

LAPORAN PENELITIAN

Tahun Anggaran 2012

**KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE
INTEGRASE (*int*) HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) 1 PADA
ESCHERICHIA COLI JM109**



Disusun oleh:

dr. Antonius Oktavian, M.Kes

Hotma Martogi Lorensi Hutapea, M.Si

Evi Iriani Natalia, AMD

BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS PAPUA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

KEMENTERIAN KESEHATAN R.I

2012

LAPORAN PENELITIAN

Tahun Anggaran 2012

**KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE
INTEGRASE (*int*) HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) 1 PADA
ESCHERICHIA COLI JM109**



Disusun oleh:

dr. Antonius Oktavian, M.Kes

Hotma Martogi Lorensi Hutapea, M.Si

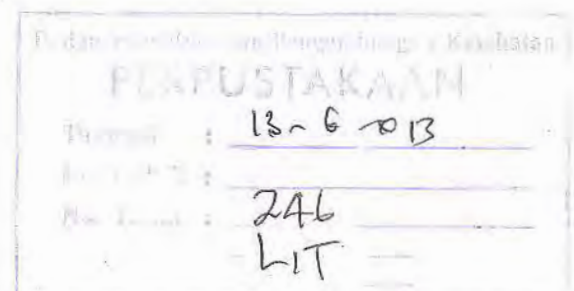
Evi Iriani Natalia, AMD

BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS PAPUA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

KEMENTERIAN KESEHATAN R.I

2012



SUSUNAN TIM PENELITI

No	Nama	Kesarjanaar:	Kedudukan Dalam tim	Uraian Tugas
1	dr. Antonius Oktavian, Mkes	Dokter	Ketua Pelaksana	Bertanggung jawab terhadap penyusunan propqsal sampai selesainya penelitian.
2	Hotma M. L. Hutapea, M.Si	Master Sains	Peneliti	Melaksanakan seluruh kegiatan penelitian sampai pembuatan laporan
3	Evi Iriani Natalia	Analisis Kesehatan	Teknisi	Melaksanakan seluruh kegiatan penelitian sampai pembuatan laporan



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id; Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

KEPUTUSAN
KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
NOMOR : HK.03.05/2/695/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN
KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE INTEGRASE (int)
Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) PADA Escherichia coli JM 109

KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

- Menimbang :**
- a. Bahwa untuk mendapatkan kandidat inhibitor aktivitas faktor virulensi HIV secara molekular, perlu dilakukan kloning kerangka baca terbuka gen pengkode integrase (int) HIV-1 pada Escherichia coli JM 109;
 - b. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a di atas, perlu ditetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembarigan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrase (int) HIV-1 pada Escherichia coli JM 109
- Mengingat :**
1. Undang-Undang No. 41 tahun 2008 tentang Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara tahun 2009 (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2008 Nomor 171, Tambahan Negara Republik Indonesia Nomor 4920);
 2. Undang-Undang No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 4. Peraturan Pemerintah Nomor 21 Tahun 2004 tentang Penyusunan Rencana Kerja dan Anggaran Kementerian Negara/Lembaga (Lembaran Negara RI Tahun 2004 Nomor 75, Tambahan Lembaran Negara RI Nomor 4406);
 5. Keputusan Presiden R.I. Nomor : 17 tahun 2001 tanggal 21 Februari 2000 tentang Pelaksanaan Anggaran dan Pendapatan Belanja Negara;
 6. Keputusan Presiden Nomor 42 Tahun 2002 tentang Pedoman Pelaksanaan Anggaran dan Belanja Negara (Lembaran Negara RI Tahun 2002 Nomor 73, Tambahan Lembaran Negara RI Nomor 4214) Sebagaimana telah diubah Terakhir kali dengan Keputusan Presiden Nomor 72 Tahun 2004, (Lembaran Negara RI Tahun 2004 Nomor 92, Tambahan Lembaran Negara RI Nomor 4418);
 7. Keputusan Presiden R.I. Nomor : 80 tahun 2003 tentang Pedoman Pengadaan Barang dan Jasa Instansi Pemerintah;
 8. Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara;
 9. Surat Keputusan Bersama Menteri Keuangan R.I. Nomor : S-42/M/2000 dan Kepala Badan Perencanaan dan Pembangunan Nasional Nomor : 2262/D.2/05/2000 tentang Petunjuk Teknis Pengadaan Barang/Jasa Instansi Per...itah;



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

10. Peraturan Menteri Kesehatan R.I. Nomor 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Susunan Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan R.I.;
11. Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 2355/MENKES/PER/XI/2011 Tanggal 22 November 2011 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Di Bidang Penelitian dan Pengembangan Biomedis;

MEMUTUSKAN

Menetapkan: KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN TENTANG PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE INTEGRASE (int) *Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1)* PADA *Escherichia coli* JM 109

- KESATU :** Tim Pelaksana Penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum Kesatu mempunyai tugas :
1. Menyusun perencanaan penelitian
 2. Melaksanakan penelitian
 3. Menyusun laporan pelaksanaan dan hasil penelitian
 4. Bertanggungjawab atas penggunaan anggaran penelitian
- KEDUA :** Tim Pelaksana Penelitian bertanggung jawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- KETIGA :** Tim Pelaksana Penelitian diberikan honorarium sesuai dengan ketentuan yang berlaku;
- KEEMPAT :** Segala biaya yang timbul dari Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan ini, dibebankan pada DIPA Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua Tahun Anggaran 2012.
- KELIMA :** Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan 31 Desember 2012, dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam keputusan ini, maka akan diadakan perubahan dan perbaikan kembali sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di Jakarta

Pada tanggal 30 Januari 2012





KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, [Website: http://www.litbang.depkes.go.id](http://www.litbang.depkes.go.id)

Lampiran

**Keputusan Kepala Badan Penelitian
dan Pengembangan Kesehatan**

Nomor : HK/03.05/2/695/2012

Tanggal : 30 Januari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN

**KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE INTEGRASE (Int)
Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) PADA *Escherichia coli* JM 109**

1. PENELITI UTAMA : dr. Antonius Oktavian, M.Kes
2. PENELITI : Hotma Martogi, M.S
3. TEKNISI LABORATORIUM/
LITKAYASA : Evi Iriani





KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.05 /EC/ 331 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutus protokol penelitian yang berjudul :

"Skrining Kekayaan Alam Papua untuk Mendapatkan Kandidat Inhibitor Aktivitas Integrase Human Immunodeficiency Virus (HI Secara Molekuler : Tahap 1 : Kloning Kerangka Baca Terbuka G Pengkode Integrase (int) Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV pada Escherichia coli JM109"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksa Peneliti Utama :

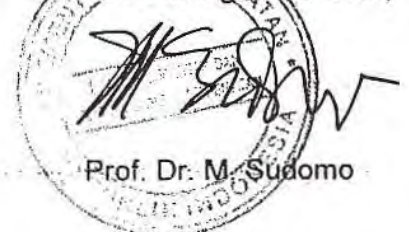
dr. Antonius Oktavian, M.Kes.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sar dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KE BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengaji kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 11 Mei 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo

LEMBAR PERSETUJUAN

Kepala Balai Litbang Biomedis

Papua,



Dr. Lidwina Salim, M.Si
NIP. 196409101996032001

Ketua Pelaksana

Dr. Antonius Oktavian, M.Kes
NIP. 197410302001121001

Mengetahui,

Panitia Pembina Ilmiah

KETUA,

Dr. drg. Magdarina Destri Agtini, MSc

NIP. 19501206 198402 2 001

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

KEPALA,



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si

NIP. 19621119 198803 1 001



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

Lampiran
Keputusan Kepala Badan Penelitian
dan Pengembangan Kesehatan
Nomor : HK/03.05/2/695/2012
Tanggal : 30 Januari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN
KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE INTEGRASE (int)
Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) PADA *Escherichia coli* JM 109

1. PENELITI UTAMA : dr. Antonius Oktavian, M.Kes
2. PENELITI : Hotma Martogi, M.Si
3. TEKNISI LABORATORIUM/
LITKAYASA : Evi Iriani



DAFTAR ISI

JUDUL PENELITIAN	
SUSUNAN TIM PENELITI	
SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN.....	
LEMBAR PENGESAHAN.....	
IDENTITAS PENGUSUL.....	I
DAFTAR ISI.....	2
DAFTAR GAMBAR	3
DAFTAR LAMPIRAN	4
KATA PENGANTAR.....	5
ABSTRAK.....	6
1 PENDAHULUAN.....	6
2 TUJUAN PENELITIAN	10
2.1 Tujuan Umum.....	10
2.2 Tujuan Khusus.....	10
3 MANFAAT PENELITIAN.....	10
4 METODE PENELITIAN.....	11
A Kerangka Konsep.....	11
B Tempat dan Waktu Penelitian.....	11
C Jenis Penelitian.....	11
D Desain Penelitian.....	11
E Bahan dan Cara Kerja.....	12
5 HASIL.....	22
6 PEMBAHASAN.....	25
7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
8 UCAPAN TERIMAKASIH	30
9 DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	31

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1	22
GAMBAR 2	24
GAMBAR 3	27

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1	32
LAMPIRAN 2.....	33
LAMPIRAN 3.....	34

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya kasih karuniaNya maka penulis telah menyelesaikan dan menulis laporan penelitian yang berjudul “Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrase HIV-1 pada *Escherichia coli* JM109” Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh *Escherichia coli* JM109 rekombinan yang membawa plasmid kloning pGEM-TintHIV. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dari penelitian ini.

Dengan rendah hati penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dari awal pengerjaan hingga selesainya penulisan laporan penelitian ini.

Akhirnya penulis berharap agar laporan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jayapura, 23 Desember 2012

ABSTRAK

HIV adalah partikel virus yang berkaitan erat dengan penyebab AIDS. Virus ini termasuk dalam golongan retrovirus dengan materi genetiknya adalah satu pasang RNA. Multiplikasi virus ini difasilitasi oleh protein yang disebut integrase. Integrase adalah enzim yang memiliki peranan dalam menyisipkan genom cDNA HIV-1 ke dalam kromosom manusia. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kerangka baca terbuka gen pengkode integrase HIV-1 yang selanjutnya dikloning ke dalam *Escherichia coli* JM109 untuk memperoleh plasmid rekombinan yang membawa fragmen DNA target tersebut. Sintesis cDNA dilakukan dengan teknik transkripsi balik dengan RNA genom sebagai templat. Selanjutnya amplifikasi dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Produk PCR disisipkan ke plasmid dengan sistem kloning TA. Karakterisasi terhadap produk PCR dengan elektroforesis DNA menunjukkan pita DNA yang sejajar dengan marker DNA 900 pb. Produk PCR tersebut dikarakterisasi lebih lanjut dengan teknik sekuensing. Elektroforegram menunjukkan, dari 8 sampel yang dikarakterisasi, 1 homolog dengan integrase HIV-1 asal Thailand, 2 homolog dengan segmen 4 hemagglutinin virus flu burung H5N1 asal Jawa, dan sisanya tidak terbaca oleh sekuenser. Fragmen DNA yang terkonfirmasi sebagai integrase HIV-1 digunakan sebagai DNA sisipan. Terdapat 3 klon yang diperoleh dari kloning, 1 klon berwarna putih, 1 klon berwarna biru muda, dan 1 klon berwarna biru. Ketiga klon tersebut dikarakterisasi dengan teknik PCR koloni dan elektroforesis DNA menunjukkan ada pita DNA dengan ukuran yang sesuai. Plasmid tersebut diisolasi dengan teknik lisis alkali dan kit komersial untuk dikarakterisasi dengan teknik sekuensing. Urutan nukleotida tidak terbaca oleh sekuenser dan sedang dikarakterisasi ulang.

Kata Kunci: HIV, gen pengkode integrase, E.coli

BABI PENDAHULUAN

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrom – penurunan system imun dapatan) telah mencapai proporsi epidemic dan 90% penderitanya ditemukan pada negara berkembang, terutama di Indonesia secara umum, dan pulau Papua secara khusus. Di Papua sendiri, pertumbuhan kasus HIV-AIDS terus meningkat. Epidemik HIV-AIDS di provinsi Papua sudah dalam kategori populasi umum. Data kumulatif dari Dinas Kesehatan Provinsi Papua yang disebarakan oleh Komisi Penanggulangan AIDS Daerah (KPAD) Papua pada 1 Maret 2010 menginformasikan bahwa kasus HIV-AIDS di Papua telah mencapai 4745 kasus.¹

HIV adalah partikel virus yang berkaitan erat dengan penyebab AIDS. Virus ini termasuk dalam golongan retrovirus dengan materi genetiknya adalah satu pasang RNA. Infeksi HIV ini disebabkan oleh transfer cairan tubuh seperti darah, semen pada pria, cairan vagina, dan air susu ibu (ASI). Virus tersebut dapat ditemukan bebas dan berada di dalam sel terinfeksi. Sejak penyakit ini ditemukan pada 1981 – 2006, AIDS telah membunuh 25 juta orang diantaranya adalah anak-anak. Penderita HIV yang tidak ditangani pada akhirnya berkembang menjadi AIDS. Mereka umumnya meninggal karena infeksi oportunistis yang diiringi dengan menurunnya sistem pertahanan tubuh mereka. Infeksi HIV membutuhkan waktu 10 tahun untuk berkembang menjadi AIDS.²

Pengobatan HIV selama ini dilakukan dengan cara pemberian senyawa antivirus yang digolongkan ke dalam NRTI (*Nucleoside RT Inhibitor*), NNRTI (*Non Nucleoside RT Inhibitor*), PI (*Protease Inhibitor*) yang secara umum bekerja menghambat aktivitas *Reverse Transcriptase* (RT) virus. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian antivirus menyebabkan resistensi virus akibat mutasi. Penelitian yang dilakukan di Uganda menunjukkan bahwa nevirapin menimbulkan mutasi pada daerah RT HIV di posisi A98G, L100I, K103N, V106A, V108I, Y181C, Y188C, dan G190A.² Penelitian lain yang serupa menunjukkan bahwa mutasi pada posisi K103N merupakan mutasi paling sering ditemukan dan menyebabkan resistensi level tinggi terhadap semua antivirus golongan NNRTI. Mutasi pada posisi tersebut

muncul setelah pemberian nevirapin, dan paling sering muncul karena pemberian efavirenz. Mutasi lain yaitu Y188L lebih sering muncul pada pasien dengan terapi efavirenz³.

Integrasi materi genetik virus ke dalam DNA sel terinfeksi merupakan proses yang sangat penting bagi replikasi HIV. Proses integrasi diperlukan agar virus dapat bereplikasi karena seluruh komponen replikasi virus terdapat pada sel inangnya^{4,5}. Proses ini difasilitasi oleh aktivitas enzim integrase yang diproduksi bersama-sama protease dan reverse transcriptase.⁶ Protein Integrase diperlukan virus untuk menyisipkan cDNAnya ke dalam genom sel terinfeksi, selain itu juga berperan sebagai cofactor enzim *reverse transcriptase*. Integrase HIV1 merupakan protein dengan bobot 32 KDa yang terdiri atas 3 domain fungsional. Domain tersebut adalah: domain amino-terminal (residu 1-50) yang dicirikan oleh motif HHCC zinc finger-like, domain central core (residu 50-212) yang mengandung residu asam yang sangat terpelihara, yaitu D64, D116, dan E152 (motif DDE) yang berperan penting dalam proses katalisis; dan domain carboxyl-terminal (residu 212-288). Integrase HIV adalah target yang rasional untuk dihambat sebagai pengobatan infeksi HIV dan pencegahan AIDS. Selain itu, penghambatan terhadap aktivitas integrase memiliki indeks terapi yang tinggi karena sel inang tidak memiliki protein yang aktivitasnya serupa dengan integrase HIV.^{7,8}

Telah banyak penelitian dasar yang dilakukan untuk mempelajari HIV dan aktivitasnya. Hasil dari penelitian-penelitian tersebut memberikan informasi tentang urutan nukleotida HIV, patogenesisnya, mekanisme resistensi virus terhadap antiviral, dan bagaimana tubuh penderita merespon infeksi HIV tersebut. Hal ini memungkinkan untuk dilakukannya penelitian yang bersifat aplikatif, yaitu untuk memperoleh komponen atau senyawa yang dapat digunakan untuk menghambat aktivitas HIV di dalam sel terinfeksi. Belum banyak penelitian yang dilakukan untuk menggali lebih lanjut karakter HIV di Papua. Adanya penelitian yang mempelajari HIV di Papua secara khusus akan memberikan kontribusi penting mengenai penyebaran virus di Papua, keragaman genotipe HIV pada penderita, dan hubungan genotipe virus dengan mekanisme resistensi HIV terhadap antiviral yang diberikan kepada penderita sehingga antivirus yang diberikan lebih tepat.

Pengobatan HIV-AIDS selama ini dilakukan dengan terapi antiviral yang memiliki aktivitas analog nukleotida. Hal ini menyebabkan mutasi pada materi genetik virus yang memunculkan reaksi resistensi terhadap antiviral yang digunakan. Permasalahan yang ditimbulkan mutasi ini adalah terbatasnya waktu penggunaan antiviral untuk terapi sementara terapi yang dilakukan membutuhkan waktu yang panjang. Selain itu efek samping dari pemberian antiviral untuk terapi cukup merugikan penderita.

Papua memiliki keanekaragaman hayati yang sangat baik. Beberapa tahun belakangan ini telah ditemukan tumbuhan-tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai obat. Melalui penelitian ini, diharapkan protein spesifik dari HIV dapat diperoleh secara molekuler untuk kemudian dianalisis. Dengan diperolehnya protein spesifik tersebut, maka selanjutnya akan dilakukan pencarian suatu senyawa inhibitor yang berasal dari keanekaragaman hayati Papua yang dapat digunakan untuk menghambat aktivitas virus ini. Aktivitas integrase diuji terlebih dahulu, kemudian skrining senyawa inhibitor integrase dilakukan secara imunokimia, dan difokuskan pada senyawa berupa protein. Dengan diperolehnya inhibitor yang berasal dari keanekaragaman Papua, maka infeksi HIV bisa dihambat dengan efek samping yang lebih minimal dibandingkan antiviral analog nukleotida yang umumnya digunakan pada saat ini.

Penelitian ini adalah penelitian multiyears yang dibagi ke dalam beberapa tahap. Tahap pertama yaitu kloning fragmen DNA pengkode integrase HIV ke dalam vektor kloning untuk memperoleh klon integrase yang dikerjakan dalam tahun pertama. Tahap kedua yaitu kloning fragmen DNA pengkode integrase HIV ke vektor ekspresi untuk memperoleh klon integrase yang dikerjakan dalam tahun kedua. Tahap ketiga yaitu overekspresi gen pengkode integrase dalam bakteri dan overproduksinya untuk mendapatkan protein integrase HIV. Tahap selanjutnya adalah analisis protein integrase HIV dan uji-ujinya untuk memperoleh karakter integrase. Kemudian skrining senyawa inhibitor dilakukan untuk memperoleh inhibitor yang aktif.

A. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Memperoleh klon kerangka baca terbuka gen pengkode *int* HIV galur murni di dalam *E.coli* JM109.

2. Tujuan Khusus

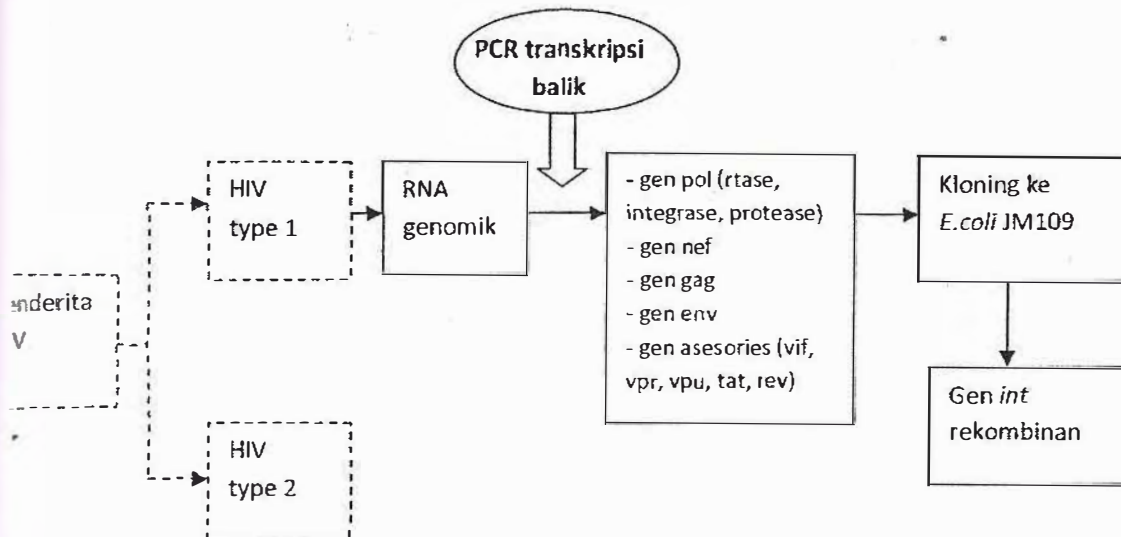
Memperoleh kerangka baca terbuka gen pengkode *int* melalui metode RT-PCR galur murni yang dibuktikan dengan analisis penentuan urutan nukleotida.

B. Manfaat Penelitian

1. Tersedianya klon *int* rekombinan yang dapat digunakan untuk memproduksi protein *INT* rekombinan.
2. Tersedianya hasil analisis urutan nukleotida fragmen DNA pengkode *int* dapat memberikan informasi mengenai data mutasi yang muncul, sehingga dapat menjadi acuan bagi petugas medis dalam memberikan antivirus yang kerjanya menghambat aktivitas protein *INT*.
3. Dalam jangka panjang, tersedianya protein *INT* rekombinan dapat digunakan sebagai target untuk mencari inhibitor aktivitas protein *INT* di dalam sel terinfeksi melalui skrining kandidat inhibitor integrase di dalam kekayaan alam Papua. Dengan diperolehnya inhibitor tersebut, maka alternatif baru dalam terapi HIV-AIDS bisa dipelajari.

BAB II METODE PENELITIAN

A. Kerangka Konsep



B. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan selama 8 bulan pada tahun 2012 di laboratorium Biomol Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua di Jayapura.

C. Jenis penelitian

Jenis penelitian adalah laboratorik eksperimental.

D. Desain penelitian

Desain penelitian adalah kontinyu laboratorik.

E. Bahan dan cara kerja

1. Perancangan Primer spesifik

Primer dirancang menggunakan *DNASTAR*, dan urutan yang diperoleh akan dikonfirmasi kepada program *BLAST* yang terdapat pada situs jaringan <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2. Isolasi kerangka baca terbuka gen pengkode *int* HIV dengan RT-PCR dan amplifikasinya dengan PCR, serta karakterisasinya.

Templat yang akan digunakan diperoleh dari bahan penelitian sebelumnya. Kerangka baca terbuka gen pengkode *int* yang memiliki sifat virulensi dan dapat dihambat secara optimal diisolasi dan diamplifikasi dengan RT-PCR. Produk PCR yang diperoleh dikarakterisasi migrasinya dengan elektroforesis DNA dan selanjutnya dianalisis urutan nukleotidanya untuk memastikan bahwa gen tersebut adalah benar-gen yang diharapkan dan merupakan galur murni.

3. Kloning kerangka baca gen pengkode *int* HIV ke vektor kloning dan karakterisasinya. Hasil isolasi kerangka baca gen pengkode *int* dikloning ke vektor kloning pGEM-T dan digunakan untuk mentransformasi mikroba inang yaitu *E.coli* JM109 kompeten (Promega). Kloning ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah gen secara *in vivo* dan dilakukan dengan metode ligasi. Transformasi sel dilakukan dengan metode *heat-shock*. Transforman (mikroba yang mengalami transformasi) selanjutnya dikarakterisasi untuk memperoleh transforman yang benar. Karakterisasi dilakukan dengan seleksi koloni biru putih, analisis pemotongan dengan enzim, dan elektroforesis. Hasil kloning dikonfirmasi kebenarannya dengan metode sekuensing.

F. Prosedur Kerja

1. Metode PCR transkripsi balik (RT-PCR) RNA HIV, dan PCR fragmen DNA pengkode *int* HIV

Tujuan: untuk memperoleh fragmen DNA pengkode *int* HIV secara spesifik.

Tahap persiapan:

- a. Siapkan larutan primer (First Base) dengan konsentrasi akhir 0,6 μ M.
- b. Lakukan seluruh reaksi di dalam es.

Tahap pengerjaan:

Tahap 1

- a. Cairkan templat RNA, larutan primer, campuran dNTP (Promega), dapar QIAGEN OneStep RT-PCR 5x, dan air bebas RNase (Promega). Sebelum digunakan, penting untuk menghomogenkan masing-masing komponen.
- b. Siapkan campuran master berdasarkan tabel di bawah.

Komponen	Volume / reaksi	Konsentrasi akhir
Campuran master		
- ddH ₂ O bebas RNase	Variabel	-
- Dapar 5x	10,0 ul	1x
- Oligo dT	Variable	0,1 – 0,5 ug
- Campuran dNTP (10 uM tiap dNTP)	2,0 ul	400 uM tiap dNTP
- Primer A	Variabel	0,6 uM
- Primer B	Variabel	0,6 uM
- AMV Reverse transcriptase	1,0 ul	5 U/ L
- Inhibitor RNase (optional)	Variabel	5-10 U / reaksi
Templat RNA	Variabel	1pg-2ug / reaksi

- c. Homogenkan campuran master dengan cara dipipet. Bagi ke beberapa tabung PCR dengan volume yang sesuai.
- d. Tambahkan templat RNA (≤ 2 ug / reaksi) ke dalam masing-masing tabung PCR.
- e. Inkubasi reaksi pada suhu 45°C selama 45 menit atau 50°C selama 30 menit.

Denaturasi awal	1 menit	95°C
Siklus		
- Denaturasi	0,5 menit	95°C
- Annealing	0,5 menit	47°C
- Ekstensi	1 menit	72°C
Jumlah siklus	35 siklus	
Ekstensi akhir	7 menit	72°C

- f. Mulai program PCR dengan tabung masih di es. Tunggu hingga alat *thermocycler* mencapai 50°C, lalu masukkan tabung ke dalam alat.

2. Gel Elektroforesis DNA

Tujuan: untuk menganalisis migrasi fragmen DNA agar dapat mengetahui bobot dan intensitas DNA yang diperoleh, baik dari hasil PCR, maupun hasil kloning.

- a. Untuk membuat gel agarosa (sigma) 1%, timbang 1 g serbuk agarose dan tambahkan 100 ml larutan TBE atau TAE.
- b. Panaskan larutan di dalam gelombang mikro atau penangas air hingga agarosa terlarut sempurna. Biarkan hingga suhu larutan antara 50 - 55°C.
- c. Siapkan bak yang tepinya sudah ditutup dengan selotip. Letakkan sisir dengan jumlah tertentu pada bak.
- d. Tambahkan 5 ul etidium bromida pada gel yang agak dingin dan tuangkan ke dalam bak. Biarkan membeku selama 15-30 menit pada suhu ruang.
- e. Lepaskan sisir, letakkan gel ke dalam *chamber* elektroforesis yang sudah diisi dengan TAE atau TBE.
- f. Campurkan 10x *loading buffer* dengan sampel.
- g. Masukkan DNA ke dalam sumur yang tercetak oleh sisir pada gel. Masukkan juga pembanding dan marka DNA.
- h. Aktifkan alat elektroforesis (Biorad) pada 70-100 V, selama 45-60 menit, tergantung pada masa DNA yang digunakan.

Amati pita-pita DNA menggunakan transluminator UV.

3. Pemurnian DNA dari gel agarosa

Tujuan: untuk mendapatkan fragmen DNA murni yang nantinya akan diligasikan dengan vektor kloning.

Pemurnian produk PCR dari gel dilakukan menggunakan kolom GFX (Promega).

Persiapan:

- a. Potong gel yang mengandung pita fragmen DNA target menggunakan skalpel yang sudah dicuci dengan ethanol 70%. Gunakan sarung tangan.
- b. Pindahkan potongan gel ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Timbang gel untuk menentukan jumlah *dapar pengikat* yang perlu ditambahkan ke gel.

Prosedur:

- a. Tambahkan sejumlah dapar pengikat ke dalam tabung yang mengandung gel. Jumlah dapar pengikat sebanding dengan bobot gel. Inkubasikan tabung pada suhu 58°C selama 10 menit, hingga seluruh gel mencair. Biarkan larutan mendingin (suhu ruang).
- b. Pindahkan larutan ke kolom GFX, sentrifuga pada 10.000 ppm selama 2 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul.
- c. Tambahkan 500 uL dapar pencuci ke dalam kolom GFX. Sentrifuga kolom pada 10.000 ppm, selama 1 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul.
- d. Ulangi tahap 3.
- e. Pindahkan kolom ke dalam tabung mikro 1,5 mL steril kosong. Tambahkan 50 uL dapar pengelusi, lalu sentrifuga tabung pada 10.000 ppm selama 2 menit.

Larutan yang tertampung pada tabung mikro adalah cairan DNA hasil PCR pekat.

4. Ligasi

Tujuan: untuk meligasikan fragmen DNA hasil PCR murni dengan vektor kloning (Promega).

Bahan:

Plasmid DNA linear

DNA sisipan

T4 DNA ligase dan dapar T4 DNA ligase 10x

ddH₂O

Persiapan:

Fragmen DNA yang sudah murni diligasi ke DNA plasmid linear dengan perbandingan sebagai berikut:

$$\text{Jumlah DNA sisipan} = \frac{\text{Jumlah vektor} \times \text{Ukuran DNA sisipan}}{\text{Ukuran vektor}} \times (\text{perbandingan DNA sisipan dengan vektor})$$

Prosedur:

- a. Ambil sejumlah tertentu DNA sisipan (ng) dari stok. Pindahkan ke tabung mikro steril.
- b. Tambahkan 50 ng plasmid DNA linear, 3 U T4 DNA ligase, dan 1 uL dapar ligase 10x ke dalam larutan DNA sisipan.
- c. Tambahkan MQ *water* hingga volume mencapai 10 uL.
Inkubasi reaksi pada suhu 4°C, 18 jam.

5. Persiapan dan transformasi *E. coli* kompeten

Tujuan: untuk membuat sel *E. coli* mengubah permeabilitas membrannya agar dapat dimasuki oleh DNA sirkuler dari luar selnya.

Pembuatan sel kompeten menggunakan Kalsium klorida

Bahan

Dapar dan larutan	: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1M)
Media	: Luria Bertani (LB)
Asam nukleat	: Plasmid DNA (rekombinan)

Prosedur:

- Kultur *E. coli* ke dalam media LB padat. Inkubasi kultur pada suhu 37°C selama 18 jam.
- Inokulasikan koloni tunggal *E. coli* dari media LB padat ke dalam 5 mL LB cair. Inkubasi inokulum pada suhu 37°C, 150 ppm, selama 18 jam.
- Pindahkan 1 mL kultur ke dalam 50 mL LB cair, lalu inkubasikan pada suhu 37°C, 150 ppm, sampai didapat kerapatan optik pada gelombang 600 nm (OD_{600}) 0,3 – 0,4.
- Pindahkan kultur sebanyak 6 mL ke dalam 1 tabung mikro 1,5 mL. Inkubasi kultur selama 10 menit di dalam es. Sentrifuga kultur pada suhu 4°C, 4000rpm, selama 10 menit. Buang supernatan.
- Resuspensi pellet dengan larutan CaCl_2 dingin sebanyak 600 μL . Inkubasi basil resuspensi di dalam es selama 10 menit.
- Sentrifuga suspensi sel pada suhu 4°C, 4000rpm, selama 10 menit. Buang supernatan.
- Resuspensi pellet dengan larutan CaCl_2 dingin sebanyak 200 μL . Inkubasi suspensi sel pada 4°C selama 18 jam sebelum digunakan untuk transformasi sel.

6. Transformasi *E. coli* JM109 oleh pGEM-T

Tujuan: untuk memasukkan DNA hasil ligasi produk PCR dengan vektor kloning ke dalam *E. coli*.

Bahan:

E. coli kompeten

Produk ligasi (pGEM-T rekombinan)

Ampisilin

IPTG (Sigma)

X-Gal (Sigma)

Prosedur:

- a. Pindahkan sebanyak 2 uL produk ligasi ke dalam 200 uL sel *E.coli* kompeten.
Inkubasikan campuran di dalam es selama 30 menit.
- b. Gunakan plasmid tanpa sisipan sebagai kontrol positif dan *E.coli*-tanpa plasmid sebagai kontrol negatif.
- c. Lakukan proses *heat-shock*, yaitu dengan menginkubasi *E.coli* pada suhu 42°C selama 90 detik, lalu segera inkubasikan ke dalam es selama 1 – 2 menit.
- d. Tambahkan 800 uL LB cair ke dalam campuran sel. Inkubasikan pada 37°C, 150 ppm, selama 90 menit, lalu sentrifuga dengan kecepatan 4000 rpm, 10 menit.
- e. Buang supernatan sebanyak 800 uL, lalu resuspensi pellet dengan 200 uL supernatan yang masih tersisa di dalam tabung.
- f. Sebarkan 100 uL suspensi sel transforman ke permukaan media LB padat yang telah mengandung 0,1 mg/mL ampisilin, 0,5 mM IPTG, dan 80 ug/mL X-Gal.
Inokulasikan sisa suspensi sel transforman ke dalam LB cair mengandung ampisilin 0,1 mg/mL, inkubasikan pada suhu 37°C, 150 ppm, selama 18 jam.

7. Metode isolasi plasmid dengan SDS: minipresipitasi

Tujuan: untuk memperoleh plasmid DNA dari *E.coli* secara konvensional

Dapar dan bahan:

Larutan lisis alkaline 1

Larutan lisis alkaline 2 (gunakan dalam keadaan segar)

Larutan lisis alkaline 3

Antibiotik untuk seleksi plasmid

Ethanol (Sigma)

Ethanol : Chloroform (1:1, v/v)

STE

TE (pH 8,0) mengandung 20 ug/uL RnaseA

Medium

Luria Bertani (LB)

Metode:

- a. Inokulasi media LB yang mengandung antibiotik yang sesuai dengan biakan bakteri yang berasal dari koloni tunggal. Inkubasi kultur bakteri pada suhu 37°C, 150 ppm, 18 jam.
- b. Tuang inokulum ke tabung mikro. Sentrifuga dengan kecepatan tinggi (13.000rpm) selama 30 detik dengan suhu 4°C.
- c. Buang media, biarkan endapan hasil sentrifugasi (pellet) sekering mungkin.
- d. Larutkan kembali pellet menggunakan 100 uL larutan lisis alkaline 1 dingin. Vortex hingga homogen.
- e. Tambahkan larutan lisis alkaline 2 segar pada larutan pellet, tutup tabung dengan rapat. Homogenkan dengan cara dibolak-balik. Jangan divortex. Letakkan tabung di dalam es.
- f. Tambahkan 150 uL larutan lisis alkaline 3. Tutup tabung, bolak-balikkan tabung hingga lisat terlihat lebih jernih. Biarkan di es selama 3 – 5 menit.
- g. Sentrifuga lisat dengan kecepatan tinggi selama 5 menit dengan suhu 4°C. Pindahkan supernatan ke tabung steril yang baru.
- h. (optional) tambahkan campuran ethanol:chloroform. Vortex campuran, kemudian sentrifuga dengan kecepatan 13.000rpm pada suhu 4°C. Pindahkan supernatan ke tabung steril baru.
- i. Presipitasi asam nukleat dari supernatan dengan menambahkan 2 volume ethanol pada suhu ruang. Homogenkan campuran dengan cara divortex. Biarkan campuran selama 2 menit pada suhu ruang.
- j. Kumpulkan asam nukleat yang dipresipitasi dengan sentrifuga 13.000rpm pada 4°C selama 5 menit.
- k. Buang supernatan, biarkan endapan sekering mungkin dengan cara dibalik dan diletakkan di atas kertas tissue. Buang sisa cairan dengan menggunakan pipet.
- l. Tambahkan 1 mL ethanol 70% pada endapan. Bolak-balikkan tabung beberapa kali. Sentrifuga dengan kecepatan 13,000 ppm pada suhu 4°C selama 2 menit.
- m. Buang supernatant. Hati-hati pada tahap ini, karena pellet seringkali tidak menempel pada dinding tabung.
- n. Buang setiap sisa ethanol dengan cara membiarkan tabung terbuka hingga ethanol menguap seluruhnya (sekitar 5 – 10 menit).

Larutkan asam nukleat dengan 50 uL dapar TE (pH 8,0) yang mengandung 20 ug/uL DNase free RNaseA. Vortex larutan asam nukleat dengan pelan, kemudian simpan pada suhu -20°C.

8. Isolasi dan karakterisasi pGEM-Trekombinan

Tujuan: untuk memperoleh plasmid rekombinan dari sel *E.coli*.

Plasmid rekombinan dimurnikan dengan kit isolasi plasmid.

- a. Ambil sel transforman *E.coli* JM109 koloni tunggal putih hasil transformasi sebelumnya dan pindahkan ke dalam media LB cair yang telah ditambahkan ampisilin 0,1 mg/mL. Inkubasi pada 37°C, 150 ppm, selama 18 jam.
- b. Sentrifuga suspensi sel pada 13.000 ppm selama 1 menit.
- c. Cuci pellet dengan 200 uL dapar resuspensi, lalu tambahkan 200 uL dapar lisis.
- d. Tambahkan 300 uL dapar netralisasi sebanyak 300 uL, homogenkan dengan dipipet naik turun. Jangan divortex.
- e. Sentrifuga campuran pada 13.000 ppm selama 2 menit hingga diperoleh supernatan yang jernih.
- f. Pindahkan supernatan ke kolom silika, lalu sentrifuga kolom pada 13.000 ppm selama 30 detik. Buang cairan pada tabung pengumpul.
- g. Tambahkan 400 uL dapar pencuci yang telah ditambahkan etanol ke dalam kolom, lalu sentrifuga kolom pada 13.000 ppm selama 30 detik. Buang cairan pada tabung pengumpul.
- h. Ulangi langkah 7.
- i. Sentrifuga kembali kolom pada 13.000 ppm selama 3 menit untuk mengeringkan kolom dari residu ethanol.
- j. Pindahkan kolom ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Tambahkan 50 uL dapar pengelusi tepat di tengah kolom. Inkubasi kolom pada suhu ruangan selama 2 menit, lalu sentrifuga kolom pada 13.000 ppm selama 2 menit.

Larutan yang terkumpul pada tabung mikro adalah larutan yang mengandung plasmid pGEM-Trekombinan.

Karakterisasi pGEM-Trekombinan

- a. Dengan metode gel elektroforesis DNA seperti yang tercantum pada protokol C.
- b. Dengan analisis pemotongan DNA menggunakan 2 jenis enzim restriksi tertentu.

- c. Dengan analisis penentuan urutan nukleotida (sekuensing).

9. Metode sekuensing

Tujuan: Pemurnian produk PCR

Sekuenser: ABI

- a. Murnikan produk PCR sebelum dilakukan sekuensing
- b. Siapkan tabung mikro steril sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan, kemudian berikan label.
- c. Ambil *reaction mix* sebanyak 2 ul ditambahkan dengan PCR product sesuai dengan perlakuan yaitu 1,5 ul (perlakuan Orig) dan 0,75 ul (perlakuan dilusi), dimasukkan ke dalam tabung mikro yang telah dilabel, kemudian ditutup rapat.
- d. Homogenkan dengan menggunakan vortex dan spin down.
- e. Masukkan tabung mikro ke dalam mesin thermal cycler (PCR) yang telah dinyalakan kira-kira 15 menit sebelumnya dan pastikan semua tabung tertutup rapat
- f. Mesin PCR disetting dengan langkah sebagai berikut : Tekan enter setelah *registered user*, tekan enter pada *current user biomolekul*, klik *protocol library* pilih *pcrSEQ* dan tekan enter. Masuk *view protocol* (pastikan protocol tersebut sama dengan metode yang tercantum pada panduan kerja) jika telah sama klik *done* dan *run protocol*, lamanya PCR bekerja sesuai dengan jumlah sampel yang diperiksa (sudah diatur oleh mesin PCR)
- g. Setelah proses amplifikasi selesai, ambil tabung lalu tambahkan isopropanol 75% sebanyak 60 ul pada masing-masing tabung lalu tutup dan inkubasikan pada suhu 4°C selama 15 menit.
- h. Setelah inkubasi tabung disentrifuga selama 15 menit dengan kecepatan maksimum, kemudian supernatant dibuang pada kertas tissue tanpa serat.
- i. Tambahkan ethanol 70% sebanyak 60 ul pada masing-masing tabung kemudian sentrifuga kembali dengan kecepatan maksimum. Buang supernatant dibuang pada tissue, dan dikeringkan di depan kipas angin kurang lebih 60 menit. Pastikan bau alkohol tidak tercium.

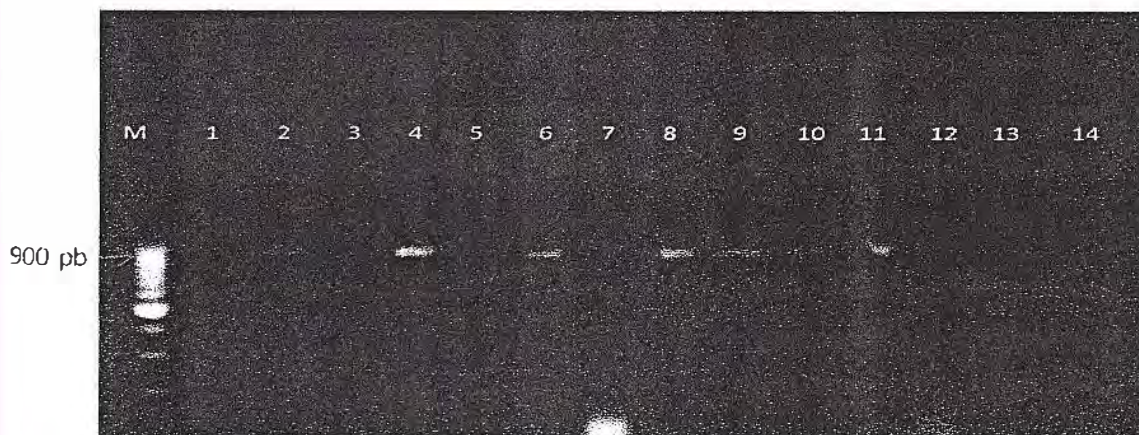
- j. Setelah kering, ditambahkan *molecular grade water* sebanyak 10 ul pada masing-masing tabung, kemudian dihomogenkan dengan vortex, dan spin down masing – masing sekitar 30 detik.
- k. Masukkan ke dalam *sequencing plate* yang telah disediakan tutup dengan septa. Pastikan semuanya tersusun dengan benar agar kapiler tidak patah lalu masukkan ke dalam sekuenser

BAB III

HASIL

Perancangan primer dilakukan menggunakan perangkat lunak *DNAstar*TM dan dikonfirmasi dengan mensejajarkan kandidat primer yang diperoleh dengan genom total RNA HIV-1 menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada web <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Urutan nukleotida primer yang digunakan adalah PHIVf 5' – ggA TCC AAT gTT TTT AgA Tgg AAT AgA TAA ggC – 3', dan PHIVr 5' – gAT ATC CTA ATC CTC ATC CTg TCT ACT T – 3'. Primer didesain mengapit fragmen DNA pengkode integrase pada nukleotida ke 3463 – 3485 dan 4329 – 4308 pada genom total HIV-1. Pada primer PHIVf ditambahkan sisi pengenalan enzim restriksi *BamHI* (ggATCC) dan kodon *start* (ATG), dan pada PHIVr ditambahkan sisi pengenalan enzim restriksi *EcoRV* (GATATC).

Fragmen DNA pengkode integrase HIV-1 telah dioptimasi dan berhasil diamplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR transkripsi balik, 50°C selama 30 menit untuk sintesis cDNA, 95°C selama 15 menit untuk inaktivasi *Reverse Transkriptase*, 95°C selama 1 menit untuk denaturasi DNA, 35 x (95°C, 1 menit denaturasi awal; 47°C, 1 menit penempelan primer; 72°C, 1 menit elongasi), 72°C, 7 menit elongasi akhir. Analisis menggunakan elektroforesis gel DNA 1% menunjukkan adanya fragmen DNA yang berukuran sekitar 900 pasang basa (pb). Hal ini sesuai dengan ukuran teoritis yang diharapkan yaitu 883 pb (gambar 1).

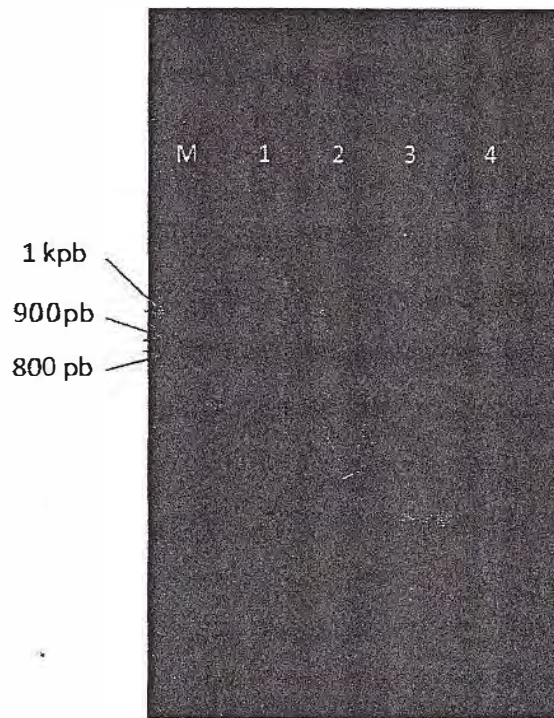


Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi kerangka baca terbuka gen pengkode integrase HIV-1. M= Marka DNA 100bp, 1= AB26, 2= DO29, 3=DO28, 4= DO26, 5= DO27, 6= AB25, 7= DO24, 8= AB08,

9= AB10, 10= DO19, 11= DO20, 12= DO16, 13= kontrol negatif, 14= AB15.

Produk PCR dimurnikan menggunakan metode ekstraksi gel dan dikarakterisasi lebih lanjut dengan metode sekuensing. Urutan nukleotida yang diperoleh dikonfirmasi dengan membandingkannya dengan urutan nukleotida yang terdapat di genbank. Dari 8 produk PCR yang dikarakterisasi untuk mengetahui urutan nukleotidanya, 1 diantaranya menunjukkan homologi yang tinggi dengan integrase HIV-1. 2 diantaranya menunjukkan homologi yang tinggi dengan segmen 4 hemagglutinin H5N1. Sisanya tidak terbaca dengan baik.

Produk PCR yang benar adalah integrase HIV-1 selanjutnya diligasi ke vektor kloning pGEM-Teasy vector. Ligasi dilakukan dengan menggunakan 3 rasio jumlah vektor dan DNA sisipan (1:3, 1:5, dan 1:7) untuk memperoleh kondisi optimal metode kloning. Reaksi ligasi dilakukan selama 18 jam pada suhu 4°C. Reaksi ligasi selanjutnya digunakan untuk mentransformasi *E.coli* JM109 dengan memasukkan hasil ligasi ke dalam sel tersebut dengan metode *heat shock*, yaitu menginkubasi campuran *E.coli* JM109 dengan reaksi ligasi di dalam *waterbath* suhu 42°C selama 90 detik. Transforman yang tumbuh diseleksi di media agar Luria Bertani yang mengandung ampisilin, Xgal dan IPTG. Koloni yang tumbuh diseleksi berdasarkan warna koloni yang terlihat. Koloni biru adalah koloni yang membawa vektor tanpa DNA sisipan, dan koloni putih adalah koloni yang membawa vektor mengandung DNA sisipan. Dalam hasil penelitian ini diperoleh 3 koloni, yaitu koloni biru, koloni biru muda, dan koloni putih. PCR koloni dilakukan untuk mengkarakterisasi klon yang tumbuh. Adanya pita DNA berukuran sekitar 900 pb seperti yang terlihat pada gambar 2 diasumsikan sebagai keberhasilan metode kloning yang digunakan dalam penelitian ini.



Gambar 2. Hasil PCR koloni transforman. M= Marker DNA 100 bp, 1= *E.coli* JM109 kosong, 2= *E.coli* JM109 koloni putih, 3= *E.coli* JM109 koloni biru muda, 4= *E.coli* JM109 koloni biru.

Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni putih yang terindikasi membawa DNA sisipan yang benar menggunakan kit Qiagen miniprep dan secara konvensional menggunakan teknik lisis alkali. Isolasi plasmid dilakukan untuk memastikan adanya plasmid dan integrasi HIV sebagai DNA sisipan.

Plasmid rekombinan selanjutnya dikarakterisasi menggunakan metode sekuensing untuk mengetahui apakah terdapat DNA sisipan integrasi HIV-1. Sekuensing dilakukan menggunakan primer universal T7 promotor dan SP6.

BAB IV PEMBAHASAN

Integrase HIV-1 merupakan protein dengan bobot 32 KDa yang terdiri atas 3 domain fungsional, yaitu region amino-terminal (residu 1 – 50) yang dicirikan oleh motif *HHCCZinc finger-like*. Motif HHCC penting untuk meningkatkan multimerisasi dengan berkordinasi dengan ion Zinc yang berperan dalam integrasi kedua ujung cDNA virus ke kromosom sel inang. Domain *central core* (residu 50 – 212) yang mengandung residu asam yang sangat terpelihara, yaitu D64, D116, dan E152 (motif DDE) yang berperan penting dalam proses katalisis. Domain lain yaitu *carboxyl-terminal* (residu 212 – 288).

Integrase HIV-1 berada pada bagian hilir gen polimerase HIV-1. Gen polimerase mengkode poliprotein yang terdiri atas protease, *reverse transcriptase*, dan integrase. Primer dirancang secara spesifik untuk mengamplifikasi DNA integrase secara utuh agar nantinya diperoleh protein integrase HIV-1 yang fungsional. Sisi-sisi pengenalan enzim restriksi ditambahkan di ujung 5' kedua primer agar diperoleh produk PCR yang mengandung kedua sisi restriksi di kedua ujungnya. Pemilihan sisi restriksi dilakukan dengan memperhatikan vektor ekspresi yang nantinya akan digunakan.

Teknik transkripsi balik dilakukan menggunakan *reverse transcriptase* dari virus Moloney Murine Leukimia yang secara sensitif mampu mengkonversikan RNA menjadi cDNA. cDNA yang diperoleh diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan enzim *Taq polymerase*. Amplifikasi menggunakan enzim ini akan menambahkan *overhang* Adenin (A) pada kedua ujung 5' sehingga sesuai dengan vektor kloning pGEM-Teasyvector yang merupakan plasmid linear dengan *overhang* Timin (T) pada ujung 3'. Produk PCR diperoleh secara optimal menggunakan suhu annealing 47°C selama 1 menit.

Produk PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis gel menunjukkan ukuran pb yang diharapkan, yaitu sekitar 883 pb. Produk PCR yang diperoleh dikarakterisasi lebih lanjut dengan teknik sekuensing untuk memperoleh data mengenai urutan nukleotidanya. Analisis terhadap sekuens produk PCR menunjukkan adanya motif HCC dan ADD yang berperan penting dalam katalisis integrase. Dalam sekuens yang diperoleh, tidak terlihat sisi restriksi

– 22 dengan daerah hemagglutinin virus H5N1. Namun hal tersebut hanya bisa terjadi jika terdapat RNA kontaminan dari virus influenza A pada saat amplifikasi dilakukan. Daerah perancangan primer sangat kecil kemungkinannya untuk diubah karena tujuan amplifikasi DNA adalah untuk memperoleh kerangka baca terbuka gen pengkode integrase HIV secara utuh.

Produk PCR disisipkan ke vektor kloning dengan memanfaatkan sifat basa A yang secara spesifik berikatan dengan basa T yang dibantu oleh enzim T4DNA *ligase*. Reaksi ligasi digunakan untuk mentransformasi *E.coli* JM109 yang sebelumnya rentan terhadap antibiotik ampisilin menjadi resistan terhadap antibiotik tersebut. Sifat resistan tersebut muncul karena adanya gen pengkode resisten ampisilin yang terdapat pada plasmid yang digunakan sebagai vektor.¹⁰ Transforman berwarna putih yang tumbuh dikarakterisasi dengan teknik PCR koloni dan sekuensing. Hasil PCR koloni pada transforman berwarna putih menunjukkan adanya DNA sisipan yang diharapkan, tetapi saat dikarakterisasi dengan teknik sekuensing, nukleotida tidak terbaca dengan baik. Hal tersebut menyebabkan keraguan akan keberhasilan kloning pada transforman yang diperoleh.

Kegagalan kloning bisa terjadi karena banyak faktor, antara lain kualitas dan keutuhan DNA yang akan disisipkan, aktifitas enzim T4 DNA *ligase* tidak optimal, kualitas dapar *ligase* yang menurun, dan rasio vektor dan DNA sisipan tidak optimal. Kualitas dan keutuhan DNA tergantung pada preparasi produk PCR sebelum ligasi. *Overhang* A pada kedua ujung DNA sisipan mudah putus karena terlalu lama terpapar sinar ultraviolet, dan penyimpanan yang terlalu lama (di atas 1 bulan).¹¹ Penyebab lainnya adalah *E.coli* JM109 yang digunakan sebagai inang menolak fragmen DNA integrase HIV-1 dan mendegradasinya sehingga tidak tersisipi di vektor yang digunakan. Dalam penelitian ini, masih ada keberhasilan kloning fragmen DNA integrase HIV-1 tersebut ke dalam *E.coli* JM109 karena PCR koloni menunjukkan ada DNA sisipan dengan ukuran yang diharapkan. Karakterisasi akhir, yaitu teknik sekuensing mungkin tidak bekerja secara optimal sehingga tidak memberikan hasil yang dapat memberikan data nukleotida vektor rekombinan. Saat ini sekuensing ulang sedang dilakukan di BPPT Serpong untuk memastikan keberhasilan kloning kerangka baca terbuka gen pengkode integrase HIV-1 pada *E.coli* JM109.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Transkripsi balik dan amplifikasi cDNA integrase HIV-1 telah berhasil dilakukan dan dibuktikan dengan data elektroforesis yang menunjukkan ukuran yang sesuai dengan teori.
2. Analisis penentuan urutan nukleotida mengidentifikasi bahwa fragmen DNA yang diperoleh adalah benar integrase HIV-1.
3. Kloning kerangka baca terbuka gen pengkode integrase HIV-1 belum berhasil diidentifikasi secara aktual.

Saran

1. Dilakukan sekuensing ulang pada sampel yang teridentifikasi sebagai flu burung H5N1 untuk memastikan kebenaran urutan nukleotidanya.
2. Melakukan amplifikasi ulang sampel-sampel yang tidak terbaca saat dikarakterisasi dengan teknik sekuensing.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Kepala Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua.
2. Kepala Seksi Pelayanan Penelitian Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua.
3. Seluruh staf Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua.
4. Semua pihak yang telah membantu berjalannya penelitian ini.

Daftar Kepustakaan

1. Sukaswara B. Jumlah Kasus HIV/AIDS per 31 Maret 2009 (online). Available from <http://www.aidsindonesia.or.id/repo/DataKasusPapuaTriwulanI2009.pdf>
2. Clavel F, Hance AJ. HIV Drug Resistance, *N Engl J Med* 2004; 350: 1023 – 1035.
3. Jackson BJ, Pergola GB, Guay LA, Musoke P, Mracna M, Fowler MG, et al. Identification of the K103N Resistance Mutation In Ugandan Women Receiving Nevirapine to Prevent HIV-1 Vertical Transmission. *AIDS* 2000 4(11): 111 – 115.
4. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase Inhibitors to Treat HIV/ AIDS, *Nature Reviews* 2005; 4: 236 – 248.
5. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, et al. Inhibitors of Strand Transfer That Prevent Integration and Inhibit HIV-1 Replication in Cells, *Science* 2000; 287: 646 – 650.
6. Goldgur Y, Craigie R, Cohen GH, Fujiwara T, Yoshinaga T, Fujishita T, et al. Structure of HIV-1 Integrase Catalytic Domain Complexed with an Inhibitor: A Platform for Antiviral Drug Design; *PNAS* 1995; 96 (23): 13040 – 13043.
7. Cherepanov P, Pluymers W, Claeys A, Proost P, Clercq ED, Debyser Z. High-level Expression of Active HIV-1 Integrase from a Synthetic Gene in Human Cells, *The FASEB Journal* 2000; 14: 1389 – 1399.
8. Evering TH, Markowitz M. HIV-1 Integrase Inhibitors, *The PRN Notebook* 2008; 13:1 – 9.
9. Madigan, MT, and Martinko JM (2006), Brock, *Biology of Microorganism*, international edition, eleventh edition, 257-265.
10. Brown, TA. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Fourth Edition. USA: Blackwell Science Ltd. 2001
11. Zimmerman, M., Beek, J., and Wolf, K. (1998) Minimizing the exposure to UV light when extracting DNA from agarose gels. *Biotechniques*. 25, 586.

bioinformatics

S/N G:59 A:39 T:40 C:36

KB.bcp

KB 1.4.18 Cap:3

A_PHIVR

KB_3130_POP7_B0TV3.mob

Pls 2079 to 12445 Pk1 Loc:2054

Version 5.2.0 HISQVBases: 518

Sep 21, 2012 01:58PM, GMT

Sep 21, 2012 02:22PM, GMT

Spacing:1145 Pls:Panel1500

Plate Name: TG(21092012)Holma

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 25



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS PAPUA

Jalan Kesehatan Nomor 10 Dok II Jayapura 99112. Kotak Pos 1427
Telepon: (0967) 534389 Faksimile: (0967) 534697
Surat Elektronik : biomedis_papua@litbang.depkes.go.id

TELAAHAN STAF

**TENTANG REALISASI PENELITIAN KLONING KERANGKA BACA TERBUKA GEN PENGKODE
INTEGRASE HIV-1**

I. Persoalan

Pada tahun 2012 terdapat 3 (tiga) penelitian yang dananya bersumber dari DIPA Balai Litbang Biomedis Papua Tahun 2012, yaitu :

1. Penelitian Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrasi HIV-1
2. Penelitian Sindroma Metabolik di Kota Jayapura
3. Studi Kejadian Luar Biasa

Dari realisasi penggunaan anggaran pada ketiga penelitian tersebut terdapat satu penelitian yaitu penelitian Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrasi HIV-1 yang realisasi anggarannya melebihi Pagu pada penelitian tersebut. Hal ini yang perlu dijelaskan dalam telaahan staf ini.

II. Analisis Masalah

Pagu penelitian Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrasi HIV-1 adalah Rp. 374.191.000,- dan realisasinya adalah Rp. 458.576.452,-. Hal ini disebabkan belanja bahan laboratorium untuk penelitian tersebut melebihi pagu yang tersedia yaitu pagu Rp. 301.366.000 realisasi Rp. 396.512.059,-.

Belanja bahan laboratorium pada penelitian ini dapat terealisasi sekalipun melebihi pagu disebabkan pengadaan bahan untuk penelitian ini digabungkan dengan pengadaan bahan laboratorium untuk penelitian Sindroma Metabolik. Penelitian Sindroma Metabolik memiliki pagu untuk pengadaan bahan laboratorium sebesar Rp. 169.742.000,-, sedangkan realisasinya Rp. 58.667.941,-.

Karena penggabungan pengadaan bahan laboratorium dari kedua penelitian ini dan khilaf untuk mengusulkan revisi anggaran, menyebabkan belanja bahan laboratorium dapat saling menutupi sehingga tidak terlihat kekurangan anggaran tersebut dan berpengaruh pada realisasi anggaran penelitian Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Integrasi HIV-1.

III. Penutup

Demikian telaahan realisasi anggaran penelitian yang dapat kami buat, dan diharapkan ke depannya hal ini dapat diperhatikan dengan lebih baik lagi.

Jayapura, Januari 2013



Lampiran Realisasi Anggaran Penelitian Tahun 2012

Judul Penelitian : Kloning Kerangka Baca terbuka Gen Pengkode Intergrase HIV-1

Ketua Peneliti : dr. Antonius Oktavian Ilambra, M.kes

Pagu Peneliti : Rp. 374.191.000,-

No	Uraian Realisasi (Rp)						
	Realisasi Total (Rp)	Honor Tetap	Belanja Bahan	BNO	Perjadin	Belanja Modal	dst
	458.576.452	14.695.000	397.958.304	6.372.000	39.551.148	-	-

*j) Mohon lembar ini di lampirkan dalam dokumen laporan akhir penelitian tahun 2012