		24	Reaktif	3,946	3,097	1		ok
358	28	1		31		Reaktif	4,610	3,543	1		ok
359	29		1		38	Reaktif	5,038	3,582	1		ok
360	30	1		27		Reaktif	4,474	3,557		1	
361	31		1		27	Reaktif	4,662	3,562	1		ok
362	32	1		28		Reaktif	4,312	3,534		1	
363	33	1		26		Reaktif	3,826	3,035	1		Jelek
365	34	1		30		Reaktif	4,662	3,536	1		ok
366	35		1		30	Reaktif	4,656	3,534		1	
367	36		1		32	Reaktif	3,534	3,098	1		ok
368	37		1		30	Non Reaktif				1	
369	38		1		39	Non Reaktif				1	
370	39		1		26	Reaktif	4,850	3,570	1		ok
371	40	1		25		Reaktif	3,238	3,019	1		Jelek
Subtotal		12	8						12	8	10 ok

No Asli	No Urut	Sex		Umur (Tahun)		Pemeriksaan anti-HIV			PCR		SEQ
						Strip (Acon)	EIA (Acon)	ELISA (Axiom)			
		L	P	L	P		+ > 0,210	+ > 1,69	+	-	
372	41	1		24		Reaktif	4,368	3,533	1		ok
392	42	1				Reaktif	4,754	3,554	1		ok
393	43		1		56	Reaktif	4,032	3,509		1	
394	44		1		38	Reaktif	3,956	3,025		1	
395	45	1		31		Reaktif	4,420	3,572	1		Jelek
396	46	1		34		Reaktif	3,996	3,097	1		Jelek
398	47	1		26		Reaktif	4,278	3,532	1		ok
400	48	1		27		Reaktif	3,704	3,065	1		ok
405	49	1		28		Reaktif	3,504	3,010		1	
406	50		1		28	Reaktif	3,360	3,033		1	
407	51	1		47		Reaktif	3,760	3,369	1		ok
Subtotal		8	3			11 reaktif			7		5 ok
Total		35	16			49 reaktif			28	23	21 ok
Rerata				33,5	32,3		4,329	3,342			7 belum ok
Batasan umur				23-53	24-56						

