

KFA  
KIC  
LP. 156/10  
Pur  
t

**LAPORAN PENELITIAN**  
**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL-**  
**BATCH III**  
**(PUBLIKASI INTERNASIONAL)**  
**TAHUN ANGGARAN 2009**



**MILIK**  
**PERPUSTAKAAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**

**TRANSPLANTASI ALLOGENIC STEM SEL DENGAN GENE TERAPI**  
**DELESI 32 CCR5 untuk TERAPI HIV/AIDS**

Purwati, dr, SpPD

Dr.Nasronudin,dr.,SpPD,K-PTI

Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh

**Dibiayai Oleh DP2M Ditjen Dikti Depdiknas T.A. 2009**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**DESEMBER 2009**



## LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Transplantasi Allogenic Stem Sel dengan Gene Terapi delesi 32 CCR5 untuk Terapi HIV/AIDS
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Purwati,dr.,SpPD
- b. Jenis Kelamin : Wanita
- c. NIP : 197202252009042001
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Jabatan fungsional : Staf Pengajar Divisi Tropik Infeksi, Depart. Ilmu Penyakit Dalam, RSUD. Dr. Soetomo-FK UNAIR Surabaya
- f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran
- g. Pusat Penelitian : ITD
- h. Alamat : JL. Mulyorejo Surabaya 60115
- i. Telpon/Faks : 031-59992445-46/ 031-5992445
- j. Alamat Rumah : Rungkut Harapan E 10 Surabaya 60293
- k. Telpon/Faks/E-mail : 031-8700566/purwatipanpan@yahoo.com
3. Mitra Kerjasama Internasional:
- Nama : Mr.M.L. Jakt
- Institusi : Stem Cell Biology Laboratory Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan
4. Jangka Waktu Penelitian: 3 tahun
5. Pembiayaan
- a. Jumlah biaya yang dibutuhkan : Rp 50.000.000,00
- b. Jumlah biaya yang disediakan oleh mitra : Rp -
- c. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti : Rp 50.000.000,00

Surabaya, 19 Desember 2009

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penyakit Tropis

Dr. Nasronudin, dr., SpPD, K-PTI  
NIP. 140 159 073

Ketua Peneliti

Purwati, dr., SpPD  
NIP 197202252009042001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Bambang Sektiani L., drh., DER  
NIP. 131 837 004

## RINGKASAN

*Acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), Pada awal infeksi, terjadi interaksi gp120 virus dengan reseptor CD4 pada permukaan sel target. Interaksi gp120 dengan CD4 mendorong terjadinya ikatan reseptor khemokin spesifik CXCR4 dan CCR5 yang juga terdapat pada membran sel target, oleh karena itu CCR5 dan CXCR4 ikut menentukan nasib sel target. Kinerja CCR5 maupun CXCR4 di pandu gen pemegang kendali yang menentukan rentan atau justru resisten terhadap infeksi HIV. Mutasi gen pengkode CCR5 dapat merupakan protektor atau resisten terhadap infeksi HIV, maka pada individu yang homozigot cenderung resisten terhadap infeksi, sedangkan yang heterozigot potensial rentan terhadap infeksi HIV.

### Tujuan

Menghasilkan limfosit TCD4 yang resisten terhadap infeksi HIV dengan menggunakan gene terapi delesi 32 CCR5 sehingga dapat digunakan untuk terapi HIV/AIDS.

### Metode

Pengumpulan sampel, Isolasi mononukleated sel, Kultur Limfosit, Identifikasi CD4, Analisis varian CCR5, co-cultivasi dengan PBMC HIV dibandingkan dengan kontrol

**Hasil:** Penelitian ini dilakukan beberapa tahapan antara lain isloasi mononukleated sel kemudian dilanjutkan kultur sel, pemurnian sel limfosit, identifikasi sel limfosit dan ekspresi CD4, serta co-cultivasi limfosit T yang sudah didelesi dengan PBMC pasien HIV dibandingkan dengan kontrol. Sel tumbuh bersama antara Limfosit T dan isolasi PBMC dari pasien HIV/AIDS, dimana PBMC HIV mengandung 1 *m.o.i.* (*multiplication of infectivity*). Partikel sel yang terinfeksi HIV menyebar membentuk forming focus (plaque) yang disebut dengan *FFU* (*Focus Forming Unit*) setelah diko-kultivasi dan tambah lama tambah banyak. Hal ini didapatkan pada control, tetapi tidak pada yang delesi.

**Kesimpulan:.** Sel tumbuh bersama antara Limfosit T dan isolasi PBMC dari pasien HIV/AIDS, dimana PBMC HIV mengandung *1 m.o.i. (multiplication of infectivity)*. Partikel sel yang terinfeksi HIV menyebar membentuk forming focus (plaque) yang disebut dengan *FFU (Focus Forming Unit)* setelah diko-kultivasi dan tambah lama tambah banyak. Hal ini didapatkan pada control, tetapi tidak pada yang delesi.

## **PRAKATA**

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat yang dilimpahkan olehNYA, kami dapat menyelesaikan penelitian Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch 3 (International Joint Research) yang diselenggarakan oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.

Penelitian yang berjudul \* Transplantasi Allogenic Stem Sel Dengan Gene Terapi Delesi 32 CCR5 Untuk Terapi HIV/AIDS\* Penelitian ini bertujuan untuk membuat Limfosit T yang resisten terhadap infeksi virus HIV, yang nantinya bisa digunakan untuk terapi pasien immunodefisiensi khususnya HIV/AIDS.

Penelitian ini terselenggara atas bantuan pendanaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, untuk itu Tim Peneliti mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya, juga kepada berbagai pihak yang telah mendukung terselenggaranya penelitian ini, khususnya kepada;

1. Institute of Tropical Diseases (Lembaga Penyakit Tropis) Universitas Airlangga, khususnya Laboratorium Dengue
2. Unit Perawatan Intermediet Penyakit Infeksi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Topik penelitian ini dipilih karena selama ini tidak ada terapi yang definitif untuk penyakit HIV/AIDS. Kami berharap hasil yang diperoleh bermanfaat untuk terapi infeksi HIV/AIDS sehingga angka kematian akibat AIDS bisa diturunkan.

**Tim Peneliti,**

**Purwati, dr, Sp.PD**

**Dr. Nasronudin, dr, Sp.PD, K-PTI**

**Prof.Dr. Fedik AR, drh**

## DAFTAR ISI

	<b>Hal</b>
1.Lembar Pengesahan	1
2.Ringkasan	2
3.Prakata	4
4.Daftar Isi	5
5.Daftar Gambar	6
6.BAB I: Pendahuluan	7
7.BAB II: Tujuan dan Manfaat Penelitian	9
8.BAB III: Tinjauan Pustaka	11
9.BAB IV: Metodologi Penelitian	23
10.BAB V: Hasil Penelitian	29
11.BAB VI: Pembahasan	37
12.BAB VII: Kesimpulan dan Saran	40
13.BAB VIII: Pembiayaan	41
14.Daftar Pustaka	43

## DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1 : Resuspensi BMA**
- Gambar 2 : BMA dimasukkan dalam Ficoll Histopaque**
- Gambar 3 : Hasil sentrifugasi yang mengandung Buffy Coat**
- Gambar 4 : Isolasi mononukleated sel**
- Gambar 5: Mononukleated sel 24 jam setelah pencucian**
- Gambar 6: Kultur mononukleated sel**
- Gambar 7: Sel hematopoetik yang tumbuh bersama sel mesenkim**
- Gambar 8: Kultur Limfosit sampai siap di ko-kultivasi**
- Gambar 9: Limfosit yang matur**
- Gambar 10: Identifikasi limfosit T CD4**
- Gambar 11: Karakterisasi CCR5 dengan RT PCR**
- Gambar 12: Ko-kultivasi Limfosit T dengan PBMC HIV antara delesi dibandingkan Kontrol**
- Gambar 13: Penyebaran HIV membentuk FFU**



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### Latar Belakang

*Acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), termasuk penyakit infeksi yang mengancam jiwa. *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan virus RNA dari famili *Retrovirus* dan subfamili *Lentiviridae*. Dikenal ada dua serotipe HIV yaitu HIV-1 dan HIV-2. secara morfologis HIV-1 berbentuk bulat yang terdiri dari bagian inti (*core*) dan selubung (*envelope*).

Retrovirus sebagai penyebab AIDS di kemukakan oleh Barre-Sinoussi dkk di institut Pasteur pada tahun 1983, sedangkan HIV-2 pertama di laporkan dari Senegal Afrika Barat pada tahun 1985. Saat ini lebih dari 150 negara melaporkan adanya infeksi HIV/AIDS dari berbagai penjuru dunia. Menurut UNAID, akhir Desember 2000, disebutkan 58 juta jiwa penduduk dunia terinfeksi HIV, 22 juta diantaranya meninggal akibat AIDS. Transmisi HIV masih tetap berlangsung, 16 ribu jiwa terinfeksi baru setiap harinya.

Begitu HIV masuk kedalam tubuh manusia didalam sirkulasi darah ditemukan 4-11 hari setelah paparan. HIV mempunyai tropisme pada berbagai sel target. Terdapat berbagai sel target infeksi HIV terutama sel-sel yang mampu mengekspresi reseptor CD4. Berbagai sel tubuh yang mampu pengekspresi CD4 pada sistim saraf : astrosit, mikroglia, oligodendroglia. Darah: limfosit T, limfosit B, monosit-makrofag, promiolisit. Pada kulit: sel Langerhans', fibroblas, dendritik.

Pada awal kejadian infeksi, terjadi interaksi antara gp120 virus dengan reseptor CD4 yang terdapat pada permukaan sel target. Interaksi gp120 dengan CD4 akan mendorong terjadinya ikatan lebih lanjut dengan reseptor khemokin yang bertindak sebagai coreseptor spesifik CXCR4 atau X4 dan CCR5 atau R5 yang juga terdapat pada membran sel target. Spesifik karena masing masing sel target mempunyai

coreseptor khusus, misalnya HIV yang *T-cell-tropic strains* mengikat pada coreseptor CXCR4 (*lymphocytotropic*) sedangkan *macrophag-tropic strains* mengikat pada coreseptor CCR5 (*monocytotropic*). Oleh karena itu CCR5 dan CXCR4 ikut menentukan nasib sel target. Kinerja CCR5 maupun CXCR4 di pandu gen pemegang kendali yang menentukan rentan atau justru resisten terhadap infeksi HIV. Mutasi gen pengkode CCR5 dapat merupakan protektor atau resisten terhadap infeksi HIV, maka pada individu yang homozigot cenderung resisten terhadap infeksi, sedangkan yang heterozigot potensial rentan terhadap infeksi HIV.

Selama ini untuk pengobatan HIV diberikan *Antiretroviral (ARV)*. Pemberian ARV tidak serta merta segera diberikan begitu saja pada pasien yang dicurigai, tetapi perlu menempuh langkah-langkah yang arif dan bijaksana, serta mempertimbangkan berbagai faktor: sanggupkah pasien mengkonsumsi obat dalam waktu yang tidak terbatas, kemampuan membeli obat dalam jangka lama, rasa kurang nyaman selama mengkonsumsi obat, pasien kebanyakan menginginkan penyakitnya tidak diketahui orang lain, potensi resistensi obat, efek samping yang tidak ringan, jangkauan memperoleh obat, serta saat yang tepat untuk memulai terapi. Diantara pilihan terapi tersebut transplantasi sel khususnya yang berasal dari *umbilical cord blood* yang berupa sel Limfosit T spesifik merupakan hal yang baru yang muncul sebagai terapi pada penderita AIDS. Dengan latar belakang pemikiran tersebut diatas maka penelitian ini dilakukan.

## **BAB II**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **Tujuan Umum**

Menghasilkan limfosit TCD4 yang resisten terhadap infeksi HIV dengan menggunakan gene terapi delesi 32 CCR5 sehingga dapat digunakan untuk terapi HIV/AIDS

#### **Tujuan Khusus**

1. Mengisolasi, identifikasi dan purifikasi limfosit T CD4 dari bone marrow donor
2. Melakukan PCR dan sequencing gen pengkode CCR5
3. Melakukan delesi 32 pada gen pengkode CCR5 sehingga resisten terhadap infeksi HIV

#### **Rumusan Masalah**

Apakah mutasi pada gen pengkode CCR5 dengan melakukan delesi 32 CCR5 dapat menyebabkan resistensi terhadap infeksi HIV

#### **Keutamaan atau Pentingnya Penelitian**

1. Adanya peningkatan penderita AIDS. Saat ini lebih dari 150 negara melaporkan adanya infeksi HIV/AIDS dari berbagai penjuru dunia. Menurut UNAID, akhir Desember 2000, disebutkan 58 juta jiwa penduduk dunia terinfeksi HIV, 22 juta

diantaranya meninggal akibat AIDS. Transmisi HIV masih tetap berlangsung, 16 ribu jiwa terinfeksi baru setiap harinya.

2. Pada penderita AIDS akan terjadi penurunan kadar limfosit T-CD4 yang progresif mencerminkan adanya defisiensi imun.
3. Dengan adanya gangguan kualitas dan kuantitas limfosit T-CD4 tersebut meningkatkan kerentanan terhadap infeksi oportunistik dan mendorong ke derajat yang lebih berat.
4. Pemberian ARV tidak serta merta segera diberikan begitu saja pada pasien yang dicurigai, tetapi perlu menempuh langkah-langkah yang arif dan bijaksana, serta mempertimbangkan berbagai faktor:

Dengan demikian maka pada penelitian ini diharapkan akan terbentuknya limfosit T CD4 yang resisten terhadap infeksi HIV sehingga dapat digunakan untuk terapi HIV-AIDS. Sehingga penelitian ini diharapkan akan memberikan manfaat:

#### 1. Bagi Penderita

Dapat menjadi alternatif terapi bagi penderita AIDS yang selama ini hanya dikenal dengan pengobatan menggunakan ARV, sehingga bisa mengurangi toksisitas dan resistensi ARV serta diharapkan dapat meningkatkan imunitas penderita.

#### 2. Bagi Klinisi

Dapat mengembangkan keilmuan untuk memperoleh alternatif terapi HIV/AIDS

#### 3. Bagi Perkembangan Ilmu Pengetahuan

Memberi informasi secara ilmiah dan mendasar dari aspek imunologis pada penderita AIDS

#### 4. Merupakan data dasar untuk penelitian berikutnya

### BAB III

#### TINJAUAN PUSTAKA

##### Patogenesis

Begitu HIV masuk kedalam tubuh manusia didalam sirkulasi darah ditemukan 4-11 hari setelah paparan. HIV mempunyai tropisme pada berbagai sel target. Terdapat berbagai sel target infeksi HIV terutama sel-sel yang mampu mengekspresi reseptor CD4. Berbagai sel tubuh yang mampu mengekspresi CD4 pada sistim saraf : astrosit, mikroglia, oligodendroglia. Darah: limfosit T, limfosit B, monosit-makrofag, promioliisit. Pada kulit: sel Langerhans', fibroblas, dendritik.

Pada awal kejadian infeksi, terjadi interaksi antara gp120 virus dengan reseptor CD4 yang terdapat pada permukaan sel target. Interaksi gp120 dengan CD4 akan mendorong terjadinya ikatan lebih lanjut dengan reseptor khemokin yang bertindak sebagai coreseptor spesifik CXCR4 atau X4 dan CCR5 atau R5 yang juga terdapat pada membran sel target. Spesifik karena masing masing sel target mempunyai coreseptor khusus, misalnya HIV yang *T-cell-tropic strains* mengikat pada coreseptor CXCR4 (*lymphocytotropic*) sedangkan *macrophag-tropic strains* mengikat pada coreseptor CCR5 (*monocytotropic*). Oleh karena itu CCR5 dan CXCR4 ikut menentukan nasib sel target. Kinerja CCR5 maupun CXCR4 di pandu gen pemegang kendali yang menentukan rentan atau justru resisten terhadap infeksi HIV. Mutasi gen pengkode CCR5 dapat merupakan protektor atau resisten terhadap infeksi HIV, maka pada individu yang homozigot cenderung resisten terhadap infeksi, sedangkan yang heterozigot potensial rentan terhadap infeksi HIV.

Interaksi beruntun antara gp120 virus dengan reseptor CD4 dan coreseptor CXCR4 serta CCR5 sel target tersebut tidak begitu saja memuluskan proses internalisasi HIV ke dalam sel target, karena masih diperlukan peran gp41 yang terdapat pada selubung virus. Glikoprotein 41 (gp41) pada selubung virus mempunyai peranan penting dalam proses peleburan atau fusi membran virus dengan membran sel

target, karena gp41 berpengaruh terhadap penyatuan kedua membran. Berikutnya seluruh komponen inti HIV masuk dan mengalami proses internalisasi yang ditandai dengan masuknya inti nukleokapsid kedalam sitoplasma.

Begitu internalisasi berlangsung akan disusul oleh proses transkripsi genom ssRNA ke *double stranded DNA* melalui *virion RNA-dependent DNA polymerase*, dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. DNA yang terbentuk setelah melalui polimerasi menjadi dua untai DNA dengan bantuan enzim polimerase.

Di dalam sitoplasma, sebelum informasi genetik yang disimpan di dalam DNA diperankan, maka RNA virus mula-mula disalin ulang (ditranskripsikan) menjadi suatu hibrida RNA/DNA, dari single-stranded RNA (ssRNA) kemudian menjadi double-stranded DNA (dsDNA). Dalam hal ini DNA hanya sebagai pola, artinya DNA tidak akan mengalami perubahan melalui proses transkripsi. Fragmen DNA yang dapat ditranskripsikan yang mengandung sandi genetik untuk suatu produk tertentu. Mekanisme tersebut dikatalisir oleh enzim *reverse transcriptase*, suatu enzim yang telah dipersiapkan dan dibawa virus sehingga terbentuk dsDNA virus dan diintegrasikan ke dalam genom pada inti sel target dan menetap dalam waktu cukup lama dalam posisi tidak aktif. Bila aktif dan terjadi replikasi virus, maka pertama-tama potongan DNA yang sesuai dengan genom virus ditranskripsikan oleh enzim polimerase RNA yang tergantung pada DNA sel. Dari sitoplasma kemudian berintegrasi ke dalam inti sel target dengan menyelip kedalam DNA sel target dengan bantuan enzim integrase terbentuk provirus. Transkriptase mRNA virus dari DNA proviral oleh polimerase RNA akan diterjemahkan ke dalam urutan asam amino yang sesuai melalui proses translasi ke berbagai poliprotein.

HIV yang telah berada didalam limfosit T tersebut juga teraktifasi oleh pengaruh rCD43, kemudian menginduksi terbentuknya kompleks TCR-CD3 dan bersama-sama CD28 mempengaruhi HIV menjadi lebih aktif. Akibatnya terjadi peningkatan aktivitas transkripsi, translasi protein, dan replikasi HIV lebih lanjut. Jumlah HIV dalam limfosit T yang terus meningkat tersebut berusaha menembus membran limfosit untuk menyerang limfosit T berikutnya. Demikian proses ini akan berjalan terus, bila tanpa

diimbangi upaya intervensi terapi ARV maupun nutrisi yang memadai, maka dari waktu ke waktu jumlah limfosit T-CD4 akan semakin turun baik kualitas maupun kuantitasnya.

Penurunan kadar limfosit T-CD4 yang progresif mencerminkan adanya defisiensi imun. Pada infeksi akut penurunan tersebut berlangsung dramatis sehingga kurang dari 1.000 CD4/ $\mu$ l, kemudian naik lagi pada saat serokonversi dan dalam fase khronik turun terus dengan laju penurunan 70 sel/ $\mu$ l setiap tahunnya. Demikian proses ini akan berjalan berkesinambungan.

Gangguan kualitas dan kuantitas limfosit T-CD4 tersebut meningkatkan kerentanan terhadap infeksi oportunistik dan mendorong ke derajat yang lebih berat, serta munculnya manifestasi klinik dari AIDS.

#### Aspek Imunologi pada Patofisiologi HIV

Limfosit T-CD4 mengatur reaksi sistem kekebalan tubuh manusia yang mengawali, mengarahkan untuk pengenalan serta pemusnahan terhadap berbagai mikroorganisme termasuk virus. Pada infeksi HIV justru limfosit T ini yang diintervensi dan mengalami infeksi serta dirusak oleh HIV sehingga jumlahnya cenderung terus menurun (normal 600-1200/mm<sup>3</sup>). Sejalan dengan laju penurunan jumlah limfosit T, respons dari limfosit T yang tersisa juga berkurang terhadap stimulasi antigen. Dampaknya terjadi perubahan rasio T4/T8 akibat menurunnya jumlah T4. Terjadi penurunan respons terhadap tes kulit dengan antigen biasa. Menjadi lebih rentan terhadap mikroorganisme yang pada kondisi normal dilindungi oleh sistem kekebalan yang diperantarai sel. Kelainan sel B dapat terjadi akibat tidak adanya pengaturan dan induksi sel T terhadap fungsi sel B. Demikian pula trombositopenia sering didapatkan pada penderita terinfeksi HIV, karena kompleks imun merusak menjadi reservoir bagi HIV dan meningkatkan kerentanan terhadap berbagai infeksi parasit dan infeksi intraseluler lainnya.

Untuk dapat mengenal antigen, sel T harus teraktivasi menjadi sel efektor. Sel efektor CD4 berperan sebagai sel helper yang dimediasi oleh sekresi sitokin yang berpengaruh di sekitar sel tersebut. Sel T CD4 mempunyai kemampuan mensekresi berbagai sitokin. Limfosit Th1 mensekresi interleukin (IL) -2, dan interferon- $\gamma$ . Sitokit

proinflamatori (IL-1/3 dan TNF- $\alpha$ ) menginduksi gen NF $\kappa$ B sehingga memicu terjadinya replikasi HIV dan mendorong peningkatan beban virus (*viral load*). Sitokin tersebut dipicu oleh kehadiran mikroorganisme lain sehingga beban virus sering meningkat pada infeksi oportunistik atau stadium AIDS. Limfosit Th2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang berperan menghambat pengaruh sitokin proinflamatori, sehingga inflamasi dan replikasi HIV dapat dikendalikan. Inhibisi replikasi HIV tersebut juga dibantu oleh peran interferon  $\alpha$  dan  $\gamma$ .

HIV begitu masuk ke dalam tubuh akan dihadapi oleh berbagai mekanisme ketahanan tubuh termasuk ketahanan tubuh alamiah. Ada tiga mekanisme ketahanan untuk menghadang HIV agar tidak dapat mencapai sel target yang mampu mengekspresikan CD4. Pertama, komplemen akan berusaha memusnahkan virus melalui opsonisasi. Dampak hiperaktivitas komplemen terjadi peningkatan kadar histamin. Pada saat ini penderita sering mengeluh gatal-gatal pada kulitnya. Bila proses ini berlangsung lama akan diikuti perubahan warna kulit menjadi lebih gelap disebut dermatitis HIV. Kedua, mekanisme berikutnya untuk menghadang HIV agar tidak dapat mencapai sel target berikutnya adalah melalui peran interferon  $\alpha$  dan interferon  $\gamma$  yang berusaha mencegah upaya replikasi HIV. Ketiga, mekanisme yang lebih kompleks terjadi pada sel target. Pada sel target yang menjadi sasaran dan terpapar HIV terdapat tiga mekanisme ketahanan tubuh untuk menyikapi keberadaan HIV tersebut. Pertama, sel yang terpapar akan segera dimusnahkan segera oleh sel NK, yang dihadapi sendiri maupun didukung oleh ADCC (*antibody dependent cell cytotoxic*). Kedua, sel yang terpapar dimusnahkan secara perlahan melalui proses apoptosis patologis. Bila HIV diikuti oleh ko-infeksi oleh virus lain atau bakteri, jamur, protozoa akan terjadi kematian yang lebih cepat dan difus disebut apoptosis patologis difus dipercepat. Proses inilah yang dapat menjelaskan penderita AIDS sering meninggal mendadak tanpa didahului petanda kegawatan klinis sebelumnya. Ketiga, sel yang terpapar HIV tetap bertahan hidup, menjelajahi tubuh dengan mengikuti sirkulasi sistemik. Sel yang terpapar ini mengalami aktivasi sehingga terjadi peningkatan produksi dan sekresi sitokin proinflamatori (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), enzim fosfolipase A2 (PLA2), meningkatnya kadar *reactive oxygen species* (ROS) akibat tuntutan terhadap mitokondria untuk meningkatkan ATP akan diikuti peningkatan kadar ROS. Sitokin proinflamatori memicu



peningkatan produksi dan sekresi prostaglandin yang bisa memengaruhi sentral termoregulasi. Bila terjadi gangguan homeostasis pada pusat termoregulasi tersebut memicu panas badan yang merupakan gejala penting infeksi HIV Dampak dari IL-1 $\beta$  selain memicu panas, juga pusing, mialgia, artralgia, mual, muntah, nafsu makan menurun, sulit tidur. Keluhan dan gejala tersebut sering menyertai penderita terinfeksi HIV pada saat terjadi viremia. Pengaruh enzim PLA<sub>2</sub> dapat memicu produksi dan sekresi mediator sekunder seperti leukotrien, prostaglandin-E<sub>2</sub>, prostasiklin, tromboksan- A<sub>2</sub> yang dapat mendorong penderita jatuh ke sepsis, syok septik akibat infeksi HIV Dampak ROS berlebihan adalah memicu terbukanya pore MPT (*mitochondrial permeability transition*), memicu terjadinya apoptosis. Sel yang paling potensial mengalami apoptosis ini adalah limfosit T, karena selain menjadi sasaran utama HIV karena terdapat reseptor CD4, ko-reseptor CCR5, CXCR4 juga dipicu peningkatan produksi ROS. Hal ini diperberat oleh menurunnya peran protektor limfosit T yang diperankan Hsp70 menjadi terganggu akibat stresor HIV terhadap Hsp70 yang berlangsung berkepanjangan..

## MANIFESTASI KLINIS

Manifestasi klinis infeksi HIV merupakan gejala dan tanda pada tubuh *host* akibat intervensi HIV Manifestasi ini dapat merupakan gejala dan tanda infeksi virus akut, keadaan asimtomatis berkepanjangan, hingga manifestasi AIDS berat. Manifestasi gejala dan tanda dari HIV dapat dibagi menjadi 4 tahap.

**Pertama** merupakan tahap infeksi akut, pada tahap ini muncul gejala tetapi tidak spesifik. Tahap ini muncul 6 minggu pertama setelah paparan HIV dapat berupa demam, rasa letih, nyeri otot dan sendi, nyeri telan, dan pembesaran kelenjar getah bening. Dapat juga disertai meningitis aseptik yang ditandai demam, nyeri kepala hebat, kejang kejang dan kelumpuhan saraf otak.

**Kedua** merupakan tahap asimtomatis, pada tahap ini gejala dan keluhan hilang. Tahap ini berlangsung 6 minggu hingga beberapa bulan bahkan tahun setelah infeksi. Pada saat ini sedang terjadi internalisasi HIV ke intraseluler. Pada tahap ini aktivitas penderita masih normal.

**Ketiga** merupakan tahap simtomatis, pada tahap ini gejala dan keluhan lebih spesifik dengan gradasi sedang sampai berat. Berat badan menurun tetapi tidak sampai 10%, pada selaput mulut terjadi sariawan berulang, terjadi peradangan pada sudut mulut, dapat juga ditemukan infeksi bakteri pada saluran napas bagian atas namun penderita dapat melakukan aktivitas meskipun terganggu. Penderita lebih banyak berada di tempat tidur meskipun kurang 12 jam per hari dalam bulan terakhir.

**Keempat** merupakan tahap yang lebih lanjut atau tahap AIDS. Pada tahap ini terjadi penurunan berat badan lebih 10%, diare yang lebih dari 1 bulan, panas yang tidak diketahui sebabnya lebih dari satu bulan, kandidiasis oral, *oral hairy leukoplakia*, tuberkulosis paru, dan pneumonia bakteri. Penderita berbaring di tempat tidur lebih dari 12 jam sehari selama sebulan terakhir. Penderita diserbu berbagai macam infeksi sekunder, misalnya pneumonia pneumistik karinii, toksoplasmosis otak, diare akibat kriptosporidiosis, penyakit virus sitomegalo, infeksi virus herpes, kandidiasis pada esofagus, trakea, bronkus atau paru serta infeksi jamur yang lain misalnya histoplasmosis, koksidiomikosis.

Menurut WHO (2002), manifestasi klinis penderita HIV/AIDS dewasa dibagi menjadi empat stadium, yaitu:

#### **Stadium I:**

1. Asimtomatik
2. limfadenopati generalisata persisten

**Dengan penampilan klinis derajat 1: asimtomatik dan aktifitas normal**

#### **Stadium II:**

3. Penurunan berat badan, < 10%
4. Manifestasi mukokutaneus minor (*dermatitis seborreic*, prurigo, infeksi jamur pada kuku, ulserasi pada mulut berulang, *cheilitis angularis*)
5. Herpes Zoster, dalam 5 tahun terakhir
6. Infeksi saluran nafas atas berulang (misalnya: sinusitis bakterial)

**Dengan atau penampilan klinis derajat 2: simtomatik, aktifitas normal**

### **Stadium III:**

7. Penurunan berat badan, > 10%
8. Diare khronik dengan penyebab yang tidak jelas, > 1 bulan
9. Demam tanpa penyebab yang jelas (*intermittent* atau menetap), > 1 bulan
10. Kandidiasis oral
11. Tuberkulosis paru, dalam 1 tahun terakhir
12. Terinfeksi bakteri berat (pneumonia, piomiositis)

**Dengan atau penanpilan klinis derajat 3: berbaring di tempat tidur, < 50% sehari dalam satu bulan terakhir**

### **Stadium IV:**

13. *HIV wasting syndrome*
14. Pneumonia pneumokistik karinii
15. Infeksi toksoplasmosis di otak
16. Diare karena *cryptosporidiosis*, > 1 bulam
17. Mengalami infeksi sitomegalovirus
18. Infeksi herpes simpleks, maupun mukokutaneus, > 1 bulan
19. Infeksi mikosis (*histoplasmosis, coccidioidomycosis*)
20. Kandidiasis esofagus, trakhea, bronkus, maupun paru
21. Infeksi mikobaktereriosis *atypical*
22. Sepsis
23. Tuberkulosis ekstrapulmoner
24. Limfoma maligna
25. Sarkoma kaposi
26. Ensefalopati HIV

**Dengan penampilan klinis derajat 4: berada ditempat tidur, > 50% setiap hari dalam bulan-bulan terakhir.**

### **Diagnosis**

Diagnosis ditegakkan berdasarkan manifestasi klinis dan pemeriksaan laboratoris. Untuk menentukan adanya infeksi HIV sebelum menjadi AIDS tidak mudah

karena individu yang terpapar masih asimtomatik, yang secara klinis tentunya tidak mudah dikenali. Meskipun demikian perlu difahami adanya berbagai faktor risiko. Ada 2 kelompok risiko terinfeksi HIV yaitu risiko tinggi dan risiko rendah.

**Tabel 1. Tes diagnostik untuk infeksi HIV**

---

**Skrening**

*Enzyme-linked immunoassay (EIA, ELISA) untuk HIV-1, HIV-2, atau keduanya Aglutinasi latek untuk HIV-1*

**Konfirmasi**

*Western blot (WB) untuk HIV-1 dan HIV-2*

*Indirect immunofluorescence antibody assay (IFA) untuk HIV-1*

*Radioimmunoprecipitation antibody assay (RIPA) untuk HIV-1*

**Lain-lain**

ELISA untuk HIV-1 p24 antigen, PCR

---

**Penatalaksanaan**

Strategi penatalaksanaan dan pengendalian progresivitas HIV ke AIDS dilakukan melalui :

- o Terapi antiretroviral
- o Terapi infeksi oportunistik serta malignansi
- o Dukungan nutrisi berbasis makronutrient dan mikronutrient
- o Konseling terhadap penderita maupun keluarganya

**Terapi Antiretroviral**

**Rekomendasi Terapi Antiretroviral**

Pemberian ART tidak serta merta segera diberikan begitu saja pada pasien yang dicurigai, tetapi perlu menempuh langkah-langkah yang arif dan bijaksana, serta mempertimbangkan berbagai faktor: sanggupkah pasien mengkonsumsi obat dalam waktu yang tidak terbatas, kemampuan membeli obat dalam jangka lama, rasa kurang nyaman selama mengkonsumsi obat, pasien kebanyakan menginginkan penyakitnya tidak diketahui orang lain, potensi resistensi obat, efek samping yang tidak ringan, jangkauan memperoleh obat, serta saat yang tepat untuk memulai terapi.

**Tabel 2. Rekomendasi memulai terapi antiretroviral menurut WHO (2002)**

<p><b>Bila pemeriksaan CD4 dapat dilakukan :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Klinis stadium IV, tanpa memperhitungkan jumlah CD4</li> <li>- Klinis stadium I, II, atau III dengan CD4 &lt; 200/mm<sup>3</sup></li> </ul>
<p><b>Bila pemeriksaan CD4 tidak dapat dilakukan :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Klinis stadium IV, tanpa memperhitungkan jumlah limfosit total</li> <li>- Klinis stadium II atau III dengan limfosit total <math>\leq</math>1200/mm<sup>3</sup></li> </ul>

### Prinsip Terapi Antiretroviral

#### Tujuan Terapi Antiretroviral

- Menurunkan angka kesakitan akibat HIV, dan menurunkan kematian akibat AIDS
- Memperbaiki kualitas hidup
- Mempertahankan dan mengembalikan status imun ke fungsi normal
- Menekan replikasi virus serendah mungkin sehingga kadar dalam plasma <50 kopi/ml

Terapi sebaiknya diberikan dalam bentuk kombinasi dan dipantau secara ketat untuk mengevaluasi kemajuan terapi, munculnya efek samping, serta kemungkinan timbulnya resisten.

#### Terapi *Stem Cells*

Diantara pilihan terapi untuk AIDS tersebut diatas, maka transplantasi

sel merupakan hal yang baru yang muncul sebagai terapi yang mungkin dapat meningkatkan jumlah limfosit T pada penderita AIDS. Sumber untuk *stem cells* dapat berupa dari:

### 1. Embryonik stem sel

Embryonik stem sel mempunyai karakteristik yaitu kemampuannya dalam hal berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi bermacam-macam tipe jaringan di dalam tubuh. Embryonik stem sel dapat diambil dari 3 sumber yaitu: janin yang aborsi (*cadaveric stem cell*), embrio hasil fertilisasi *in-vitro* (*discarded embryos*) dan *research embryos*. Akhir-akhir ini telah banyak dibicarakan tentang aplikasi transplantasi embryonik stem sel dimana peluang yang diprediksi yaitu embryonik stem sel pada manusia, disamping itu juga diwaspadai adanya kontroversi dari segi keagamaan dan politik. Sedangkan dari sudut pandang keilmuan merupakan peluang yang menjanjikan.

Melalui kultur *in vitro*, embryonik stem sel akan berdiferensiasi menjadi sel hematopoietik. H1 sel akan terbentuk setelah 4-7 hari kultur, H1 sel akan berdiferensiasi menjadi sistik bodi yang akhirnya akan berkembang menjadi sel CD34+. Dendritik sel (DC) yang berasal dari embryonik stem sel setelah kultur 12 hari akan mengekspresikan HLA B7.2. Disamping itu DC-SIGN (CD209) yang merupakan diferensiasi dari embryonik stem sel, yang mempunyai peranan penting sebagai *resting* T sel yang dapat mengenali reseptor ICAM-3.

Keterbatasan penggunaan embryonik stem sel ini yaitu adanya rejeksi serta adanya potensi untuk terbentuknya teratoma serta aritmogenik yang melalui 3 mekanisme yaitu: *reentry*, *automaticity*, *triggered activity*. Disamping itu para peneliti di Eropa tidak menemukan program-program penelitian embryonik stem sel pada transplantasi. Pada akhirnya penelitian ini masih merupakan kontroversi yang N.sar.

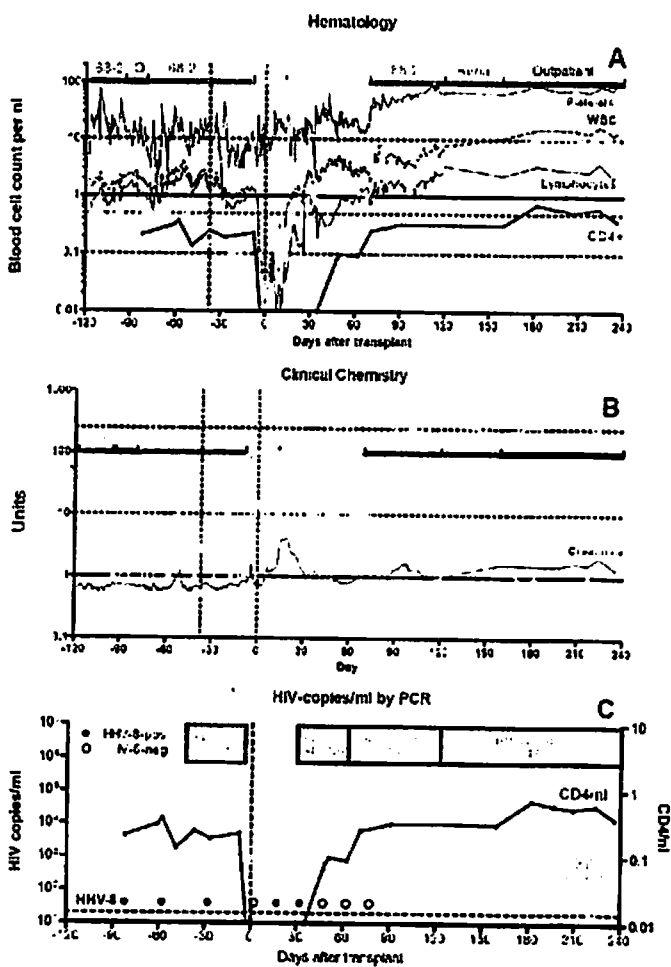
### 2. Endothelial progenitor cells (EPCs)

Dari data yang telah dipublikasikan diferensiasi atau transdiferensiasi stem sel tergantung dari sumber stem sel tersebut,

A. Sumsum tulang yang terdiri dari endotelial prekursor set akan berkembang menjadi pembuluh darah, *multipotent adult progenitor cell (MAPCs)* menjadi hepatosit like set, *hematopoietic stem cells (HSC)* menjadi hepatosit dan kolangiosit, *CD133<sup>+</sup> cells* menjadi darah merah, darah putih dan set endotel, stem sel mesenkimal menjadi adiposit, kondrosit, osteosit, stromal set sumsum tulang, cardiomyosit, miosit, sedangkan stromal set sumsum tulang akan menjadi neuron dan set neural.

Hanya sedikit data yang dipublikasikan transplantasi sumsum tulang pada HIV. Pada tahun 1996 dilaporkan seorang penderita CML yang ternyata HIV + mendapat transplantasi sumsum tulang, dalam waktu 3 tahun terjadi remisi komplit dengan CD4 <200/ $\mu$ L.

Figure 2



Haematology, clinical chemistry and HIV-therapy. A: Hematological work up shows successful engraftment and improvement of pancytopenia. Neutrophiles reached values < 0.5/nL on day +18 and finally were 10-fold higher than before BMT. Platelets recovered concurrently. B: Clinical chemistry before and after BMT. C: HIV-PCR, CD4 count, HHV-8 PCR

and HIV-therapy. HIV load was rapidly elevated in the therapy-free interval day 0 until day +14. After reintroduction of HAART, HIV load was under the limit of detection from day +138. CD4 count reached pretransplant level after the neutropenic period. Qualitative HHV-8 PCR became negative after BMT

**B. *Peripheral blood*** yang terdiri dari *circulatory skeletal muscle cells* yang akan menjadi adiposit dan osteosit, sedangkan HSC menjadi hepatosit, sel epitel di kulit dan saluran gastrointestinal. Salah satu studi tentang HSC pada HIV didapatkan bahwa CD34+ progenitor sel terbentuk setelah kultur 5-6 hari, 30% progenitor sel menjadi Thy1.

**C. *Umbilical cord blood*** yang terdiri dari *hematopoietic precursor cells (HPC)* yang akan berkembang menjadi sel darah merah dan putih, HSC menjadi neuron, progenitor sel mesenkimal menjadi sel darah merah dan putih serta osteoblas dan adiposit. 4. Otak yang terdiri dari *neural stem cells* yang akan berkembang menjadi *skeletal muscle cells, fetal stem cells* dari sistem saraf pusat menjadi astrosit, neuron, oligodendrosit, adult dan *neonatal neural progenitor cells* akan menjadi sel yang sama dengan di atasnya. 5. Lemak yang terdiri dari sel stromal pembuluh darah yang berasal dari proses *lipospirate* akan berkembang menjadi adiposit, osteosit, kondrosit dan prekursor miosit. 6. Liver yang terdiri dari HSC berkembang menjadi HPC, sel darah merah dan putih. 7. Pankreas yang terdiri dari *nestin positive islet derived progenitor cells* menjadi sel pankreas dan sel hati. 8. *Umbilical vein* yang terdiri dari sel endotelial akan berkembang menjadi cardiomyosit. Jadi disini setiap stem sel akan mengalami perkembangan identitas yang unik melalui interaksinya antara relung-relung sel (faktor internal) dengan regulasi sinyal eksternal sehingga dapat bertahan, memperbaharui diri serta berdiferensiasi.

*Blood cord* adalah merupakan sumber yang terbaik karena cenderung normal dan secara etik dapat diterima, serta sumber berlimpah karena sekitar 100 juta bayi dilahirkan setiap tahunnya, tentu saja untuk dijadikan bahan terlebih dahulu harus diskreneng dari penyakit infeksi terutama HIV. HSC juga berguna untuk terapi HIV dimana HSC dihantarkan dengan memikat HIV atau *RNAse genes*, sehingga sel T CD4 yang matur yang merupakan sel target dari infeksi HIV menjadi resisten terhadap infeksi HIV.



## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### Jenis Penelitian

Merupakan penelitian eksperimental dengan *allogenic stem cell transplantation* secara *in vitro*, *in vivo* pada binatang, kemudian tahap selanjutnya yaitu *in vivo* pada *human* dengan menggunakan *Bone Marrow lymphocyte TCD4* dari donor untuk kemudian dilakukan delesi pada CCR5, untuk selanjutnya dilakukan gene terapi pada penderita HIV/AIDS.

#### Sampel

Diambil dari Bone Marrow donor yang sehat

#### Kriteria Inklusi

1. Berusia 18-30 tahun
2. Dalam keadaan sehat
3. Tidak menderita sakit sistemik maupun degenerative
4. Tidak adanya penyakit infeksi
5. Menandatangani *informed consent*

#### Kriteria Eksklusi

1. Adanya penyakit infeksi lainnya.
2. Adanya penyakit dasar yang berat (DM,CKD,Gagal jantung, Gagal hati,Sirosis hepatis,dl
3. Usia > 30 tahun
4. Tidak bisa membaca dan menulis

## **Tempat**

RSU Dr. Soetomo Surabaya dan *Institute of Tropical Diseases* UNAIR Surabaya

## **Waktu**

Selama 3 tahun :

1. Tahun Pertama : secara *in vitro*
2. Tahun Kedua : uji coba pada animal
3. Tahun Ketiga : Clinical trial pada Human

## **Metode**

### **1. Pengumpulan Sampel**

Sampel diambil dari donor yang masih mempunyai hubungan kekerabatan (saudara kandung). Setelah diambil 5 cc darah dari BMA donor dilakukan isolasi mononukleated sel dengan menggunakan Ficol Histopaque gradient 1.077, selanjutnya dilakukan culture. (Rantam et all, 2008)

### **2. Isolasi Mononukleated**

BMA disentrifugasi 1600 rpm, 15 menit, kemudian dimasukkan pada tabung 15 cc yang mengandung Ficol pelan pelan melalui tepi dari tabung. Setelah dilakukan sentrifugasi maka buffy coat diisolasi dengan cara masukkan pipet, disedot dan ditampung pada eppendorf tube, lalu dicuci dengan PBS, kemudian diculture dimasukkan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan menggunakan medium alfa MEM yang mengandung serum 25% FBS (Rantam et all, 2008)

### **3. Kultur Limfosit**

Setelah hari ketiga dikultur untuk selanjutnya dilakukan Pemisahan supernatan yang mengandung *Hematopoetic* stem sel kemudian dilakukan sentrifugasi dengan

kecepatan 1600 rpm, 5 menit, t 10°C. Setelah supernatan dibuang kemudian pellet diresuspensi dengan medium penumbuh yang mengandung serum FBS 20% dan antibiotika penstrep. Setelah resuspensi dimasukkan ke dalam petri disk kemudian dimasukkan dalam inkubator CO2 5% (Rantam et all, 2008)

#### **4. Identifikasi CD4**

Untuk mengetahui maturasi dari sel tersebut maka diperlukan suatu indikator dalam hal ini adalah CD4. Identifikasi tersebut dilakukan dengan cara kultur sel limfosit dipanen kemudian dimasukkan ke dalam tube 15 cc, kemudian dilakukan fiksasi dengan menggunakan metanol, setelah 15 menit ditambahkan reagen anti sel T CD4 yang dilabel dengan Fit C. Kemudian dicuci dengan PBS, lalu ditetaskan pada objek glass dan dianalisis di bawah mikroskop fluorensence (Rantam et all, 2008)

#### **5. Analisis CCR5**

Pada tahapan ini dilakukan ekstraksi RNA, sintesis cDNA dan amplifikasi, serta elektroforesis.

##### **5.1. Ekstraksi RNA**

Sampel serum 60 ul diencerkan dalam deepwater (DW) atau RNase free water sebanyak 190 ul kemudian ditambahkan 750ul Trizol selanjutnya dilakukan homogenisasi dan diinkubasikan selama 5 menit pada temperatur ruangan. Setelah ditambahkan chloroform 200 ul dan di vortex kemudian dibiarkan 5 menit pada temperatur ruangan , selanjutnya disentrifugasi 12000 rpm selama 15 men pada temperatur 4°C. Kemudian bagian atas dipipet sebanyak 500 ul ditransfer ke eppendorf baru lalu ditambahkan 500 ul propanol-2 vortex dan diletakan pada temperatur kamar selama 10 men. Stelah dilakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 10 men pada temperatur 4°C kemudian lapisan supernatan dibuang dan selanjutnya ditambah 1 ml ethanol 70% kemudian divortex dapat disimpan pada -20°C atau langsung digunakan untuk analisis selanjutnya. Jika langsung digunakan dilakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit pada 4°C akhirnya lapisan supernatan dibuang dan kemudian ditambahkan 10 ul DW. (Rantam et al. 2000, 2008)

## 5.2. Sintesis cDNA

Pada tahapan ini untuk mensintesis cDNA yang akan digunakan untuk amplifikasi dengan cara mencampur 4  $\mu$ l of 5 x RT Buffer, 4  $\mu$ l of dNTPs mix, 0,5 $\mu$ l of Ribonuclease inhibitor, 0,5 $\mu$ l of Reverse transcriptase, 1,0 $\mu$ l of Primer D-2 (100 pm/ $\mu$ l) setelah dilakukan pencampuran kemudian diinkubasikan 42°C selama 60 men. Produk cDNA dapat disimpan pada -20°C atau langsung digunakan untuk analisis (Rantam, et al. 2008)

## 5.3. Amplifikasi

Setelah sintesis cDNA dilakukan PCR dengan menggunakan primer yang spesifik untuk CCR5. Primer yang digunakan antara lain adalah sbb :

Primer	Urutan nukleotida primer	Posisi primer	PCR product
F	5'CTCCCAGGAATCATCTTTACC-3'		200bp
R	5'TCATTTTCGACACCGAAGCAG-3'		

## 5.4. One Step Multiplex RT-PCR

Metode ini selain digunakan untuk skrining serotipe virus dengue juga digunakan untuk produksi cDNA untuk sekuensing. Caranya yaitu dengan menggunakan kit superscript III one step RT PCR kemudian ditambahkan primers model Lanciotti dan atau primers spesifik protein E. Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan menggunakan 55°C selama 30 men untuk reverse transcriptase, 94°C 3 men untuk predenaturasi 94°C selama 30 det untuk denaturasi, 56°C 45 det untuk annealing, 72°C 1 men untuk ekstensi dan 60°C 7 men untuk *shocking*, proses amplifikasi ini dijalankan sebanyak 40 siklus.

### **5.5. Analisis RNA dengan agarose gel elektroforesis**

RNA atau DNA yang diamplifikasi dipisahkan dengan 1% agarose gel dan selanjutnya di analisis dengan bantuan transluminator (UNIQUEIP) dengan panjang gelombang 302 nm. Dan selanjutnya dokumentasi dilakukan pemotretan dengan kamera digital atau gel doc (Kodak)

Untuk memastikan kualitas ekstraksi RNA dilakukan penilaian dengan cara gelelektroforesis: 2 µg isolate RNA kemudian ditambahkan 18 µl sampel buffer, selanjutnya ditambahkan 2 µl ethidium bromid kemudian diinkubasikan pada temperatur 65°C selama 10 menit. Setelah itu 2 µl dimasukkan kedalam buffer sampel dan akhirnya dilakukan running dengan 40 volt . akhirnya dilakukan dokumentasi, dan atau dilakukan purifikasi untuk sekuensing (Rantam, et al. 2008)

### **5.6. Sekuensing**

Pada tahapan ini dilakukan setelah didapatkan cDNA murni yang merupakan produk cDNA. DNA kering dapat disimpan dalam waktu yang lama, asalkan tidak sering mengalami "freezing dan "thawing", sampai siap untuk dianalisis di mesin sequencing. Biasanya pellet tidak terlihat, Jika menggunakan Dye Rhodamine maupun Big Dye Terminator, kecuali dengan Dye Deoxy Terminator. Sebelum dilakukan running pada ABI Prism 310, maka DNA kering tersebut mengalami perlakuan sebagai berikut :

Stelah ditambahkan 25 µl TSR (Template Suppression Reagent) pada DNA kering. Kemudian di Vortex dan panaskan pada 95°C selama 2 – 5 menit. (Tanpa ada bubble) dan diinkubasi pada es ± 10 menit. Lalu di Spin down. Stelah itu pindahkan dalam microtube (0.5 ml) P/N: 401956.

Dan dispin down usahakan tidak ada Bubble. Akhirnya simpan pada es (4°C) sampai siap dianalisis pada mesin ABI PRISM 310. Hasil yang didapat selanjutnya dilakukan analisis filogenetik dan homologi dengan bio-edit. (Rantam et al. 2000)

## **6. Delesi CCR5**

Pada tahap ini dilakukan delesi 32 produk PCR CCR5 dengan menggunakan enzim restriksi

## **7. Ko-Kultivation dengan PBMC HIV**

Serum dari PBMC dipisahkan dengan peletnya, peletnya dimasukkan kedalam vicol 4cc → disentrifuge 1600 rpm, 5 menit, t 10°C , diambil supernatannya → ditambahkan lagi 5cc PBS → disentrifuge 3500 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan eritrositnya, kemudian supernatannya ditambahkan kedalam *microplate* 24 well yang berisi limfosit T yang didelesi dan yang kontrol → diinkubasi, hasilnya dibandingkan.

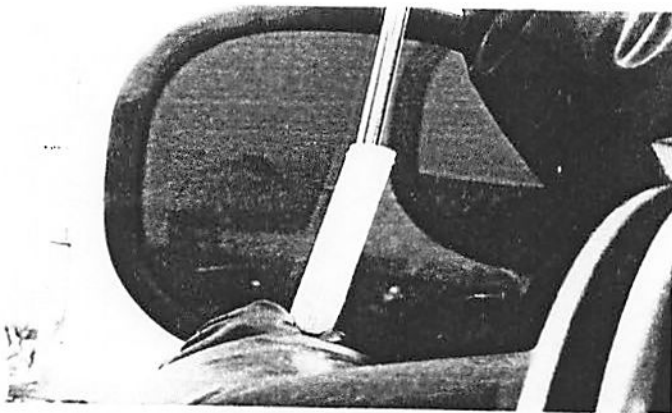
## BAB V

### HASIL PENELITIAN

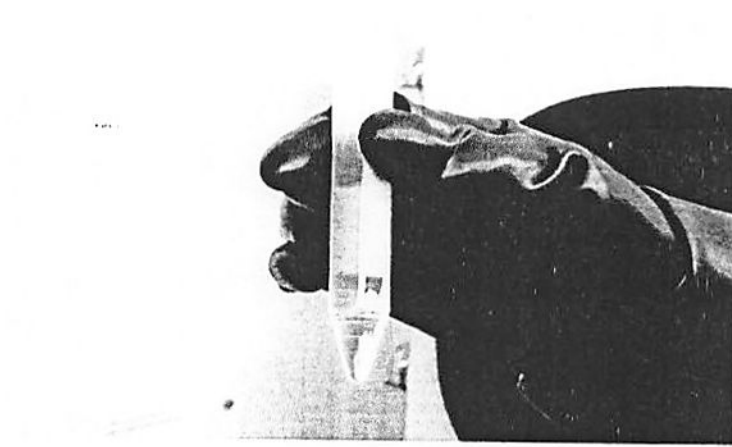
Penelitian ini pada tahun pertama dilakukan beberapa tahapan antara lain isolasi mononukleated sel kemudian dilanjutkan kultur sel, pemurnian sel limfosit, identifikasi sel limfosit dan ekspresi CD4, serta co-cultivasi limfosit T yang sudah didelesi dengan PBMC pasien HIV dibandingkan dengan kontrol.

#### 1. Isolasi mononucleated sel dari umbilical cord blood:

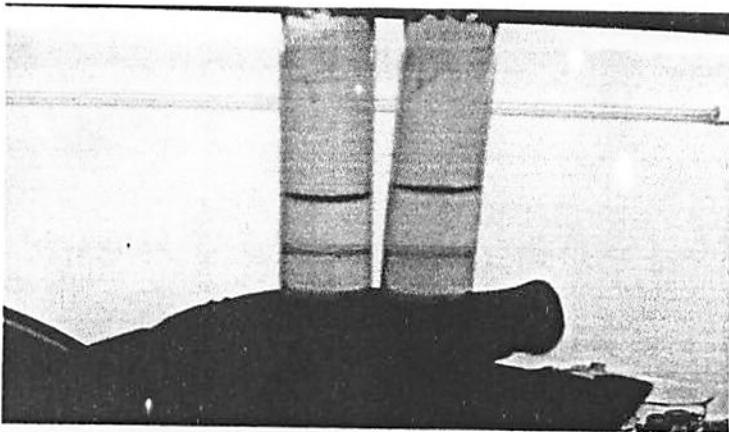
Setelah whole blood dari UMC dikoleksi dengan tube kemudian dilakukan isolasi sel mononukleated. Pertama dilakukan resuspensi umbilical cord blood sel kemudian dimasukkan ke dalam ficoll histopaque lalu disentrifuge



Gambar 1: Resuspensi Bone Marrow Stem Sel



Gambar 2: BMA yang telah diresuspensi dimasukkan ke dalam ficoll histopaque lalu disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit



Gambar 3: Setelah disentrifuge maka akan dihasilkan buffy coat yang selanjutnya diambil untuk dikultur



## 2.Kultur mononukleated sel setelah isolasi



Gambar 4:Sel diisolasi dengan menggunakan Ficoll histopaque 1,077 dan dikultur, dilihat dibawah inverted microscope dengan pembesaran 10 x



Gambar 5:Sel 24 jam setelah dicuci dan dilihat dibawah inverted microscope dengan pembesaran 10x

## 3. Purifikasi limfosit

Setelah hari ketiga dikultur untuk selanjutnya dilakukan Pemisahan supernatan yang mengandung *Hematopoetic* stem sel kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm, 5 menit, t 10°C. Setelah supernatan dibuang kemudian pellet

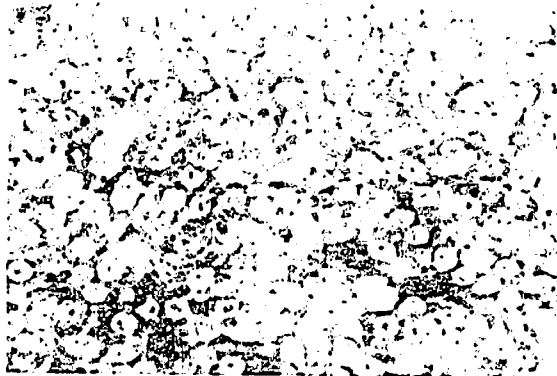
diresuspensi dengan medium penumbuh yang mengandung serum FBS 20% dan antibiotika penstrep. Setelah resuspensi dimasukkan ke dalam petri disk kemudian dimasukkan dalam inkubator CO2 5%.



Gambar 6: Kultur mononucleated sel dilihat dibawah inverted microscop dengan pembesaran 10x

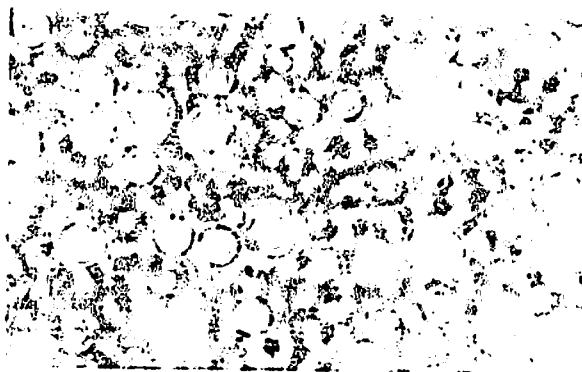


Gambar 7: Hari ke 5 setelah sel hematopoetik dikultur maka tumbuh juga sel mesenkim diantara sel hematopoetik, dilihat dibawah inverted microscope 10 x, kemudian sel hematopoetik dipisahkan dari mesenkim

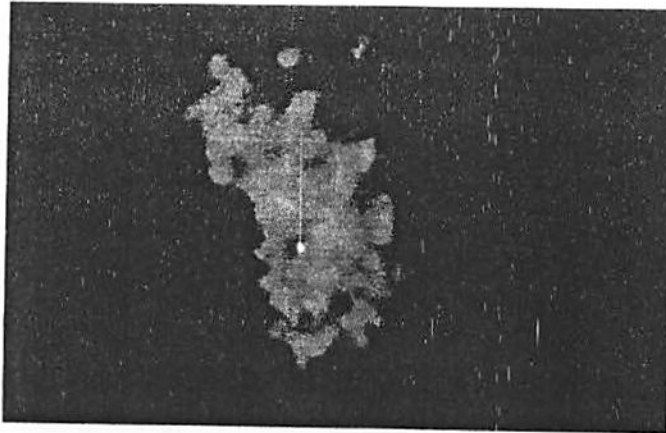


**Gambar 8:**Limfosit dikultur sampai siap di ko kultivasi, dilihat dibawah inverted microscope 10 x.

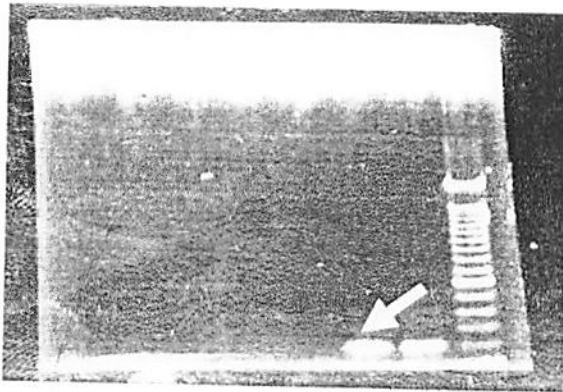
#### **4. Identifikasi Pematangan limfosit dengan CD4**



**Gambar 9:**Limfosit yang sudah matur kemudian diidentifikasi dengan CD4, dilihat dibawah inverted microscope 40x

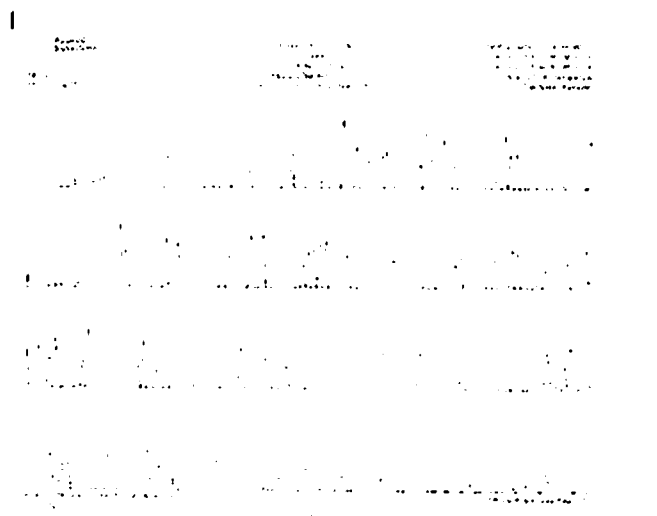


Gambar 10: sel limfosit dipanen kemudian dimasukkan ke dalam tube 15 cc, kemudian dilakukan fiksasi dengan menggunakan metanol, setelah 15 menit ditambahkan reagen anti sel T CD4 yang dilabel dengan Fit C. Kemudian dicuci dengan PBS, lalu ditetaskan pada objek glass dan dianalisis di bawah mikroskop fluoresence



Gambar 11: Karakterisasi CCR5 dengan RT PCR

### 5. Sequencing dan delesi produk PCR CCR5



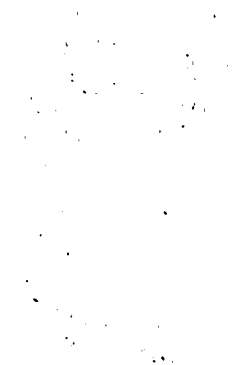
### 6. Co-Cultivasi Limfosit T yang sudah di delesi dibandingkan dengan kontrol



**Gambar 13: Cells growing together between lymphocyte stem cell and PBMCs isolating from HIV patients, PBMCs cell contain about 1 m.o.i. (multiplication of infectivity) in control**



**Control**



**Delesi**

**Gambar 14: HIV infected particles spreading in some cells forming focus (plaque) as well as on pfaile ,Six days after co-cultivation in control lymphocyte**

## **BAB VI**

### **PEMBAHASAN**

Setelah dilakukan penelitian pada beberapa tahapan yang meliputi isolasi, identifikasi, karakterisasi dan co-cultivasi dengan PBMC pasien HIV/AIDS menunjukkan hasil yang cukup signifikan, antara lain:

#### **1. Isolasi mononucleated sel**

Pada tahapan ini setelah dilakukan isolasi didapatkan sel sebanyak  $2 \times 10^7$  per 3 ml UMC, namun pada tahapan ini setelah dilakukan isolasi dan dikultivasi banyak sel yang tidak bisa tumbuh, hal ini kemungkinan karena proses antara collecting sample dan isolasi lebih diperlankan waktu yang cepat dan temperatur yang sesuai dengan kebutuhan sel, serta PH medium harus sesuai dengan sifat dari sel. Hal ini terbukti ketika dilakukan kultur dengan menggunakan petri dish banyak sel yang tidak bisa berkembang dikarenakan tidak optimalnya adheren antara sel dengan matrik petri dish. Hal lain yang perlu diperhatikan dalam proses isolasi adalah collecting sample yang menggunakan transport medium yang sesuai sehingga kematian sel dapat ditekan, hal ini terbukti dengan hasil isolasi mononucleated sel dengan sel yang tumbuh pada petri dish, dimana pertumbuhannya diatas 80%.

#### **2. Kultur mononukleted sel**

Setelah buffy coat yang mengandung mononucleated sel dipisahkan atau dicuci dengan menggunakan PBS, hal ini memerlukan perhatian yang lebih mendalam terhadap PH dari PBS atau medium pencuci, hal ini karena jika suasana terlalu asam atau basa maka bisa menyebabkan kerusakan dari membran yang dapat mengakibatkan kerusakan dari membran yang ditandai sulit terjanya perlekatan sel pada petri dish sehingga tidak mempunyai kemampuan adheren akibatnya terjadi

kematian sel. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah saat sentrifugasi, jika sentrifugasi punya kecepatan tinggi diatas 3600 rpm, sering terjadi perlekatan diantara sel, sehingga bila dilakukan resuspensi maka akan terjadi defek pada membran sel yang akibatnya sel tidak mampu untuk beradaptasi dan melekat pada dasar petri dish.

Pada kultur sel haematopoetik diperlukan kecermatan dalam isolasi sel hematopoetik sehingga tidak terjadi kontaminasi sel mesenkim dengan harapan akan didapatkan perkembangan sel yang optimal yang akan menjadi sel innate (innate immunity, seperti makrofag, monosit, PMN, eosinofil, basofil). Dengan demikian sel ini mempunyai kemampuan diferensiasi menjadi lebih baik. Pada penelitian ini tidak dilakukan karakterisasi produk –produk yang berperan penting seperti TGF, TNF, IL, IFN, dll yang bertindak sebagai signaling transduser maupun pemicu sel imun menjadi aktif yang dapat mempercepat terjadinya diferensiasi dari sel. Hal ini akan dilakukan pada tahap berikutnya. Walaupun demikian setelah dilakukan pengulturan hasil dari pemisahan antara sel mesenkim dan hematopoetik masih juga ditemukan kontaminan, karena itu pada tahapan ini diperlukan pemurnian lebih lanjut dan hasilnya seperti pada gambar 7.

### **3.Karakterisasi dan diferensiasi sel limfosit**

Pada tahapan ini setelah dilakukan pemurnian limfosit dan dikembangkan dengan medium penumbuh menunjukkan perkembangan yang signifikan baik terbukti dengan pemeriksaan reseptor CD4 dapat ditemukan hampir pada semua sel limfosit. Hal ini menandakan bahwa sel tersebut mengalami diferensiasi yang cukup sempurna yang ditandai dengan adanya densitas yang tinggi terhadap ekspresi CD4. Seperti hasil ini dapat dilihat pada gambar 10 yang menggunakan pendekatan imunofluoresen. Dari hasil tersebut dapat diindikasikan bahwa terjadi proses diferensiasi limfosit T yang signifikan walaupun produk sel tersebut seperti sitokin pada penelitian ini belum dilakukan identifikasi, tetapi terbukti pada penelitian tersebut sel ini sudah mengalami diferensiasi dan dapat dipakai sebagai dasar untuk terapi imunodefisiensi, seperti pada pasien HIV/AIDS. Hal lain yang perlu dilakukan



pendekan adalah produk dari CTL yang berperan penting pada proses terjadinya apoptosis. Indikasi ini dapat digunakan sebagai petanda aktivitas dari sel limfosit terhadap paparan agen asing.

#### 4. Ko-kultivasi limfosit T dengan PBMC pasien HIV/AIDS dibandingkan dengan kontrol

## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **Kesimpulan**

Pada penelitian ini dari hasil karakterisasi Bone Marrow Stem Sel *in vitro* telah dapat diidentifikasi ekspresi Limfosit T CD4 dengan imunositokimia dan CCR5 dengan RT-PCR melalui suatu proses isolasi BMA, kultur mononukleated sel, purifikasi sel limfosit, serta identifikasi Limfosit T CD4, Identifikasi CCR5, Sequencing dan delesi 32 bp dari produk PCR CCR5, dan dilakukan ko-kultivasi dengan PBMC HIV pasien dibandingkan antara kontrol dan trial, dimana pada trial tidak didapatkan penyebaran HIV dengan tidak adanya FFU, dimana nantinya kedepan bisa digunakan untuk terapi penyakit imunodefisiensi khususnya HIV/AIDS.

#### **Saran**

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat diterapkan pada aplikasi klinis sebagai terapi penyakit imunodefisiensi.

## BAB VIII

### PEMBIAYAAN

**Jumlah dana yang diusulkan Rp.150.000.000,-**

**Jumlah dana yang disetujui Rp. 50.000.000,-**

**Jumlah dana yang diterima Rp. 42.022.727,-**

#### **Bahan Habis Pakai**

1.Cronical tube 15 cc	=Rp. 250.000,-
2.Concanavalin A	=Rp.2.581.000,-
3.One step RT PCR	=Rp.2.887.500,-
4.Dream tag green PCR	=Rp.2.100.000,-
5.2x PCR master mix	=Rp.1.800.000,-
6.PCR tube 0.2 cc	=Rp.1.800.000,-
7.One step superscrip PCR	=Rp.4.245.000,-
8.Sensiglove S	=Rp. 200.000,-
9.Sensiglove.M	=Rp. 200.000,-
10.TC dish plastik 6 cm	=Rp. 127.500,-
11.TC dish plastik 9 cm	=Rp. 157.500,-
12.Poli L lisyne slide	=Rp.2.070.000,-
13.High fidelity PCR enzym	=Rp.1.567.000,-
14.Yellow tip	=Rp. 360.000,-
15.Blue tip	=Rp. 390.000,-
16.White tip	=Rp.1.155.000,-

17.Eppendorf tube 1.5 cc	=Rp. 825.000,-
18.Falcon 15 cc	=Rp. 750.000,-
19.Falcon 80 cc	=Rp. 750.000,-
20.Cryo tube 2 cc	=Rp. 690.000,-
	-----+
	=Rp.22.075.000,-

**Pembiayaan untuk sewa alat dan honor:**

1. Publikasi dan dokumentasi	=Rp. 1.500.000,-
3. HR Ketua peneliti : Rp.35.000 x 7 jam x 5 hari x 2 bulan	=Rp. 2.450.000,-
4. HR Wakil Peneliti : Rp.30.000 x 7 jam x 5 hari x 2 bulan	=Rp. 2.100.000,-
5. HR analis (2) : 5 bulan x Rp. 200.000 x 2	=Rp. 1.500.000,-
6. HR anggota peneliti Rp. 25.000 x 7 jam x 5 hari x 2 bulan	= Rp. 1.750.000
8. ATK, pembuatan laporan	=Rp. 500.000
9. Sequencing 2 kali	=Rp. 800.000,-
	-----+
	=Rp.10.600.000,-

## DAFTAR PUSTAKA

- Antelman G, Msamanga GI, Spiegelman D, Urassa E, Nunn JH (2000). Nutritional factors and infectious disease contribute to anemia among pregnant women with human immunodeficiency virus in Tanzania. *J.Nutr.* 130, 1950-1957.
- Brooke SM, McLaughlin JR, Cortopassi KM, Sapolsky RM (2002). Effect of gp120 on glutathione peroxidase activity in cortical cultures and the interaction with steroid hormones. *J Neurochem* 81, 1-24.
- Dinsmore J, Ratliff J, Deacon T (1996). Embryonic stem cell differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant*, 5: 131-43.
- Drew WL (2001). HIV & Other Retroviruses. In: *Current Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases*. Editors: Wilson WR, Sande MA. Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, p.442- 447.
- Folks TM, Hart CE (1997). The Life Cycle of Human Immunodeficiency Virus Type 1. In: *AIDS. Fourth Edition*. Editors: DeVita VT, Hellman S, Rosenbrk SA. Lippincott – Raven, Philadelphia, pp. 29-43.
- Hirschel B (2003). HIV infection. In : *Infectious diseases in 30 days*. Editor: Southwick FS. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, USA, p.477- 524.
- Jaroslawa C, Cornelia W, Alexandra R (2003). Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem*, 384: 1391-409.
- Koolman J, Rohm KH (2001). Daur Hidup Virus HIV. Dalam: *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia. Edisi Alih Bahasa : Wanandi SI*. Editor: Sadikin. Penerbit Hipokrates, Jakarta, p.358-359.
- Ledru E, Lecoer H, Garcia S, Debord T, Gougeon ML (1998). Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: Correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis. *The Journal of Immunology*. 160, 3194 – 3206.
- Levinson W, Jawetz E (2003). Human Immunodeficiency Virus. In: *Medical Microbiology and Immunology. Seventh Edition*. Editor: Levinson W, Jewetz E. International Edition. Singapore, p.286-294.
- Levy JA (1994). Intracellular Control of HIV replication. In: *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. ASM press, Washington DC, p.59-70.

- Luzuriaga K, Sullivan JL (1997). Transmission of the human immunodeficiency virus from mother to the fetus and infant. In: AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention. Fourth Edition. Editor: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia, p.167- 173.
- Mandel GL (2000). Human immunodeficiency virus. In: Essential atlas of infectious diseases, 2<sup>nd</sup> ed. Editor : Bleck TP, Brook I, Fekety R, Lorber B, Mildvan D. Philadelphia: Current Medicine, Inc, p.6-7.
- Metcalf JA, Davey RT, Lane HC (1997). Acquired Immunodeficiency Syndrome : Serologic and Virologic Tests. In: AIDS. Fourth Edition. Editors: DeVita VT, Hellman S, Rosenbrk SA. Lippincott – Raven, Philadelphia, p.177-195.
- Money D, 2003. HIV and pregnancy. From: <http://www.bcpwa.org/issue07/hivpreg.htm>  
Accessed 10/28/2003.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, (2003). Cytokines. In: Medical immunology. Tenth ed. Editors: Parslow TG, Stites Dp, Terr AI, Imboden JB, .International edition, San Fransisco, p.48-166.
- Rantam, FA, Ferdiansyah, Nasronudin, Purwati, (2009). Stem Cells and Exploration, Airlangga University Press.
- Sriram B, Rammesh A (2008). Human embryonic stemcell (hES) derived dendritic cells are functionally normal and are susceptible to HIV-1 in. AIDS Research and Therapy.
- Suwendra P (2002). Human Immunodeficiency Virus. Dalam: Buku Ajar Ilmu Kesehatan Anak infeksi dan Penyakit Tropis. Edisi pertama. Editor: Soedarmo S, Garna H, Hadinegoro SR. Ikatan Dokter Anak Indonesia, Jakarta, hlm. 281-302
- UNAIDS/WHO (2002). AIDS epidemic update. Joint United Nations Programe on HIV/AIDS and World Health Organization, Genewa, p.1-42.
- Viviani B, Corsini E, Binaglia M, Galli CL, Marinovich M (2001). Reactive oxygen species generated by glia are responsible for neuron death induced by human immunodeficiency virus-glycoprotein 120 in vitro. Neuroscience 107, 2-24.
- WHO (2002). The use of antiretrviral therapy: A simplified approach for resource-constrained countries.WHO regional office for South-East Asia, New Delhi, pp 1-49.
- Wolf T, Rickerts V, Staszewski S (2007). First Case of successful allogenic stem cell transplantation in an HIV-patient who acquuuuuired severe Aplastic Anemia. Haematologia, Vol 92, Issue 4, e56-e58 doi:10.3324/haematol.11394

Zhang YM, Hartzell C, Narlow M (2002). Stem cells derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 106: 1294- 99.