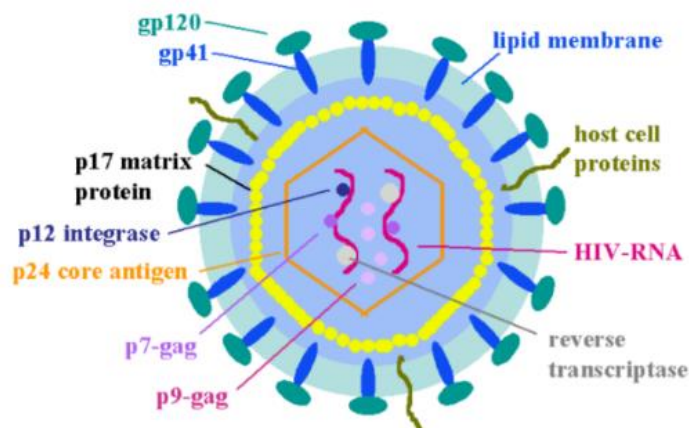


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Human immunodeficiency virus (HIV)*

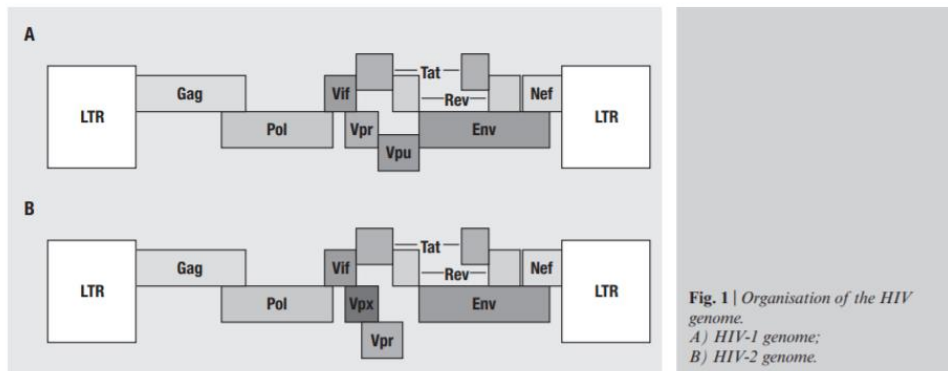
HIV termasuk kedalam genus *Lentivirus* dalam keluarga *Retrovirus*, subfamili *Orthoretrovirinae* (Seitz, 2016). *Retrovirus* adalah salah satu keluarga virus RNA (*Ribonucleic acid*) yang memiliki enzim *reverse transcriptase* yang mampu membuat salinan DNA (*Deoxyribonucleic acid*) dari RNA virus yang kemudian diintegrasikan ke dalam DNA sel inang. *Retrovirus* dapat dibagi menjadi tiga kelompok besar yaitu oncoretrovirus (retrovirus onkogenik), lentivirus (retrovirus lambat) dan spumavirus (virus berbusa). *Oncoretrovirus* dapat menyebabkan kanker pada beberapa spesies, *lentivirus* dapat menyebabkan defisiensi imun yang parah dan kematian pada manusia dan hewan lainnya, dan *spumavirus* bersifat jinak dan tidak terkait dengan penyakit apa pun pada manusia atau hewan (Prasolov & Ivanov, 2000). *Retrovirus* banyak menyebabkan penyakit serius pada manusia, mamalia, dan burung. Terdapat empat retrovirus manusia menular dan telah diidentifikasi yaitu *human T-lymphotropic virus* tipe 1 (HTLV-1) dan HTLV-2, HIV-1 dan HIV-2 diidentifikasi pada tahun 1983 dan 1986 (Voisset et al., 2008). HIV menyerang sistem kekebalan tubuh, khususnya sel darah putih yang disebut sel CD4 (*Cluster of Differentiation 4*) berperan membantu mengidentifikasi dan menghancurkan patogen penyebab infeksi, termasuk bakteri, jamur, dan virus (Fowler, 1997). HIV menghancurkan sel CD4 (**Gambar 2.4**), terjadi penurunan imunitas perlahan lahan yang akan menyebabkan tubuh menjadi mudah terserang infeksi dan menyebabkan kematian (Fowler, 1997; Ibrahim et al., 2018).



Gambar 2. 1 Struktur HIV (Hoffmann & Kamps, 2003)

(**Gambar 2.1**) HIV memiliki diameter sekitar 100 nm dan memiliki kapsid berbentuk peluru, terbentuk dari protein p24 dari gen gag, kapsid berisi dua duplikat RNA yang merupakan genom virus. HIV memiliki 3 gen penyusun utama yaitu pertama, *Envelope gene (Env gene)* berupa gp120 dan gp41. Gp 120 merupakan glikoprotein yang tertutup oleh molekul gula untuk melindungi dari pengenalan antibodi yang berfungsi mengenali secara spesifik reseptor dari permukaan target sel. Gp 41 merupakan transmembran glikoprotein yang berfungsi melakukan transmembran virus, mempercepat fusion (peleburan) dari penderita dan membran virus serta membawa HIV masuk ke dalam tubuh penderita. Kedua, *polymerase gene (pol gene)* mengkode enzim *reverse transcriptase* (RTase) berperan penting dalam replikasi virus yang mengubah RNA virus menjadi DNA. Ketiga, *core gene (gag gene)* yaitu p7 dan p9 (*Nucleo Capsid*) yang berfungsi mengkode protein yaitu Matrix protein (p17) dan p24 (*Core Antigen*). Matrix protein (p17) yaitu garis dari bagian dalam membran virus dan dapat memfasilitasi perjalanan dari HIV DNA masuk ke inti tubuh penderita. *Core Antigen* (p24) yaitu inti dari virus HIV yang berisikan 2 genom RNA an 3 macam enzim (*reverse ranscriptase, protease dan integrase*) (Gigantesco & Giuliani, 2011; Khan & Geiger, 2021; Xue et al., 2012).

Patogenesis HIV



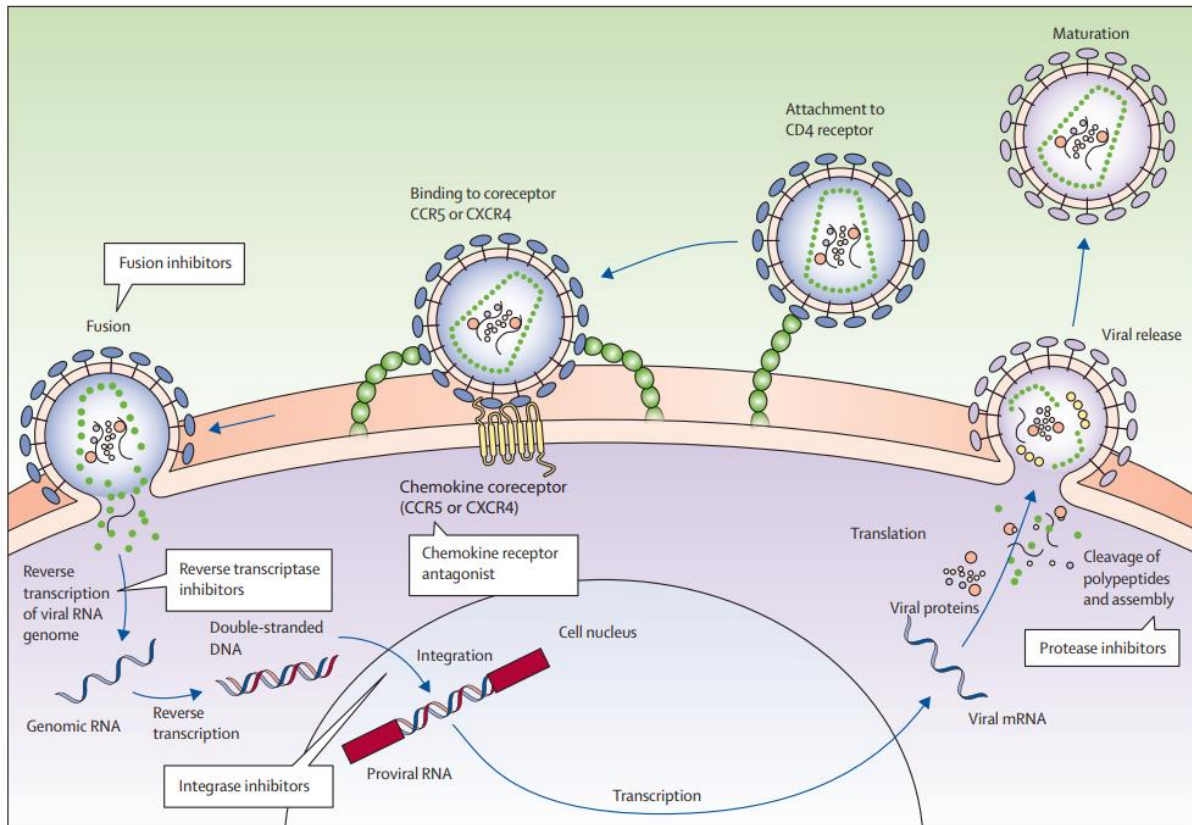
Gambar 2. 2 Stuktur genom HIV (Popper et al., 1999).

(**Gambar 2. 3**) HIV mempunyai tiga gen khas retrovirus yaitu gag, pol, dan env yang berperan pada protein struktural, genom RNA mempunyai gen tambahan yaitu gen tat dan rev berperan dalam replikasi. Gen tat berfungsi dalam transaktivasi, terlibat meningkatkan produksi mRNA HIV selama proses transkripsi. Gen rev berperan dalam mengawal pengeluaran mRNA dari nukleus ke sitoplasma. Protein tat dan nef akan menekan sintesa protein MHC kelas I yang mengurangi kemampuan sel T sitotoksik untuk membunuh sel-sel yang terinfeksi oleh HIV. Empat gen lain yaitu *viral infectivity factor* (vif), *viral protein x* (vpx), *viral protein u* (vpu) dan *viral protein r* (vpr) adalah gen yang tidak berperan dalam replikasi namun berperan dalam infeksi aktif HIV. HIV memiliki 2 tipe yaitu HIV-1 dan HIV-2, diketahui HIV-2 kurang patogen dibandingkan HIV-1, HIV-1 mempunyai gen vpu tetapi tidak mempunyai gen vpx, sebaliknya HIV-2 mempunyai vpx tetapi tidak mempunyai vpu, vpu berperan meningkatkan degradasi protein CD4 yang menyebabkan HIV-1 lebih patogen. Penularan heteroseksual HIV-2 terjadi lebih sedikit daripada HIV-1, tingkat perkembangan penyakit pada infeksi HIV-2 jauh lebih rendah daripada HIV-1 (Khan & Geiger, 2021; Popper et al., 1999).

Tabel 2. 1 Karakteristik gen HIV

Protein	Fungsi	Pustaka
Vif	Meningkatkan infektifitas HIV dengan menghambat <i>apolipoprotein B RNA-editing enzyme</i> (APOBEC3G), enzim ini menyebabkan hipermutasi dalam RNA retrovirus.	(Popper et al., 1999; Xue et al., 2012).
Nef	Replikasi virus dan patogenisitas, berperan juga dalam aktivitas interaksi seluler, mengubah banyak fungsi sel T yang normal, termasuk endositosis, transduksi sinyal, dan lainnya.	(Popper et al., 1999; Xue et al., 2012).
Vpr	Protein pleiotropik yang terlibat dalam apoptosis, penghentian siklus sel, disregulasi sistem imun dan modulasi transkripsi dari genom virus.	(Kogan & Rappaport, 2011; Xue et al., 2012).
Vpx	Vpx pada HIV-2 merupakan fungsi yang dilakukan oleh Vpr pada HIV-1 yaitu berperan penting untuk replikasi virus	(Popper et al., 1999).
Vpu	Vpu memiliki dua fungsi penting dalam infeksi HIV-1. Pada jalur proteasomal ubiquitin berperan meningkatkan degradasi protein CD4 yang diproduksi secara <i>de novo</i> di retikulum endoplasma dan menambah pelepasan virion keturunan dari sel yang terinfeksi dengan melawan efek <i>tetherin</i> (pemblokiran virus).	(Khan & Geiger, 2021).

II.1.1 Infeksi dan Replikasi HIV



Gambar 2. 4 Siklus hidup HIV(Maartens et al., 2014)

(Gambar 2. 5) Infeksi sel diawali dengan interaksi protein-protein kompleks sebagai berikut: **1). Fusion**, proses infeksi dimulai dengan pengikatan (*attachment and binding*) gp120 dengan molekul reseptor pada permukaan sel target (*CC-chemokine receptor 5* (CCR5) atau *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR4) melalui CD4, Selanjutnya inti virus masuk ke dalam sel dan terjadi fusi membran sel dengan envelope virus (informasi genetik virus akan masuk ke dalam sel). **2). Reverse Transcription**, genom HIV terdiri dari dua RNA untai plus yang dilindungi oleh nukleokapsid akan mengalami transkripsi balik menjadi DNA oleh enzim RTase, disebut *complimentary* DNA (DNA untai tunggal), berlanjut menjadi DNA untai ganda (*double stranded DNA* / dsDNA) kemudian dsDNA dibawa ke inti sel. Di inti akan terjadi integrasi dsDNA virus dengan kromosom DNA sel, dimediasi enzim *integrase*. **3). Integration**, Kompleks pra integrasi berikutnya diimpor ke dalam nukleus. DNA integrasi akan mencetak mRNA dengan bantuan enzim *polymerase*. **4). Transcription**, DNA HIV ditranskripsi ke mRNA virus, mRNA kemudian diekspor ke ribosom yang berada disitoplasma yang merupakan tempat terjadi translasi. **5). Translasi**, Translasi merupakan proses penerjemahan kode DNA sehingga menghasilkan rantai polipeptida penyusun protein. mRNA ditranslasi menjadi komponen virus baru di dalam

sitoplasma sel yang terinfeksi virus. Komponen-komponen virus akan ditransportasi ke membran plasma dan disinilah akan terjadi perakitan menjadi virus HIV baru yang masih *immature*. **6). *Maturation***, virus akan terbungkus dalam genom virus baru yang telah mengalami replikasi dan siap dilepaskan dari sel inang, proses ini termasuk tahap pematangan virus, untuk membuat protein virus dan akhirnya mengalami proteolisis oleh protease menjadi virus HIV *matur* (Deeks et al., 2015; Kirchhoff, 2016; Seitz, 2016).

II.1.2 Fase-fase infeksi HIV dan *Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*

Infeksi HIV memiliki efek yang mendalam dan kompleks pada sistem kekebalan tubuh. HIV menginfeksi CD4+ yang diaktifkan oleh sel T, melalui mekanisme langsung (sitopatik) atau tidak langsung infeksi ini dapat menyebabkan kematian sel (Deeks et al., 2015). Infeksi HIV terdiri dari beberapa fase, yaitu:

Fase Gerhana

3 minggu pertama, selama infeksi HIV virus yang ditransmisikan pertama kali menginfeksi sel target di jaringan mukosa dan kemudian menyebar melalui sistem limfoid, penyebaran sistemik melalui kelenjar getah bening menyebabkan hilangnya CD4+ dengan cepat hingga memicu respon interferon dan membentuk *reservoir* virus.

Fase Akut

6 minggu setelah fase gerhana, kadar RNA HIV pertama kali dapat dideteksi dalam darah dan kemudian meningkat secara eksponensial mencapai puncak dalam beberapa minggu, pada titik ini juga munculnya respon imun adaptif dan muncul gejala seperti flu (Deeks et al., 2015).

Fase Kronik

Selanjutnya selama infeksi 4 bulan hingga beberapa tahun dalam fase kronik, penghancuran Sel T CD4+ menyebabkan imunodefisiensi dan peradangan kronis sehingga memperburuk kerusakan jaringan limfoid terutama di usus (Deeks et al., 2015) selama fase kronik, jumlah Sel-T CD4+ menurun secara drastis terjadi viremia tinggi (kondisi akibat adanya kadar virus tinggi dalam tubuh), tanggapan antibodi HIV sebagian besar tidak efektif karena pelepasan virus yang cepat (Popper et al., 1999).

Nilai ideal CD4+ pada orang dengan sistem kekebalan yang baik yaitu berkisar antara 500-1200 *cell/μl*, sedangkan pada orang dengan sistem kekebalan yang terganggu nilai CD4+ semakin lama akan semakin menurun hingga di bawah 500 *cell/μl*. CD4+ merupakan penanda pada permukaan sel sel darah putih manusia, terutama sel-sel limfosit. CD4+ pada

orang yang memiliki sistem kekebalan menurun menjadi sangat penting, karena berkurangnya nilai CD4+ dalam tubuh manusia menunjukkan lemahnya peranan sel limfosit dalam memerangi infeksi yang masuk ke tubuh manusia. Pada pasien yang terinfeksi HIV nilai CD4+ akan terus menurun seiring dengan progresifitas penyakit, maka dari itu jumlah CD4 dapat menjadi salah satu indikator untuk menilai tingkat sistem kekebalan tubuh pada pasien dengan HIV/AIDS (Deeks et al., 2015; Ibrahim et al., 2018), telah dilaporkan bahwa individu yang menunjukkan gejala yang lebih parah dan tahan lama dalam perjalanan infeksi akut cenderung berkembang lebih cepat menjadi AIDS. Pasien dengan gejala AIDS akan menerima diagnosis AIDS ketika jumlah CD4+ mereka turun di bawah 200 *cell/μl* atau jika mereka mengembangkan infeksi oportunistik tertentu (Ford et al., 2017). Penderita AIDS dapat memiliki viral load yang tinggi dan sangat menular, tanpa pengobatan penderita AIDS umumnya dapat bertahan hidup sekitar tiga tahun.

II.2 Pengobatan Kuratif dan Prefentif HIV

Pengobatan Kuratif

Terapi Antiretroviral merupakan pengobatan utama untuk pasien HIV atau AIDS, namun antiretroviral tidak dapat mengeliminasi HIV, karena mekanisme obat ini hanya memperlambat laju pertumbuhan virus tersebut, dan membantu menghambat proses replikasi HIV dalam sel CD4, dengan demikian dapat mengurangi jumlah virus untuk menularkan ke sel CD4 lainnya (Andriani et al., 2014). Empat kelas umum obat ART yaitu:

Tabel 2. 2 Golongan obat Antiretroviral

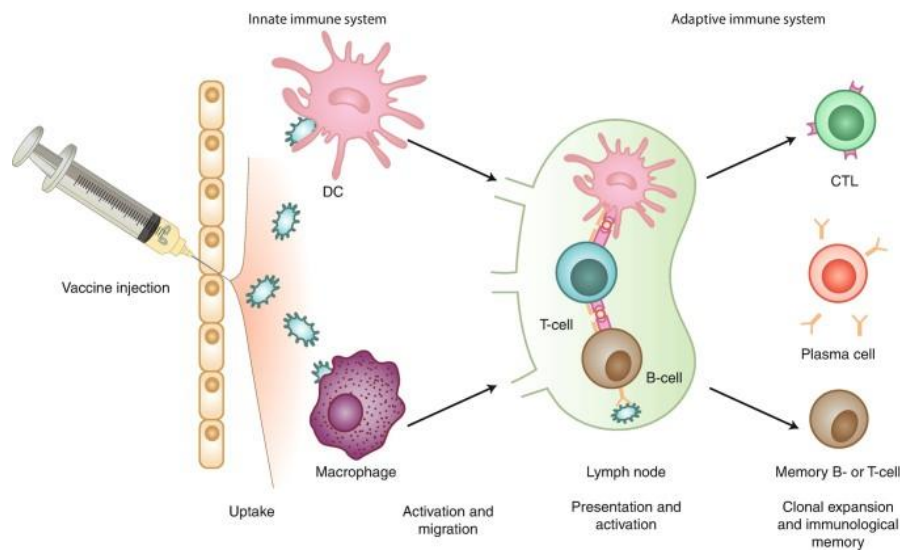
Golongan Obat	Mekanisme Kerja	Contoh Obat
Entry Inhibitor	Menghambat virus memasuki sel (Deeks et al., 2015).	Enfuvirtide, Ibalizumab-uyk, dan Maraviroc (Fowler, 1997).
<i>Reverse Transcriptase Inhibitor</i>	Bekerja memblokir <i>Reverse Transcription</i>	Terdiri dari dua kelas: NRTI (<i>Nukleosida/Nukleotida Reverse Transcriptase Inhibitor</i>) dan NNRTI (<i>Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>). Contoh obat NRTI yaitu Abacavir, Didanosine, Emtricitabine, Lamivudine, Stavudine, Tenofovir alafenamide, Tenofovir disoproxil fumarate, dan Zidovudine. Contoh Obat

NNRTI yaitu Devalirdine, Doravirine, Efavirine, Nevirapine, dan Rilpivirine (Fowler, 1997).

InSTI (<i>Integrase strand transfer inhibitors</i>)	Menghambat transfer untai integrase mencegah genom HIV diintegrasikan ke dalam genom inang (Deeks et al., 2015)	Bictegravir, Dolutegravir, Elvitegravir (coformulated with cobistat), dan Raltegravir (Fowler, 1997)
PI (<i>Protease Inhibitors</i>)	Memblokir langkah terakhir dalam siklus hidup virus (Deeks et al., 2015)	Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Tipranavir (Fowler, 1997)

Pengobatan Prefentif

Vaksinasi merupakan bentuk imunitas aktif yang sederhana, efektif, dan aman untuk melindungi atau mencegah dari penyakit berbahaya yang disebabkan oleh bakteri atau virus. Vaksinasi menggunakan pertahanan alami dari tubuh untuk membangun ketahanan terhadap infeksi tertentu dan membuat sistem kekebalan kelompok (*herd immunity*) atau sistem imun tubuh lebih kuat (WHO 2020). Vaksin adalah zat atau senyawa yang berfungsi untuk meningkatkan respon kekebalan tubuh terhadap virus yang akan menyerang (Antigen), antigen merupakan molekul unik yang ditemukan dipermukaan patogen. Ketika mendapatkan vaksin, sistem kekebalan tubuh akan memberikan respon mengenali antigen yang menyerang seperti virus atau bakteri (Paisal & Subangkit, 2013; Purwaniati & Asnawi, 2020; Sharma et al., 2020) yang akan menghasilkan antibodi yaitu protein yang diproduksi secara alami oleh sistem kekebalan untuk melawan penyakit, jika terjadi infeksi virus di masa mendatang, sistem kekebalan dapat dengan cepat menghancurkannya sebelum tubuh jatuh sakit (World Health Organization (WHO), 2013), (Husada, 2020), (Sari & Sriwidodo, 2020). Oleh karena itu, vaksin merupakan cara yang aman dan efektif untuk menghasilkan kekebalan dalam tubuh tanpa menyebabkan penyakit, hal tersebut yang menjadikan vaksin sebagai solusi yang sangat direkomendasikan dan intervensi kesehatan dengan biaya yang paling efektif (World Health Organization (WHO), 2013).



Gambar 2. 6 Mekanisme Vaksin Memicu Kekebalan Tubuh (Crommelin et al., 2019)

(**Gambar 2. 7**) Mekanisme Vaksin Memicu Kekebalan Tubuh. Setelah vaksin disuntikkan, komponen vaksin akan diambil oleh *Antigen Presenting Cells* (APC) seperti makrofag dan sel dendritik (DC), sel APC yang telah mengambil antigen menjadi aktif dan mulai bermigrasi menuju kelenjar getah bening didekatnya yang merupakan tempat sel T dan B, didalam kelenjar getah bening, antigen yang diproses oleh APC dipresentasikan ke limfosit, ketika limfosit mengenali antigen dan menerima sinyal kostimulasi yang sesuai, sel T (CD4+) dan sel B akan menjadi aktif, yang mana Sel T berfungsi membantu sel B memproduksi antibodi untuk melawan antigen. Selain itu, memori sel B dan T terbentuk yang memberikan perlindungan jangka panjang (terkadang seumur hidup) terhadap infeksi patogen atau virus. Sel limfosit B yang memiliki daya afinitas yang rendah serta autoreaktif akan mengalami proses apoptosis, sedangkan sel yang memiliki daya afinitas yang tinggi dan tidak autoreaktif akan menjadi sel B memori, bila terpapar dengan antigen yang sama untuk kedua kalinya maka sel B memori tersebut dapat menghasilkan antibodi yang memiliki daya afinitas yang tinggi (Crommelin et al., 2019).

II.3 Platform Vaksin HIV

Pengembangan vaksin HIV terbukti menjadi tantangan yang sulit, kesulitan dalam membuat vaksin HIV disebabkan oleh kompleksitas infeksi HIV yaitu menginfeksi CD4+ yang merupakan reseptor sistem kekebalan tubuh (Letvin, 2005; Prakash Sahoo et al., 2021). Platform virus hidup yang dilemahkan dan virus yang dinaktivasi merupakan metode pembuatan vaksin secara tradisional yang dapat digunakan untuk berbagai patogen virus pada manusia. Vaksin konvensional tidak direkomendasikan untuk HIV karena terbukti tidak bermanfaat untuk pencegahan infeksi HIV (Hsu & O'Connell, 2017; Letvin, 2005; Nath, 2010). Vaksin subunit protein mengandung fragmen antigenik dari suatu mikroorganisme sehingga dapat merangsang respon imun. AIDSVAX gp120 merupakan vaksin AIDS yang

dirancang menggunakan konsep subunit yang telah diujikan pada manusia. Hasil uji menunjukkan vaksin ini tidak dapat mencegah infeksi HIV. Evaluasi efikasi menunjukkan kurangnya induksi bnAbs. Hingga saat ini penelitian masih terus dilakukan pengoptimalkan vaksin pada masa yang akan datang (Hsu & O'Connell, 2017; Nath, 2010). Kemampuan untuk menginduksi bnAbs menjadi tantangan dalam vaksin HIV. Induksi bnAbs dihambat oleh kestabilan dari glikan yang melindungi Env HIV (Bracaglia 2017). Saat ini, para peneliti telah mengeksplorasi pendekatan baru yaitu vaksin mRNA dan penargetan sel dendritik (DC) (Gandhi et al., 2016; Ndhlovu et al., 2012; Prakash Sahoo et al., 2021).

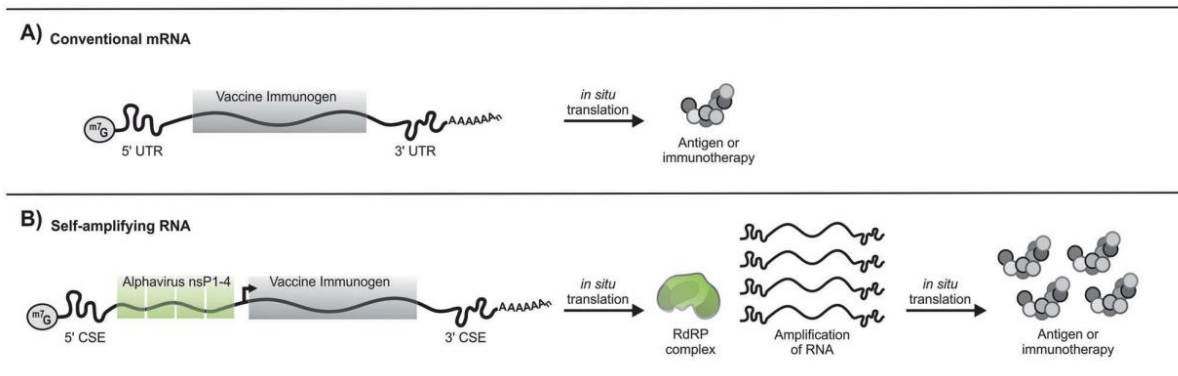
II.3.1 Vaksin subunit

Vaksin ini mengandung komponen patogen penyebab penyakit, seperti protein dan polisakarida spesifik, atau asam nukleat yang dapat memicu respon kekebalan tubuh. Kelebihan dari vaksin subunit dianggap sangat aman karena tidak mengandung komponen hidup. Kelemahan vaksin ini yaitu respon kekebalan dapat terjadi namun tidak ada jaminan memori kekebalan akan terbentuk pada infeksi selanjutnya (Jenner et al., 2012; Panjiasih Susmiarsih, 2019). Hanya satu (RV144) dari 6 uji coba yang menunjukkan efikasi dalam menginduksi bnAbs menggunakan desain tiruan trimer Env asli (Hsu & O'Connell, 2017).

II.3.1 Vaksin mRNA

mRNA adalah metode yang relatif baru dan berpotensi untuk berbagai aplikasi klinis, termasuk vaksin (Nelson et al., 2020). Vaksin berbasis mRNA mengandung untai mRNA tiruan yang mengkode protein antigen khusus untuk memicu respon imun dalam tubuh. Respon imun akan menghasilkan antibodi yang melindungi dari infeksi jika virus yang sebenarnya masuk ke tubuh kita (Sharma et al., 2020). Keunggulan utama mRNA dibandingkan dengan pendekatan konvensional yaitu dapat meminimalisir potensi risiko infeksi dan induksi insersi mutagenesis akibat degradasi mRNA dalam sel lingkungan mikro, selain itu memiliki efektivitas yang tinggi untuk meningkatkan imun karena perancangan modifikasi struktur mRNA akan meningkatkan kestabilan dan translasi yang baik, dalam imunisasi dosis rendah vaksin ini memiliki potensi yang tinggi untuk menetralkan immunoglobulin sehingga dapat menginduksi respon imun yang kuat dengan mengaktifkan sel T (Prakash Sahoo et al., 2021; Wang et al., 2020). mRNA membawa transkrip pengkodean antigen, dan menggunakan mesin translasi sel inang untuk menghasilkan antigen, yang kemudian merangsang respon imun (Cordeiro & Alonso, 2016). Vaksin mRNA berdasarkan kapasitas translasi RNA dibagi menjadi dua jenis yaitu *non-amplifying* (mengkode antigen yang diinginkan) dan *self-amplifying* (mengkode replika virus yang

direkayasa dari alphavirus). Kedua klasifikasi tersebut memiliki kelebihan dan keterbatasan sebagai berikut: (Brito et al., 2015).



Gambar 2. 8 Ilustrasi skema *Conventional* (A) dan *self-amplifying* (B) (Bloom et al., 2021)

(**Gambar 2. 9**) Karakterisasi vektor mRNA *non-amplifying* (*Conventional mRNA*) dan *self-amplifying* mRNA. (A) 5' (m⁷G) dan ujung poli A digunakan pada semua transkrip RNA, mRNA konvensional mengkodekan vaksin imunogen dan mengait 5' dan 3' UTR. Antigen atau imunoterapi diterjemahkan dari transkrip yang tidak bereplikasi. (B) RNA yang menggandakan diri mengkode urutan 5' dan 3' CSE, gen nsP1-4, promotor subgenomik, dan imunogen vaksin. Mengikuti translasi in situ, protein nsP1-4 membentuk kompleks RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*) yang mengenali urutan CSE yang mengait dan memperkuat penyediaan vaksin transkrip. Hal ini menyebabkan akumulasi antigen atau imunoterapi di dalam sel.

II.3.1.1 *Non-amplifying mRNA*

mRNA *non-amplifying* merupakan pendekatan yang sederhana dan ekonomis untuk pengembangan vaksin mRNA. mRNA disuntikkan sendiri (naked) atau dienkapsulasi dalam liposom. Pengembangan vaksin ini telah dilakukan dalam beberapa tahun terakhir untuk meningkatkan imunogenisitas dan keamanan, optimasi yang dilakukan berupa penggunaan kodon yang dioptimalkan, 3' capping, 3' dan 5' wilayah yang tidak diterjemahkan, ekor poli A, modifikasi dan pemurnian nukleosida (Mu et al., 2021). mRNA *non-amplifying* memiliki kelebihan karena konstruksinya ukurannya yang sederhana, relatif kecil dibandingkan dengan *Self-amplifying* dan tidak adanya protein tambahan yang disandikan yang bisa menjadi target kekebalan yang tidak diinginkan. Terapi mRNA ini memiliki waktu paruh yang pendek, tidak stabil dan tingkat ekspresi rendah, salah satu upaya mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan memasukkan elemen urutan tertentu pada sintesis mRNA, merubah ribonukleotida (Brito et al., 2015).

II.3.1.2 *Self-amplifying mRNA (saRNAs)*

Vaksin dengan metode ini menggunakan mRNA yang direkayasa dari virus RNA yang mengkodekan imunogen vaksin serta mesin replikasi virus. saRNA akan bereplikasi sendiri

setelah memasuki sitosol sel, sehingga meningkatkan produksi imunogen yang dikodekan dibandingkan dengan mRNA *non-amplifying*. Imunogen yang diproduksi disandikan dengan kuat. saRNA menunjukkan tingkat imunogenisitas yang sama dengan mRNA *non-amplifying* pada dosis yang lebih rendah. Sebagian besar saRNA dikembangkan dari alphavirus untai tunggal, seperti virus ensefalitis venezuela equine, virus sindbis dan virus hutan semliki (Mu et al., 2021). Dalam mRNA *self-amplifying* berbasis alphavirus, mRNA tambahan mengandung ORF yang mengkode empat protein nonstruktural (nsP1-4) dan promotor subgenomik. Gen dalam genom virus yang mengkode protein struktural digantikan oleh gen yang mengkode protein yang diinginkan, sehingga tidak dihasilkan virus menular. Setelah diantarkan ke sitosol sel, mRNA akan ditranslasi didalam ribosom sel inang menghasilkan empat komponen fungsional RDRP atau aparatus replikasi genom virus: nsP1, nsP2, nsP3, dan nsP4 (Brito et al., 2015). Perkembangan vaksin HIV-1 menggunakan saRNA diformulasikan dengan polimer agar dapat dikombinasi dengan vektor yang mudah menginduksi bnAbs (Moyo et al., 2019).

II.3.1.3 Produksi vaksin mRNA

Pada vaksin jenis mRNA tidak dibutuhkan kultur sel serta material yang diturunkan dari hewan seperti halnya vaksin inaktivasi, berikut tahap produksi vaksin mRNA secara umum:

Pembentukan mRNA

Vaksin jenis mRNA terdapat dua tahap pembentukan mRNA yaitu reaksi enzimatik transkripsi *in vitro* dan pemasangan tutup (*capping*) mRNA. Tahap pertama, reaksi enzimatik IVT (*in vitro transcription*) digunakan untuk menghasilkan mRNA yang tergantung pada rantai polimer T7, SP6 atau T3 pada RNA. Rantai polimer ini berfungsi mengkatalisasi sintesa mRNA dari template *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Template DNA diproduksi melalui proses pemurnian linier dari plasmid atau dengan penguatan area gen yang diinginkan menggunakan reaksi *polymerase chain reaction* (PCR). Secara keseluruhan reaksi enzimatik IVT pembentukan mRNA hanya membutuhkan waktu 4 jam. Tahap kedua, pemasangan tutup pada mRNA dapat dilakukan saat reaksi enzimatik IVT yaitu dengan mensubstitusi bagian dari substrat *Guanosine Triphosphate* (GTP) dengan penutup analog. *Capping* mRNA juga dapat dilakukan saat reaksi enzim kedua (setelah IVT) menggunakan enzim penutup vaksin (*vaccinia capping enzyme*, VCE) dan substrat metil yang didonorkan (Khalid et al., 2021; Nelson et al., 2020; Rosa et al., 2021).

Isolasi dan Pemurnian

Pada vaksin jenis mRNA, proses isolasi dan purifikasi dilakukan untuk memisahkan antigen dari kotoran dalam campuran reaktor. Kotoran tersebut antara lain enzim, sisa *nucleotide triphosphate* (NTPs) dan template DNA, serta hasil mRNA menyimpang yang terbentuk saat reaksi IVT. Pada skala laboratorium, proses pemurnian menggunakan cara tradisional yaitu pemisahan DNA dengan enzim pemangsa DNA (DNase digestion) dan dilanjutkan dengan proses pengendapan menggunakan litium klorida (LiCl), namun metode ini tidak mampu memisahkan produk mRNA yang menyimpang seperti fragmen isomer dsRNA dan *truncated* RNA. Pada skala pabrik, proses pemurnian umumnya menggunakan alat kromatografi yang mampu menyeleksi mRNA dengan baik (*selectively*), serba guna (*versatility*), dapat dikembangkan pada berbagai skala (*scalable*), dan efektif dari segi biaya (*cost-effectiveness*). (Khalid et al., 2021).

Pemilihan Sistem pengiriman virus

Setelah pemurnian, mRNA disimpan dalam *buffer* akhir atau dicampur dengan sistem pengiriman (Khalid et al., 2021). mRNA terdiri dari ratusan hingga ribuan nukleotida yang harus mencapai sitosol dengan panjang penuh untuk translasi aktif (Zeng et al., 2020). Oleh karena itu, perlindungan terhadap RNase sangat penting untuk sebagian besar strategi pengiriman *in vivo* (Mu et al., 2021; Rea et al., 2001). Metode pengiriman yang ideal akan melindungi mRNA dari degradasi dan memfasilitasi masuknya sel dengan toksisitas minimal. mRNA untuk tujuan terapeutik memiliki ketidakstabilan molekul, kurangnya metode pengiriman yang efisien, aktivasi kekebalan bawaan yang tidak terkendali melalui sensor RNA dan kesulitan dalam pembuatan mRNA skala besar (Nelson et al., 2020; Pardi et al., 2018). *lipid Nanopartikel* (LNP) mewakili sistem yang paling cocok sampai saat ini untuk pengiriman mRNA. mRNA yang diformulasikan LNP memasuki sel melalui penyerapan yang dimediasi reseptor ke dalam endosom dan kemudian dilepaskan ke sitosol di mana ia diterjemahkan ke dalam protein yang diinginkan, kemajuan substansial dalam pengembangan sistem lipid baru untuk terapi mRNA baru-baru ini (Nelson et al., 2020).

Tabel 2. 3 Sistem pengiriman mRNA (Zeng et al., 2020)

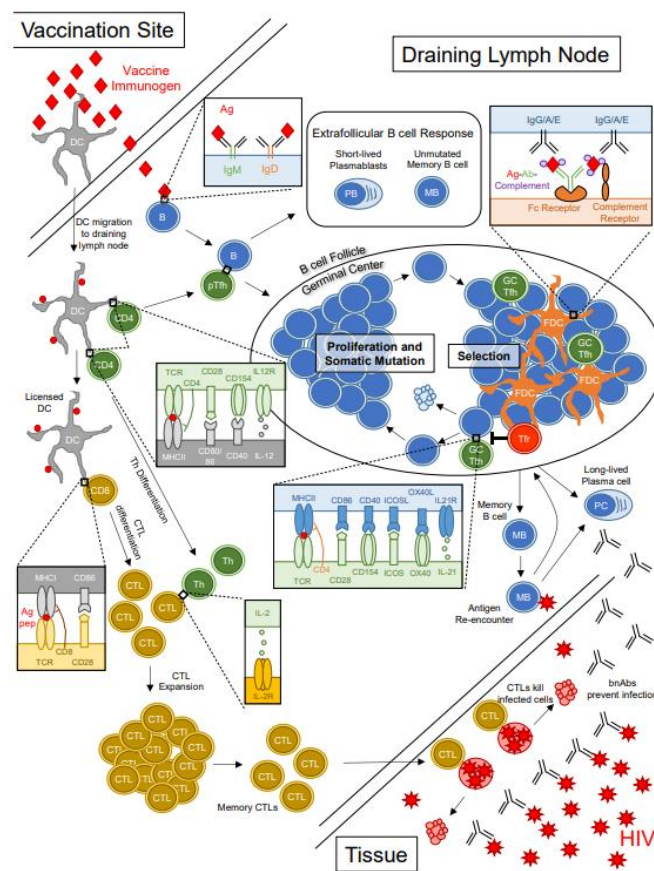
Format Pengiriman	Kelebihan	Kekurangan
Nanopartikel berbasis lipid	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - Pengiriman mRNA intraseluler yang efisien - Reproduksiabilitas tinggi 	Potensi efek samping Uji klinis

	<ul style="list-style-type: none"> - Mudah untuk ditingkatkan 	
Nanopartikel berbasis polimer	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - Pengiriman mRNA intraseluler yang efisien 	<ul style="list-style-type: none"> - Potensi efek samping - Polidispersitas
Protamin	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - Kompleks protamine-mRNA memiliki aktivitas adjuvant 	<ul style="list-style-type: none"> - Efisiensi pengiriman rendah - mRNA yang dikomplekskan dengan protamin diterjemahkan dengan buruk
Peptida lainnya	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - Peptida menawarkan banyak fungsi untuk dieksploitasi 	Efisiensi pengiriman rendah
Partikel replika seperti virus	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - Pengiriman intraseluler yang efisien dari mRNA yang menggandakan diri sendiri - Ekspresi yang kuat 	<ul style="list-style-type: none"> - Menantang untuk meningkatkan - Produksi antibodi melawan vektor virus
Nanoemulsi kationik	<ul style="list-style-type: none"> - Melindungi mRNA dari degradasi RNase - CNE berbasis squalene memiliki aktivitas adjuvant - Formulasi dapat disiapkan dan disimpan tanpa RNA untuk penggunaan di masa mendatang - Mudah ditingkatkan 	Efisiensi pengiriman terbatas
mRNA naked	<ul style="list-style-type: none"> - Mudah disimpan dan disiapkan - Mudah ditingkatkan 	<ul style="list-style-type: none"> - Rentan terhadap degradasi RNase - Efisiensi pengiriman rendah
DC	<ul style="list-style-type: none"> - APC yang efisien penting untuk kekebalan bawaan/adaptif - Biokompatibilitas 	<ul style="list-style-type: none"> - Populasi sel heterogeny - Proses kompleks untuk memanipulasi dan

		mengkarakterisasi DC
--	--	----------------------

II.3.1.4 Mekanisme Kerja Immunologi Vaksin Messenger RNA (mRNA)

Kandidat vaksin HIV telah memasuki uji tahap klinis fase 1 pada manusia pada November 2021 (Clinicaltrial.gov.2022). Vaksin ini menggunakan saRNA untuk menghasilkan protein yang akan memicu respon imun terhadap HIV dan merangsang sel b untuk menghasilkan bnAbs (Prakash Sahoo et al., 2021). Mekanisme vaksin mRNA menginduksi bnAbs sebagai berikut:



Gambar 2. 10 Mekanisme vaksin menghasilkan antibodi spesifik (Mu et al., 2021).

(**Gambar 2. 11**) Imunogen vaksin mendorong antigen spesifik untuk merespons imun humoral yang optimal, sel B spesifik antigen harus berinteraksi dengan sel pra-TFH (*Pre-T Follicular Helper cell*) untuk memulai reaksi *Germinal center*. Di dalam *Germinal center*, sel B berproliferasi dan mengalami mutasi somatik, hasil mutasi tersebut dimasukkan ke dalam gen yang mengkode reseptor sel B sehingga meningkatkan afinitas antibodi atau mengurangi afinitas antigen. Sel B yang mengandung reseptor yang telah memperoleh afinitas melalui mutasi berinteraksi dengan sel TFH untuk menerima kelangsungan hidup sinyal dan masuk kembali ke siklus proliferasi dan mutasi. Di *Germinal center* menghasilkan sel plasma berumur panjang yang mensekresikan antibodi afinitas tinggi dan sel B memori berdiferensiasi menjadi sel plasma setelah bertemu

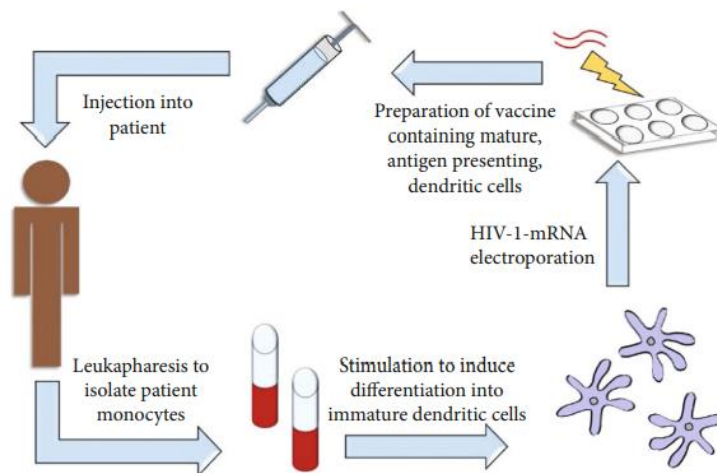
kembali dengan antigen untuk perlindungan diri dari HIV. Vaksin yang dibuat harus menginduksi bnAbs yang berfungsi sebagai lapisan pertahanan dengan mencegah HIV menginfeksi sel, untuk induksi optimal dari respon imun seluler, diperlukannya CD8+ Sel T, sel dendritik dan sel pembantu CD4+. Sel T CD4+ melisensi sel dendritik untuk mengaktifkan spesifik peptide Sel T CD8+ naif, yang menerima sinyal kostimulator baik dari sel dendritik maupun sel T CD4+ untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi Limfosit T sitotoksik untuk perlindungan dari HIV, tujuan kedua dari vaksin hiv ini yaitu untuk mendapatkan Limfosit T sitotoksik memori spesifik HIV untuk berfungsi sebagai lapisan pertahanan sekunder, membunuh sel inang yang terinfeksi oleh virus yang lolos dari netralisasi oleh bnAbs (Mu et al., 2021).

II.3 Penargetan sel dendritik (DC)

Hingga saat ini pengembangan vaksin HIV bertujuan untuk pencegahan yaitu menginduksi bnAbs dan CTL. Penanganan HIV-1 memerlukan kombinasi reaktivasi virus yang menginfeksi sel secara laten dan stimulasi respons imun spesifik HIV-1. Vaksin HIV berbasis sel dendritik bertujuan untuk meningkatkan respon imun terhadap HIV untuk mengendalikan replikasi virus tanpa perlu terapi antiretroviral. Vaksin ini merangsang kekebalan sel T pada pasien yang telah terinfeksi HIV. Sel dendritik autologus berasal dari monosit darah yang dimanipulasi secara *ex vivo* dipaparkan antigen spesifik dan kemudian disuntikkan kembali ke pasien tersebut. Salah satu tantangan utama untuk strategi ini adalah bagaimana mengirimkan antigen secara optimal ke DC *ex vivo* (Gandhi et al., 2016; Mu et al., 2021).

Sel dendritik dalam tubuh berfungsi sebagai APC yang membawa dan memperkenalkan virus atau bakteri kepada respons imun spesifik, berasal dari prekursor sumsum tulang dan membentuk sistem yang tersebar luas di seluruh tubuh. Secara umum sel dendritik dibagi menjadi *convensional* (cDCs), *plasmacytoid* (pDCs), dan turunan monosit (Castell-Rodríguez et al., 2017). Sel dendritik berperan dalam memicu respons imun sel T terhadap antigen yang diinokulasi, berperan untuk menangkap dan memproses antigen untuk disajikan oleh molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada sel T (Macri et al., 2016; Martin-Gayo & Yu, 2019).

Sel dendritik memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi vaksin HIV, desain vaksin terapeutik dendritik memiliki tantangan utama untuk yaitu bagaimana mengirimkan antigen secara optimal ke DC *ex vivo* (Gandhi et al., 2016). Pada penelitian saat ini pengembangan vaksin sel dendritik untuk HIV-1 menggunakan transfeksi mRNA, metode ini efisien mengirimkan antigen ke DC untuk merangsang respons sel T CD4 dan CD8 antigen spesifik *in vitro*, imunisasi dengan DC yang ditransfeksi mRNA dapat mengirimkan produk gen virus secara keseluruhan, mengkode seluruh produk gen HIV-1 (Gandhi et al., 2016).



Gambar 2. 12 Konsep Vaksin sel dendritik autologous (Mohamed et al., 2020).

Sel dendritik autologus disiapkan menggunakan monosit yang berasal dari pasien yang terinfeksi HIV melalui *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) yang diperoleh melalui leukapheresis. Sel dendritik turunan monosit diperluas in vitro bersama kultur dengan faktor perangsang koloni granulosit makrofag dan interleukin (IL)-4. Pada hari ke 5 kultur, sel dendritik turunan monosit yang belum matang disuspensikan kembali dalam larutan Belzer UW, dicampur dengan mRNA sintetik yang mengkode HIV-1, dikenai elektroporasi untuk menginduksi penyerapan RNA. Kemudian dapat diformulasikan menjadi vaksin yang diberikan kepada pasien untuk mendapatkan respons sel T yang spesifik terhadap antigen HIV-1 dan membangkitkan respons yang ditingkatkan terhadap sel yang terinfeksi HIV-1 (Mohamed et al., 2020; Ndhlovu et al., 2012).

II.4 Tahap Pengembangan Vaksin

Kandidat vaksin harus melewati tahap pengembangan dan pengujian untuk memastikan bahwa vaksin aman dan efektif, proses pengembangan vaksin membutuhkan waktu hingga kurang lebih 10 hingga 15 tahun sebelum digunakan secara luas (Sharma et al., 2020). Beberapa tahap pengembangan vaksin secara umum yaitu:

a. Tahap eksplorasi dan studi praklinis

Tahap ini melibatkan penelitian laboratorium dasar dan pemodelan komputasi yang bertujuan untuk mengidentifikasi antigen alami atau sintesis yang dapat digunakan mencegah atau mengobati penyakit, berikutnya tahap studi pra-klinis studi pra-klinis melibatkan sistem kultur sel atau jaringan, dan pengujian hewan untuk menilai keamanan vaksin dan imunogenisitasnya, setelah hasil imunogenisitas dan kemanjuran yang ditunjukkan pada hewan aman maka kemajuan dibuat untuk uji klinis manusia yang menguji keamanan dan

imunogenisitas dalam kelompok kecil kemudian kelompok besar selama 3 fase, sebagai diuraikan di bawah (Sharma et al., 2020).

b. Tahap klinis

Fase 1 (Keamanan) : tahap ini merupakan uji percobaan pertama yang diberikan kepada sejumlah kecil individu manusia sehat dan imunokompeten untuk diuji terutama untuk keamanan, dosis yang tepat dan untuk memeriksa respon imun, sebagai efek sekunder.

Fase 2 (Keamanan yang diperluas): Vaksin diberikan kepada ratusan manusia yang dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan demografi (contoh: tua vs muda). Fase ini berfungsi untuk memastikan vaksin tersebut aman dan imunogenik dan juga menentukan dosis yang tepat untuk digunakan dalam uji coba Fase 3.

Fase 3 (Khasiat) : tahap ke tiga merupakan uji coba skala besar di mana vaksin diberikan kepada ribuan orang untuk mengevaluasi kemanjuran. Tujuan dari fase ini yaitu untuk mengkonfirmasi dan menilai efektivitas vaksin dan menguji ada atau tidaknya efek samping (Sharma et al., 2020).

c. Tahap persetujuan dan lisensi

FDA (*Food and Drug Administration*) dari Amerika Serikat, atau Badan Obat Eropa di UE akan memberikan lisensi pada vaksin jika manfaat vaksin menunjukkan lebih besar daripada risiko potensial bagi manusia dan memungkinkan untuk digunakan masyarakat. Tahap ini membutuhkan waktu 1 hingga 2 tahun (Sharma et al., 2020).

d. Produksi vaksin dan kontrol kualitas

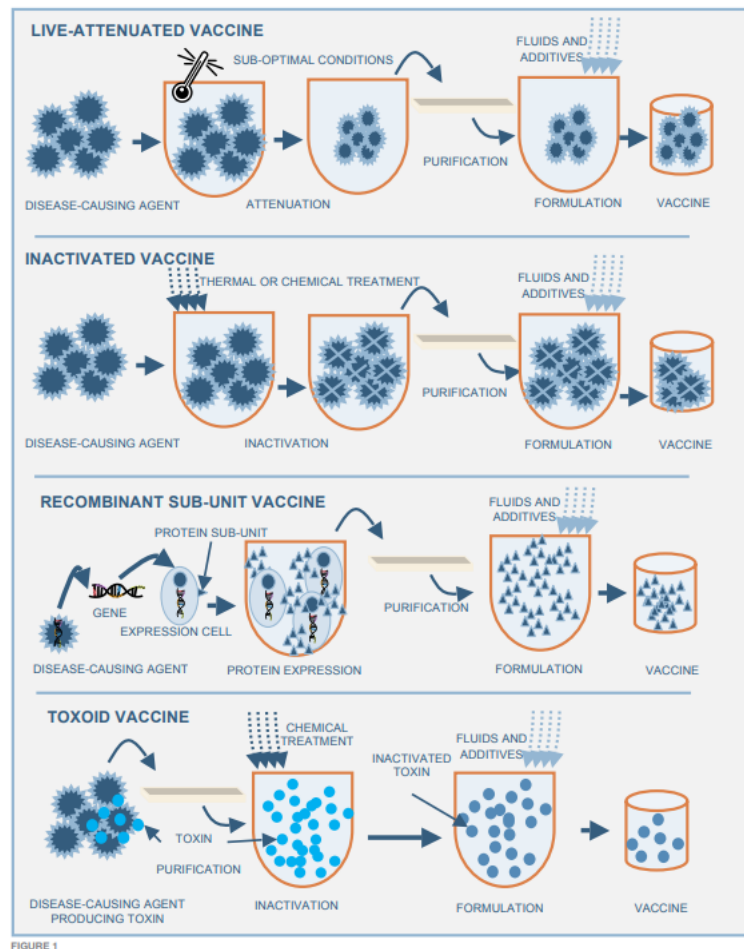
Setelah vaksin dipasarkan dan dilisensikan, secara teratur FDA memeriksa fasilitas produksi vaksin untuk memastikan mereka mengikuti peraturan, mencatat efek buruk yang mungkin dialami setelah vaksinasi (Sharma et al., 2020).

II.5 Formulasi Vaksin

Vaksin terdiri dari antigen yang telah di modifikasi dan diformulasikan (dicampur) dengan eksipien seperti air atau garam, aditif atau pengawet, dan bahan pembantu lainnya, biasanya diformulasikan dalam bentuk cairan, tetapi mungkin dibekukan-kering (*lyophilized*) untuk rekonstitusi segera sebelum waktu penyuntikan (Jenner et al., 2012).

a. Antigen

Antigen dalam vaksin dimodifikasi dengan beberapa cara yaitu :



Gambar 2. 13 Tipe metode vaksin (Jenner et al., 2012)

Live-attenuated vaccine, yaitu vaksin dengan metode virus yang telah dilemahkan, biasanya dari budidaya di bawah kondisi sub-optimal (juga disebut atenuasi), atau dari modifikasi genetik, yang memiliki efek mengurangi kemampuan virus untuk menyebabkan penyakit. *Inactivated vaccine* yaitu dari seluruh organisme yang telah dinonaktifkan oleh kimia, termal atau cara lain. *Recombinant sub-unit vaccine* yaitu dari komponen organisme penyebab penyakit, seperti protein dan polisakarida spesifik, atau asam nukleat. *Toxoid vaccine* yaitu dari toksin yang tidak aktif dari bakteri penghasil toksin, dari ikatan (konjugasi) polisakarida menjadi protein (ini meningkatkan efektivitas vaksin polisakarida pada anak kecil) (Jenner et al., 2012).

b. Pengawet

Pengawet bertujuan untuk memastikan sterilitas vaksin selama periode umur penyimpanan, pengawet dapat digunakan untuk mencegah kontaminasi wadah multi dosis yaitu ketika dosis pertama vaksin diekstraksi dari wadah, pengawet akan melindungi produk yang tersisa dari bakteri yang dapat dimasukkan ke dalam wadah tersebut. Selain itu, pengawet dapat ditambahkan selama pembuatan untuk mencegah kontaminasi mikroba. Pengawet yang

digunakan dalam vaksin bersifat tidak beracun dalam jumlah yang digunakan dan tidak mengurangi potensi vaksin, namun tidak semua bahan pengawet dapat digunakan dalam semua vaksin, beberapa pengawet akan mengubah sifat beberapa antigen vaksin, meskipun belum ada bukti bahaya yang disebabkan oleh pengawet, beberapa tahun sekarang vaksin di AS dan Eropa, sebagian besar tidak mengandung thimerosal dan beberapa vaksin yang lebih baru mungkin tidak mengandung bahan pengawet apapun (Jenner et al., 2012).

Tabel 2. 4 Contoh vaksin dengan pengawetnya (Jenner et al., 2012)

Pengawet	Vaksin
<i>Phenol</i>	<i>Typhoid, pneumococcal polysaccharide</i>
<i>Benzethonium chloride</i>	<i>Anthrax</i>
<i>2-phenoxyethanol</i>	<i>Inactivated polio</i>
<i>Thimerosal</i>	<i>Multi-dose influenza</i>

c. Adjuvant

Selain pengawet, beberapa vaksin mengandung bahan *adjuvant* atau bahan pembantu, untuk meningkatkan efek kekebalan dari antigen vaksin, salah satu contohnya yaitu garam aluminium merupakan adjuvant yang paling umum digunakan untuk vaksin. adjuvan vaksin mungkin memiliki tingkat reaksi merugikan yang sedikit lebih tinggi, termasuk rasa sakit di tempat suntikan, malaise dan demam (Jenner et al., 2012).

Tabel 2. 5 Beberapa Adjuvant yang digunakan pada vaksin (Jenner et al., 2012)

Vaksin	Adjuvant
<i>Hepatitis A</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>Hepatitis B</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>Diphtheria, Tetanus, acellular pertussis combinations (DTaP or Tdap)</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>Aluminum salt</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>Haemophilus influenzae type b (Hib)</i>	<i>Aluminum salt or ASO4 (aluminum salt and</i>
<i>Human Papiloma Virus (HPV)</i>	<i>monophospholipid A)</i>
<i>Pneumococcal conjugate</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>Japanese encephalitis</i>	<i>Aluminum salt</i>
<i>H1N1 influenza</i>	<i>MF59 (oil in water emulsion)</i>