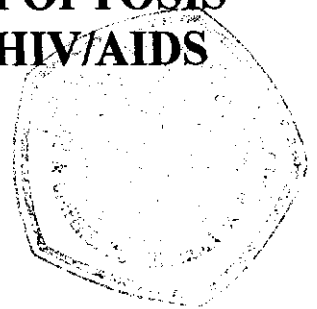


DISERTASI

**EFEK PERNYATAAN DIAGNOSIS TERINFEKSI
HIV/AIDS TERHADAP MEKANISME APOPTOSIS
LIMFOSIT T-CD4 PADA PENDERITA HIV/AIDS**

Suatu Pendekatan Psikoneuroimunologi

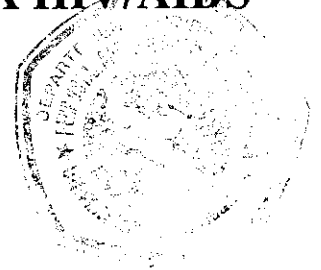


NASRONUDIN

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

EFEK PERNYATAAN DIAGNOSIS TERINFEKSI HIV/AIDS TERHADAP MEKANISME APOPTOSIS LIMFOSIT T-CD4 PADA PENDERITA HIV/AIDS

Suatu Pendekatan Psikoneuroimunologi



DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 26 Mei 2005

Pukul : 10.00 BBWI

Oleh :

NASRONUDIN

NIM. 0902214908D

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2005

Lembar Pengesahan

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 16 Juni 2005

Oleh

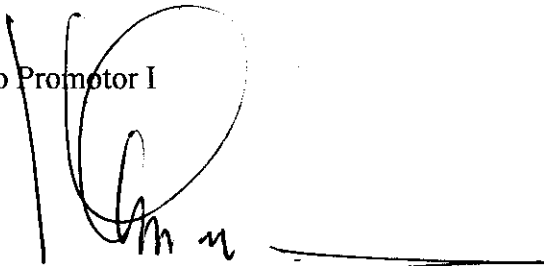
Promotor



Prof. Eddy Soewandojo, dr., Sp.PD-KPTI

NIP. 130 325 831

Ko Promotor I



Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.

NIP. 130 934 628

Ko Promotor II



Prof. H. Kuntoro, dr., MPH, Dr.PH

NIP. 130 531 767

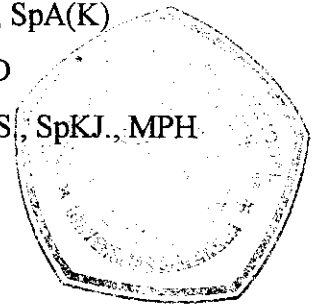
Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap II (Terbuka)

Tanggal 26 Mei 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Mandojo Rukmo, dr., MSc., SpKG

Anggota : 1. Prof. Eddy Soewandojo, dr., Sp.PD-KPTI
2. Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., M.S
3. Prof. H. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH
4. Prof. Dr. H. Soebijanto Marto Sudarmo, dr., SpA(K)
5. Prof. Dr. Hendromartono, dr., Sp.PD-KEMD
6. Prof. Dr. R. Moeljono Notosoedirjo, dr., SpS, SpKJ, MPH
7. Prof. Dr. H. Kabat, SpP(K)
8. Prof. Dr. Purnomo Suryo Hudoyo, dr.
9. Dr. Prihatini, dr., SpPK(K)



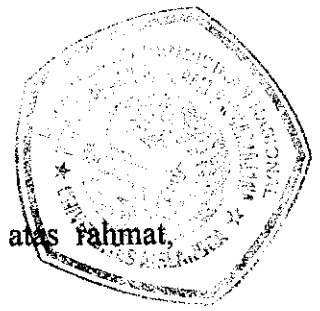
Ditetapkan dengan Surat Keputusan

Rektor Universitas Airlangga

Nomor : 2635/J03/PP/2005

Tanggal : 19 April 2005

UCAPAN TERIMA KASIH



Syukur Alhamdulillah saya panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, karunia serta karena ridho-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada Prof. Dr. Eddy Soewandojo, SpPD-KPTI atas kesediaan menjadi promotor. Bimbingan serta arahannya sangat berguna untuk memperluas wawasan di bidang ilmu kedokteran khususnya dibidang infeksi HIV/AIDS.

Terima kasih juga kami sampaikan kepada Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., atas kesediaannya menjadi ko-promotor. Dorongan dan bimbingannya dengan segala jerih payah yang mengantarkan saya mendalami psikoneuroimunologi yang menjadi landasan guna mengungkap berbagai permasalahan ilmiah sehubungan dengan penelitian ini.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH yang telah bersedia menjadi ko-promotor serta membimbing, mengarahkan, memberikan petunjuk dalam merancang dan analisis statistik penelitian ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr., SpBTKV yang telah memberikan berbagai fasilitas sehingga dapat mengikuti pendidikan Doktor di Pascasarjana UNAIR.

Kepada Direktur Program Pascasarjana Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., SpP saya juga mengucapkan terima kasih atas kesempatan dan fasilitas sehingga memungkinkan saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor di Pascasarjana UNAIR.

Terima kasih saya sampaikan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Prof. Dr. HM Wiyadi, dr., Sp.THT yang telah memberikan ijin untuk mengikuti pendidikan S3 di Pascasarjana UNAIR.

Terima kasih saya sampaikan kepada Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana UNAIR Prof. Dr. Mandojo Rukmo, dr., MSc., SpKG serta mantan Ketua Program Studi Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr., MS., Sp.PA., FIAC,

yang selalu memberikan dukungan, semangat sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih saya sampaikan kepada Prof. Dr. Abu Amar Jusuf, dr., SpS., yang bersedia menjadi dosen mata kuliah penunjang disertasi (MKPD). Beliau memberikan arahan terutama menyangkut peran astrosit, mikroglia pada pasien terinfeksi HIV.

Terima kasih saya sampaikan kepada Prof. Dr. R. Moeljono Notosoedirjo, dr., SpS., SpKJ., MPH, atas kesediaannya menjadi dosen kuliah penunjang disertasi (MKPD). Beliau memberikan berbagai arahan, tatacara belajar yang efektif, mendalami berbagai peran neurotransmitter dan berbagai aspek psikiatri molekuler.

Kepada Siti Pariani, dr., Ph.D., saya ucapkan terima kasih atas kesediaan sebagai dosen mata kuliah penunjang disertasi (MKPD), khususnya dalam memecahkan berbagai masalah infeksi HIV/AIDS dari sudut pandang sosioantropologi.

Kepada para konsultan statistik Dr. Hari Basuki, dr, SKM; Didik Budianto, drh., dan Abdul Kholik, AMS saya ucapkan terima kasih.

Selanjutnya ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Slamet Riyadi Yuwono, dr., DTM & MARS, Direktur RSUD Soetomo dan Abdus Syukur, dr., SpBD, serta Prof. H.M. Dikman Angsar, dr., SpOG, mantan Direktur RSUD Soetomo yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Kepala Bagian Penyakit Dalam Prof. Dr. Askandar Tjokroprawiro, dr., SpPD-KEMD yang memberikan kesempatan pada saya untuk masuk dan mengikuti program S3 serta selalu memberikan dorongan pada setiap kesempatan guna mempercepat penyelesaian disertasi ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada seluruh staf pengajar di Program Pascasarjana UNAIR yaitu: Prof. Eddy Pranowo Soediby, dr., MPH (alm.), Fuad Amsari, dr., MPH., Ph.D, Prof. Dr. M. Zainuddin, Apt., Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Widodo J. Pudjirahardjo, dr., MS., MPH., Dr. PH. Prof H Kuntoro, dr., MPH., Dr. PH, Prof. H. Soeprapto As, dr., DPH., Siti Pariani, dr., Ph.D., Prof.

Lasiyo, Prof. Dr. J Glinka, SVD., Prof. Dr. L Dyson P,MA, Dr. Ni Made Mertaniasih, dr. M.S., SpMK., Dr. FM Yudayana,dr., M.S, SpPK (K), Prof. Dr. Sc. H. Kuehn dari Humboldt University Berlin, dan masih banyak staf pengajar lainnya yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Semua staf pengajar tersebut telah menyumbangkan ilmu dan pengetahuan di bidang disiplin ilmu masing-masing sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan.

Terima kasih saya sampaikan kepada tim penilai ujian kelayakan dan tertutup Prof. Eddy Soewandojo, dr., SpPD-KPTI., Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr. PH., Prof. Dr. Hendromartono, dr, Sp.PD-KEMD, Prof. Dr. Abu Amar Jusuf, dr., SpS., Prof. Dr. Guntur Hermawan, dr., Sp.PD-KPTI, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Siti Pariani, dr., Ph.D., Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., SpMK yang telah banyak memberikan berbagai tambahan serta berbagai informasi ilmiah guna penyempurnaan naskah untuk diajukan dalam ujian terbuka.

Terima kasih saya sampaikan kepada para ODHA (orang dengan HIV/AIDS) yang menjadi subyek penelitian, OHIDHA (orang yang hidup dengan penderita HIV/AIDS), telah mendukung pelaksanaan penelitian ini.

Ucapan terima kasih juga kepada seluruh Paramedis di Unit Perawatan Intermediate Penyakit Infeksi (UPIPI), semua rekan dari Lembaga Swadaya Masyarakat yang telah memberikan dorongan kepada saya menyelesaikan penelitian dengan subyek pasien yang dihadapkan masalah stigma dan diskriminasi dari berbagai kalangan.

Demikian juga terima kasih saya sampaikan kepada Marga Maramis,dr., SpKJ yang juga membantu memberikan konseling dan persiapan kepada para penderita.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Laboratorium Prodia Surabaya terutama kepada mbak Yayuk, mbak Sari serta Prodia Jakarta khususnya kepada Tommy Heryanto, Drs, Apt dengan seluruh staf yang banyak membantu pengadaan reagen dan pemeriksaan laboratorium guna menunjang penelitian ini.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. Yusuf Barakbah, dr., SpKK serta seluruh staf Tim Medik AIDS RSUD Sutomo FK Unair Surabaya yang telah memberikan dorongan dan penelitian di bidang AIDS.

Seluruh Staf Bagian / SMF Penyakit Dalam serta seluruh Staf Divisi Penyakit Tropik Infeksi : Prof. Eddy Soewandojo, dr., SpPD-KPTI, Dr. Suharto, dr., MSc., DTMH., SpPD-KPTI, Usman Hadi, dr., SpPD-KPTI, atas segala dukungan, bantuan dan kerjasamanya guna menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada almarhum Bapak saya dan juga kepada Ibu saya serta kedua mertua yang telah meletakkan landasan akan arti penting pendidikan yang berguna bagi negara dan sesama.

Demikian juga kepada Istri saya Wahyu Dwi Astuti, dr., SpPK dan semua anak saya : Brian Eka Rachman, Bimo Dwi Lukito, Debby Tri Siswita yang telah memberikan kesempatan seluas-luasnya serta selalu sabar mendampingi saya dalam penyelesaian studi ini.

Kepada para tenaga administrasi khususnya : Anis Churillailil, Astri Septa Diana, Sri Darwatin yang telah memberikan bantuan dalam penyelesaian administrasi mulai dari persiapan, pelaksanaan, dan penyelesaian penelitian.

Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu saya mengucapkan terima kasih yang tiada terhingga.

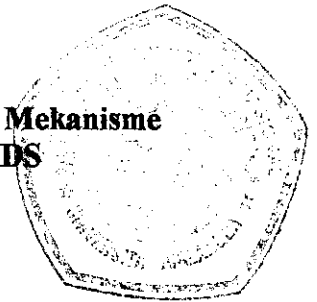
Sebagai manusia biasa tentu didapatkan berbagai kekurangan, kesalahan dan kekhilafan sehubungan dengan pelaksanaan pendidikan Program Doktor di Pascasarjana Universitas Airlangga, untuk itu saya mohon maaf yang sebesar-besarnya.

RINGKASAN

Efek Pernyataan Diagnosis Terinfeksi HIV/AIDS Terhadap Mekanisme Apoptosis Limfosit T-CD4 Pada Penderita HIV/AIDS

Suatu Pendekatan Psikoneuroimunologi

Nasronudin



Penyakit infeksi HIV/AIDS merupakan masalah kesehatan global termasuk Indonesia. Menurut UNAIDS hingga Desember 2000, 58 juta jiwa terinfeksi HIV, 22 juta diantaranya telah meninggal akibat AIDS. Transmisi HIV masih terus berlangsung, 16 ribu jiwa terinfeksi baru setiap hari. Mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita HIV/AIDS yang melibatkan *Heat shock protein70* (Hsp70) belum dijelaskan. Padahal apoptosis merupakan jalur amat penting terhadap kejadian kerusakan imunitas, terutama limfosit T-CD4 yang merupakan target utama HIV. Hsp70 merupakan molekul chaperone yang mempunyai peran dalam imunitas bawaan dan bersifat sitoprotektif terhadap lingkungan mikro yang penuh stresor.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap efek pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita HIV/AIDS. Penelitian ini memerlukan pendekatan melalui paradigma psikoneuroimunologi.

Jenis penelitian ini termasuk penelitian observasional dengan melakukan pengukuran terhadap pelbagai variabel. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *panel study*.

Empat belas pasien terinfeksi HIV yang ditentukan secara acak sederhana menjadi subyek penelitian. Empat belas individu berisiko tinggi yang secara serologi belum terinfeksi HIV sebagai pembanding. Kriteria ikut penelitian adalah kelompok risiko tinggi yang terbukti terinfeksi HIV, dinyatakan melalui pemeriksaan serologis tiga metode (ELISA, imunokromatografi, dipstik). Semua subyek dan pembanding yang memenuhi kriteria inklusi dilakukan pemeriksaan ACTH, kortisol, Hsp70, anti

Hsp70, fragmentasi DNA limfosit T, dan jumlah CD4 setelah menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan.

Pemeriksaan dilakukan 3 kali yaitu pertama saat belum mengetahui status infeksi, pada tahap ini HIV sebagai stresor biologis. Pemeriksaan kedua (hari ke-7) pada saat mengalami stres akut dengan stresor psikologis pernyataan terinfeksi HIV/AIDS. Ketiga (hari ke-31), saat pasien mengalami stres kronis dan menerima kenyataan bahwa dirinya terinfeksi HIV/AIDS.

Untuk menganalisis data penelitian digunakan analisis multivariat, karena setiap perubahan biologik didapatkan interaksi antara beberapa variabel.

Pada pemeriksaan pertama didapatkan penurunan CD4 (kurang 1000 sel/mm³) pada kelompok terinfeksi HIV/AIDS maupun kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV/AIDS. Laju penurunan kelompok terinfeksi HIV/AIDS lebih progresif dari pada kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV (250.29 ± 230.15 vs 598.50 ± 370.70), dan pada analisis statistik perbedaan tersebut signifikan (p= 0.006). Kelompok terinfeksi HIV/AIDS, kadar Hsp70 lebih tinggi daripada kelompok yang belum terinfeksi HIV/AIDS (1.3007 ± 0.6904 vs 0.8214 ± 0.3157). Hal ini menunjukkan bahwa Hsp70 sebagai molekul chaperon muncul karena distimulasi oleh stresor biologis HIV dari pada kelompok yang serologis HIV/AIDS negatif.

Pada pemeriksaan kedua (hari ke-7) selain terdapat perbedaan CD4 antara kedua kelompok, juga terjadi kenaikan kadar Hsp70 akibat pengaruh stresor biologis HIV serta terjadi kenaikan kadar kortisol yang di picu stresor psikologis yaitu pernyataan di diagnosis terinfeksi HIV. Didapatkan perbedaan kadar kortisol yang signifikan antara kelompok yang terinfeksi dengan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi (12.377 ± 4.046 vs 8.650 ± 3.213). Pemeriksaan kedua (hari ke-7) ini kadar Hsp70 rerata lebih tinggi dari hasil pemeriksaan pertama pada kelompok terinfeksi (1.5757 ± 0.8127 vs 1.3007 ± 0.8214).

Pada pemeriksaan ke tiga (hari ke-31) selain terdapat perbedaan CD4 dari kedua kelompok, juga yang menonjol terjadi kenaikan kadar Hsp70 dan anti Hsp70. Hsp70 meningkat secara signifikan pada kelompok terinfeksi HIV daripada

kelompok yang secara serologis belum terinfeksi (1.6907 ± 0.9175 vs 0.8464 ± 0.3608). Hsp70 cenderung terjadi kenaikan kadar dari pemeriksaan pertama, kedua, dan ketiga (1.3007 ± 0.6904 vs 1.5757 ± 0.8127 vs 1.6907 ± 0.9175). Terdapat kecenderungan peningkatan Hsp70 dari stres akut ke kronis. Pada penelitian ini pemeriksaan fragmentasi DNA limfosit T tidak menunjukkan perbedaan antara kelompok terinfeksi dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi. Hasil pemeriksaan pertama (0.29307 ± 0.43161 vs 0.33371 ± 0.24749), kedua (0.34036 ± 0.52735 vs 0.42871 ± 0.42971), dan ketiga (0.30829 ± 0.40400 vs 0.72357 ± 0.68682), tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok. Hsp70 mempunyai peran melindungi terhadap apoptosis limfosit T. Atas berbagai peran penting Hsp70 tersebut, dimasa mendatang Hsp70 sebagai suatu molekul chaperon mempunyai peran dalam penatalaksanaan infeksi HIV/AIDS.

Dapat disimpulkan bahwa HIV selain menyebabkan deplesi CD4 juga merupakan stimulator Hsp70 yang berperan dalam mekanisme sitoprotektif terhadap lingkungan mikro yang penuh stresor.

Berdasarkan temuan tersebut disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut guna untuk pengembangan diagnosis dan terapi penyakit infeksi HIV/AIDS.

SUMMARY

The Effect of HIV/AIDS Infection Diagnosis to T-CD4 Lymphocytes Apoptosis Mechanism in HIV/AIDS Patients

A Psychoneuroimmunological Approach

Nasronudin

HIV/AIDS until now is still a global health problem including in Indonesia. The UNAIDS estimates that as in December 2000, 58 million people have been infected with HIV. Twenty two million people have already died due to AIDS. The epidemic continues to spread rapidly. A total of 16,000 persons are newly infected per day. The T-CD4 lymphocytes apoptosis mechanism in HIV/AIDS infection through Heat shock protein 70 (Hsp70) mediated pathway is still unclear, while apoptosis is an important pathway in immunity destruction, especially T-CD4 lymphocytes as the target cells of HIV. Hsp70 is a member of a family of molecular chaperones that contribute to innate immunity and cytoprotection from stressor in microenvironment.

To disclose the effect of HIV/AIDS infection diagnosis to T-CD4 lymphocytes apoptosis mechanism in HIV/AIDS patients, a study using psychoneuroimmunology paradigm was conducted. This study used observational design with panel study approach.

Fourteen HIV/AIDS infected patients taken by simple random sampling were enrolled in this research. Fourteen persons having a high risk of HIV infection, but still nonreactive, as revealed in HIV serology test, served as control after providing their informed consent. The inclusion criteria in this study were high-risk individuals who, in the examination using serologic HIV test in three methods (ELISA, immunochromatography, and dipstick), revealed reactive in all. All subjects and controls were subjected to three-times examinations for ACTH, cortisol, Hsp70, anti Hsp70, T lymphocytes DNA fragmentation, and CD4 count. The first examination (day 0) was done two hours after the signing of informed consent while the patients

still did not know about their HIV infection status. The second examination (day 7) was carried out when the patients were in acute stress condition after HIV/AIDS infection diagnosis was informed. At the third examination (day 31), the patients were in chronic stress condition and showed acceptance of this disease.

The results of this research were analysed by multivariate analysis, because each biological alterations showed interactions between variables.

The first examination revealed that CD4 decreased both in HIV/AIDS infection and non-HIV/AIDS infection group of less than 1000 cells/mm³. The decrease progression in the HIV/AIDS group is faster than that in non HIV/AIDS infection (250.29 ± 230.15 vs 598.50 ± 370.70). The difference was significant in the statistical analysis ($p = 0.006$). This study demonstrated that in HIV/AIDS infection group Hsp70 had a higher level than that in non HIV/AIDS infection (1.3007 ± 0.6904 vs 0.8214 ± 0.3157). These data showed that Hsp70 as a molecular chaperone became higher due to the stimulation by biological stress HIV.

In the second examination, besides the difference of CD4 count in two groups, Hsp70 level increases. It was not only stimulated by biological stress HIV to lymphocytes, but also to other immune cells. Cortisol secretion and production could be induced by psychological stressor of being informed as having HIV infection. Hsp70 level in the second examination was higher than that in the first examination (1.5757 ± 0.8127 vs 1.3007 ± 0.6904).

The third examination revealed that Hsp70 and anti Hsp70 level could be readily produced in large amount than those in the first and second examinations, in addition to the greatest expression of CD4 cells in two groups. Hsp70 level increased significantly in HIV/AIDS group, more than that in non HIV/AIDS infection at day 31 (1.6907 ± 0.9175 vs 0.8464 ± 0.3608). Hsp70 level in HIV/AIDS group tended to increase from first, second and third examination, i.e., 1.3007 ± 0.6904 vs 1.5757 ± 0.8127 vs 1.6907 ± 0.9175 respectively. This research demonstrated a trend of increasing Hsp70 level from acute to chronic stress in HIV/AIDS infection. In this research T lymphocytes DNA fragmentation was found to have less significant

difference between HIV and non HIV group. The first, second, and third examination HIV/AIDS and non HIV/AIDS group revealed 0.29307 ± 0.43161 vs 0.33371 ± 0.24749 , 0.34036 ± 0.52735 vs 0.42871 ± 0.42971 , 0.30829 ± 0.40400 vs 0.72357 ± 0.68682 respectively. Hsp70 function is for protecting T-CD4 lymphocytes from apoptosis. Hsp70 as a molecular chaperone; is important for managing HIV/AIDS infection in the future.

In conclusion, HIV not only contributes to T-CD4 lymphocytes depletion, but also stimulates production of Hsp70, a cytoprotection mechanism from stressor in microenvironment.

Based on the results of this research, the author suggests to conduct further studies to clarify the role of Hsp70 in developing of the diagnosis and therapy of HIV/AIDS infection.

ABSTRACT

The Effect of HIV/AIDS Infection Diagnosis to T-CD4 Lymphocytes Apoptosis Mechanism in HIV/AIDS Patients

A Psychoneuroimmunological Approach

Nasronudin

HIV/AIDS until now is still a global health problem including in Indonesia. The T-CD4 lymphocytes apoptosis mechanism in HIV/AIDS infection through the Heat shock protein 70 (Hsp70) mediated pathway is still unclear. The objective of this study was to disclose the effect of HIV/AIDS infection diagnosis to T-CD4 lymphocytes apoptosis mechanism in HIV/AIDS patients.

Fourteen HIV/AIDS infected patients taken by simple random sampling were enrolled in this research. Fourteen persons having a high risk of HIV infection, but still nonreactive, as revealed in HIV serology test, served as control. All subjects and controls were subjected to three-times examinations for ACTH, cortisol, Hsp70, anti Hsp70, T lymphocytes DNA fragmentation, and CD4 count. The first examination (day 0) was done two hours after the signing of informed consent while the patients still did not know about their HIV infection status. The second examination (day 7) was carried out when the patients were in acute stress condition after HIV/AIDS infection diagnosis was informed. At the third examination (day 31), the patients were in chronic stress condition and showed acceptance of this disease. The results of this research were analysed by multivariate analysis.

The first examination revealed that CD4 decreased both in HIV/AIDS infection and non-HIV/AIDS infection group of less than 1000 cells/mm³. The decrease progression in the HIV/AIDS group is faster than that in non HIV/AIDS infection. This study demonstrated that in HIV/AIDS infection group Hsp70 had a higher level than that in non HIV/AIDS infection.

The result of the second examination showed that besides the difference of CD4 count in two groups, Hsp70 level increases. It was not only stimulated by

biological stress HIV to lymphocytes, but also to other immune cells. Cortisol secretion and production could be induced by psychological stressor of being informed as having HIV/AIDS infection. Hsp70 level in the second examination was higher than that in the first examination

The result of the third examination revealed that Hsp70 and anti Hsp70 level could be readily produced in large amount and it is enhanced by the CD4 expression cells from the two groups. Hsp70 level increased significantly in HIV/AIDS group, more than that in non HIV/AIDS infection at day 31. Hsp70 level in HIV/AIDS group tended to increase from first, second and third examination, i.e., 1.3007 ± 0.6904 vs 1.5757 ± 0.8127 vs 1.6907 ± 0.9175 respectively. This research demonstrated a trend of increasing Hsp70 level from acute to chronic stress in HIV/AIDS infection. In this research T lymphocytes DNA fragmentation was found to have less significant difference between HIV/AIDS and non HIV/AIDS group.

In conclusion, HIV not only contributes to T-CD4 lymphocytes depletion, but also stimulates production of Hsp70, a cytoprotection mechanism from stressor in microenvironment.

Keywords: apoptosis, T lymphocytes, HIV/AIDS, Hsp70 biological stressor.

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|----------------------------------|-------|
| Sampul Depan | i |
| Sampul Dalam | ii |
| Prasarat Gelar | iii |
| Persetujuan | iv |
| Penetapan Panitia Penguji | v |
| Ucapan terima kasih | vi |
| Ringkasan | x |
| Summary | xiii |
| Abstrak | xvi |
| DAFTAR ISI | xviii |
| DAFTAR TABEL | xxiii |
| DAFTAR GAMBAR | xxiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xxv |
| DAFTAR SINGKATAN | xxvi |
| BAB 1 PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang Masalah | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.3.1 Tujuan umum | 4 |

| | |
|--|---|
| 1.3.2 Tujuan khusus | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 4 |
| 1.4.1 Manfaat teoritis | 4 |
| 1.4.2 Manfaat terhadap pelayanan kesehatan | 5 |

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

| | |
|---|----|
| 2.1 Konsep stres dan stresor | 6 |
| 2.1.1 <i>Stress cell</i> | 7 |
| 2.1.2 Produk <i>stress cell</i> | 7 |
| 2.1.3 Peran Hsp70 | 8 |
| 2.1.4 Anti Hsp70 | 12 |
| 2.2 Neuropatogenesis Infeksi HIV : Sawar Darah Otak, Infeksi pada Endotel, Astrosit, Mikroglia | 14 |
| 2.3 Respons Sel Saraf terhadap HIV | 16 |
| 2.4 ACTH dan Kortisol | 20 |
| 2.5 Pengaruh Infeksi HIV terhadap Neurodegenerasi | 23 |
| 2.6 Mekanisme Infeksi HIV ke dalam Limfosit T-CD4 | 25 |
| 2.7 Berbagai Peristiwa yang Terjadi pada Limfosit T-CD4 Terinfeksi HIV | 27 |
| 2.8 Pengaruh HIV Terhadap Perubahan Kadar ROS dan <i>Heat Shock</i> <i>Protein</i> | 29 |
| 2.9 Aktivasi dan Modulasi Caspases | 33 |
| 2.10 Apoptosis dan Nekrosis | 34 |

| | | |
|---|---|----|
| 2.11 | Proses Apoptosis | 37 |
| 2.11.1 | Proses apoptosis jalur <i>mitochondrial mediated pathway</i> | 38 |
| 2.11.2 | Proses apoptosis melalui jalur <i>receptor mediated pathway</i> | 39 |
| 2.12 | Mitokondria dan Peranannya pada Apoptosis | 40 |
| 2.13 | Peranan Reseptor | 45 |
| 2.14 | Peran <i>Mitochondrial Permiability Transition Pore (MPTP)</i> pada Apoptosis | 47 |
| 2.15 | Peran <i>Chaperonins</i> pada Apoptosis | 50 |
| 2.16 | Mitokondria, <i>Reactive Oxygen Species</i> dan <i>Heat Shock Protein</i> | 55 |
| 2.17 | Pengaruh <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i> terhadap Gen Pengendali <i>Folding Protein</i> serta Hsp | 58 |
| 2.18 | <i>Heat Shock Protein 70 (Hsp70)</i> | 64 |
| 2.19 | <i>Reactive Oxygen Species</i> Penyebab Kegagalan Repair DNA Inti | 65 |
| 2.20 | <i>The 5 Stages of Grief</i> | 70 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN | | |
| 3.1 | Kerangka Konseptual | 74 |
| 3.2 | Hipotesis Penelitian | 75 |
| BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN | | |
| 4.1 | Metode Penelitian | 76 |
| 4.1.1 | Jenis dan rancangan penelitian | 76 |
| 4.1.2 | Rancangan penelitian | 76 |
| 4.1.3 | Bagan rancangan penelitian | 79 |
| 4.1.4 | Kerangka operasional penelitian | 80 |

| | | |
|--|---|-----|
| 4.2 | Populasi, Besar Sample dan Teknik Pengambilan Sampel | 81 |
| 4.2.1 | Populasi | 81 |
| 4.2.2 | Penghitungan besar sampel | 81 |
| 4.2.3 | Teknik pengambilan sampel | 83 |
| 4.2.4 | Kriteria inklusi dan eksklusi | 86 |
| 4.2.5 | Persetujuan setelah penjelasan (PSP, <i>informed consent</i>) dan kelaikan etik | 88 |
| 4.3 | Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel | 88 |
| 4.3.1 | Variabel penelitian | 88 |
| 4.3.2 | Definisi operasional variabel | 89 |
| 4.4 | Sampel Penelitian | 91 |
| 4.4.1 | Penanganan spesimen darah | 92 |
| 4.4.2 | Bahan dan peralatan penelitian | 92 |
| 4.5 | Peralatan Penelitian | 93 |
| 4.6 | Lokasi dan Waktu Penelitian | 93 |
| 4.7 | Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data | 94 |
| 4.7.1 | Prosedur pengambilan sampel darah | 94 |
| BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN | | |
| 5.1 | Data Penelitian | 102 |
| 5.2 | Analisis dan Hasil Penelitian | 103 |
| 5.2.1 | Homogeneity of variance IIDN ($0, \sigma$) | 103 |
| 5.2.2 | Uji data penelitian | 103 |
| BAB 6 PEMBAHASAN | | 121 |

BAB 7 SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan 162

7.2 Saran 163

DAFTAR PUSTAKA 166

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 2.1 : Neurotransmitter, neuropeptida, neurohormon, efektor molekul neuroendokrin, dan modulasi sistem imun | 17 |
| Tabel 2.2 : Diversity of the major molecular chaperone families | 51 |
| Tabel 2.3 : Hsp90 and Hsp70 co-chaperons, interacting molecules and Cellular function | 53 |
| Tabel 5.4 : Rerata Variabel Psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari Pertama | 104 |
| Tabel 5.5 : Koefisien Diskriminan Linier Fisher's | 106 |
| Tabel 5.6 : Pola Kontribusi | 106 |
| Tabel 5.7 : Rerata Variabel Psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tujuh. | 108 |
| Tabel 5.8 : Koefisien Diskriminan Linier Fisher's | 110 |
| Tabel 5.9 : Pola Kontribusi | 111 |
| Tabel 5.10 : Rerata Variabel Psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tiga puluh satu..... | 112 |
| Tabel 5.11 : Koefisien Diskriminan Linier Fisher's | 114 |
| Tabel 5.12 : Pola Kontribusi | 115 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1 : Respons Tubuh Terhadap Stres | 20 |
| Gambar 2.2 : Patogenesis Kematian Neuron pada HIV <i>associated</i> <i>dementia</i> (HAD) | 24 |
| Gambar 2.3 : Siklus hidup HIV | 27 |
| Gambar 2.4 Peran <i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i> , Caspases pada Apoptosis | 50 |
| Gambar 2.5 : Struktur <i>chaperonin</i> 10 dan <i>chaperonin</i> 60 | 55 |
| Gambar 2.6 : Chaperonins sebagai signal interseluler | 57 |
| Gambar 2.7 : Interaksi chaperonin 60 Bakteri dengan Sel Host | 58 |
| Gambar 2.8 : Struktur Asam Amino | 62 |
| Gambar 2.9 : Empat tingkat struktur protein | 62 |
| Gambar 2.10 : Peran Chaperonins pada Folding dan Sintesis Protein Baru | 64 |
| Gambar 5.1a : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari Pertama | 104 |
| Gambar 5.1b : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari Pertama | 105 |
| Gambar 5.2 : Pola Kontribusi terhadap Infeksi HIV | 107 |
| Gambar 5.3a : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tujuh | 108 |
| Gambar 5.3b : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tujuh | 109 |
| Gambar 5.4 : Pola Kontribusi terhadap Infeksi HIV | 111 |
| Gambar 5.5a : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tiga puluh satu | 112 |
| Gambar 5.5b : Rerata Variabel psikoneuroimunologi Pemeriksaan hari ke tiga puluh satu | 113 |
| Gambar 5.6 : Pola Kontribusi terhadap Infeksi HIV | 115 |
| Gambar 5.7 : Grafik perubahan jumlah limfosit pengamatan hari ke 1,7,31 | 116 |
| Gambar 5.8 : Grafik perubahan jumlah CD4 pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 116 |
| Gambar 5.9 : Grafik perubahan kadar ACTH pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 117 |
| Gambar 5.10 : Grafik perubahan kadar kortisol pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 118 |
| Gambar 5.11 : Grafik perubahan Hsp70 pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 118 |
| Gambar 5.12 : Grafik perubahan anti Hsp70 pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 119 |
| Gambar 5.13 : Grafik perubahan jumlah <i>cell death</i> pengamatan hari ke 1, 7, 31 | 120 |

DAFTAR LAMPIRAN

1. Jadwal Kegiatan
2. Rincian Biaya
3. Penjelasan Pengambilan Sampel Darah
4. Surat Persetujuan
5. Surat Pernyataan Persetujuan Sebagai Subyek Penelitian
6. Persetujuan Tindakan Medis
7. Prosedur Pemantauan Untuk Keselamatan Subyek Penelitian
8. Kelaikan Etik
9. Lampiran :
 - a. Lampiran 1
 - b. Lampiran 2
 - c. Lampiran 3
 - d. Lampiran 4
 - e. Lampiran 5
10. Lampiran Uji Homogenitas dan Lampiran Konversi Data

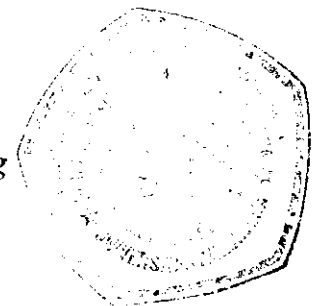
DAFTAR SINGKATAN

| | |
|---------|---|
| ACTH | : <i>Adenocorticotropic hormone</i> |
| ADCC | : <i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i> |
| ADP | : <i>Adenosine di phosphate</i> |
| AIDS | : <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> |
| AIF | : <i>Apoptosis inducing factor</i> |
| AKt | : <i>AGE-IP13 Inositol 3-Phosphate (=IP3) kinase transducer</i> |
| Apaf-1 | : <i>Apoptosis protease activating factor-1</i> |
| ATP | : <i>Adenosine tri phosphate</i> |
| Caspase | : <i>Cysteine aspartic acid-specific proteases</i> |
| CD | : <i>Cluster of differentiation</i> |
| CD69 | : <i>Cluster of differentional 69</i> |
| cDNA | : <i>Copy DNA</i> |
| CRF | : <i>Corticotropin- releasing factors</i> |
| 8-oxoG | : <i>8-oxoguanin</i> |
| d-ATP | : <i>Deoxy-ATP</i> |
| DG | : <i>Diasilgliserol</i> |
| DNA | : <i>Deoxyribo nucleic acid</i> |
| DNA-PK | : <i>DNA-dependent protein kinase</i> |
| ELISA | : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ERK | : <i>Exstracellular regulated kinase</i> |

| | |
|--------------|--|
| FasI | : <i>Fas ligand</i> |
| GAS | : <i>General adaptations syndrome</i> |
| gp120 | : <i>Glycoprotein 120</i> |
| gp41 | : <i>Glycoprotein 41</i> |
| GPx | : <i>Glutation peroksidase</i> |
| GSH | : <i>Glutathione</i> |
| HIV | : <i>Human immunodeficiency virus</i> |
| HPA-axis | : <i>Hypothalamic pituitary adrenal-axis</i> |
| Hsp | : <i>Heat shock protein</i> |
| Hsp40 | : <i>40-kDa heat-shock protein</i> |
| Anti Hsp40 | : <i>Anti-40-kDa heat-shock protein</i> |
| Hsp60 | : <i>60-kDa heat-shock protein</i> |
| Anti Hsp60 | : <i>Anti-60-kDa heat-shock protein</i> |
| Hsp70 | : <i>70-kDa heat-shock protein</i> |
| Anti Hsp70 | : <i>Anti-70-kDa heat-shock protein</i> |
| Hsp90 | : <i>90-kDa heat-shock protein</i> |
| Anti Hsp 90 | : <i>Anti-90-kDa heat-shock protein</i> |
| ELISA | : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Hsp 100 | : <i>100-kDa heat-shock protein</i> |
| Anti Hsp 100 | : <i>Anti-100-kDa heat-shock protein</i> |
| <i>Hsps</i> | : <i>Heat-shock proteins</i> |
| ICE | : <i>Interleukin-1β converting enzyme</i> |

| | |
|----------------|---|
| IFN γ | : <i>Interferon γ</i> |
| IL-1 β | : <i>Interleukin-1β</i> |
| IL-2 | : <i>Interleukin-2</i> |
| IP3 | : <i>Inositol three phosphat</i> |
| JNK | : <i>c-Jun NH2-terminal kinase</i> |
| kDa | : <i>kilodaltons</i> |
| kb | : <i>kilobase</i> |
| MAP | : <i>Mitogen-activated protein</i> |
| MIP-1 α | : <i>Macrophage inflammatory protein-1α</i> |
| MIP-1 β | : <i>Macrophage inflammatory protein-1β</i> |
| MPTP | : <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> |
| mRNA | : <i>Messenger ribonucleic acid</i> |
| MSH | : <i>Melanosit stimulating hormon</i> |
| mtDNA | : <i>Mitochondrial deoxyribonucleic acid</i> |
| NAD | : <i>Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form</i> |
| NADH | : <i>Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form</i> |
| nDNA | : <i>Nuclear deoxyribonucleic acid</i> |
| NO | : <i>Nitric oxide</i> |
| OXPHOS | : <i>Oxidative phosphorylation</i> |
| PDI | : <i>Protein disulfide isomerase</i> |
| P55 | : <i>Protein p55</i> |
| PFGE | : <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> |

| | |
|--------------------------|--|
| pg/ml | : <i>Pikogram/mili liter</i> |
| phospholipase C- β | : <i>Phospho-inositide-spesific phospholipase C-β</i> |
| PKC | : <i>Protein kinase C</i> |
| POMC | : <i>Pro opio melanocortin</i> |
| PVN | : <i>Para ventricularis nucleus</i> |
| rCD43 | : <i>Receptor CD43</i> |
| RE | : <i>Reticulum endoplasmic</i> |
| RNA | : <i>Ribo nucleic acid</i> |
| ROS | : <i>Reactive oxygen species</i> |
| SAT | : <i>Status antioksidan total</i> |
| SEM | : <i>Structural equation modeling</i> |
| SOD | : <i>Superoksida dismutase</i> |
| TCP-1 | : <i>T-complex polypeptide 1</i> |
| TCR-CD3 | : <i>T-cell receptor – CD3</i> |
| Th-1 | : <i>T helper-1</i> |
| TNF- α | : <i>Tumor necrosis factor-α</i> |
| TNFr | : <i>Tumor necrosis factor-receptor</i> |
| TdT | : <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> |
| TUNEL | : <i>TdT-mediated dUTP-X nick and labeling</i> |



BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi HIV/AIDS hingga kini masih merupakan masalah kesehatan global. Masalah yang berkembang sehubungan dengan penyakit infeksi HIV/AIDS adalah kejadian dan kematian yang masih tinggi (Hirschel, 2003). Fakta yang ditemukan ternyata keterlibatan ODHA (orang dengan HIV/AIDS), misalnya Magic Johnson ketahanan hidupnya lebih baik. Kondisi tersebut dipengaruhi oleh proses penerimaan dini (*acceptance*). Hal tersebut penting karena terkait dengan mekanisme apoptosis. Hsp70 termasuk famili molekul chaperone yang mempunyai kontribusi kuat terhadap imunitas bawaan sebagai protektor sel dari pengaruh stres. Ekspresi Hsp70 secara berlebihan justru dapat menimbulkan jejas sel dan mendorong apoptosis, tetapi batas kadar kedua pengaruh Hsp70 tersebut hingga kini belum diketahui. Untuk menentukan batas tersebut perlu mengetahui peran Hsp70 terhadap apoptosis. Keterkaitan Hsp70 dengan apoptosis dalam mekanisme ketahanan masih terdapat berbagai sisi pandang yang hingga kini masih diperdebatkan.

Meskipun telah dicapai kemajuan di bidang ilmu kedokteran dan farmasi, serta telah dilakukan upaya pencegahan, seharusnya angka kesakitan akibat HIV dan kematian akibat AIDS semakin menurun. Kenyataannya kesakitan dan kematian masih tetap tinggi bahkan cenderung terus meningkat. Menurut UNAID, akhir Desember 2000, dilaporkan 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 (Zavasky, 2001).

Pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS merupakan stresor bagi individu yang dapat memicu stres serta potensial mempengaruhi mekanisme apoptosis dan perjalanan penyakit.

Apabila efek diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 tersebut tidak segera dijelaskan maka penatalaksanaan terhadap penderita tidak dapat dilakukan secara optimal, sehingga berakibat: transmisi infeksi HIV terus berlangsung, kesakitan karena HIV terus bertambah, kematian akibat AIDS semakin banyak, progresivitas infeksi HIV ke AIDS tidak terbendung dan semakin meresahkan masyarakat.

Ada berbagai faktor yang menentukan perjalanan infeksi HIV, salah satu faktor yang penting adalah status imun yang semakin lemah ditandai penurunan jumlah limfosit T-CD4. Sel yang mampu mengekspresi CD4 juga teraktivasi termasuk astrosit dan mikroglia. Astrosit dan mikroglia yang teraktivasi mendorong peningkatan aktivitas aksis hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA), serta kadar kortisol dalam darah (Zavasky, 2001; Oppenheim, 2003; Ransohoff, 2003). Perubahan kadar kortisol kemudian mempengaruhi fungsi protein tubuh termasuk *heat shock protein70* (Hsp70) (Scholz, 2001; Tanaka, 2001; Bailey, 2002).

Hingga kini efek diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita HIV/AIDS yang melibatkan *Heat shock protein70* (Hsp70) belum dijelaskan. Padahal apoptosis merupakan jalur amat penting terhadap kejadian kerusakan imunitas, terutama limfosit T-CD4 yang merupakan

target utama infeksi HIV. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar Hsp70, karena Hsp70 merupakan chaperonin yang dapat berinteraksi dengan berbagai protein regulator termasuk reseptor kortisol, melalui *chaperonins-steroid receptor interactions* (Smith, 1998).

Guna menghambat laju apoptosis, maka penyampaian diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap individu diperlukan langkah yang arif dan bijaksana.

Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini memerlukan pendekatan melalui paradigma psikoneuroimunologi untuk mengungkap efek diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita HIV/AIDS sehingga penatalaksanaan penderita menjadi optimal, kesakitan karena HIV dan kematian akibat AIDS dapat ditekan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas, dapat diajukan rumusan masalah penelitian sebagai berikut :

Apakah ada perubahan jumlah limfosit T, CD4, kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, jumlah *cell death* dalam darah kelompok terinfeksi HIV/AIDS dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV/AIDS pada fase post pernyataan diagnosis (fase akut dan kronis) ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan efek pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap mekanisme apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita HIV/AIDS.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan perubahan jumlah limfosit T, CD4, kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, dan jumlah *cell death* pada kelompok terinfeksi HIV/AIDS dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV/AIDS pada stres akut dan kronis.
2. Menentukan diskriminator (variabel pembeda) perubahan respons imun fase akut dan kronis pada penderita HIV/AIDS

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Menjelaskan efek pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS terhadap kejadian apoptosis limfosit T-CD4 yang melibatkan perubahan jumlah limfosit T, CD4, kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, dan jumlah *cell death* pada penderita HIV/AIDS.

1.4.2 Manfaat Terhadap Pelayanan Kesehatan

Petugas kesehatan harus bijaksana dan perlu memperhatikan tahapan dalam penyampaian diagnosis terinfeksi HIV/AIDS. Tahapan tersebut meliputi penjelasan tentang potensi terinfeksi HIV/AIDS bagi risiko tinggi, menekankan bahwa setiap penyakit ada obatnya, meyakinkan telah tersedia obat antiretroviral yang mampu mengurangi kepadatan HIV dalam darah, telah tersedia ruang perawatan untuk penderita HIV/AIDS, menumbuhkan rasa ketenangan jiwa yang mampu mempercepat proses penerimaan dini (*acceptance*) melalui program pendampingan (ODHA, sebaya, keluarga, masyarakat peduli AIDS) selain pengobatan dan perawatan. Petugas kesehatan yang bijaksana dapat membawa kearah kualitas hidup penderita tetap baik dan memperpanjang umur harapan hidup.

BAB 2
TINJAUAN PUSATAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Konsep Stres dan Stresor

Stres merupakan istilah yang rumit, sehingga untuk mengartikan istilah tersebut secara tepat diperlukan 3 pendekatan. Pertama, pendekatan *engineering*, stres digunakan untuk menanamkan kondisi lingkungan yang merusak, yang menyebabkan individu yang hidup di lingkungan tersebut sakit. Kedua, stres digunakan untuk menanamkan kondisi psikologis yang terancam sebagai akibat keterbatasan kemampuan untuk memenuhi tuntutan. Penggunaan istilah stres yang demikian digunakan oleh yang mengikuti pendekatan psikologis. Ketiga, menurut pendekatan medikofisiologis istilah stres digunakan untuk menamakan respons biologis terhadap sumber stres atau *stressor*. Dengan demikian maka istilah stres dapat digunakan untuk menamakan lingkungan yang merusak, kondisi psikologis yang terancam, dan respons biologis terhadap *stressor* (Putra, 2003). Stresor dapat berupa psikis, fisik, maupun lingkungan (Stryer, 1995). Menurut Hans Selye, penampilan respons biologis terhadap stresor ada 3, yang terkemas dalam *general adaptation syndrom* (GAS), yaitu respons dengan penampilan alarm, adaptasi atau *eustress*, dan kelelahan atau *distress*. Pada sel yang stres maka penampilan kelelahan dapat berupa nekrosis dan apoptosis (Black, 1994; Putra, 2003).

2.1.1 *Stress cell*

Istilah stres tidak hanya berlaku untuk individu tinggi yang kompleks, tetapi juga digunakan untuk menggambarkan respons sel terhadap stresor. Hal ini menunjukkan penggunaan istilah stres lebih didasari oleh persamaan konsep, dan terkesan tidak mempersoalkan mekanisme respon stres. Berbagai penelitian terhadap sel yang mengalami stres yang lazim disebut *stress cell*, telah menemukan *stress protein* yang berfungsi sebagai bahan yang mengisyaratkan stres (*stress signaling substances*) (Putra, 1999). Pada sel yang stres maka penampilan kelelahan dapat berupa nekrosis dan apoptosis (Putra, 2003).

2.1.2 *Produk Stress Cell*

Stres adalah suatu keadaan yang mengancam atau dirasakan (dipersepsikan) akan mengancam kesejahteraan (*well-being*) seseorang atau individu. Keadaan stres selalu ditandai dengan peningkatan sekresi suatu molekul sinyal: CRF (*corticotropin releasing factor*) suatu senyawa yang sekaligus dapat berfungsi sebagai neurotransmitter dan sebagai hormon (neurohormon) (Suryohudoyo, 1999).

Sel yang mengalami stres dapat menghasilkan protein tertentu yang disebut *stress protein*, salah satu diantaranya adalah *heat shock proteins70* (Hsp70). Induktor Hsp70 adalah lingkungan stres, ROS, serta banyaknya polipeptida yang tidak terlipat (Stryer, 1995). Pada awalnya protein ini dihasilkan sel sebagai upaya melindungi diri agar tidak mati. Pada kondisi lanjut protein tersebut dapat terlibat pada *molecular chaperones*, yang dapat menimbulkan perubahan pada kualitas protein fungsional. Respons sel terhadap stressor tergantung pada jenis, lama, dan berat jejas. Efek yang

ditimbulkan sangat tergantung pada jenis (labil, stabil, permanen), status dan kemampuan adaptasi sel. Sel normal mempunyai keseimbangan fungsi yang harus dipertahankan. Kemampuan sel tersebut dimungkinkan karena sel mempunyai inti, mitokondria, sitosol dan berbagai organela lain. Bila keseimbangan ini terganggu atau bahkan tidak dipertahankan, maka sel akan mati. Setiap sel normal mempunyai beratus-ratus mitokondria, setiap mitokondria mempunyai beberapa ikal DNA (mtDNA), dan sebanyak 37 gen dari setiap mtDNA terlibat dalam pembentukan energi. Mitokondria merupakan tempat pembentukan energi sel dan banyak menghasilkan radikal bebas endogen. Ironisnya mtDNA tidak mempunyai intron dan histon yang protektif sehingga rentan terhadap kerusakan akibat radikal bebas (Putra, 2003). Pada sel yang terpapar mikroorganisme pengelolaan (*coping mechanism*) potensial terganggu sehingga mudah mengalami penurunan kualitas keseimbangan (*eustress*) dan bahkan terjadi ketidakseimbangan yang berat atau kondisi *distress*.

2.1.3 Peran Hsp70

Hsp70 merupakan protein respons stres yang mempunyai peran:

1. Mengarahkan protein ke berbagai situs di dalam sel, seperti lisosom, mitokondria, dan inti. Pemilahan ini terjadi ketika protein mulai disintesis. Suatu ribosom tetap bebas dalam sitosol, sampai dibimbing ke retikulum endoplasma oleh suatu urutan sinyal dalam protein nasens yang sedang disintesis. Rantai polipeptida nasens yang dibentuk oleh ribosom yang terikat pada membran dipindahkan melintasi membran RE. Dalam lumen RE banyak protein mengalami glikosilasi dan diubah dengan berbagai cara. Selanjutnya protein tersebut dibawa ke

kompleks Golgi dan diubah lebih lanjut. Akhirnya protein tersebut dipilah dan diserahkan ke lisosom, vesikel sekresi, dan membran plasma. Sinyal pemandu protein melintasi membran retikulum endoplasma dengan urutan yang sama mengirim protein ke membran plasma untuk mensekresikannya.

2. Hsp70 membantu pelipatan dengan menghadang interaksi molekul yang tidak lazim. Dengan demikian Hsp70 mendapatkan molekul chaperone. Rantai polipeptida nasens dalam lumen RE tidak segera melipat. Polipeptida ini mengikat protein Hsp sehingga tetap tidak terlipat untuk beberapa menit, kemudian Hsp akan mengikat konformasi . Tanpa Hsp polipeptida nasens niscaya akan terjalin kusut. Hsp akan mempertahankan nasens yang baru muncul sampai sintesis lengkap terlaksana. Hsp akan melepaskan polipeptida nasens pada saat yang tepat. Kompleks Hsp-ADP memiliki afinitas yang tinggi hanya terhadap polipeptida yang belum terlipat dan tidak terhadap protein alamiah. Pengikatan penggalan polipeptida yang belum terlipat ke Hsp akan membebaskan ADP, sehingga ATP yang baru dapat masuk ke dalam situs katalitik Hsp. Kompleks ATP-Hsp membebaskan penggalan peptida. Hidrolisis berikutnya yang dialami ATP yang terikat ini memungkinkan Hsp untuk kembali mengikat penggalan lain yang belum terlipat. Waktu antara pengikatan dan pembebasan ditentukan oleh laju hidrolisis. Bersamaan dengan berlangsungnya pelipatan, makin sedikit rantai peptida nasens yang dapat diikat oleh Hsp. Pada hakekatnya Hsp berusaha menunda waktu yang tepat sehingga pelipatan yang tepat ini merupakan masalah termodinamika.

3. Hsp70 merupakan protein protektif endogen (Hung, 2002; Kirchhoff, 2002). Hsps mempunyai peranan penting dalam proses biologis seperti pelipatan protein, translokasi, dan kehidupan sel (Hung, 2002). Respon seluler terhadap infeksi virus dan induksi Hsps sangat tergantung dari tipe virus yang menginfeksi dan tipe sel (Hung, 2002). Meskipun berbagai virus disebutkan dapat menginduksi Hsps tetapi penelitian ke arah itu masih belum dilakukan. Infeksi oleh virus influenza melibatkan Hsp40 dan terlibat dalam pengendalian P68 protein kinase (PKR) yang memediasi respons interferon. Hsp40 membentuk kompleks dengan p58, dan menghambat PKR di dalam sel (Hung, 2002). Selama berlangsungnya infeksi virus influenza, kompleks inhibitor melepaskan ikatan P58 ke PKR, memblokir fosforilasi pada subunit α dari faktor 2 dari eukaryotic, dan merangsang sintesis protein di dalam sel yang terinfeksi virus (Hung, 2002).
4. Mengendalikan struktur sekunder, tersier, dan kuartener sebagian besar protein. Secara spontan setelah sintesis kemungkinan informasi setelah konformasi protein yang aktif secara biologik (native) sudah disandikan di dalam urutan asam aminonya. Dalam keadaan fisiologik, pelipatan protein menguntungkan struktur alamiah (native) protein. Keadaan dimana protein kehilangan konformasi alamiahnya disebut denaturasi protein. Denaturasi terjadi bila nilai pH terlalu ekstrim, pada temperatur yang tinggi atau sebagai akibat pemberian zat pelarut atau substansi lain yang dapat mendenaturasi. Konformasi protein dapat distabilkan dengan bantuan interaksi, seperti jembatan hidrogen, jembatan disulfida, interaksi elektrostatik, dan pembentukan kompleks dengan ion logam,

serta efek hidrofobik. Mengenai urutan asam amino suatu protein menentukan struktur tiga dimensi dan bagaimana suatu rantai polipeptida yang tidak terlipat memperoleh bentuk protein alami, hal itu perlu ada yang mengatur dan mengendalikan. Protein tidak dapat melipat dengan mencari konformasi secara acak. Pembentukan lipatan protein terjadi dengan stabilisasi berbagai zat antara yang terjadi secara progresif. Suatu rantai polipeptida yang terurai dengan cepat memadat yang mempunyai lebih banyak bersifat struktur sekunder, bukan struktur tersier yang tersusun padat seperti strukturnya yang alamiah. Pembentukan susunan yang padat disebabkan karena berbagai rantai samping hidrofobik perlu dilindungi. Pembentukan lipatan protein ternyata diarahkan oleh interaksi yang juga menstabilkan bentuk akhir protein yang terlipat. Berbagai unit lipatan menstabilkan struktur lain yang kurang stabil. Penglipatan protein dalam sel kebanyakan berlangsung dengan bantuan enzim. Protein disulfida isomerase mengkatalisis pengacakan ikatan disulfida untuk menemukan pasangan yang cocok. Peptidil prolil isomerase juga memainkan peran kunci dalam pembentukan lipatan dengan cara mempercepat isomerase cis-trans ikatan peptida prolil. Dalam suasana yang penuh sesak di dalam sel, berbagai protein nasens akan melipat secara abnormal bila tidak bertemu pendamping Hsp (molekul chaperone). Protein pemandu, banyak mendapat tenaga dari ATP, memperkecil kemungkinan agregasi protein dan menguraikan semua agregat yang telah terbentuk. Struktur tiga dimensi dari urutan asam amino, satu dimensi dapat dijadikan suatu arsitektur tiga dimensi yang merupakan penentu aktivitas biologik. Penglipatan protein dalam sel dibantu oleh katalis. *Protein disulfida*

isomerase (PDI) mempercepat pertukaran disulfida beberapa ribu lipat pada bentuk antara yang ditangkap secara kinetik. *Peptidil prolil isomerase* (PPIase) sangat mempercepat isomerisasi ikatan-ikatan peptida. Protein yang terentang dan yang terlipat sebagian dalam konsentrasi tinggi cenderung beragregasi. Hsp sebagai protein pendamping menghambat perlekatan yang tidak benar dan membongkar hubungan yang tidak benar. Aksi pembongkaran oleh Hsp digerakkan oleh hidrolisis ATP. Langkah pertama dalam ramalan struktur adalah terletak pada suatu protein baru serupa dengan protein lain yang struktur tiga demensinya sudah diketahui. Bila urutan dua protein lebih dari 40% identik, konformasi tulang punggungnya sangat mungkin hampir sama di bagian yang identik. Sepasang protein yang nyata berbeda urutannya secara esensial dapat mempunyai struktur tulang punggung yang pada dasarnya sama bila pola hidrofiliknya serupa. Motif fungsional dalam protein dapat juga diidentifikasi dengan meninjau sekilas urutan asam amino.

2.1.4 Anti Hsp70

Perubahan lingkungan sel yang dipicu stressor akan mempengaruhi sel dalam tubuh untuk meningkatkan produksi protein. Protein tersebut awalnya diinduksi oleh pengaruh temperatur yang tinggi, maka disebut *heat shock protein* atau Hsp. Berbagai kondisi stres seperti inflamasi, infeksi, iskemia, paparan toksin, atau transformasi malignansi dapat memicu ekspresi Hsp. *Heat shock protein* berperan sebagai molekuler chaperon terhadap molekul protein. Umumnya terdapat didalam sitoplasma mempunyai berbagai fungsi penting pada proses intraseluler. Hsp

mempunyai peranan penting untuk pemulihan sel dari pengaruh stres dan bersifat sitoprotektif (Nollen, 2002). Peranan penting tersebut termasuk interaksi antar protein, *folding*, penentuan konfirmasi dan struktur protein, mencegah terjadinya agregasi protein. Nama *heat shock protein* diberikan berdasarkan berat molekulnya, misalnya Hsp dengan berat molekul 70 kDa disebut Hsp70 (Fink, 1998; Smith, 1998). Hsp70 terekspresi pada kondisi normal dan kadarnya semakin meningkat pada keadaan stres (*stress-induced*). Hsp70 di sitosol berperan untuk meregulasi pembentukan kompleks aporeseptor, bersama Bag1 di nukleus mempunyai peran *downregulation* terhadap reseptor yang teraktifasi (Nollen, 2002). Hsp70 dapat ditemukan didalam sel yang sama meskipun berbeda tempat selnya, tetapi mempunyai peran yang beraneka ragam. Hsp70 terutama terdapat di sitosol, mitokondria, nukleus, retikulum endoplasmik, pada berbagai jaringan termasuk otot polos. Sejalan dengan peningkatan kadar Hsp70 akan diikuti dengan peningkatan kadar anti Hsp70 sebagai respons terhadap sekresi dan peningkatan kadar Hsp70. Translokasi Hsp70 dan anti Hsp70 pada berbagai komponen sel tersebut terutama dipicu stressor yang mengakibatkan timbulnya stres sel, stres nukleus (Fink, 1998; Smith, 1998). Ekspresi dan peningkatan kadar Hsp70 pada awalnya bersifat sitoprotektif, tetapi bila terjadi ekspresi yang berlebihan justru memicu terjadinya jejas sel. Ekspresi Hsp70 senantiasa akan diimbangi dengan ekspresi anti Hsp70 pada kondisi fisiologis guna mencegah terjadinya degradasi, denaturasi protein, serta kematian sel. Proses didalam sel yang melibatkan protein senantiasa diupayakan terjaga dalam kondisi homeostatis (Nollen, 2002).

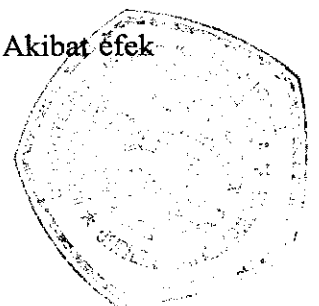
2.2 Neuropatogenesis Infeksi HIV : Sawar darah otak, infeksi pada sel endotel, astrosit, mikroglia

Pada umumnya sel otak tidak mudah menjadi sasaran infeksi sistemik karena 99% dilindungi oleh sawar darah otak. Bila infeksi sistemik dapat menimbulkan komplikasi ke sistim saraf pusat sering berakibat fatal (Becher, 2004). Otak dilindungi dari pengaruh mikroorganisme oleh sawar darah otak yang terdiri dari rangkaian endotel dengan *tight junctions* pada kapiler susunan saraf pusat (SSP), *pericyte*, lamina basalis, *astro-endofeet* dan kanal. Dalam kondisi normal sawar darah otak bersifat resisten terhadap rangsangan listrik (1200 ohm cm^2), *multiple drug resistance (P-glycoprotein)*, sebagai sistem transporter. Sawar darah otak mengalami disfungsi oleh berbagai pengaruh antara lain stres, infeksi dan lain-lain (Burt, 1993; Waxman SG, 2003). Peran sawar darah otak tersebut juga ditunjang oleh sel imunokompeten dan antibodi.

Keberadaan HIV di endotel kapiler otak sebagai awal mula kelainan di otak setelah berhasil melampaui sawar darah otak yang mengalami gangguan fungsi akibat pengaruh infeksi. HIV dari sirkulasi awalnya menginfeksi lapisan endotel serebrovaskuler (induksi dan sekresi sitokin IL1 β , IL6, TNF α). Pengaruh sitokin tersebut menyebabkan kebocoran akibat peningkatan permeabilitas. HIV juga menimbulkan infeksi perivaskuler. Akibat kerusakan endotel protein serum menjadi bisa melewati sawar darah otak, monosit yang terinfeksi HIV juga memasuki jaringan otak. HIV yang berhasil melewati lapisan permukaan basolateral menuju astrosit kemudian menimbulkan kelainan patologis di otak, antara lain mielopati vacoular.

Astrosit mempunyai peran penting sebagai penyangga jaringan otak terutama dalam memenuhi kebutuhan nutrisi. HIV bersifat sitopatik dan sitolitik, bila menimbulkan infeksi pada astrosit mengakibatkan aktivasi astrosit untuk memproduksi sitokin dan atau astrosit mengalami kematian. Hal ini berakibat terjadinya kematian neuron. Susunan saraf pusat sering terlibat pada infeksi HIV, sekitar 40% penderita AIDS atau infeksi HIV simtomatik berkembang ke arah manifestasi neurologis. Separuh dari kelainan neurologis penderita AIDS disebabkan pengaruh infeksi langsung (gp41 HIV) maupun tidak langsung (produk HIV), sisanya akibat pengaruh infeksi sekunder (penurunan respons imun) (Becher, 2004). Dampak patologis yang ditimbulkan sebagai akibat langsung dari protein virus yaitu Gp120, Gp41, Tat, Nef (Epstein, 2000). Pengaruh langsung HIV mengakibatkan ensefalopati HIV, meningitis HIV dan lain-lain. Sedangkan dampak tidak langsung akibat produksi dan sekresi sitokin yaitu IL1 β , IL-2, TNF- α . Pengaruh tidak langsung yang dimungkinkan akibat sitokin dan penurunan sistem imun terjadi infeksi sekunder di otak akibat toksoplasma, mikobakterium tuberkulosa, jamur (Boven, 1999; Epstein, 2000).

HIV dapat menginfeksi sel target yang dapat mengekspresikan reseptor CD4. sel otak yang mampu mengekspresikan CD4 adalah astrosit, mikroglia. Astrosit akan memproduksi TNF- α , limfotoksin, IL-6, IFN α dan IL-1 β , serta *transforming growth factor* β . Mikroglia (makrofag) memproduksi IL-2, TNF- α , TGF- β , IL-6, *quinolonic acid*. Sel T memproduksi limfotoksin (TNF- β), neuroleukin, *nitric oxide* (NO) (Boven, 1999; Meyerhoff, 2001). Sitokin yang berada di otak akan mempengaruhi perilaku dan demam (Boven, 1999; Lasseran, 1999; Ransohoff, 2003). Akibat efek



langsung dan tidak langsung tersebut menyebabkan gangguan komunikasi antar sel karena terjadi blokade neurotransmitter sehingga terjadi neurotoksik dan kematian sel-sel saraf yang berakhir dengan manifestasi klinis dari sindroma demensia, meningitis, abses serebri dan leukoensefalopati multifokal yang progresif (Lesserman, 1999; Ransohoff, 2003).

2.3 Respons Sel Saraf terhadap HIV

Masuknya HIV ke dalam tubuh merupakan stresor biologis yang berdampak luas (Mayer, 2003). HIV dapat mempengaruhi seluruh organ tubuh termasuk otak, sistem imun, organ-organ visera (Mayer, 2003). Stresor HIV akan di respons oleh sistem saraf pusat yang melibatkan otak, hipotalamus, batang otak, hipofisis, serta saraf perifer (Black, 1994). Dampak dari stresor biologis HIV tersebut akan menstimulir sel-sel otak untuk memproduksi dan sekresi berbagai molekul sinyal seperti neurotransmitter, neuropeptida, neurohormon, maupun neuroendokrin molekul efektor. Molekuler sinyal tersebut dapat memodulasi sistem imun (tabel 1).

Tabel 1. Neurotransmitter, neuropeptida, neurohormon, efektor molekul neuroendokrin, dan modulasi sistem imun (Black, 1994).

| Molekul Sinyal |
|---|
| Neurotransmitter - Norepinefrin - 5-Hidroksitriptamin (serotonin) - Asetilkolin - Dopamin |
| Neuropeptida - Arginin vasopresin - Vasoaktif polipeptida intestinal - Kolesistokinin - Oksitosin - Melatonin |
| Neurohormon - CRF - Kortikotropin - Kortikosteroid - Hormon pertumbuhan - Prolaktin - Somatostatin |
| Neuroendokrin molekul efektor - Epinefrin - Tiroksin - Tri Iodotironin |

Stresor biologis HIV tersebut akan meningkatkan aktivitas aksis hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) melalui *corticotropin releasing factors* (CRF). Dampaknya akan dialami berbagai sel tubuh termasuk astrosit, mikroglia. Astrosit, mikroglia menjadi aktif memproduksi, mensekresi sitokin proinflamatori (IL-1 β , IL-6, TNF- α), produksi *reactive oxygen species* (ROS). Sitokin proinflamatori tersebut, bersama serotonin, norepinefrin, dan asetilkolin, mempengaruhi *paraventricular nucleus* (PVN) di hipotalamus, kemudian memproduksi molekul sinyal berupa *corticotropin-releasing factors* (CRF). CRF bertindak sebagai koordinator respons stres. Meskipun berbagai neuron juga memproduksi CRF tetapi kadar tertinggi di

dapat di PVN (Black, 1994). Dalam waktu singkat yaitu hitungan menit sejak munculnya stres akut akan meningkatkan mRNA CRF, disusul meningkatnya kadar CRF pada nukleus paraventriculer. CRF selanjutnya bergerak menelusuri akson ke bagian medial hipotalamus dan akhirnya dilepaskan di penghujung pembuluh darah kapiler dalam pleksus venous hipofisialportal yang merupakan muara kelenjar hipofisis anterior. CRF selanjutnya mengaktifkan reseptor basofil pada hipofisis anterior, menginduksi polipeptid *proopiomelanocortin* (POMC) yang pasca translasi memproduksi ACTH, α, β, γ *melanosit stimulating hormone* (MSH), dan β endorfin. ACTH menstimuler spongiosa pada zona fasikulata korteks adrenal untuk memproduksi kortisol sebagai hormon stres (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Viviani, 2001). Hormon *ACTH* mengikuti aliran darah sistemik, selanjutnya mempengaruhi spongiosit (sel zone fasikulata korteks) adrenal sehingga memicu peningkatan kadar kortisol (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Nair, 2000).

Respons stres melalui sensitisasi CRF ternyata menstimuler dua komponen berbeda, yaitu hormonal dan non-hormonal (Mayer, 2003). Respons stres dapat menyebabkan aktifnya reseptor CRF1 (CRF1R) pada neuron non-hipotalamus dan menghasilkan perubahan regulasi sebagai *feedback* terhadap aksis HPA dengan meningkatkan aktivitas ekspresi reseptor mineralokortikoid di hipokampus (Mayer, 2003). CRF1, juga lazim disebut CRH mempunyai kaitan erat dengan peptida, berbagai mediator dengan respons stres yang terintegrasi baik adaptif maupun maladaptif. Sejak diketahui 20 tahun silam neuropeptida CRF dan reseptornya

menunjukkan ke terkaitan stres dengan sistem saraf pusat dan perifer dengan berbagai molekul sinyal.

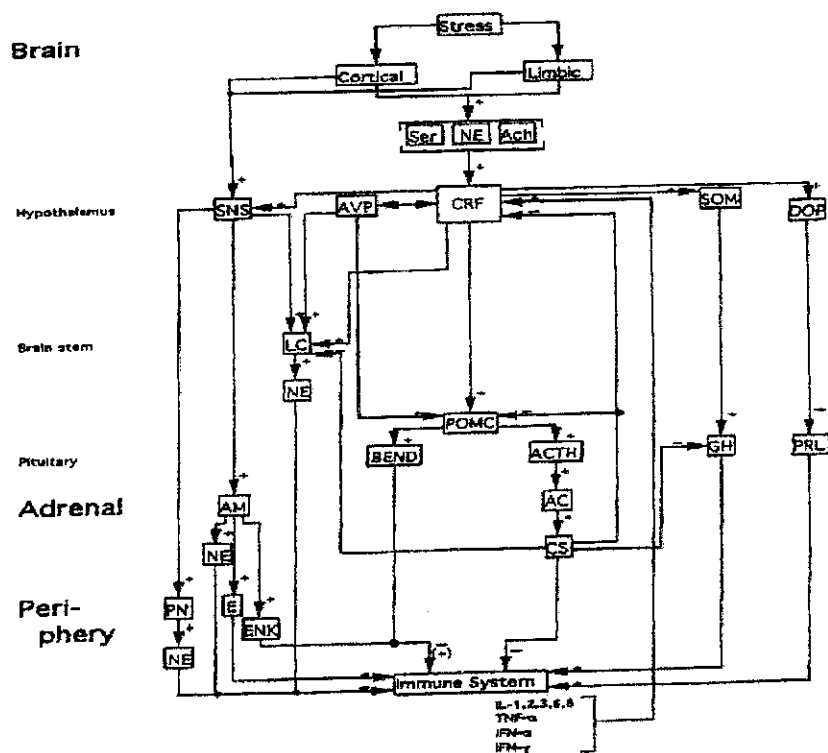
Pengaruh CRF juga dikendalikan oleh tiga *agonist endogen* CRF (CRF, urocortin (Ucn), Ucn II dan Ucn III) yang berinteraksi dengan ke tiga reseptor protein G (CRF1R, CRF2R, dan CRF3R) di berbagai tempat di otak (Mayer, 2003). CRF1Rs penting didalam mempengaruhi perilaku, neuroendokrin dan memodulasi respons nyeri terhadap stres. CRF2Rs berperan untuk *counter* regulasi terhadap aktivitas CRF/CRF1R melalui pengendalian nafsu makan dan fungsi kardiovaskuler. CRF2R memediasi neuroendokrin atau aksis HPA dan *behavioral* (respons kecemasan) terhadap stres (Mayer, 2003).

Peningkatan kadar CRF, kortisol, katekolamin pada keadaan stres juga diikuti oleh peningkatan argininvasopresin (AVP) di hipotalamus yang bekerja sinergis dengan CRF untuk menginduksi ekspresi polipeptida atau gen POMC dan ekspresi norepinefirin dari *locus ceruleus*. CRF juga menginduksi sekresi somatostatin dan dopamin oleh hipotalamus.

Pengaruh terhadap respons imun, kortisol yang meningkat kadarnya selama stres berlangsung mempunyai efek immunosupresif pada sistem limforetikuler. Kortisol menghambat fungsi limfosit, makrofag, dan leukosit serta efek pada tempat infeksi. Kortisol mempunyai kemampuan menekan produksi sitokin dan mediator inflamasi.

Dapat difahami bahwa peran otak melalui produksi dan sekresi mediator, ROS, dan sitokin dalam merespon stres begitu hebat dan salah satu responsnya berakibat peningkatan kadar kortisol (Black, 1994). Diantara ketiga sitokin (IL-1, IL-

6, $\text{TNF}\alpha$), peran IL-1 lebih dominan dalam menginduksi terjadi peningkatan kadar kortisol dalam darah daripada IL-6 dan $\text{TNF}\alpha$ (Besedovsky, 2001).



Gambar -1. Respons tubuh terhadap stres (Black, 1994)

2.4 ACTH dan Kortisol

Kortisol merupakan glukokortikoid yaitu steroid 21-karbon yang dominan pada manusia, hormon ini dibuat di dalam zona fasikulata korteks adrenal. Dalam kondisi normal, hanya sekitar 10% kortisol dalam plasma bebas dari ikatan transkortin dan albumin. Dari semua yang di produksi korteks adrenal zona fasikulata, hanya kortisol yang sekresinya dikendalikan oleh ACTH. Bila kortisol bebas (tidak terikat protein) kadarnya meningkat dalam darah, maka sekresi ACTH akan dihambat melalui lingkaran umpan-balik negatif. Demikian halnya bila kadar

kortisol subnormal, maka mekanisme umpan-balik negatif menurun. Sebaliknya kadar ACTH naik, korteks adrenal mensekresi kortisol hingga kadar dalam darah normal. Sekresi kortisol, walaupun ada hanya sedikit yang disimpan di dalam sel adrenal mengingat hormon ini segera dilepas ke dalam plasma begitu selesai dibuat. Pelepasan kortisol terjadi secara berkala diatur oleh irama diurnal pelepasan ACTH. Sebagai konsekuensinya kadar kortisol berfluktuasi. Kadar kortisol akan mencapai nilai tertinggi pada pagi hari segera setelah bangun tidur dan nilai terendah akhir sore hari serta awal malam hari. Kadar normal kortisol dalam serum atau plasma adalah 50- 230 ng/ml (138-635 nmol/l) pada jam 8.00-10.00, sedangkan pada sore hari jam 16.00 adalah 30-150 ng/ml (82.8-414 nmol/l), dengan faktor konversi 1 ng/ml = 2.76 nmol/l. Pengukuran kortisol sebaiknya dilakukan pada jam 8.00 pagi, dapat dilakukan dengan ELISA dari bahan serum maupun plasma. Pengendalian kadar hormon ini dilakukan melalui lingkaran umpan-balik negatif klasik. Sekresi kortisol tergantung pada ACTH oleh basofil di hipofisis anterior yang dikendalikan oleh *corticotropin releasing hormone* (CRH) hipotalamus. Mekanisme umpan-balik negatif dilakukan oleh hipotalamus maupun hipofisis.

Transport kortisol, kortisol beredar di dalam plasma dalam 2 bentuk yaitu bentuk terikat protein dan bentuk bebas. Protein pengikat utama di dalam plasma adalah α -globulin yang dinamakan transkortin atau globulin pengikat-kortikosteroid (CBG; *corticosteroid-binding globulin*) yang diproduksi di hati. CBG mengikat sebagian besar hormon tersebut kalau kadar kortisol plasma berada dalam kisaran normal.

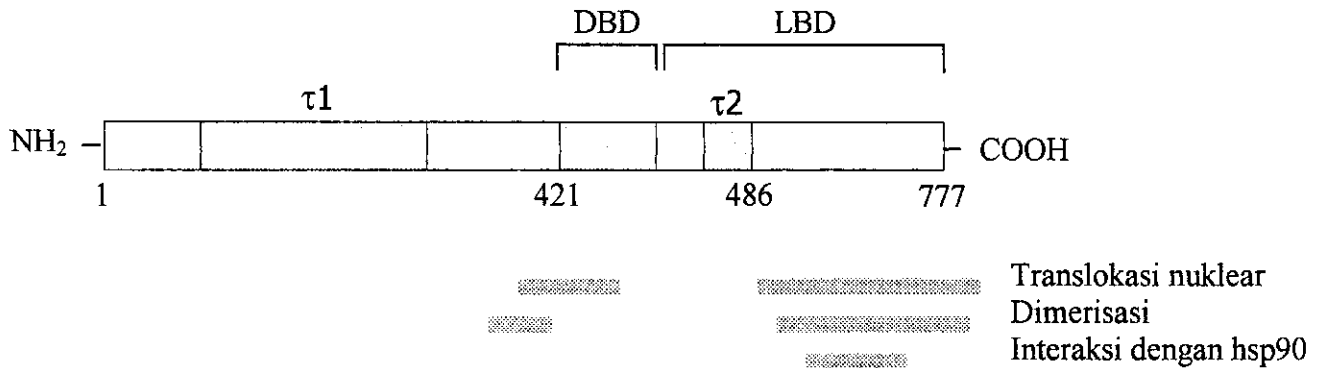
Efek biologis kortisol antara lain sebagai promotor glukogenesis, deposisi glikogen liver, meningkatkan kadar glukose darah, efek metabolisme lemak, dan potensi anti inflamasi. Efek terhadap mekanisme pertahanan tubuh adalah supresi respons imun. Pertama, menyebabkan penghancuran (lisis) limfosit yang spesifik menurut tipe sel. Kedua, supresi respons inflamasi dengan (1) menurunkan jumlah leukosit yang beredar di dalam darah dan migrasi leukosit jaringan (2) menghambat proliferasi fibroblast (3) menginduksi lipokortin lewat inhibisi fosfolipase A₂, akan menumpulkan produksi molekul-molekul anti inflamasi yang poten, yaitu prostaglandin dan leukotrien (Granner, 2003).

Kaitan dengan stres, kortisol merupakan komponen esensial dalam proses adaptasi terhadap keadaan stres berat. Mekanisme kerja kortisol dimulai lewat penggabungan dengan reseptor intrasel yang spesifik. Kompleks ini akan berikatan ke regio spesifik DNA untuk mengatur ekspresi gen.

Kortisol disintesis dari kolesterol yang terutama berasal dari plasma, tetapi sebagian kecil hormon ini disintesis secara insitu dari asetil-KoA lewat mevalonat dan skualen. Dalam kelenjar adrenal di esterifikasi dan disimpan di dalam tetesan lipid sitoplasma. Stimulasi adrenal oleh ACTH (atau cAMP), enzim esterase akan diaktifkan. Kolesterol bebas yang terbentuk di angkut ke dalam mitokondria tempat enzim pemutus rantai-samping sitokrom P-450 (P-450_{scc}) mengubah kolesterol menjadi pregnenolon. Pemutusan rantai samping tersebut melibatkan reaksi hidrosilasi berurutan. Pertama pada C₂₂, selanjutnya pada C₂₀, diikuti oleh pemutusan rantai-samping (pengeluaran fragmen 6-karbon isokaproaldehid) hingga memberikan steroid 21- karbon. Suatu protein regulator akut steroidogenik yang

bergantung- ACTH (STAR) sangat esensial bagi pengangkutan kolesterol ke P450_{scc} di membran interna mitokondria (Granner, 2003).

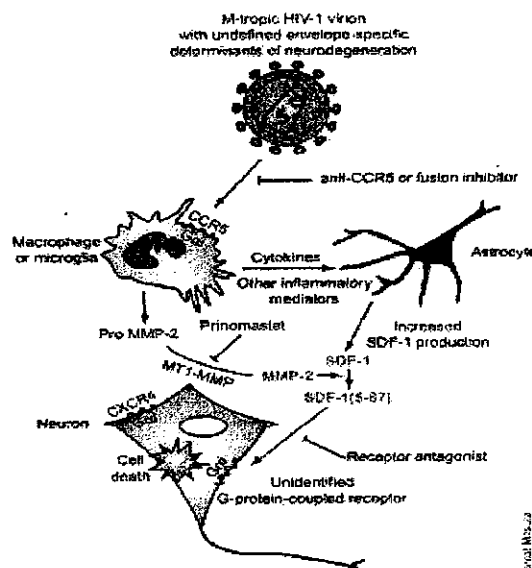
Reseptor kortisol secara skematik dengan 777 asam amino sebagai berikut.



2.5 Pengaruh Infeksi HIV terhadap Neurodegenerasi

Lebih 10% individu terinfeksi HIV berkembang ke arah demensia, ditandai disfungsi motorik, dan perubahan perilaku (Ransohoff, 2003). Sehubungan dengan demensia neuron mengalami destruksi secara tidak langsung, karena HIV memasuki berbagai sel otak melalui makrofag atau mikroglia (Ransohoff, 2003). Mikroglia yang terinfeksi HIV terstimulasi sehingga aktif memproduksi sitokin proinflamasi, kemokin, *matrix metalloproteases* (MMPs), *reactive oxygen species* (ROS), dan *nitrogen species* (Ransohoff, 2003). Berbagai neurotoksik serta radikal bebas tersebut mempunyai peran begitu penting terhadap kejadian demensia atau *HIV-associated dementia* (HAD). MMP-2 menginduksi terbentuknya *stromal derived factor* (SDF)1 atau CXCL12. CXCR4 merupakan reseptor terhadap CXCL12 yang berperan dalam berbagai jaringan termasuk sistem saraf pusat (SSP). CDF-1 sangat toksik terhadap

neuron. Jadi CXCR4 dan SDF-1 mempunyai peran kunci seluler pada HAD. Pada limfosit-T, CXCR4 merupakan obligat ko-reseptor dari CD4 sehingga memungkinkan masuknya HIV virion pada sel target. Neuron pada orang dewasa mampu mengekspresi CXCR4 karena modulasi neurotransmisi SDF-1 yang kemudian mengirimkan sinyal apoptotik (Ransohoff, 2003), tetapi karena tidak mampu mengekspresi CD4 maka neuron tidak rentan terhadap infeksi HIV. Lain halnya dengan astrosit, mikroglia yang mampu mengekspresi CD4 dan mempunyai ko-reseptor CXCR4 pada astrosit dan CCR5 pada mikroglia sehingga merupakan target HIV pada otak. CCR5 dan CXCR4 pada permukaan membran selubung makrofag atau mikroglia menginduksi terbentuknya proMMP dan bila terinfeksi HIV menjadi aktif memproduksi sitokin proinflamatori yang neurotoksik (Ransohoff, 2003). Pada pemeriksaan cairan serebrospinal akan didapatkan kenaikan kadar MMP-2, ini menunjukkan potensi terjadinya kematian sel.



Gambar-2. Patogenesis kematian neuron pada *HIV associated demenntia* (HAD) (sumber: Ransohoff, 2003).

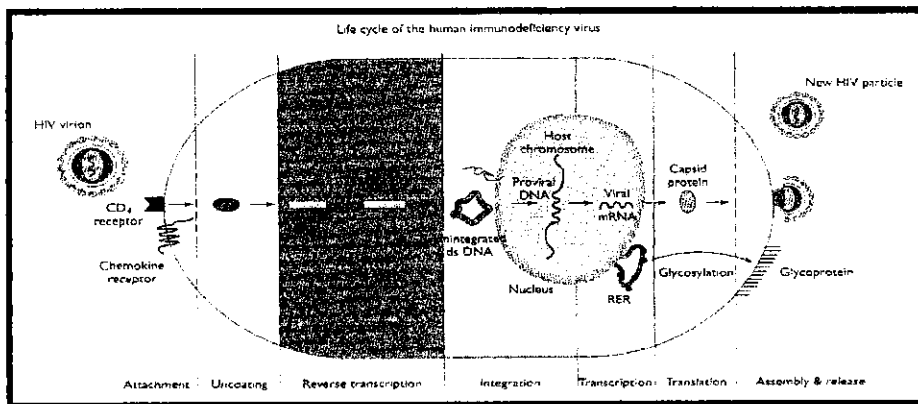
Neurodegenerasi pada infeksi HIV terkait dengan aktivitas neuroglia. Potensi kerusakan sistem saraf pada infeksi HIV terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung HIV berinteraksi dengan sel yang mampu mengekspresikan reseptor CD4 dan ko reseptor CCR5, CXCR4. Sel otak yang mampu mengekspresikan CD4 adalah astrosit, makrofag atau mikroglia, oligodendroglia (Ransohoff, 2003). Kerusakan neuron terjadi secara tidak langsung, melalui pengaruh astrosit dan atau mikroglia (Ransohoff, 2003).

2.6 Mekanisme Infeksi HIV ke dalam Limfosit T-CD4

Transmisi HIV masuk ke dalam tubuh manusia melalui 3 cara, yaitu : (1) secara vertikal dari ibu ke anak, (2) secara transeksual (homoseksual maupun heteroseksual), (3) secara horizontal yaitu kontak antar darah (pemakaian jarum suntik bersama-sama secara bergantian, tatto, tindik, transfusi darah, transplantasi organ, tindakan hemodialisis, perawatan gigi, khitanan masal, dll).

Berbagai sel dapat menjadi target dari HIV, tetapi HIV virion cenderung menyerang limfosit T karena terdapat reseptor CD4 pada permukaannya. Target HIV pada limfosit T-CD4 ini kemudian menarik perhatian karena mekanisme penurunan jumlah limfosit T belum sepenuhnya diketahui, dan jumlah limfosit T tersebut penting untuk menentukan progresivitas penyakit (McCloskey, 1998; Drew, 2001; Zavasky, 2001). HIV cenderung memilih target limfosit T karena pada permukaan limfosit T terdapat reseptor CD4 yang merupakan pasangan ideal bagi gp120 permukaan (*surface glycoprotein 120*) pada permukaan luar HIV (*enveloped*) (Schols, 1996; McCloskey, 1998; Badley, 2000). Meskipun demikian kompleks gp120 dan reseptor CD4 tersebut

masih belum memungkinkan HIV masuk ke dalam limfosit T melalui proses internalisasi. Internalisasi ke dalam limfosit T di tubuh host perlu dibantu oleh peran *coreseptor CCR5 dan CXCR4* yang juga berada di permukaan limfosit T (Zavasky, 2001; Oppenheim, 2003). Dengan peran gp41 transmembran (*transmembrane glycoprotein 41*), maka permukaan luar dari HIV terjadi fusi dengan membran plasma limfosit T-CD4. Sedangkan inti (*core*) HIV selanjutnya masuk ke dalam limfosit T sambil membawa enzim *reverse transcriptase* (Pavlakis, 1997; Lawrence, 2001; Gill, 2004). Begitu memasuki sitoplasma limfosit T-CD4 yang terinfeksi, bagian inti HIV yaitu RNA (*single-stranded RNA*) akan berusaha menyesuaikan dengan konfigurasi *double-stranded DNA* dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* yang telah dipersiapkan tersebut. Selanjutnya terjadi penyatuan virion dengan DNA polimerase, terbentuklah cDNA atau proviral DNA. Begitu terbentuk proviral DNA, proses berikutnya adalah upaya masuk ke dalam inti limfosit T dengan bantuan enzim integrase. Terjadilah rangkaian proses integrasi, transkripsi yang dilanjutkan dengan translasi protein virus, serta replikasi HIV virion. Jumlah HIV virion yang berlipat ganda kemudian meninggalkan inti. Setelah mengalami modifikasi, saling melengkapi, kemudian berusaha keluar menembus membran limfosit (*budding*). Virion yang baru terbentuk siap menginfeksi limfosit T-CD4 berikutnya. Demikian proses ini terus berlangsung sehingga jumlah limfosit T-CD4 cenderung terus menurun (Drew, 2001; Brooke, 2002; Gill, 2004).



Gambar-3. Siklus hidup HIV (Sumber: Mandel, 2000)

2.7 Berbagai Peristiwa yang Terjadi pada Limfosit T-CD4 Terinfeksi HIV

Stresor biologis dari HIV mencetuskan timbulnya stres psikologis dan sebaliknya. HIV dapat mempengaruhi ekspresi astrosit di amigdala – hipotalamus serta mikroglia. Akibatnya astrosit dan mikroglia tersebut menjadi aktif dan mensekresi berbagai interleukin. Astrosit memproduksi IL-1 β , IL-6, TNF α serta IFN- α . Mikroglia memproduksi IL-2, IL-6, TNF α serta IFN β . Berbagai sitokin dan interferon tersebut menstimulir *para ventricularis nucleus (PVN)* di hipotalamus sehingga memproduksi molekul sinyal yaitu *corticotropin- releasing factors (CRF)* dan dapat menyebabkan neuroinflamasi atau neuro-AIDS. *Corticotropin- releasing factors (CRF)* tersebut mempunyai peranan ganda yaitu sebagai neurotransmitter dan neuroendokrin yang dapat mempengaruhi reseptor basofil di hipofisis anterior.

Stresor HIV tentunya dapat berpengaruh terhadap limfosit T-CD4. Dampaknya seperti halnya stresor lain yang menyebabkan reseptor CD43 (*sialophorin*) pada permukaan limfosit terekspresi sehingga menjadi aktivator terhadap limfosit T-CD4 sendiri maupun pada HIV (Barat, 2002; Brown, 2003).

Selain itu rCD43 juga berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi reseptor CD69 dan CD40L (Schols, 1996; Barat, 2002).

Peningkatan aktivitas Limfosit T-CD4 yang terinfeksi HIV tersebut menginduksi Th-1 untuk mensekresi IL-1 β , IL-2, TNF- α , dan IFN- γ sehingga kadarnya meningkat dalam darah serta berpengaruh terhadap peningkatan kadar ROS (Ledru, 1998; Barat, 2002; Oppenheim, 2003). IL-1 β , IL-2, TNF- α , dan IFN- γ , serta CD69 dan CD40L yang terekspresi tersebut secara simultan meningkatkan aktivitas berbagai protein yang terlibat dalam proses sinyaling termasuk protein kinase C (PKC), dan mobilisasi kalsium transmembran mitokondria limfosit T-CD4. Meningkatnya aktifitas PKC dan mobilisasi kalsium dalam sirkulasi tersebut berpengaruh terhadap mitokondria sehingga meningkatkan produksi ATP dan memproduksi *reactive oxygen species (ROS)* (Atanackovic, 2002). Peningkatan ROS juga terjadi sebagai efek toksik langsung dari HIV virion melalui gp41, maupun secara tidak langsung oleh efek bifasik dari *nitric oxide (NO)* (Ramachandran, 2002).

HIV yang telah berada di dalam limfosit T-CD4 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 (Drew, 2001; Barat, 2002). Jumlah HIV dalam limfosit T-CD4 yang terus meningkat tersebut akan berusaha menembus membran limfosit untuk menyerang limfosit T-CD4 berikutnya. Demikian proses ini akan berjalan terus, bila tanpa diimbangi upaya

intervensi maka dari waktu ke waktu jumlah limfosit T-CD4 akan semakin turun dan membuka peluang terjadi infeksi oportunistik (Barat, 2002; Gill, 2004).

2.8 Pengaruh HIV Terhadap Perubahan Kadar ROS dan *Heat Shock Protein*

Keterkaitan HIV dengan produksi ROS, dapat melalui : (1) peran aktivator molekuler sinyal rCD43 (*Sialophorin*) yang terekspresi karena pengaruh hormon kortisol dari sel-sel zona fasikulata korteks adrenal serta hormon katekolamin dari sel-sel medula adrenal (Barat, 2002), (2) efek sitotoksik maupun neurotoksik yang merusak sel glia langsung dari gp41 HIV virion (Viviani, 2001; Brooke, 2002), (3) efek bifasik dari *nitric oxide (NO)* endotel (Mossalayi, 1999; Ramachandran, 2002).

Tingkat perubahan kadar ROS yang terjadi tersebut akan sangat tergantung dari kemampuan mitokondria dalam mempertahankan stabilitas homeostasis internal melalui produksi ROS dari pengaruh limfosit T-CD4 yang terinfeksi HIV. Bila produksi ROS terus meningkat dan atau bila disertai penurunan kadar antioksidan, maka kadar ROS akan terus meningkat tanpa terbandung yang berdampak luas pada berbagi sel.

Berbagai protein yang terlibat dalam proses sinyaling termasuk *chaperonins* akan terpengaruh oleh peningkatan kadar ROS tersebut. Perilaku *chaperonins* yang mestinya berfungsi sebagai sitoprotektif, maka berikutnya akan ditentukan oleh kemampuan mempertahankan homeostasis melalui *general adaptations syndrome (GAS)*, yaitu *alarm*, *adaptation*, maupun *exhaustion stage*. Bila gagal melakukan adaptasi maka *chaperonins* akan masuk ke *exhausted stage* atau mengalami *distress*.

Eksresi *chaperonins* pada kadar tertentu mempunyai fungsi proteksi terhadap sel terutama dalam mengatur irama dan waktu yang tepat untuk *folding* protein serta mempertahankan struktur tiga dimensi protein. Bila aktivitas *chaperonins* terus berlebihan, maka pada saatnya akan mengalami *exhausted* atau *distress* sehingga mekanisme kerjanya terganggu. Terjadi *missfolding* dan terjadi agregasi protein yang irreversibel. (Kobayashi, 2000; Smith, 1998). Aktivitas berlebihan dari *chaperonins*, seperti terjadinya ekspresi berlebihan Hsp70 akan berakibat *exhausted*. Fungsi proteksi mitokondria menjadi terganggu, reparasi mitokondria juga terganggu. Struktur dan fungsi mitokondria tidak bisa dipertahankan normal, akhirnya terjadi fragmentasi mtDNA atau terjadi apoptosis (Smith, 1998).

Perilaku patologis *chaperonins* tersebut akan mengakibatkan komunikasi antar sel yang ikut dalam proses sinyal terganggu sehingga terjadi : (1) peningkatan aktivitas kinase *JNK* (*c-Jun NH2-terminal kinase*), (2) meningkatkan *ERK* (*Extracellular regulated kinase*), meningkatkan aktivitas kinase Akt (*AGE-1PI3 Inositol 3-Phosphate (=IP3) kinase transducer*), dan p38 (Miyata, 2001; Suhara, 2001). Ketiga tipe *mitogen-activated protein* (MAP) kinase tersebut akan saling berinteraksi satu sama lain. Bila aktivitas kinase *JNK* dan *ERK* yang dominan maka akan mendorong terjadinya apoptosis limfosit T-CD4, sebaliknya bila aktivitas kinase Akt yang dominan akan menghambat apoptosis limfosit T-CD4.

Meskipun dominasi aktivitas kinase *JNK* dan *ERK* berpotensi menyebabkan apoptosis limfosit T-CD4, tetapi jalur yang ditempuh ternyata berbeda. Aktivasi kinase *JNK* akan mempengaruhi reseptor Fas dan bersama-sama Fas ligand akan meningkatkan aktifitas caspase-8 (Katsikis, 1997; Mosser, 2000; Miura, 2001;

Oppenheim, 2003). Peningkatan aktifitas kinase *JNK* juga mengaktifkan reseptor p55, dan mengaktifkan caspase-8. Sedangkan peningkatan aktifitas *ERK* oleh pengaruh *ROS*, akan memicu sekresi sitokrom C dari mitokondria limfosit T-CD4. Sitokrom C tersebut akan mengaktifasi caspase-9 (Mosser, 2000; Sparagna, 2000; Gabai, 2002). Caspase-9 bersama-sama dengan caspase-8, diduga berinteraksi dengan *Chaperonins* khususnya Hsp60 akan menginduksi caspase-3 guna menjalankan fungsinya sebagai eksekutor berakibat terjadi hidrolisis ATP, fragmentasi DNA mitokondria, dan berakhir dengan kematian limfosit T-CD4 melalui apoptosis (Katsikis, 1997; Xanthoudakis, 1999; Mosser, 2000).

Peningkatan kadar kortisol berpengaruh terhadap proses *folding* protein yaitu melalui *chaperonins* yang berinteraksi terhadap berbagai sinyal protein. Hsp90 merupakan salah satu regulator protein termasuk regulator reseptor glukokortikoid, sehingga terjadi interaksi *chaperonine-receptor glukokortikoid* (Smith, 1998). Beberapa molekul sinyal mempunyai peranan di dalam rangkaian *folding* protein antara lain : Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40. Dari beberapa Hsp tersebut yang mempunyai peranan penting dalam rangkaian *folding* adalah Hsp90, Hsp70, Hsp60 dan Hsp40. Retikulum endoplasmik (RE) memiliki kompleks *chaperonins*. Ada dua RE *chaperonins* yaitu Bip/Grp78 dan Grp94/gp96, yang berturut-turut merupakan anggota dari famili Hsp70 dan Hsp90 (Benjamin, 1998; Ranford, 2000; Nollen, 2002).

Peranan *chaperonins* terhadap apoptosis limfosit T-CD4 belum sepenuhnya diketahui. Awalnya over ekspresi *Chaperonins* bertujuan untuk mencegah terbentuknya agregat protein dan menghindari terjadi apoptosis limfosit T-CD4 pada

penderita terinfeksi HIV (Kobayashi, 2000), tetapi aktivitas yang berlebihan akibat ROS seperti terjadi akibat *stressor* HIV, maka peran sitoprotektif *chaperonins* diduga terjadi penurunan sehingga terjadi apoptosis limfosit T-CD4 patologis yang dipercepat.

Beberapa jalur dapat ditempuh dalam rangka mempertahankan kehidupan sel, kehidupan protein, termasuk kelestarian *heat shock protein* adalah melalui jalur sinyal. Dengan menginduksi *chaperonins*, misalnya pada Hsp72 dan Hsp27, dengan jalan aktivasi sinyal protein kinase ekstraseluler. Adanya aktivasi *stress* kinase, *c-Jun NH2-terminal kinase* maka hal ini akan menentukan terjadi atau tidaknya kematian sel melalui apoptosis. Akhir-akhir ini diketahui bahwa aktivasi kinase oleh *heat shock* dapat mengendalikan sintesis dan fungsi dari *chaperonins*, selanjutnya akan memodulasi atau menentukan hidup atau matinya sel melalui apoptosis (Vladimir, 2002).

Human immunodeficiency virus (HIV) merupakan stresor biologis yang berpengaruh terhadap terjadinya stres dan berkembang menjadi distress bagi penderita. Distres tersebut juga akan dialami oleh protein termasuk *heat shock protein* (Hsp). Pada penderita sepsis, pengaruh ROS terhadap apoptosis sel terjadi melalui *receptor mediated pathway* maupun *mitochondrial mediated pathway* (Hotkiss, 2001). ROS yang banyak diproduksi selama infeksi HIV tentu akan memperberat stres *chaperonins*, memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstraseluler yaitu *receptor mediated pathway* dan jalur intraseluler yaitu *mitochondrial mediated pathway*.

2.9 Aktivasi dan Modulasi Caspases

Peningkatan ROS maupun Ca^{+2} intraseluler mengakibatkan terbukanya MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), potensial membran mitokondria menurun, pelepasan faktor pro-apoptotik yaitu sitokrom C dan AIF (*apoptosis inducing factor*), aktivasi kaskade caspases, penurunan enzim DNA repair, dan aktivasi endonukleoses, serta fragmentasi DNA. Caspases merupakan *cystein aspartic acid-specific proteases*, merupakan *interleukin-1 β converting enzyme* (ICE/CED-3) atau CPP32, yaitu enzim penting dalam proses apoptosis. Ada 11 caspases yang berhasil diidentifikasi pada tubuh manusia. Dalam kondisi normal caspases diproduksi dalam sitoplasma sel sebagai pro-enzim inaktif. Aktifasi caspases terjadi sebagai respons terhadap sinyal apoptotik, menyebabkan pro-caspases menjadi enzim aktif.

Dari 11 caspases yang ada dalam tubuh manusia, caspase-3 merupakan caspase utama dalam rangkaian proses apoptosis. Caspase-3 merupakan tetramer terdiri 2 subunit kecil dan 2 subunit besar. P32 pro-enzim caspase-3 yang pertama kali mengalami pembelahan pada C-terminal Asp28 yang kemudian diikuti C-terminal dari Asp175 menghasilkan fragmen p17 dan p12. Berbagai faktor dapat mengaktifasi caspases, termasuk faktor eksternal melalui reseptor transmembran. Selanjutnya dapat menghancurkan berbagai komponen seluler. Caspases dapat diaktifkan melalui dua jalur. Jalur pertama, dimulai bila molekul sinyal (secara kolektif disebut ligands kematian) terikat dengan reseptor spesifik (kolektif disebut reseptor kematian) terjadi ikatan ligands kematian terhadap reseptor kemudian

mengaktifkan molekul transduksi pada sel membran yang di aktiver melalui caspases. Ada dua contoh ligands kematian yaitu Fasl (*Fas ligand*) dan TNF- α (*tumor necrosis factor α*) dengan reseptor yaitu Fas reseptor (CD95) dan TNFr (TNF-receptor) (Mukae, 1998; Suryohusodo, 2001).

Jalur kedua, dimulai bila melekul tertentu seperti oksidan, senyawa oksidatif reaktif, merusak mitokondria. Kerusakan mitokondria diikuti sekresi sitokrom C dan molekul lain yang disebut Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*). Bersama d-ATP (deoxy-ATP) kemudian mengaktifer caspases.

Apoptosis diregulasi baik oleh molekul pro-apoptotik seperti Bad dan molekul anti apoptotik seperti Bcl-2. Keseimbangan antara keduanya menentukan terjadi sensitif atau resisten terhadap pencetus apoptosis.

2.10 Apoptosis dan Nekrosis

Seperti diferensiasi dan proliferasi, apoptosis merupakan metode kontrol seluler yang tidak kalah penting dalam pengendalian sel. Gangguan pada sistem ini dapat menyebabkan gangguan dalam pengendalian sel menjadi abnormal.

Proses kematian sel terjadi melalui apoptosis atau nekrosis. Kedua proses kematian sel tersebut memberikan gambaran yang berbeda. Nekrosis selalu patologis, tetapi apoptosis dapat patologis maupun fisiologis. Apoptosis fisiologis merupakan proses kematian sel yang terjadi secara alami. Apoptosis dipicu oleh sekelompok enzim yang disebut caspases. Dalam kondisi normal enzim tersebut dalam keadaan inaktif, yaitu sebagai pro-enzyme. Aktivasi enzim caspases segera disusul gambaran

morfologis spesifik apoptosis, yaitu *apoptotic bodies* (Buchman, 2000; Suryohudoyo, 2001). Apoptosis dipicu oleh berbagai molekul sinyal dari dalam sel, misalnya protein P53 (*P53 dependent mediated pathway*). Dari luar sel, misalnya TNF α (*P53 independent mediated pathway*) (Haryana, 1999; Hotchkiss, 2000; Suryohudoyo, 2001). Apoptosis dimodulasi oleh molekul yang proapoptotik dan molekul yang antiapoptotik. Keseimbangan antara kedua kondisi tersebut menentukan sensitifitas atau resistensi terhadap apoptosis. Banyak atau sedikitnya apoptosis akan menentukan perpaduan proliferasi atau kematian sel yang luas.

Terdapat perbedaan gambaran morfologis dari nekrosis dan apoptosis. Sel yang nekrotik menunjukkan pembengkakan, lisis, diisi oleh komponen-komponen ekstraseluler, disertai proses inflamasi, menarik serta berkumpulnya sel-sel fagosit, terjadi perubahan berupa sel-sel nekrotik. Sel yang mengalami apoptosis tidak disertai pembengkakan sel, terjadi perubahan struktur seperti penyusutan volume, pengkerutan membran, sitoplasma mengalami konsentrasi, kondensasi kromatin, tidak ada proses lisis tetapi terjadi degradasi DNA menjadi oligonukleosomal fragmen. Terbentuk fragmen kecil disebut *apoptotic bodies* dari 600-750 kb menjadi sekitar 50-300 kb. Serta kehilangan kemampuan berkomunikasi dengan sekitarnya (Winter, 1988; Rasola, 1999; Buchman, 2000). *Apoptotic bodies* yang terbentuk tidak bertahan lama oleh karena segera di fagosit makrofag tanpa disertai proses inflamasi (Collins JA, 1997; Buchman, 2000; Esser, 2001). Berbagai faktor dapat mendorong terjadi apoptosis, menginduksi munculnya perubahan pada mitokondria sebagai proses awal dari kematian sel. Awalnya terbentuk *megaspore* pada

permukaan membran mitokondria, pembengkakan matrik, hilangnya mekanisme elektrokimia pada permukaan membran dalam, menyebabkan terlepasnya sitokrom C ke dalam sitosol. Begitu sitokrom C di dalam sitosol akan memprovokasi kompleks multiprotein yang kemudian mengaktifkan caspase-9 dan berikutnya caspase-3. Caspase merupakan proteases suatu enzim proteolitik yang mengubah zimogen inaktif menjadi enzim heterodimerik aktif disebut juga *interleukin-1 β converting enzyme* (Rasola, 1999).

Apoptosis fisiologis terjadi pada masa embrional atau terjadi pada usia dewasa, misalnya pada penggantian sel kulit dan mukosa saluran cerna (Buchman, 2000). Apoptosis patologis terjadi bila terdapat fragmentasi DNA yang di induksi oleh peningkatan aktivitas protein P53, maupun reseptor TNF α . Keadaan normal sinyal kematian melalui apoptosis berada dalam keadaan inaktif. Menjadi aktif bila terdapat sinyal kematian sel dan program kematian yang dipandu gen nef, dengan demikian disebut kematian sel yang terprogram. Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram berakibat matinya sel yang tidak dikehendaki. Apoptosis jelas berbeda dengan nekrosis, karena apoptosis merupakan suatu kematian sel yang terprogram dan bukan secara kebetulan seperti kerusakan sel yang mengalami nekrosis. Selain itu, sel apoptotik dikenali dan dimusnahkan oleh fagosit sebelum mengalami disintegrasi. Sehingga sel yang mengalami apoptosis tidak didapatkan kerusakan jaringan sekitarnya, tidak terjadi induksi respons peradangan seperti pada nekrosis (Buchman, 2000; Haryana, 2000; Rasola, 2001).

Apoptosis merupakan bentuk kematian sel secara fisiologis, terjadi pada semua sel dan jaringan. Merupakan bagian penting dari keseimbangan sel dan jaringan normal. Pada akhir masa hidupnya, sel normal terjadi kondensasi inti heterokromatik, pengerutan sel dan teracaknya letak berbagai organela di dalam sitoplasma. Gambaran karakteristik seperti pola anak tangga di dapatkan pada elektroforesis DNA sel apoptotik yang dihasilkan oleh fragmen oligonukleosom karena adanya kromatin internukleosom oleh endonuklease endogen.

Berikut ini adalah beberapa protein yang mengontrol apoptosis :

| | Promoting | Inhibiting |
|-----------|---|--|
| Intrinsic | P53 MYC Interleukin-1 β converting enzyme BAX/BCLXs | BCL2/BCLX _L A20 |
| Extrinsic | TNFα TGF β | Many. For example : Erythropoietin PDGF/IGFI Sex hormones |

2.11 Proses Apoptosis

Apoptosis dapat terjadi pada semua sel, ditandai oleh adanya pengerutan sel, konsentrasi sitoplasma, kondensasi kromatin, teracaknya berbagai organela di dalam sel, dan fragmentasi DNA (Buchman, 2000). Dari beberapa kepustakaan disebutkan bahwa selama infeksi HIV berlangsung, maka sejalan dengan itu terjadi peningkatan proses apoptosis pada berbagai sel termasuk limfosit, hanya saja mekanismenya hingga kini belum diketahui.

Pada penderita yang mengalami sepsis, apoptosis terjadi melalui 3 jalur yaitu pertama melalui *receptor mediated apoptosis pathway*, kedua melalui *mitochondrial-*

mediated apoptosis pathway, ketiga melalui proses sitolisis oleh sell killer dan ADCC.

2.11.1 Proses Apoptosis Jalur *Mitochondrial Mediated Pathway*

Pada jalur *metochondrial mediated pathway*, maka radikal bebas yang terbentuk akan memicu Protein kinase-C (PKC) dan PK-2 yang selanjutnya memicu gen P53 sehingga terjadi peningkatan ekspresi protein P53 (Hotchkiss, 2000; Nakae, 2002). P53 merupakan faktor *stress-induce transcription* yang kemudian mencetuskan terjadinya kegoncangan sel dan mengakibatkan apoptosis pada berbagai sel. Peningkatan ekspresi p53 tersebut berakibat kerusakan mitokondria melalui terbukanya pore pada membran, yang kemudian mengeluarkan sitokrom-C dan molekul lain yang bertindak sebagai *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1). Keadaan ini akan mengaktifir caspase-9, caspase-3, mempengaruhi DNA-ase sehingga terjadi fragmentasi DNA, dan berakhir dengan kematian sel melalui proses apoptosis. Proses apoptosis pada penderita HIV/AIDS tersebut tentunya juga terjadi pada Limfosit T-CD4, sehingga jumlah limfosit dalam sirkulasi darah penderita dapat menurun jumlahnya kurang 50% dari nilai normal selama infeksi berlangsung. Hal ini semakin memperburuk keadaan penderita sehingga terjadi infeksi oportunistik, muncul keganasan, sepsis berat, kegagalan fungsi multi organ (Hotchkiss, 2000; Nakae, 2002).

2.11.2 Proses Apoptosis Melalui Jalur *Receptor Mediated Pathway*

Pada penderita sepsis, apoptosis dapat berlangsung dengan peran molekul sinyal dan reseptor. Molekul sinyal yang secara kolektif disebut ligands kematian yang terikat pada reseptor spesifik yang secara kolektif disebut reseptor kematian.

Hal ini dapat difahami karena pada sepsis banyak diproduksi ROS yang berinteraksi dengan reseptor spesifik dan ligands kematian. Ikatan ligands kematian terhadap reseptornya yang aktif sebagai molekul transduksi pada sel membran yang mengaktifir caspases. Ada dua contoh ligands kematian yaitu FasL (*Fas ligand*) dan TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*) dengan reseptornya yaitu Fas dan TNFr (TNF-receptor) yang disebut APO-1 atau CD95, menyebabkan trimerisasi reseptor. Trimerisasi reseptor berakibat aktivasi caspase-8 melalui molekul adaptor FADD/MORT1 dan aktivasi membran plasma oleh kompleks sinyal kematian.

Pada proses apoptosis jalur ekstraseluler akan melibatkan *receptor mediated pathway* yaitu reseptor TNF- α , reseptor ligan fas, dan reseptor protein p55 yang selanjutnya memicu aktifasi caspase-8 dan caspase-6 serta diikuti kaskade aktivasi caspase-3 menyebabkan terjadinya pemisahan berbagai komponen sel seperti poli (ADP ribosyl) polimerase, lamin, actin, rho-GDI, dan fodrin sehingga menyebabkan perubahan morfologi sel selama berlangsungnya proses apoptosis (Yoon, 1996). Peningkatan aktivitas caspase-3 menyebabkan aktifasi DNAase (Mukae, 1998). Salah satu petanda penting dari apoptosis adalah terjadinya degradasi DNA kromosom menjadi unit-unit nukleosom (Mukae, 1998).

2.12 Mitokondria dan Peranannya pada Apoptosis

Mitokondria adalah organel yang ukurannya sebesar bakteri (kurang-lebih 1 x 2 μm), terdapat pada hampir semua sel eukariotik dalam jumlah besar. Yang khas adalah dijumpai sekitar 2000 mitokondria pada setiap sel, keseluruhan mitokondria dalam satu sel mencapai 25% volume sel. Mitokondria dikelilingi oleh dua membran, satu membran mitokondria bagian luar yang licin dan satu di bagian dalam yang berlipat. Membran mitokondria bagian dalam mempunyai permukaan yang sangat luas dan mengelilingi ruang matriks. Lipatan membran ini disebut krista, ruang antara membran dalam dan luar disebut ruang antar membran (Koolman, 2001; Singh, 2003).

Jumlah dan bentuk mitokondria, demikian juga jumlah kristanya dapat sangat berbeda dari tipe sel ke tipe sel lainnya. Jaringan dengan metabolisme oksidatif yang intensif, seperti otot jantung, mempunyai krista yang sangat banyak. Di dalam satu jaringan, bentuk mitokondria dapat bervariasi sesuai dengan fungsinya, karena mitokondria merupakan organel yang mobil dan plastis.

Membran mitokondria mengandung protein integral. Pada membran bagian luar terdapat pori-pori, yang memungkinkan membran dapat dilewati molekul-molekul yang lebih kecil dari 10 kDa. Membran ini mengandung suatu fosfolipid khusus, yaitu kardiolipin. Kandungan protein membran mitokondria bagian dalam sangat tinggi, yaitu kira-kira 75%. Salah satu peran protein membran mitokondria bagian dalam ialah pengemban spesifik untuk transpor zat yang terkontrol, enzim, dan komponen rantai pernafasan lainnya serta ATP-sintase. Dalam kondisi normal lapisan

mitokondria dalam bersifat impermeabel terhadap berbagai material kecuali terhadap metabolit selektif dan ion. Pada keadaan stress, terbentuk pore non-spesifik yaitu *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) yang memungkinkan lapisan dalam membran mitokondria menjadi terbuka (Halestrap, 2002). Bila MPTP terbuka, maka permeabilitas membran dalam menjadi terganggu dan mitokondria menjadi tidak mampu mensintesis ATP. Akibatnya terjadi translokasi ATPase-proton yang berbalik langsung mengakibatkan mitokondria menjadi aktif menghidrolise ATP melalui glikolisis. Kadar ATP intraseluler menurun drastis, terjadi kekacauan ion dan homeostasis metabolik serta aktivasi berbagai enzim degradatif seperti fosfolipases, nukleases, dan proteases. Semakin banyak pore yang terbuka, akan terjadi perubahan hiperkontraktur dan kerusakan sel yang ireversibel berakibat kematian sel (Halestrap, 2002; Widodo, 2003). Faktor yang mendorong pembukaan MPTP adalah peningkatan kadar kalsium dalam matrik mitokondria, terutama akibat pengaruh peningkatan ROS, penurunan nukleotida adenine, akumulasi posfat organik dan depolarisasi mitokondria.

Dengan terbukanya MPTP maka akan mendorong dipercepatnya putaran mata rantai kearah kematian sel, hal ini terjadi karena terbukanya pore yang diikuti keluarnya subtrat metabolik penting dan antioksidan seperti NADH, ATP, dan GSH (Cassarino, 1998; Widodo, 2003). Penurunan kadar GSH merupakan situasi kritis menyebabkan terjadinya kemampuan mitokondria dalam menurunkan kadar H₂O₂ serta ROS. Terbukanya pore juga menyebabkan mitokondria melepaskan cadangan Ca⁺ yang kemudian mengaktifkan enzim proteases. Terbukanya pore juga berakibat penurunan ATP dan oksidasi NADH serta NADPH (Cassarino, 1998; Singh, 2003).

Fungsi metabolik mitokondria dikenal sebagai pembangkit energi sel secara biokiawi, karena mitokondria selama proses penghancuran oksidatif bahan makanan memproduksi ATP dalam jumlah terbesar yang dibutuhkan oleh sel. Didalam mitokondria berlangsung proses-proses berikut: perubahan piruvat menjadi asetil-KoA, daur asam sitrat, rantai pernafasan yang terangkai dengan sintesis ATP (bersama-sama dikenal sebagai fosforilasi oksidatif), penghancuran asam lemak melalui oksidasi-beta dan sebagainya daur urea. Mitokondria menyediakan produk antara untuk metabolisme sel dan merupakan suatu penyimpanan kalsium yang menjaga konsentrasi kalsium di dalam sitoplasma tetap rendah (kira-kira $1 \mu\text{M}$).

Fungsi penting lain dari mitokondria adalah menerima substrat untuk metabolisme energi (asam lemak, piruvat, kerangka karbon dan asam amino) dari sitoplasma dan menghancurkan secara oksidatif bahan-bahan tersebut menjadi CO_2 dan H_2O dan menghasilkan ATP. Dalam siklus asam sitrat menghasilkan karbondioksida (CO_2) yang teroksidasi secara lengkap dan ekuivalen dengan pereduksi yang sementara waktu terikat pada koenzim. Proses ini berlangsung hampir seluruhnya didalam ruang matriks. Sebaliknya rantai pernafasan yang mengoksidasi kembali koenzim berlokalisasi di membran mitokondria bagian dalam. Rantai pernafasan menggunakan NADH dan FADH_2 yang terikat pada enzim sebagai zat pereduksi oksigen dan membentuk air. Reaksi yang bersifat eksergonik kuat ini terangkai dengan traspor proton (H^+) dari ruang matriks melalui membran mitokondria bagian dalam ke dalam ruang intramembran. Akibatnya terbentuk suatu gradien elektrokimia melalui membran dalam. Mitokondria menggunakan gradien ini

untuk sintesis ATP dari ADP dan Pi dengan bantuan ATP- sintese. Untuk pertukaran zat dengan sitoplasma, berbagai sistem transpor berlokalisasi di dalam membran mitokondria bagian dalam. Sistem tersebut dapat mentranspor zat-zat melalui symport atau antiport antara lain: piruvat, ATP, ADP, glutamat, aspartat, malat, 2-ketoglutarat, sitrat dan asam lemak. Untuk kalsium juga terdapat sistem pengemban yang mengatur influks dan efluks dengan demikian mengontrol konsentrasi kalsium di dalam sitoplasma. ATP-4 yang diproduksi mitokondria didalam ruang matriks diekspor ke dalam sitoplasma dengan cara menukarnya terhadap ADP-3 dengan bantuan suatu translokator ADP/ATP. Di dalam sitoplasma akan dipakai ATP-4 dalam jumlah besar. Fosfat bersama-sama dengan satu protein diimpor kedalam mitokondria, tanpa tergantung dari transpor ADP/ATP. Dengan bantuan DNAny sendiri (mtDNA), mitokondria mempunyai kemampuan untuk mensintesis sendiri beberapa proteinnya. Namun bagian terbesar protein mitokondria disandi di dalam inti sel, kemudian disintesis pada ribosom yang bebas dalam sitoplasma dan diimpor ke dalam mitokondria. Untuk impor protein terdapat pengemban khusus didalam membran mitokondria.

DNA mitokondria manusia yang urutannya telah dikenal, mengandung 16.569 pasangan basa. mtDNA tersebut berbentuk sirkular dan tidak berhubungan dengan histon. Pada kedua rantai mtDNA yaitu rantai H yang kaya akan nukleotida G dan rantai L yang kaya akan nukleotida C, terdapat informasi genetik. MtDNA mengandung sandi genetik untuk 2 rRNAs, untuk tRNAs dari 22 asam amino, dan untuk 13 macam polipeptida yang berbeda. Sandi genetik mitokondria berlainan

dengan sandi genetik inti sel, sedikit modifikasi dan menunjukkan varian spesifik jenisnya.

Mitokondria memperbanyak diri melalui pertumbuhan dan pembelahan. Mitokondria adalah tempat respirasi sel dengan hasil akhir energi (ATP, Adenosine Triphosphate), 90% kebutuhan oksigen dikonsumsi oleh mitokondria. Sekitar 1-2% dari oksigen tersebut oleh mitokondria dirubah menjadi radikal bebas. Radikal bebas terjadi karena adanya hambatan transfer elektron pada respirasi sel. Sehingga dapat dikatakan bahwa mitokondria sebagai sumber radikal bebas intrasel (Ritcher, 1992). Radikal bebas mempunyai sifat sebagai oksidator, yang mempunyai sasaran lipid, protein, dan DNA yang selanjutnya akan menginduksi terjadinya mutasi DNA mitokondria (mtDNA). Selain mitokondria, radikal bebas diproduksi di sitokrom P450, leukosit, makrofag, hemoglobin, dll. Pada umumnya enzim tersusun oleh nukleotida, apabila terjadi mutasi akan mengakibatkan enzim tersebut tidak aktif, sehingga enzim tidak mampu atau sedikit metabolisme obat-obatan. Seperti diketahui bahwa DNA terdapat di inti dan mitokondria. Mitokondria adalah tempat respirasi sel melalui suatu proses enzimatik fosforilasi oksidatif (*Oxidative Phosphorylation, OXPHOS*) menghasilkan energi dalam bentuk ATP (Adenosine Triphosphate). Mitokondria tidak mempunyai sistem repair, karena mtDNA tidak mempunyai histon yang berfungsi sebagai pelindung seperti pada nDNA.

Mutasi pada mitokondria menimbulkan dua efek patofisiologi dari defisiensi OXPHOS : pertama penurunan energi (ATP), kedua meningkatnya produksi dan toksisitas ROS (*Reacting Oxygen Species*). Meningkatnya ROS akan menghambat rantai respirasi yang merupakan patofisiologi kelainan mitokondria yang diawali

menurunnya produksi energi atau terjadinya hambatan transfer elektron yang mengakibatkan produksi ROS meningkat.

Telah diketahui bahwa mitokondria mensekresi berbagai faktor dari ruang membran dalam antara lain sitokrom C yang kemudian menginduksi apoptosis. Peristiwa ini terjadi karena sitokrom C tersebut selanjutnya mengaktifkan pro-caspase-9 (caspase-9 inaktif) menjadi aktif, Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*). Begitu caspase-9 aktif akan mengaktifkan Apaf-1 dengan bantuan deoxy-ATP (dATP) dan mempengaruhi enzim proteolitik pro-caspase-9 menjadi caspase-9 dan diikuti caspase-3 yang juga menjadi aktif. AIF (*apoptosis inducing factors*) yang mengalami migrasi ke nukleus dan menginduksi perubahan pada struktur kromatin, terjadi aktivasi protein pro-apoptotik sebagai respon terhadap ROS dan kemudian membuka MPTP. Keadaan tersebut menyebabkan mitokondria mengalami pembengkakan dan ruptur atau terbukanya pore pada membran mitokondria yang menyebabkan dilepaskannya sitokrom C. Akibat terbukanya pore pada membran tersebut maka produksi ATP menurun, sel mengalami krisis terjadi aktivasi berbagai rangkaian menuju apoptosis

2.13 Peranan Reseptor

Merupakan protein membran sel yang mempunyai peran mengenal dan mengait neurotransmitter. Melaksanakan peran dengan efektor untuk membuka maupun menutup kanal, secara langsung atau melalui *messenger II*. Secara langsung memerlukan waktu yang singkat dalam hitungan mili detik (Ionik), melalui *messenger II* berlangsung agak lambat dalam hitungan detik atau menit

(metabotropik). Peran reseptor metabotropik adalah mengenali neurotransmitter spesifik dan mengaktifkan organ efektor melalui proses biokimiawi. Ada dua jenis reseptor metabotropik yaitu: pertama, G-protein (Guanine nucleotide, $R\alpha$, β , R muskarinik, $GABA\beta$, R Glutamat, R5-HT, R neuropeptida). Kedua, tyrosine kinase (hormon, GF, peptida, dll). Tahapan transmisi 1) terkaitnya neurotransmitter pada reseptor, 2) aktivasi G-protein, 3) aktivasi sitim efektor (Kandel, 1995).

Mekanisme yang menyebabkan suatu sel dapat mempengaruhi sel lain sudah ada didunia sel jauh sebelum sel multiseluler muncul (Yuswanto, 2000). Sel-sel berkomunikasi dengan berbagai molekul baik berupa protein maupun senyawa kimia lain. Molekul-molekul sinyal tersebut dapat disekresikan oleh sel sinyaling atau terdapat pada permukaan sel. Molekul sinyal (ligand) dari sel sinyaling diterima oleh sel target pada protein spesifik yang disebut reseptor. Lokasi reseptor dapat berada dipermukaan sel atau di dalam sel /intraseluler. Jika molekul sinyal berikatan dengan reseptor maka akan terjadi inisiasi proses respon dari sel target. Kebanyakan molekul sinyal bereaksi pada konsentrasi sangat rendah ($<10^{-8}$ M) dan reseptor yang mengenalinya berikatan dengan afinitas yang sangat tinggi (konstante afinitasnya $K_a > 10^8$ L/mol) (Haryana, 1999). Molekul sinyal yang direspon oleh reseptor permukaan biasanya berupa molekul hidrofilik, sementara molekul sinyal yang direspon intraseluler biasanya berukuran lebih kecil dan berifat hidrofobik. Reseptor-reseptor intraseluler tersebut diatas akan berikatan dengan sekuen DNA yang berikatan dengan gen-gen dan diatur oleh liganda. Pada mekanisme tersebut ligand mengubah konfirmasi reseptor yang kemudian akan mengaktifkan transkripsi gen.

Pada beberapa kasus, mekanisme tersebut berjalan dalam dua tahap. Tahap pertama, adalah respon primer yaitu induksi langsung dari transkripsi sejumlah gen. Selanjutnya produk dari gen tersebut akan mempengaruhi produksi gen-gen lain, proses ini disebut sebagai respon sekunder yang dapat bertindak sebagai sel sasaran untuk suatu molekul sinyal tertentu, karena sel tersebut memiliki suatu reseptor yang dapat menangkap molekul sinyal tersebut. Setiap molekul sinyal memiliki suatu reseptor untuk molekul tersebut. Menurut lokasinya dapat dibedakan dua kelompok reseptor, yaitu reseptor sitosolik (terletak didalam sitosol) dan reseptor transmembran (terletak pada permukaan membran sel). Molekul sinyal yang bersifat hidrofobik dapat menembus membran sel. Untuk molekul sinyal ini, reseptor terdapat di dalam sitosol. Sebaliknya yang hidrofilik, memerlukan reseptor pada permukaan membran sel molekul sinyal yang hidrofilik dapat larut dalam plasma darah, sebaliknya yang hidrofobik, untuk transportasinya perlu diikatkan pada suatu protein, misalnya albumin atau protein khusus yang disebut protein pengangkut. Karena molekul sinyal yang hidrofilik tak dapat menembus membran sel, maka pesan yang dibawa harus dialihkan (ditransduksi) kepada molekul lain yang terdapat di dalam sel (Suryohusodo, 1999).

2.14 Peran *Mitochondrial Permiability Transition Pore* (MPTP) pada Apoptosis

Paling tidak ada tiga stresor utama yaitu psikologis, fisikologis, dan lingkungan dapat mempengaruhi rangkaian repons stres didalam tubuh manusia termasuk dampaknya terhadap sel. Pada kondisi stres astrosit, mikroglia akan merespon dengan memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamatori, peningkatan

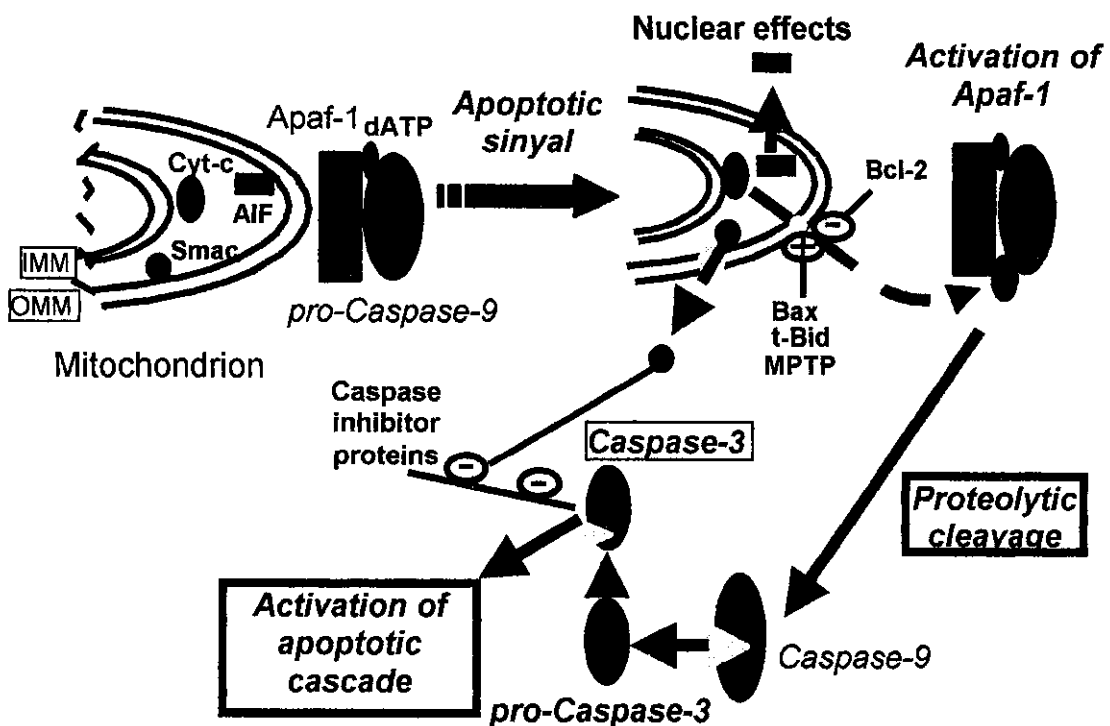
produksi ROS. Di perifer limfosit yang terpapar HIV dan juga karena pengaruh peningkatan kadar glukokortikoid akan terjadi aktivasi melalui CD43 r, sehingga aktif memproduksi sitokin proinflamatori yang berdampak terhadap peningkatan kadar ROS. Salah satu organela di dalam sel adalah mitokondria, merupakan pabrik utama ATP yang diperlukan untuk berbagai kebutuhan sel. Mitokondria memiliki membran luar atau *outer membrane mitochondria* (OMM) dan membran dalam *inner membrane mitochondria* (IMM). Membran luar sangat permeabel, sebaliknya membrane dalam impermeabel dan sangat membatasi terhadap berbagai molekul yang akan melalui, kecuali terhadap O_2 dan H_2O . Membrane dalam sangat selektif dalam memberi kesempatan terhadap lalu-lalangnya molekul, kesempatan bisa tidaknya molekul melalui membran dalam sangat ditentukan oleh aktivitas *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP). Molekul dapat melalui membran dalam bila MPTP terbuka oleh beberapa keadaan seperti peningkatan kadar kalsium, depolarisasi mitokondria, penurunan kadar adenin nukleotida, peningkatan kadar posfat inorganik, dan peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) (Halestrap, 2002). Sedangkan penutupan MPTP dilakukan oleh meningkatnya kadar magnesium dan imunosupresan. Mekanisme aktivitas MPTP tersebut akan menentukan kelangsungan hidup sel itu sendiri, serta memandu proses kematian sel melalui nekrosis atau apoptosis. Diantara membran luar dan dalam mitokondria terdapat ruang antar membran (*intermembrane space*), didalamnya terdapat dua macam protein spesifik yaitu cytochrom C dan smac.

Sel yang mengalami stres akan berdampak terhadap terjadinya peningkatan kadar kalsium, depolarisasi mitokondria, deplesi adenin nukleotida, peningkatan

kadar posfat inorganik, ROS, dan berbagai situasi tersebut akan membuka MPTP. Pada mitokondria mekanisme apoptosis diawali oleh terbukanya MPTP pada membran dalam yang membuka, dampaknya akan mempengaruhi aktivitas kedua komponen protein spesifik yaitu cytochrom C dan smac yang terdapat didalam ruang antar membran tersebut dan berlangsung secara simultan. Cytochrom c menjadi aktif dan mempengaruhi *apoptosis inducing factors* (AIF), sedangkan aktifnya smac berdampak inhibisi terhadap pengaruh AIF endogen. Akibat kinerja yang simultan dari kedua komponen protein spesifik tersebut menyebabkan terjadinya perubahan yang dramatis pada mitokondria yaitu terjadi kondensasi (*cell blebbing*) disusul terjadinya fragmentasi sehingga terbentuk apoptotic bodies dengan membran yang tetap utuh yang akan segera difagositosis makrofag, atau terjadi nekrosis sekunder bila respon makrofag lamban. Terbukanya MPTP menyebabkan terjadinya distensi dan pembengkakan (*swelling*) menyeluruh yang mendorong terjadinya ruptur membran luar mitokondria. Karena membran luar mengalami ruptur maka cytochrom c (apaf-2) lepas kedalam sitoplasma, mempengaruhi *apoptosis promoting activating factor-1* (Apaf-1) dengan dukungan dioxo-ATP (dATP), Apaf-1 akan mengirimkan sinyal apoptosis (*apoptotic sinyal*) ke inti (*nuclear effects*). Dalam kondisi normal, inti terjaga dalam kondisi homeostasis oleh Bcl-2 yang protektif dan Bax, t-bid, MPTP terbuka yang destruktif. Oleh pengaruh stresor, maka aktivitas bax, t-bid, dan MPTP yang terbuka begitu dominan dan Bcl-2 tidak kuasa membendung pengaruh destruktif tersebut. Maka terjadi aktivasi Apaf-1, mempengaruhi aktivitas enzim *cystein aspartic acid specific proteosis* (Caspases). Salah satu enzim yang terpengaruh adalah pro-Caspase-9 (apaf-3) yang inaktif menjadi Caspase-9 yang

aktif. Rangkaian peristiwa yang kemudian terjadi Caspase-9 tersebut berpengaruh terhadap pro-Caspase-3 inaktif menjadi Caspase-3 yang aktif. Caspases merupakan enzim proteolitik yang dapat menyebabkan lisisnya berbagai organela sel yang mengandung protein. Caspase-3 tersebut merupakan eksekutor kematian sel karena melisis DNA inti menjadi fragmen-fragmen yang dalam waktu singkat difagositosis oleh makrofag (Halestrap, 2002).

The role of mitochondria in initiating the apoptotic cascade



Gambar-4. Peran Mitochondrial Permiability Transition Pore, Caspases pada Apoptosis (Source: Halestrap, 2002).

2.15 Peran Chaperonins Pada Apoptosis

Mekanisme terjadinya destruksi dan penurunan jumlah limfosit T-CD4 hingga kini belum diketahui (Lauener, 1995; Hackeng, 2000). Laskey dkk (1978) menemukan berbagai protein yang berperan untuk merespons *stressor* berbagai

keadaan yaitu: *heat-shock proteins (Hsps)*, *stress proteins* atau *molecular chaperones* (Ranford, 2000). Berbagai *stressor* tersebut antara lain: iskemia, hipoksia, panas, dingin, gangguan keseimbangan osmotik, toksin, logam berat, sitokin, dan eikosanoids.

Terdapat berbagai *molecular chaperones* atau *chaperonins* seperti yang tertera pada tabel berikut (Ranford, 2000):

| Family | Chaperone functions |
|---|---|
| Chaperon 10 (cpn 10, hsp 10, co-chaperonin early pregnancy factor, GroES) | 'Co-chaperon' to chaperonin 60; promotes folding of substrates that are bound to chaperonin 60 |
| Small heat-shock parotein (hsps) | Diverse class of protein; chaperone function is independent of adenosine triphospate (ATP); bind non-native proteins |
| Hsp40 (DnaJ related) | Co-chaperones that regulated the activity of hsp 70 proteins; some can bind non-native proteins themselves |
| Chaperon 60 | ATP-dependent folding and/or refolding of `15-30% of total cellular proteins |
| Hsp70 | Prevent the aggregation of unfolded polypeptides; disassemble multimeric protein complexes; involved in protein trafficking; regulate the heat-shock response |
| Hsp90 | Spesific functions in regulating sinyal tranductional pathways; through their actions on certain kinases and steroid receptors; might also have 'general' chaperon activity |
| Hsp100 (Clp) | Disasseble protein oligomers and aggregates |
| Hsp110 | High degree of homology with the hsp70 family; little know about functions |

Pada akhir abad ke-20, diketahui bahwa di dalam sitoplasma sel, *molecular chaperones* atau *chaperonins* berinteraksi dengan protein-protein lain sehingga memungkinkan berlangsungnya mekanisme *folding*, *refolding*. Oleh karena itu peran *chaperonins* dikenal luas dalam berbagai fungsi utama sel seperti dalam proses

metabolisme, pertumbuhan, deferensiasi, kematian sel terprogram (apoptosis), serta mempengaruhi aktivasi berbagai enzim dan reseptor (Ranford, 2000; Sullivan, 2002).

Chaperonins merupakan subkelompok oligomeric *molecular chaperones*, termasuk subklas GroE dan TCP-1 (*T-complex polypeptide 1*). Termasuk subklas GroEL adalah *chaperonin 60* dan termasuk GroES adalah *chaperonin 10*. GroEL maupun GroES berperan penting dalam *folding* protein di dalam sel baik dalam kondisi normal maupun kondisi *stress*. Ewalt dkk (1997), mengemukakan bahwa dalam kondisi normal GroEL menentukan *folding* 10-15% dari seluruh protein sitoplasma, sedangkan pada kondisi *stress (heat stress)* terjadi peningkatan *folding* menjadi 30%. *Chaperonin-60* merupakan tetradekamer, terdiri dari 14 cincin dalam 2 rangkaian cincin masing-masing rangkaian terdiri dari 7 cincin dengan mempunyai berat molekul 60 kD (Burns, 1992). Didalam memerankan fungsinya *chaperonin 60* oligomers saling terkait dengan *chaperonin 10* oligomers. *Chaperonin 10* yang berbentuk cincin tunggal heptamer, dengan berat molekul tiap unitnya 10 kD (Burns, 1992). Bila ATP berikatan dengan *chaperonin 60*, maka *chaperonin 10* akan memosisikan sebagai penutup pada puncak *chaperonin 60* yang berbentuk tong (*barrel*) akibatnya *central cavity* melebar sehingga memudahkan terjadinya *folding* protein.

Chaperonins mulai banyak dibicarakan pada akhir abad ke-20 sebagai *heat-shock* atau respons *stress* yang mampu menginduksi ekspresi protein tertentu dalam upaya mempertahankan kelangsungan hidup sel tersebut. Pada perkembangan lebih lanjut, yaitu pada abad ke-21 *chaperonins* diketahui sebagai molekul sinyal (Ranford, 2000).

Chaperonins merupakan imunogen yang potent, dalam arti mempunyai kemampuan menginduksi dan respons terhadap sistem imun spesifik sangat kuat.

Peran chaperonins dapat diperlihatkan seperti Hsp90 dan Hsp70 berikut (Nollen, 2002):

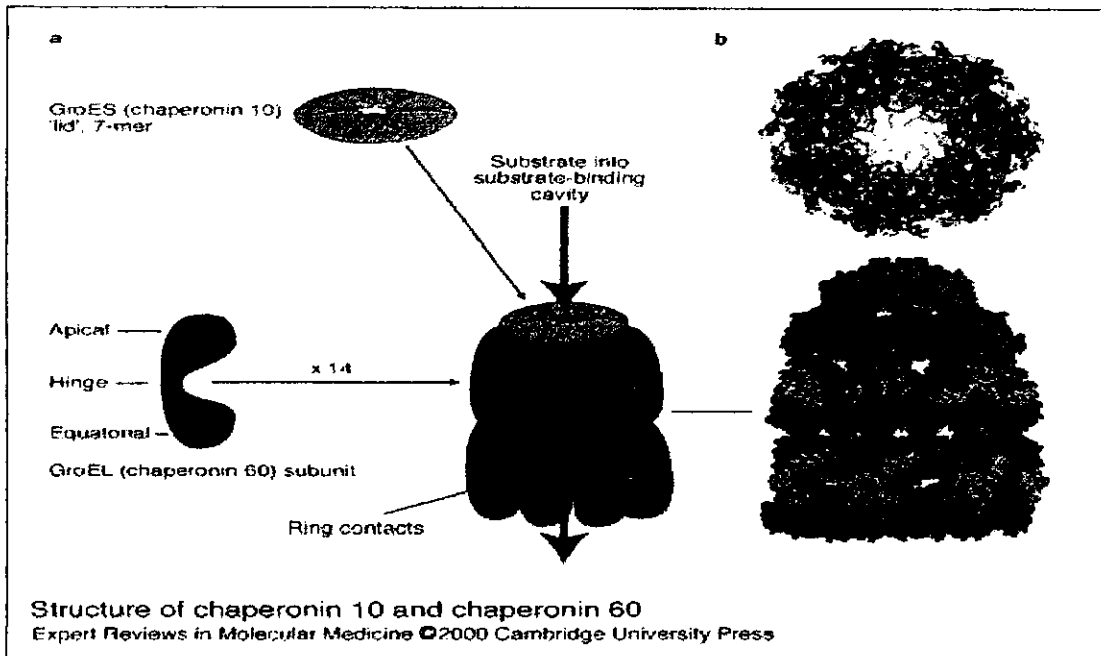
Table 3. Hsp90 and Hsp70 co-chaperons, interacting molecules and cellular function.

| Chaperons | Cellular function | Co-chaperone | Preferred interaction partner |
|-----------|---------------------|--|--|
| Hsp90 | Sinyal transduction | Cdc37 | Kinases |
| | Hormone response | PP5 (TPR) : Cyp40 FKBP52 FKBP51 | Glucocorticoid receptor Hormone receptor Oestrogen receptor Progesteron/glucocorticoid receptor |
| | Cell death | Unknown | Apaf-1 |
| | Stress response | Unknown | HSF-1 |
| | Complex assembly | P23 | Chaperone complex |
| | | Hop | Chaperone complex |
| Hsp70 | Sinyal transduction | Bag 1 Bag 1 | Raf-1 kinase Growth factor receptors |
| | Hormone response | Bag 1 Hip | Hormone receptor Steroid receptor |
| | Cell death | Bag 1 Unknown | Bcl -2 Apaf-1 |
| | Stress response | Unknown | HSF-1 |
| | Complex assembly | Hop Hdj-1 | Chaperone complex Chaperone complex |

Infeksi merupakan *stressor* terhadap mikroorganisme maupun host, yang dapat menginduksi peningkatan produksi *chaperonins* baik oleh mikroorganisme maupun host. Meskipun demikian peran imunitas *chaperonins* pada infeksi hingga kini masih belum diketahui (Ranford, 2000).

Hsp90, Hsp70, Hsp60 merupakan stress protein, akan meningkat kadarnya bila individu maupun sel mengalami stress, misalnya akibat terpapar bahan kimia, hipoksia, iskemia, inflamasi, *autoimmunity*, apoptosis, transplantasi organ, infeksi bakterial, dan infeksi virus.

HIV sebagai *stressor* biologis berakibat terjadinya peningkatan kadar kortisol, dan *distress* akan mempengaruhi mekanisme *folding* protein dan *chaperonins* sehingga berbagai kemungkinan dapat terjadi antara lain mekanisme folding protein tetap berlangsung sehingga memungkinkan terjadinya translokasi, terjadi native protein, atau terjadi agregasi maupun denaturasi protein akibat pengaruh gen penyandi yang mengalami stress. Hsp90 diketahui mempunyai interaksi dengan berbagai protein regulator termasuk mempengaruhi reseptor hormon steroid. Reseptor kortisol merupakan salah satu target dari regulasi oleh Hsp90, serta diketahui adanya *chaperonins-steroid receptor interactions* (Smith, 1998). Keadaan ini akan menentukan bertahan atau tidaknya kelangsungan hidup sel. Selain itu kelangsungan hidup sel juga ditentukan oleh pengaruh *chaperonin* dan *anti-chaperonin antibodies*.



Gambar-5. Struktur *chaperonin 10* dan *chaperonin 60* (Ranford, 2000)

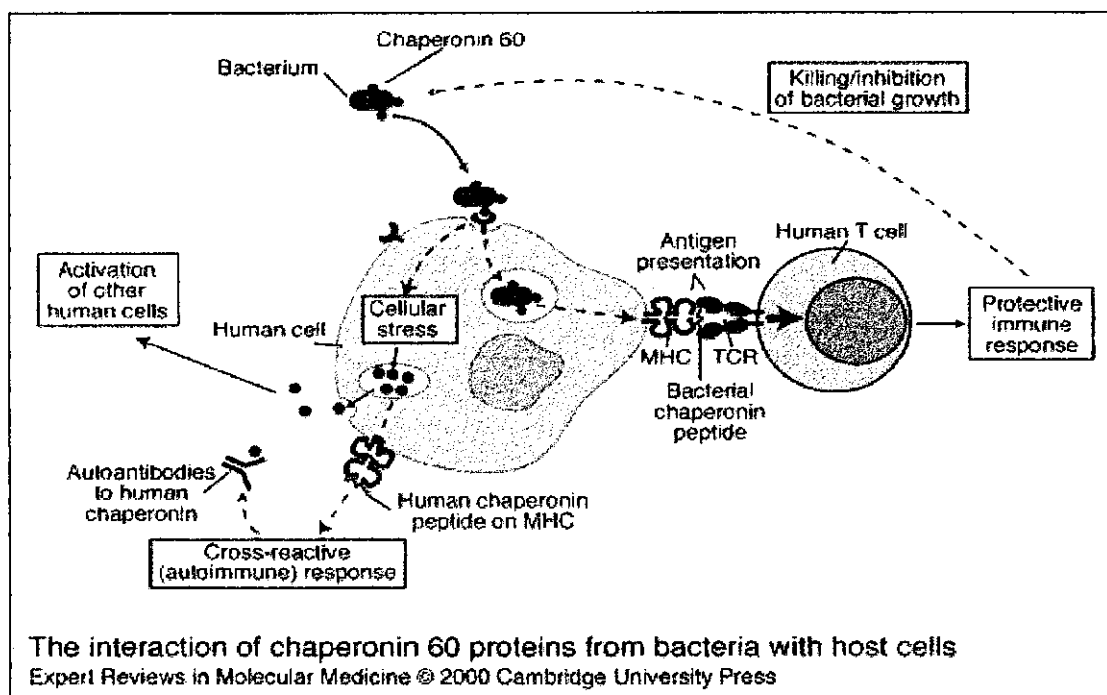
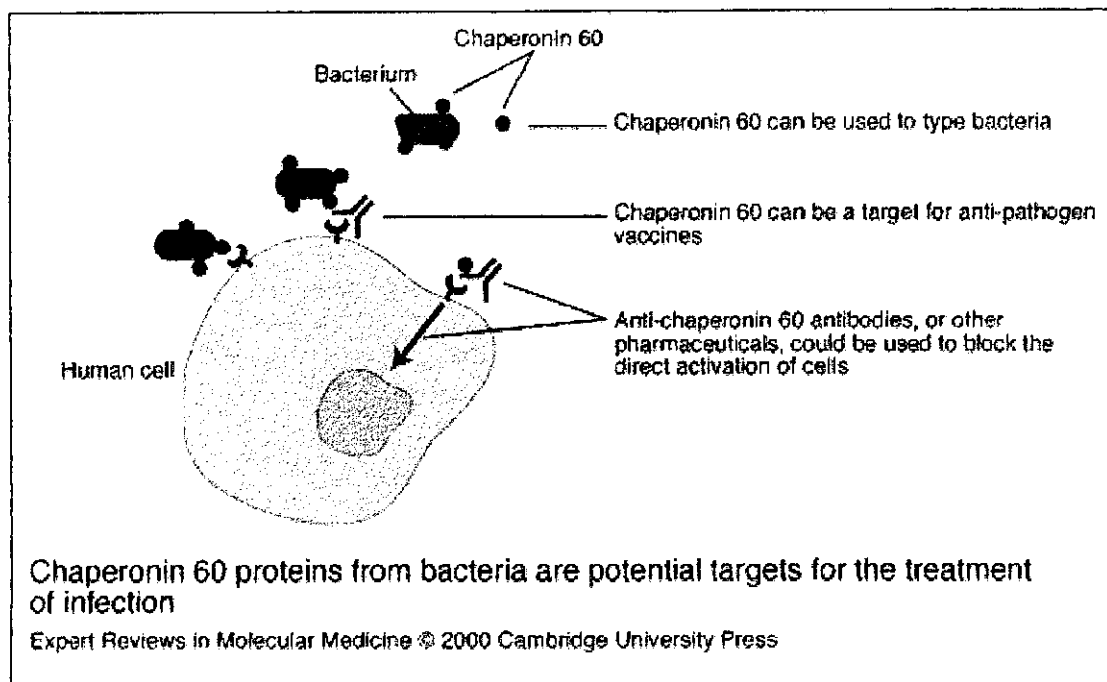
2.16 Mitokondria, *Reactive oxygen species* dan *Heat shock protein*

Mitokondria merupakan organela sel yang mempunyai berbagai fungsi yaitu: posforirasi oksidatif, sintesis hem, lipid, asam amino dan nukleotida. Mitokondria merupakan 25% dari volume setiap sel, dan setiap sel terdiri dari kurang-lebih 2000 mitokondria. Mitokondria dikenal sebagai pembangkit energi sel secara biokimiawi, lebih dari 90% kebutuhan energi sel diproduksi mitokondria. Mitokondria juga berperan mempertahankan homeostasis intraselular karena pengaruh *ROS*. Mitokondria memproduksi *ROS* tetapi aktifitasnya juga dipengaruhi *ROS*. Pengaruh *ROS* pada DNA mitokondria dapat mengakibatkan lebih dari 100 tipe modifikasi pada DNA, baik berupa perubahan epigenetik maupun mutasi. DNA mitokondria banyak mengandung guanine, reaksi oksidatif dapat menyebabkan perubahan guanine menjadi *8-oxoguanine (8-oxoG)* sehingga menyebabkan terjadinya lesi DNA serta

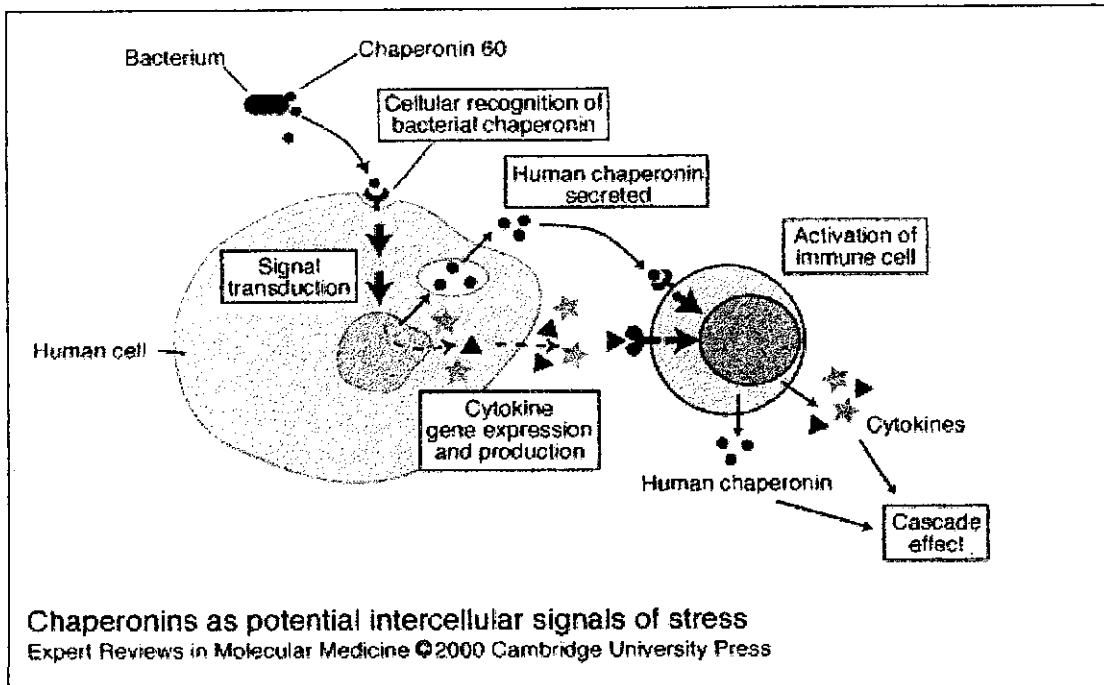
mutasi selama berlangsungnya replikasi DNA. *ROS* dapat menginduksi kerusakan sel terutama melalui DNA mitokondria sehingga mengalami *exhausted*, lesi, perubahan epigenetik, maupun mutasi sehingga kehilangan *quality control* terhadap proses sinyaling pada akhirnya dapat mengakibatkan *distress protein*, *distress molecular chaperones*, *distress chaperonins*, *distress Hsp* (Brown-Borg, 2003; Sing, 2003). Keadaan ini dapat menyebabkan perubahan perilaku Hsp yang berdampak pada mutasi atau perubahan epigenetik DNA inti.

Mitokondria merupakan organela sel yang memproduksi ATP untuk keperluan metabolisme dan mempertahankan kadar normal kalsium guna mempertahankan homeostasis di dalam sel. Gangguan dari fungsi mitokondria tersebut akan berdampak negatif berupa fragmentasi dan menuju kematian sel. Fragmentasi mitokondria terjadi antara lain oleh: (1) penurunan kadar antioksidan di dalam sel, (2) peningkatan kadar *ROS*, (3) peningkatan unsaturasi lipid pada permukaan dalam membran mitokondria (Hagen, 1998)

Mikroorganisme merupakan *stressor* kuat yang dapat mempengaruhi mekanisme proteksi sel dengan menginduksi molekul sinyal Hsp sehingga terjadi *missfolding* (denaturasi) pada protein intraseluler (Ranford, 2000). Hsp60 dan Hsp10 yang disekresi akibat infeksi oleh bakteri berpengaruh terhadap progresifitas penyakit karena dapat menimbulkan inflamasi, aktivasi leukosit, aktivasi sel-sel epitel maupun monosit untuk menstimulir produksi sitokin.



Gambar-6. Chaperonins sebagai sinyal interseluler (Ranford, 2000)



Gambar-7. Interaksi chaperonin 60 Bakteri dengan Sel Host (Ranford, 2000)

2.17 Pengaruh *Reactive Oxygen Species* (ROS) terhadap Gen Pengendali *Folding Protein* serta Hsp

Produksi ATP dan ROS oleh mitokondria meningkat pada infeksi HIV. Mitokondria tersusun dari empat komponen yaitu membran luar, membran dalam, intermembran dan matrik. Masing-masing komponen tersusun dari protein yang spesifik. Protein-protein penyusun mitokondria disandi oleh gen-gen inti dan hanya sebagian kecil protein mitokondria disandi oleh genom mitokondria. Protein mitokondria disandi oleh gen-gen inti yang disintesis ribosom sitosolik sebagai protein prekursor dan harus diimport ke dalam mitokondria. Protein prekursor mitokondria biasanya berupa rangkaian terminal NH₂.

Chaperonins dalam sitosolik pada pasca translasi protein diimport ke dalam mitokondria dengan difasilitasi Hsp70 (cHsp70). Di sitosol Hsp70 berikatan dengan

unfold protein dan melepaskan beberapa protein serta hidrolisis ATP. Ada beberapa pengaruh chaperonins terhadap *unfold* polipeptida pertama, mengalami pelipatan awal setelah membentuk kompleks dengan GroEL dan GroES akan terjadi pelipatan protein sempurna (Bhutani, 2002). Kedua, terjadi pelipatan yang belum sempurna tetapi kemudian terbentuk agregasi khususnya yang memiliki berat molekul rendah dan berakhir dengan pembentukan *inclusion body*. Ketiga, dari pelipatan yang belum sempurna tersebut terbentuk kompleks dengan DnaK dan DnaJ sehingga tidak terjadi folding. Keempat, dari *unfold* langsung mengalami degradasi (Gragerov, 1998; Gabai, 2002). Peran dalam proses pelipatan protein adalah Hsp70 disandi oleh berbagai gen famili SSA (SSA1, SSA2, SSA3, dan SSA4) (Endo, 1998). Mekanisme terjadinya import protein ke dalam mitokondria kinerja Hsp70 dan Hsp40 dikendalikan oleh DnaJ.

Di dalam kehidupan manusia protein termasuk *chaperonins* berperan di tiga peristiwa penting yaitu proses kelahiran, tumbuh-kembang, dan kematian. Dalam proses kematian, *chaperonins* berperan dalam dua peristiwa utama yaitu degradasi dan agregasi protein. Ada dua jalur degradasi yang melibatkan *chaperonins* yaitu jalur proteolisis lisosomal dan proteosome (*the death machine*).

Pada limfosit T-CD4 yang terinfeksi HIV, terjadi ekspresi rCD43 (sealophorin) serta meningkatnya aktivasi CD43. Peningkatan aktifitas CD43 akan menginduksi Th1 sehingga terjadi peningkatan produksi ROS, yang menyebabkan lesi pada DNA mitokondria. Lesi yang terjadi pada DNA mitokondria berpotensi menyebabkan perubahan epigenetik maupun mutasi genetik akibat perubahan susunan nukleotida. Keadaan tersebut dapat berpengaruh terhadap *chaperonins*.

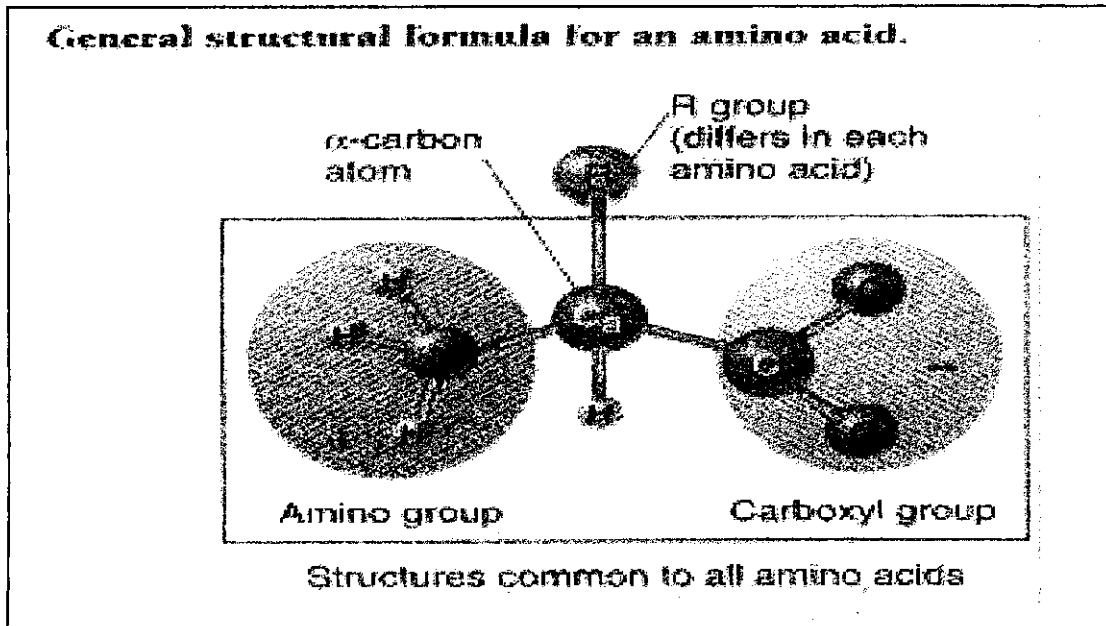
Pengaruh ROS yang begitu hebat menyebabkan *chaperonins* mengalami *distress* dan berubah perilaku. Perubahan perilaku *chaperonins* tersebut sangat mungkin menyebabkan terjadinya perubahan informasi kimia dan perubahan epigenetik, terjadinya mutasi akibat perubahan susunan nukleotida pada DNA inti. Perubahan tersebut dapat berupa substitusi, duplikasi atau delesi dari nukleotida yang merupakan penyusun DNA (Sismindari, 2000). Informasi genetik yang disimpan dalam suatu molekul DNA juga berubah karena sekuen dari nukleotida dalam segmen DNA dari suatu gen adalah merupakan bentuk dari kode genetik. Kode genetik tersebut merupakan kombinasi dari tiga nukleotida (triplet). Hampir semua kemungkinan kombinasi triplet tersebut menentukan satu asam amino dari 20 jenis asam amino penyusun protein, yakni produk akhir dari ekspresi gen. Untuk dapat diekspresi suatu gen awalnya diproses menjadi messenger RNA (mRNA). Proses tersebut disebut sebagai transkripsi. Hasil transkripsi tersebut akan berasosiasi dengan organel seluler, ribosom untuk ditranslasi atau diterjemahkan menjadi protein. Adanya fakta bahwa protein merupakan sebagian besar produk akhir ekspresi gen maka protein sangat penting bagi suatu kehidupan. Protein mempunyai peranan yang penting karena merupakan bagian dari berlangsungnya mekanisme suatu sel dapat mempengaruhi sel lain, melalui protein-protein yang terlibat dalam proses sinyaling yaitu protein G-binding, reseptor pada permukaan, dan protein kinase, serta *chaperonins*.

ROS dapat mengaktifkan rangkaian proses yang mengubah kadar satu atau lebih molekul sinyaling intraseluler termasuk *chaperonins* yang pada gilirannya meneruskan sinyal dengan cara merubah kondisi dari protein target. Selain *chaperonins*, mediator intraseluler yang banyak digunakan adalah Ca^{++} . Agar Ca^{++}

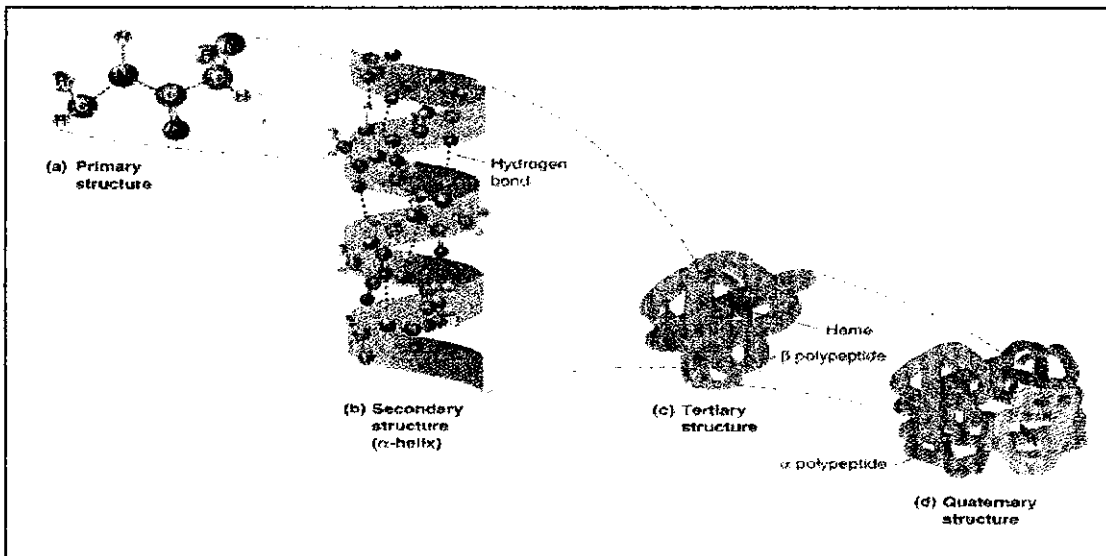
dapat berfungsi sebagai mediator intraseluler harus mampu merubah atau menurunkan konsentrasinya. Padahal akibat pengaruh ROS justru terjadi peningkatan mobilisasi Ca^{++} transmembran sehingga kinerjanya terganggu.

Hsp90 merupakan *heat shock protein* 90-kDa. Hsp90 merupakan protein spesifik yang terkait dari berbagai sinyaling termasuk reseptor steroid, p53, protein kinases, sintesis *nitric-oxide*, dan telomerase. Aktifitas Hsp90 meliputi siklus ikatan ATP dan hidrolisis. Berbagai peran Hsp90 adalah mengatur *folding* protein, terutama pada *folding* reseptor steroid, terkait dengan Hsp70, Co-chaperones, dan imunofilins (Scholz, 2001; Tanaka, 2001; Bailey, 2002). Interaksi Hsp90 dengan reseptor Hsp70 sangat heterokomplek. Penurunan kadar Hsp70 dan Hsp60 disertai peningkatan Hsp90 Co-chaperon p23. Meskipun p23 terikat langsung dengan ATP pada Hsp90 (Scholz, 2001). Mutasi genetik dari DNA mitokondria tersebut dapat memicu terbentuknya kompleks Hsp90 + Cdc37 yang pada akhirnya mengalami perubahan perilaku, menurunnya produksi ATP dan situasi ini mencetuskan timbulnya perubahan epigenetik dan mutasi DNA inti. DNA mitokondria yang mengalami lesi tersebut juga menstimulir terbentuknya kompleks Hsp70 + Bag1/Hip menyebabkan kompleks ini mengalami perubahan perilaku dari Hsp70 dalam arti aktifitas Hsp70 dihambat oleh Bag1/Hip. Perubahan perilaku Hsp90 dan Hsp70 tersebut berpengaruh terhadap terjadinya mutasi DNA inti yang mencetuskan timbulnya apoptosis. DNA mitokondria yang mengalami lesi menyebabkan keluarnya sitokrom C keluar dan memicu Apaf-1, kemudian dapat mengaktifasi caspase-9 dan secara simultan mengaktifir caspase-3 sehingga mempercepat terjadinya apoptosis. Menurun atau berubahnya fungsi Hsp70 dan Hsp90 menyebabkan mekanisme *folding* protein

terganggu, terjadi *missfolding* maupun agregasi protein yang irreversibel sehingga struktur protein tiga dimensi tidak bisa dipertahankan.



Gambar-8. Struktur Asam Amino (Russell, 2002)



Gambar-9. Empat tingkat struktur protein (Russell, 2002)

Folding protein dikendalikan melalui kode genetik termasuk dalam proses translasi asam amino dari struktur dimensi tunggal hingga struktur tiga dimensi (Horowitz, 1998). *Missfolding* protein juga dapat terjadi akibat kendali GroER

melalui upaya melambankan maupun mencegah terjadinya mekanisme *folding* protein.

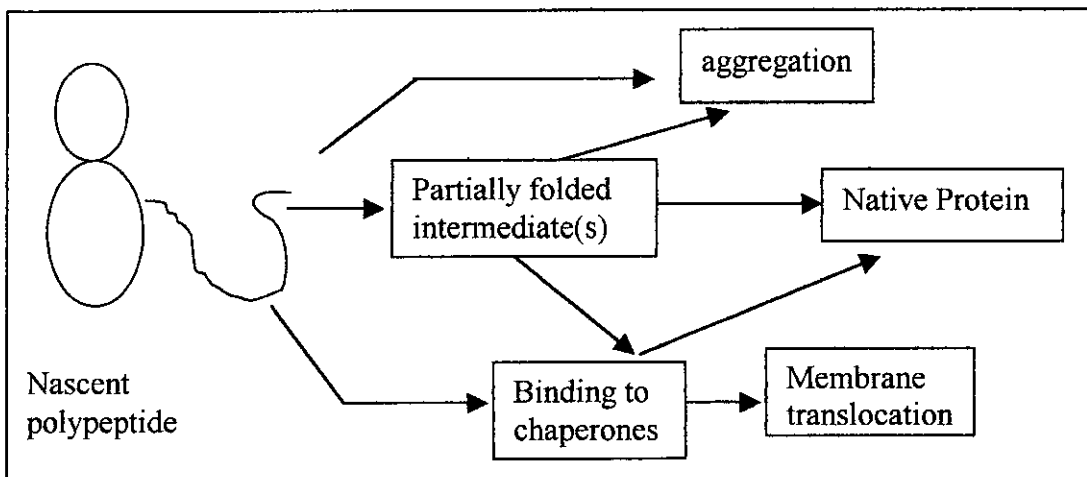
Protein merupakan komponen retikulum endoplasmik, aparatus golgi, bagian luar inti, ribosom, dan endosom (Brewer, 1998). Didalam retikulum endoplasmik mulai terjadi *folding* pembentuk kompleks protein heterotipik. Apabila mekanisme *quality control* gagal maka akan terjadi degradasi protein. *Chaperonins* berperan pada sintesis protein di ribosom, maturasi di retikulum endoplasmik serta mengeliminir protein yang gagal maturasi.

Chaperonins mempunyai peranan yang penting didalam interaksi protein dengan *molecular chaperones*, *folding* protein, pada berbagai peristiwa kehidupan terutama dalam sintesis, import protein, translokasi dan degradasi protein (Stuart, 1998). Selama kehidupan individu, protein diperlukan dalam tiga peristiwa penting yaitu kelahiran, tumbuh- kembang, serta kematian. Dalam ke tiga peristiwa tersebut *chaperonins* mempunyai peranan penting baik *chaperonins* umum dan sering dikenal seperti Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp100 maupun *chaperonins* yang lebih spesifik seperti *calnexin*. Peran dalam mekanisme *folding* maupun maturasi protein, translokasi protein transmembran, serta berbagai fungsi *chaperonins* sebagai *pro-peptides*, proline dan isomerisasi disulfide. Dalam peristiwa kematian sel *chaperonins* juga berperan, terutama dalam degradasi proteolitik serta insolubilisasi ireversibel.

Penentuan struktur tertentu serta supaya dapat menjalankan fungsinya, *chaperonins* tersebut semuanya tidak lepas dari peranan gen pengendali. GroEL dari famili Hsp60 dan dengan kombinasi dengan *co-chaperonin* GroES memfasilitasi terjadinya *folding* protein terutama mencegah terjadinya agregasi protein. Peran

dalam *folding* berbagai protein, *chaperonins* dibantu oleh dua kofaktor yaitu *protein disulfide isomerase* (PDI) dan *peptidyl prolyl isomerase* (PPI) yang terdapat di dalam retikulum endoplasmik.

Folding protein dikendalikan melalui kode genetik termasuk dalam proses translasi asam amino dari struktur dimensi tunggal hingga struktur tiga dimensi (Brewer, 1998; Bhattacharyya, 2002). *Missfolding* protein juga dapat terjadi akibat kendali GroER melalui upaya melambankan mekanisme maupun mencegah terjadinya *folding* protein.



Gambar-10. Peran Chaperonins pada Folding dan Sintesis Protein Baru (Fink, 1998).

2.18 Heat Shock Protein 70 (Hsp70)

Heat shock protein (*Hsp*) merupakan famili protein protektif endogen. Hsp70 merupakan protein terlarut sitosol yang utama dapat terekpresi pada kondisi normal maupun stres, berperan sebagai transduksi sinyal, hormon respon, respon stres dan kematian sel yang mekanisme belum diketahui (Beck, 2000; Nollen, 2002). Hsp70 merupakan molekuler chaperone yang teraktivasi oleh berbagai keadaan termasuk

kondisi *heat stress*. Hsp70 akan berkoordinasi dengan chaperone dan cochaperone yang lain dan berinteraksi intra-molekul antara N-terminal dan inter-molekul serta C-terminal domain. Aktivitas molekuler *chaperone heat shock protein 70-kDa* (Hsp70) adalah dalam hal fungsi, mencegah agregasi, dan regulasi stabilitas protein selular yang penting termasuk reseptor hormon steroid, protein kinases, regulasi siklus sel dan kematian sel terprogram calmodulin, Raf1, (Tanaka, 2001; Bhutani, 2002; Nollen, 2002). Jadi berbagai kondisi tersebut menunjukkan adanya berbagai tempat pengikatan peptida pada Hsp70. Bila sel dihadapkan pada kondisi stres maka Hsp termasuk Hsp70 mempunyai peranan penting untuk melindungi sel dari pengaruh stres, jadi bersifat sitoproteksi (Nollen, 2002). Didalam menjalankan fungsinya sebagai transduksi sinyal Hsp70 didampingi oleh co-chaperone Bag 1, sebagai hormon respon didampingi oleh co-chaperone Bag 1 dan Hip, yang akan berinteraksi dengan reseptor steroid maupun apaf-1 yang mekanismenya belum diketahui (Nollen, 2002).

2.19 *Reactive Oxygen Species* Penyebab Kegagalan Repair DNA Inti

ROS dapat mencetuskan timbulnya berbagai penyakit termasuk pancreatitis akut, akibat lesi sel β pankreas. Hal tersebut diketahui dari adanya peningkatan kadar peroksidasi lipid yang merupakan indeks kerusakan membran oksidatif pada penderita dengan pankreatitis akut. Terapi *Scavenger* terhadap ROS dapat menunjukkan hasil baik pada penyembuhan pankreatitis. Situasi seperti ini tentunya dapat diekstrapolasikan pada limfosit T-CD4 yang terinfeksi HIV. ROS dapat merupakan trigger molekul pada berbagai proses inflamasi yaitu secara langsung dapat merusak

membran biologis, akumulasi neutrofil dan perlekatan pada dinding kapiler. Keadaan ini diasumsikan bahwa ROS mempunyai peranan penting pada inflamasi pankreas dan munculnya komplikasi ekstra pankreas. Kematian sel-sel dalam pankreas akibat ROS dapat terjadi melalui nekrosis maupun apoptosis (Song, 2003).

Protein Ku70 (70-kDa) dan Ku80 (80-kDa) merupakan regulator pengikat DNA sub unit *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) yang terdiri dari 470-kDa *catalytic* (DNA-PKcs) dan protein Ku. Protein Ku70 dan Ku80 sebagai regulator DNA-PK dan awal dari proses *repair DNA double-strand break* yang disintegrasikan, menghasilkan fragmentasi oleh aktifitas DNA-PK setelah mengikat DNA double strand yang disintegrasikan tersebut. Stress oxidative dapat menyebabkan kematian sel melalui apoptosis dengan menghambat peran dan menurunkan kadar Ku70 dan Ku80 sehingga menyebabkan kegagalan perbaikan (repair) DNA inti serta kematian sel acinar pankreas AR42J (Song, 2003).

Konseling Prates HIV (Depkes RI, 2003 ; Kaplan, 2003))

Tujuan: membuat klien mampu memutuskan apakah dirinya perlu memeriksakan status HIV nya atau tidak, dengan segala konsekuensinya.

Pelaksana: konselor yang memahami masalah psikologis dan pemeriksaan serta penilaian hasil pemeriksaan laboratorium HIV, penyakit dan terapi.

Isi konseling: konseling prates mempunyai 5 prinsip yaitu :

1. Motif pelaksanaan sukarela
2. Interpretasi hasil tes:
 - a. penapisan vs konfirmasi

- b. Tanpa gejala vs gejala nyata
 - c. pemahaman bahwa infeksi HIV dan dampaknya tidak dapat sembuh namun ODHA dapat tetap produktif
 - d. Infeksi oportunistik dapat diobati
3. estimasi hasil
- a. kesiapan mental-emosional penerimaan hasil pemeriksaan
 - b. risiko bukan harapan akan hasil
 - c. periode jendela
4. Membuat rencana jika didapatkan hasil
- a. apa yang harus dilakukan jika hasil positif atau negatif
 - b. memperkirakan dukungan dari orang dekat
 - c. membangun pemahaman hidup sehat dan mendorong perilaku sehat
5. Membuat keputusan melakukan tes apa tidak

Beberapa hal penting pada konseling prates HIV (Kaplan, 2003):

1. Diskusikan arti hasil positif dan jelaskan penyimpangan (misalnya, tes mendeteksi pemaparan terhadap virus AIDS; bukan merupakan tes untuk AIDS).
2. Diskusikan arti hasil negatif (misalnya, serokonversi memerlukan waktu, perilaku resiko tinggi yang baru dilakukan mungkin memerlukan pengujian susulan).
3. Siaplah untuk mendiskusikan rasa takut dan kekhawatiran pasien (rasa takut yang tidak realistis mungkin memerlukan intervensi psikologis yang sesuai).

4. Diskusikan mengapa tes diperlukan. (tidak semua pasien akan mengakui memiliki perilaku risiko tinggi).
5. Galilah kemungkinan reaksi pasien terhadap hasil yang positif (misalnya, “saya akan bunuh diri jika positif”). Ambillah langkah yang diperlukan untuk mengintervensi kemungkinan reaksi yang membahayakan.
6. Galilah reaksi masa lalu terhadap stres yang parah.
7. Diskusikan konfidensialitas masalah yang relevan dengan situasi tes (misalnya, apakah ini merupakan lingkungan anonim atau nonanonim?). Beritahukan pasien tentang pilihan tes lain dimana konseling dan pengujian dapat dilakukan secara anonim (misalnya, dimana hasilnya tidak dijadikan bagian permanen kartu rumah sakit). Diskusikan siapa yang dapat melihat hasil tes.
8. Diskusikan kepada pasien bagaimana menjadi seropositif dapat mempengaruhi status sosial (misalnya, perlindungan asuransi kesehatan dan jiwa, pekerjaan dan perumahan).
9. Galilah perilaku risiko tinggi dan anjurkan intervensi untuk menurunkan risiko.
10. Catatlah diskusi dalam kartu.
11. Berikan waktu pada pasien untuk bertanya.

Konseling Pascates HIV (Depkes RI, 2003; Kaplan, 2003):

Tujuan: membuat klien mampu menerima hasil pemeriksaan status HIVnya dan menyesuaikan diri dengan konsekuensi dan risikonya, membuat perubahan perilaku menjadi perilaku sehat.

Pelaksana: konselor yang memahami masalah psikologis dan pemeriksaan serta penilaian hasil pemeriksaan laboratorium HIV, penyakit dan terapi.

Isi Konseling: (1) menilai keadaan psikososial terkini, (2) menilai pemahaman klien, (3) membacakan hasil, (4) mendukung emosi klien, (5) manajemen pemecahan masalah: gali masalah, pahami dan pahami pada klien, susun rencana, membantu membuat rencana menghadapi kehidupan pascapenetapan hasil dengan perubahan perilaku ke perilaku sehat, (6) bila ada masalah psikiatri yang memerlukan terapi obat dan psikoterapi, rujuk pada psikiater atau bekerjasama dengan psikiater.

Beberapa hal penting pada konseling pascates HIV (Kaplan, 2003):

1. Interpretasi hasil tes:

Jelaskan penyimpangan (misalnya, “tes yang negatif masih berarti anda dapat tertular virus dimasa depan; ini tidak berarti anda kebal terhadap AIDS”).

Tanyakan tentang pemahaman pasien dan reaksi emosionalnya terhadap hasil tes.

2. Anjurkan pencegahan penularan (diskusikan dengan berhati-hati tentang perilaku risiko tinggi dan petunjuk untuk pencegahan penularan).
3. Anjurkan follow-up pasangan seksual dan kontak jarum.

4. Jika hasil tes positif, anjurkan untuk menghindari mendonorkan darah, sperma, atau organ dan jangan menggunakan pisau cukur, sikat gigi dan barang lainnya yang mungkin mengandung darah secara bersama-sama.

Rujukan untuk dukungan psikologis yang tepat. Pasien dengan HIV positif sering memerlukan jalur kepada tim kesehatan mental (jalur yang diperlukan untuk perawatan rawat inap atau rawat jalan; pertimbangkan terapi suportif individual atau kelompok). Tema yang sering adalah terguncang saat diagnosis, rasa takut akan kematian, dan akibat sosial, duka cita terhadap kemungkinan kehilangan, dan harapan yang kecil akan berita baik. Juga carilah adanya depresi, keputusasaan, rasa marah, frustrasi, rasa bersalah, dan tema obsesional. Aktivasikan dukungan yang tersedia bagi pasien (misalnya, keluarga, teman-teman, pelayanan masyarakat).

2.20 *The 5 Stages of Grief*

Proses penerimaan penyakit terminal dan kematian dikemukakan oleh Dr. Elizabeth Kubler-Ross. Kesedihan yang dialami oleh setiap individu ditentukan oleh berbagai faktor yang kompleks, multidimensional. Tetapi pada umumnya proses penerimaan kondisi penyakit terminal dan kematian melalui 5 tahap. Kelima tahap tersebut pada umumnya adalah sebagai berikut. Pertama, *Denial and Isolation* pada tahap ini penderita mengalami ketakutan terhadap penyakit terminal yang dialaminya dan mengatakan *No, not me*. Kedua, *Anger* pada tahap ini penderita sering bertanya, *why me?*. Dia merasa marah dan iri, frustrasi dan merasa kurangnya dukungan maupun bantuan. Dia marah terhadap keluarga, dokter, perawat, teman-temannya maupun semua pihak yang ikut merawat dan memberikan perhatian. Ketiga,

Bargaining pada tahap ini penderita sudah mulai melakukan perundingan terhadap tuhan, kerabat maupun penyakit yang dideritanya. Individu memerlukan waktu yang lebih lama untuk dapat disembuhkan dari penyakitnya maupun menyelesaikan pekerjaan yang masih tersisa. Keempat, *Depression and Withdrawal* pada tahap ini penderita memiliki perasaan yang besar untuk kehilangan segala-galanya, kehilangan janji-janji dan kelompok kerja atau akan kehilangan segala sesuatu yang diperoleh dari keluarga maupun tuhan. Penderita sering mengalami depresi serta menutup diri. Lingkungan yang berusaha memberikan dukungan serta suasana yang menggembirakan sangat bermanfaat bagi penderita pada tahap ini. Kelima, *Acceptance* ini merupakan suatu tahap akhir untuk direnungkan dan mengharapkan suasana yang tenang. Penderita umumnya merasa letih dan lelah sebelum pada akhirnya pergi untuk selama lamanya. Ini merupakan saat penerimaan kematian yang tidak mungkin dihindari bagi penderita serta penerimaan kenyataan kematian penderita tersebut bagi keluarga dan teman-temannya (Kubler-Ross and TLC Group, 2005).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

DAN

HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

HIV merupakan stressor biologis dapat mempengaruhi lingkungan internal maupun eksternal sel. Menurut Selye, penampilan respons biologis terhadap stressor melalui *general adaptation syndrom* (GAS). Sel saling berinteraksi melalui molekul sinyal. Rangkaian molekul sinyal terdiri atas reseptor, enzim, saluran, dan protein pengatur, Hsp (Stryer, 1995). Astrosit memiliki daya tangkap yang tinggi terhadap sinyal lingkungan. Penginderaan serta pengolahan rangsang terlaksana melalui kaskade transduksi sinyal. Stressor virus akan meningkatkan aktivitas aksis HPA melalui *corticotropin releasing factors* (CRF). Dampaknya dialami berbagai sel termasuk astrosit, mikroglia. Astrosit, mikroglia menjadi aktif, mensekresi sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α), produksi *reactive oxygen species* (ROS). Sitokin tersebut, bersama serotonin, norepinefrin, dan asetilkolin, mempengaruhi *paraventriculer nucleus* (PVN) di hipotalamus, dalam hitungan menit sejak dipicu stressor memproduksi CRF (Black, 1994). CRF mengaktifkan reseptor basofil pada hipofisis anterior, menginduksi polipeptid *proopiomelanocortin* (POMC) memproduksi ACTH. ACTH menstimuler spongiosa zona fasikulata korteks adrenal untuk memproduksi kortisol sebagai hormon stres (Chrousos, 1995; Fink, 1998; Seeley, 1998; Viviani, 2001). Kortisol berkomunikasi dengan Hsp melalui *chaperone - steroid receptor interactions* (smith,1998).

Hsp70 merupakan salah satu dari molekul *chaperone*, berupa protein seluler yang di induksi transkripsi bila sel terpapar stressor. Hsp70 bersama Hsp90 sebagai molekul *chaperone* mempunyai kontribusi terhadap reseptor kortisol melalui *chaperonins-steroid receptor interactions* (Smith, 1998; Beck, 2000; Hung, 2002). Hsp70 mempunyai berbagai peran termasuk pelipatan polipeptida sehingga terbentuk struktur protein tiga dimensi, mencegah salah lipat, atau justru tidak terjadi pelipatan, mencegah agregasi, import protein, translokasi dan degradasi protein (Stuart, 1998; Bhattacharyya, 1999; Bush, 1999). Protein utama dan rangkaian proses apoptosis melibatkan mitokondria, Hsp70 mempunyai peran penting sebagai antiapoptotik. Hsp70 sebagai protein stres mempunyai peran kunci didalam proses kehidupan dan kematian sel akibat kerusakan DNA (Benyamin, 1998). Meningkatnya Hsp70 akan menghambat apoptosis dari berbagai sel (Benyamin, 1998).

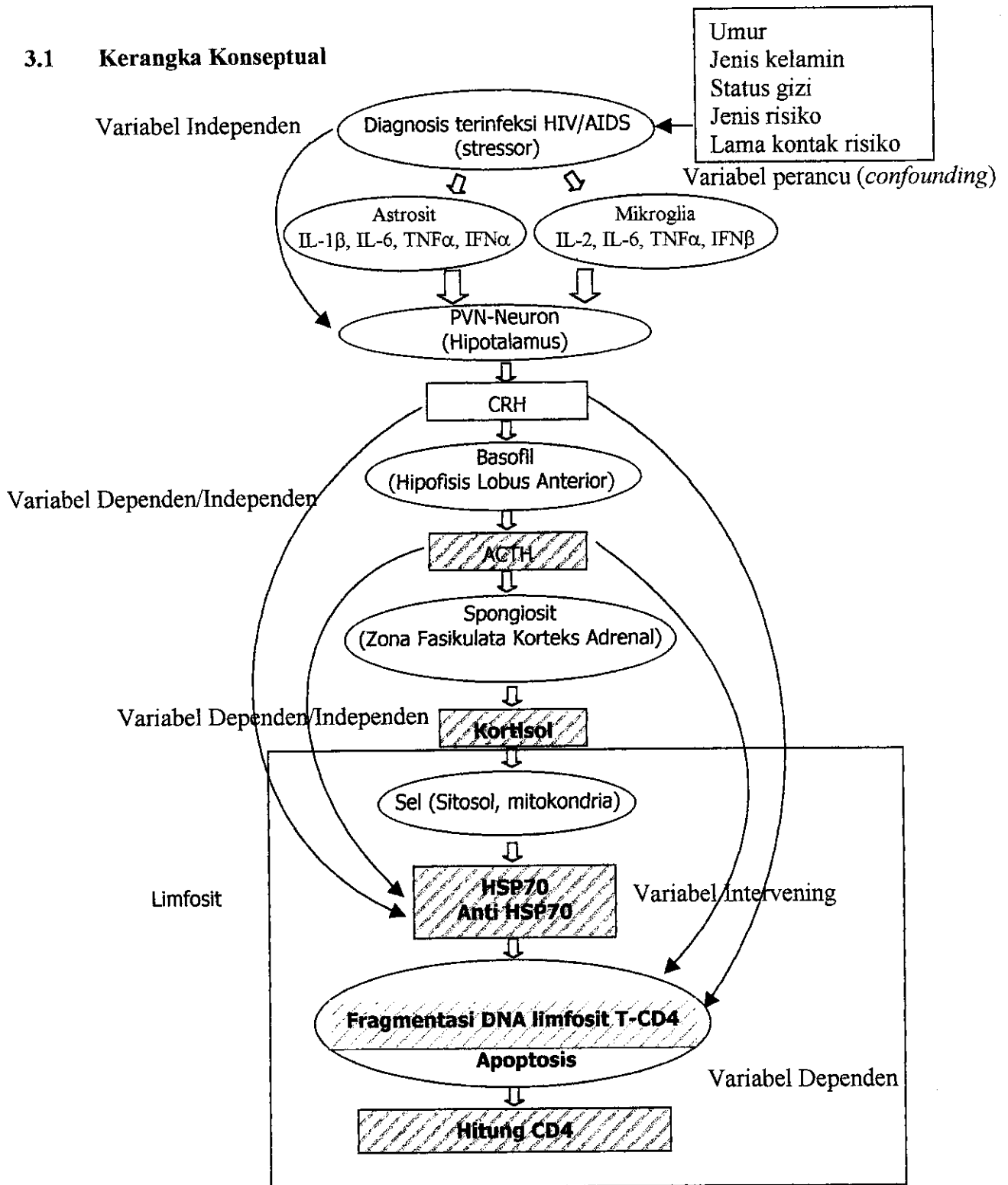
HIV merupakan stressor biologis tentu dapat mendorong terjadi gangguan pelipatan protein serta terjadinya protein abnormal.

Hsp70 dapat menghambat berbagai reseptor protein virus (Vpr) yaitu CD40, CCR5, CXCR4 yang mempunyai kontribusi kuat terhadap patogenesis infeksi. Berbagai reseptor dan ko-reseptor tersebut terdapat pada limfosit T yang menjadi target HIV.

Atas dasar berbagai pernyataan diatas, Hsp70 diduga dapat dipakai sebagai landasan imunopatogenesis penyakit infeksi HIV serta progresivitas menuju AIDS.

Kerangka konseptual penelitian ini secara global dapat digambarkan sebagai berikut :

3.1 Kerangka Konseptual



3.2 Hipotesis Penelitian

Ada perubahan jumlah limfosit T, CD4, kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, jumlah *cell death* dalam darah kelompok terinfeksi HIV/AIDS dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV/AIDS pada fase post pernyataan diagnosis (fase akut dan kronis).

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian

4.1.1 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini termasuk penelitian observasional dengan melakukan pengamatan dan pengukuran terhadap pelbagai variabel subyek penelitian menurut keadaan alamiah. Sebagai subyek penelitian adalah penderita terinfeksi HIV/AIDS. Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan peran infeksi HIV terhadap apoptosis limfosit T-CD4 melalui jalur *heat shock protein70* (Hsp70) pada kelompok risiko tinggi yang terinfeksi HIV dengan kelompok risiko tinggi tetapi belum terinfeksi HIV sebagai pembanding. Pada setiap subyek dari ke dua kelompok di lakukan *follow-up* selama 30 hari.

4.1.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang akan dipakai adalah *panel study*. Kelompok yang dibandingkan adalah kelompok risiko tinggi yang terinfeksi HIV dengan kelompok risiko tinggi tetapi belum terinfeksi HIV. Pada kedua kelompok tersebut di observasi kadar ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4, jumlah CD4, jumlah limfosit T.

Pada penelitian ini digunakan pembanding dari kelompok risiko tinggi tetapi belum terinfeksi HIV sehingga perubahan kadar ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti

Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4, jumlah CD4, jumlah limfosit T betul-betul oleh pengaruh HIV.

Guna memperoleh kesahihan (validitas) interna yang tinggi atau asosiasi yang diperoleh hanya dipengaruhi variabel yang diteliti, dilakukan upaya-upaya meminimalkan kesalahan acak, nilai bias, dan faktor perancu (*confounding*), maka penetapan subyek terpilih (*eligible subjects*) atau sampel yang dikehendaki (*intended sample*) yang merupakan bagian dari populasi terjangkau yang direncanakan untuk diteliti langsung.

Karena faktor transmisi HIV mempengaruhi perjalanan penyakit yang diduga akan mempengaruhi hasil penelitian (jumlah CD4), maka perlu dilakukan stratifikasi jenis faktor risiko. Hal tersebut dimaksudkan agar diperoleh subkelompok (*strata*) yang lebih homogen. Randomisasi dilakukan pada tiap strata secara terpisah, kemudian subyek yang terpilih digabungkan kembali dalam kelompok yang sesuai. Jadi dalam penelitian ini dilakukan random sampling sederhana di dalam strata (*stratified random sampling*), dengan menggunakan sampling acak sederhana.

Pemilihan sampel yang dikehendaki dari kelompok penderita terinfeksi HIV dilakukan dengan cara memilih secara sampling berdasarkan strata. Sedangkan untuk mendapatkan sampel yang homogen dari kelompok risiko tinggi yang terinfeksi HIV dengan kelompok risiko tinggi tetapi belum terinfeksi HIV sebagai pembanding, dilakukan secara *matching* individual dalam hal umur, jenis kelamin, status gizi, jenis risiko dan lama kontak dengan risiko tinggi.

Pengambilan darah tepi dilakukan 3 kali yaitu: pemeriksaan pertama (data dasar), pengambilan darah tepi dilakukan pada hari ke-1 pada saat kriteria inklusi di

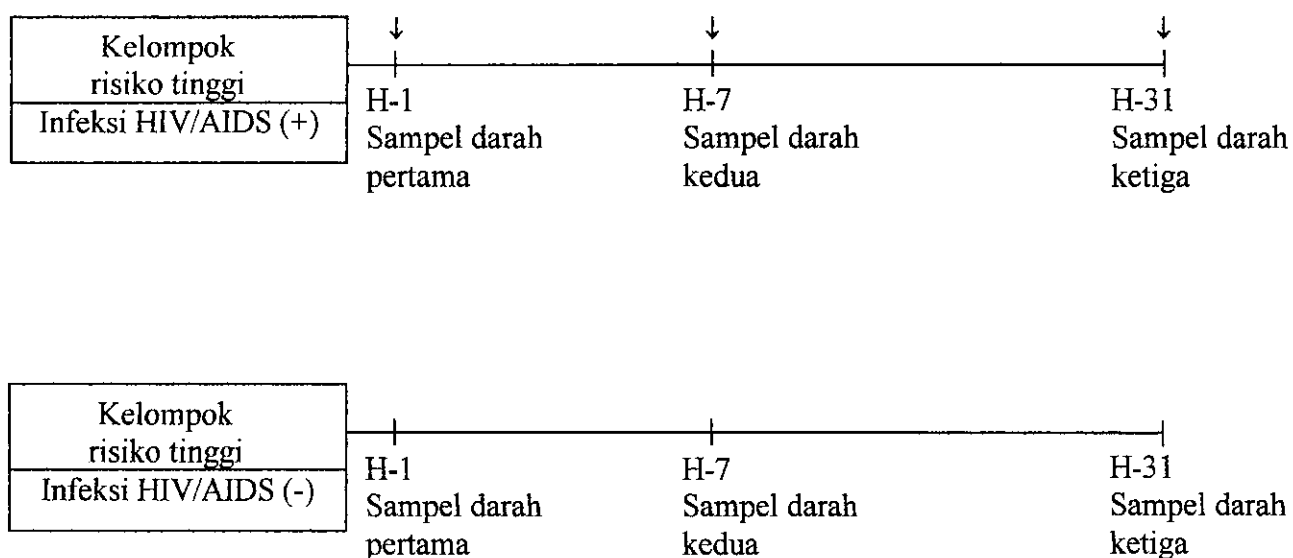
penuhi, tetapi penderita belum mengetahui status terinfeksi HIV. Penderita menyatakan tidak keberatan mengikuti prosedur penelitian dan membubuhkan tanda tangan pada surat pernyataan persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*) sebagai subyek dan persetujuan tindakan medis berupa pengambilan sampel darah. Pemeriksaan kedua dilakukan pada hari ke-7. Penetapan hari ke-7 didasarkan atas pertimbangan bahwa stres akut terberat berlangsung pada 7 hari pertama setelah diagnosis terinfeksi HIV. Pemeriksaan ketiga, dilakukan pada hari ke-31, karena stres akut umumnya berlangsung dua jam sampai hari ke-15 setelah mendapat stresor. Setiap subyek mendapatkan konseling pre-tes dan pos-tes serologi HIV.

Tiga kali pemeriksaan tersebut dimaksudkan untuk mendapatkan data yang menyangkut variabel bebas dan variabel terikat. Pemeriksaan dari bahan darah meliputi : ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4, jumlah limfosit T, jumlah CD4. Dari bahan darah tersebut juga dilakukan pemeriksaan : darah lengkap untuk mengetahui status hemoglobin dan limfosit total; pemeriksaan SGPT, albumin, serta serum kreatinin untuk mengetahui status gizi.

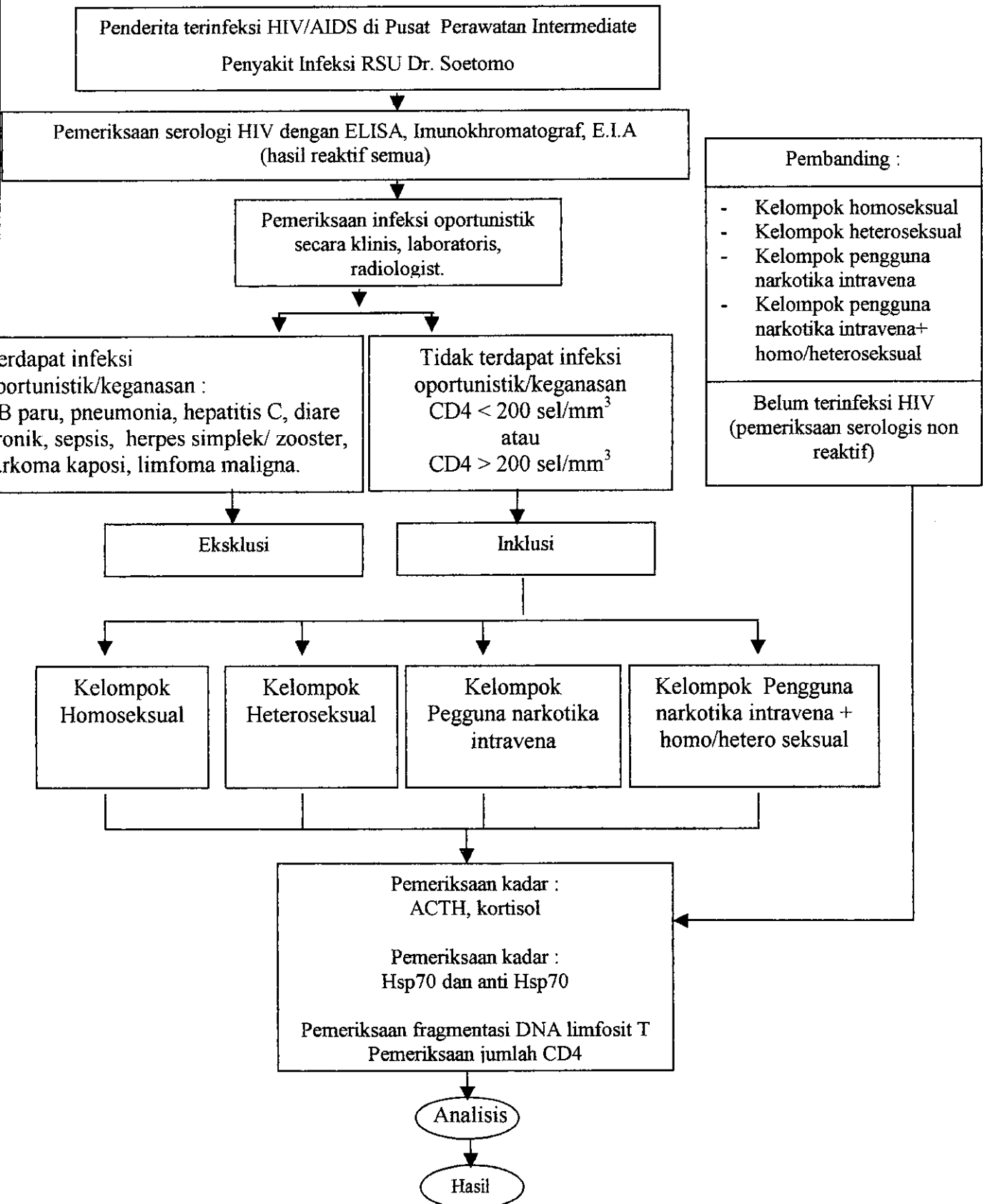
Guna memperoleh kesahihan (*validitas*) eksterna sehingga hasil penelitian ini nantinya dapat diterapkan pada kelompok yang lebih luas, maka untuk kesahihan eksterna pertama subyek penelitian diambil dari populasi terjangkau yaitu penderita yang datang / berada di pusat perawatan intermediate penyakit infeksi dan dari populasi terjangkau ke populasi target yaitu individu berisiko tinggi yang merupakan kesahihan eksterna kedua.

4.1.3 Bagan Rancangan Penelitian

Untuk mendapatkan sampel yang sesuai dengan perjalanan infeksi HIV, maka dilakukan *follow-up* selama 30 hari dengan pertimbangan bahwa stres akut muncul 2 jam hingga 15 hari dilanjutkan stres kronis sejak diketahui adanya stresor biologis HIV. Stres biologis (Hans Selye) berat berlangsung terutama pada 7 hari pertama.



4.1.4 Kerangka Operasional Penelitian



4.2 Populasi, Besar sample dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Penelitian dilakukan pada populasi terjangkau (*accessible population*) yaitu penderita terinfeksi HIV/AIDS, umur 15-65 tahun di Pusat Perawatan Intermediate Penyakit Infeksi RSUD dr Soetomo Surabaya, tahun 2004.

4.2.2 Penghitungan Besar Sampel

Untuk menentukan besar sampel, dilakukan penelitian pendahuluan pengukuran jumlah CD4 pada kelompok risiko tinggi (kelompok homoseksual, heteroseksual multipartner, pengguna narkotika intravena, campuran/ pengguna narkotika intravena dan juga aktif kontak seksual (homo/heteroseksual) yang terinfeksi HIV/AIDS dengan hasil sebagai berikut:

| | Homoseksual | Heteroseksual multipartner | narkotika intravena | Campuran |
|--------|-------------|----------------------------|---------------------|----------|
| Rerata | 198,77 | 243,48 | 303,25 | 345 |
| SD | 159,43 | 250,63 | 247,13 | 306,08 |

Penghitungan besar sampel dipakai rumus :

$$n = Z^2 \sum_{h=1}^L \frac{N_h^2 P_h (1-P_h)}{w_h} / [N^2 d^2 + Z^2 \sum_{h=1}^L N_h^2 P_h (1-P_h)]$$

$$n = \frac{1,96^2 \left[\frac{(38^2 \cdot 159,43^2)}{38} + \frac{107^2 \cdot 250,63^2}{107} + \frac{115^2 \cdot 247,13^2}{115} + \frac{8^2 \cdot 306,08^2}{8} \right]}{268^2 \cdot 25^2 + 1,96^2 (38 \cdot 159,43^2 + 107 \cdot 250,63^2 + 115 \cdot 247,13^2 + 8 \cdot 306,08^2)}$$

Keterangan :

$Z_{1-\alpha/2}$ = Harga normal baku (luas area dibawah luas normal baku)

α = 0,05 ; $Z = 1,96$

N = Besar populasi penderita terinfeksi HIV/AIDS (268)

N_h = Besar populasi pada strata ke-h (berdasarkan data th. 2003,
 $N = 268$)

Strata I (homoseksual) = 14% (38)

Strata II (heteroseksual multipartner) = 40% (107)

Strata III (pengguna narkotika intravena) = 43% (115)

Strata IV (campuran) = 3% (8)

σ_n = Simpangan baku populasi pada strata ke-h (berdasarkan SD
CD4)

Strata I SD = 159,43

Strata II SD = 250,63

Strata III SD = 247,13

Strata IV SD = 306,08

d = Batas kesalahan yang dapat ditolelir (ketelitian
pemeriksaan) = 25

W_h = Fraksi observasi pada strata ke-h

Diambil alokasi strata setara $W_1=W_2=W_3=W_4=0,25$

Dari perhitungan tersebut didapatkan hasil $n = 14,455$, dibulatkan menjadi 14.

n untuk strata I = 3 penderita, strata II = 4, strata III = 4, strata IV = 3 penderita.

Jadi besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini 14 penderita terinfeksi HIV/AIDS dengan pembanding juga 14 orang risiko tinggi tetapi belum terinfeksi HIV/AIDS.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Pada waktu skrining dilakukan pemeriksaan serologi HIV, CD4, foto toraks, serta pemeriksaan lain ke arah kecurigaan adanya infeksi oportunistik (kandidiasis oris, endokarditis, tuberkulosis, diare infeksius, dll). Sebelum pemeriksaan dilakukan konseling pre-tes dan pernyataan persetujuan pemeriksaan serologi HIV dengan membubuhkan tanda tangan pada lembar persetujuan setelah penjelasan (PSP) atau *informed consent*. Sampel adalah bagian (subset) dari populasi yang dipilih dengan cara tertentu hingga dianggap mewakili populasinya. Subyek terpilih (*eligible subjects*) atau sampel yang dikehendaki dalam penelitian ini adalah penderita terinfeksi HIV/AIDS yang memenuhi kriteria penerimaan/inklusi.

Adapun Pengambilan Sampel Penelitian sebagai berikut:

1. Pemilihan sampel yang dikehendaki dari kelompok penderita HIV/AIDS dilakukan dengan cara memilih secara *sampling* berdasarkan strata atau

subkelompok risiko tinggi, sehingga diperoleh subkelompok homoseksual, heteroseksual dengan multipartner, pengguna narkotika intravena, pengguna narkotika intravena tetapi juga aktif kontak seksual (homo/heteroseksual).

2. Karena besar kemungkinan terdapat hasil yang akan memberikan nilai bias yang jelas berbeda, maka dalam *sampling* tidak dilakukan terhadap semua subyek sebagai satu kesatuan, guna menghindari perolehan sampel dengan variasi yang sangat besar serta menghindari hasil penelitian (jumlah CD4) yang bias. Untuk mengatasi hal tersebut dilakukan stratifikasi atau pemilihan berdasarkan strata.
3. Pada penelitian ini sampel dipilih secara acak sederhana (*sample random sampling*) untuk setiap strata, kemudian hasilnya digabungkan menjadi satu sampel yang terbebas dari variasi untuk setiap strata.
4. Variabel yang digunakan untuk stratifikasi adalah jenis kelamin, umur, status gizi, jenis faktor risiko (heteroseksual dengan multipartner, homoseksual, pengguna narkotika intravena, pengguna narkotika intravena dan aktif kontak seksual (homo/heteroseksual), lama kontak dengan faktor risiko.
5. Penderita yang bersedia dengan sukarela ikut sebagai subyek penelitian kemudian menandatangani surat persetujuan sebagai subyek penelitian dan surat persetujuan tindakan medis berupa pengambilan sampel darah, setelah sebelumnya diberikan penjelasan maksud dan tujuan penelitian, pemeriksaan darah, risiko pengambilan darah, serta tindakan antisipasi yang diperlukan. Bila penderita telah menyatakan persetujuan dengan membubuhkan tanda

tangan baik pada lembar persetujuan sebagai subyek penelitian dan tindakan medis, maka dilakukan pengambilan sampel darah.

6. Pengambilan sampel darah tepi dilakukan 3 kali yaitu :

Pertama, pengambilan sampel darah dilakukan sebelum penderita mengetahui status HIV (data dasar) jadi sebelum 2 jam semenjak dinyatakan terinfeksi HIV (oleh karena stres akut berlangsung 2 jam dan berlangsung dalam 15 hari pertama). Kemudian penderita diberi penjelasan hasil pemeriksaan HIV sekaligus diberikan konseling post-tes. Kepada penderita tersebut juga dilakukan anamnesis dan pemeriksaan fisik lengkap. Pemeriksaan berat badan, tinggi badan. Pada pemeriksaan pertama tersebut, dilakukan pengambilan darah tepi menggunakan 2 tabung *BD vacutainer* @ 7 ml, dilanjutkan dengan 4 tabung *BD vacutainer* EDTA @ 3 ml (2 tabung untuk pemeriksaan CD4, 1 tabung untuk pemeriksaan darah lengkap, dan 1 tabung untuk pemeriksaan ACTH). Darah dari kedua tabung yang berisi 7 ml darah tersebut kemudian disentrifugasikan dengan kecepatan 2500 rpm guna memperoleh serum untuk pemeriksaan: kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit, albumin, SGPT, serum kreatinin.

Kedua, pengambilan darah tepi dilakukan pada hari ke-7 (kadar hormon stres tertinggi sekitar 7 hari pertama sejak paparan stresor) dilakukan pengambilan darah melalui satu tabung ukuran 7 ml untuk pemeriksaan laboratorium: kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4. Dilanjutkan pengambilan melalui 4 tabung *DB vacutainer* EDTA @ 3 ml : 2 tabung untuk pemeriksaan CD4, satu tabung untuk pemeriksaan darah lengkap, satu tabung

untuk pemeriksaan ACTH. Juga dilakukan anamnesis dan pemeriksaan fisik lengkap.

Ketiga, pengambilan darah dilakukan pada hari ke-31 dilakukan pengambilan darah melalui satu tabung *BD vacutainer* ukuran 7 ml untuk pemeriksaan: kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4. Dilanjutkan pengambilan melalui 4 tabung *BD vacutainer* EDTA @ 3 ml : 2 tabung untuk pemeriksaan CD4, satu tabung untuk pemeriksaan darah lengkap, satu tabung untuk pemeriksaan ACTH. Juga dilakukan anamnesis dan pemeriksaan fisik lengkap.

Sampel darah untuk pemeriksaan ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4 disimpan dalam suhu minus 20 derajat C, karena pemeriksaan dilakukan serentak setelah semua sampel terkumpul di Laboratorium Prodia Pusat Jakarta.

4.2.4 Kriteria penerimaan/ inklusi

1. Kelompok risiko tinggi : riwayat heteroseksual dengan berganti-ganti pasangan, homoseksual, pemakai narkotika intravena. Suami/isteri penderita terinfeksi HIV/ AIDS yang terbukti positif terinfeksi HIV dari pemeriksaan serologi
2. Umur 15-65 tahun
3. Status perkawinan: kawin/ belum kawin/ duda/ janda

4. Jumlah CD4 > 200 sel/ mm^3 , tidak ada infeksi oportunistik maupun malignansi
5. Jumlah CD4 < 200 sel/ mm^3 , tidak ada infeksi oportunistik maupun malignansi
6. Menyatakan bersedia ikut penelitian dengan menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan (PSP) atau *informed consent* baik sebagai subyek penelitian maupun tindakan medis pengambilan sample darah.

Kriteria AIDS yang diikuti dalam penelitian ini hanya kriteria hasil pemeriksaan CD4 kurang 200 sel/ mm^3 tanpa disertai infeksi oportunistik maupun malignansi.

Derajat penurunan limfosit T-CD4

- a. Menurun ringan, yaitu bila CD4 $\geq 500-1000$ sel/ mm^3
- b. Menurun sedang bila CD4 $\geq 200-499$ sel/ mm^3
- c. Menurun berat bila CD4 < 200 sel/ mm^3
- d. Menurun sangat berat bila CD4 < 100 sel/ mm^3

4.2.5 Kriteria penolakan / eksklusi :

- a. Penderita tidak bersedia ikut penelitian.
- b. Terdapat keadaan yang mengganggu pengukuran atau interpretasi: penderita mendapat pengobatan kortikosteroid atau imunosupresan lain.
- c. Terdapat infeksi oportunistik atau terdapat penyakit keganasan
- d. Terdapat penyakit lain yang mengganggu pengukuran atau interpretasi yaitu: diabetes mellitus, gagal ginjal kronis, sirosis hepatitis.

- e. Terdapat keadaan yang mengganggu kemampulaksanaan: penderita tidak komunikatif, dalam keadaan kritis, penderita tidak punya tempat tinggal tetap hingga dipastikan akan sulit ditindaklanjuti.

4.2.6 Persetujuan setelah penjelasan (PSP, *informed consent*) dan Kelaikan etik

Karena penelitian ini melibatkan manusia sebagai subyek penelitian, maka sebelum melaksanakan telah diperoleh persetujuan setelah penjelasan (PSP) atau *inform consent* dari calon subyek penelitian atau keluarganya. Karena penelitian ini melibatkan penderita di institusi rumah sakit yaitu rumah sakit umum Dr Soetomo, maka sebelum pelaksanaan usulan penelitian telah diajukan dan di presentasikan di hadapan tim penguji kelaikan etik (*ethical clearance*) serta telah ditetapkan layak etik.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas adalah: stresor biologis HIV, stresor psikologis akibat pernyataan terinfeksi HIV yang ditentukan dengan mengukur kadar ACTH dan kortisol
2. Variabel antara/ penghubung adalah: Hsp70, anti Hsp70
3. Variabel Tergantung adalah fragmentasi DNA limfosit T-CD4, Jumlah CD4
4. Variabel perancu (*confounding*): jenis kelamin, umur, status gizi, jenis faktor risiko, lama kontak dengan risiko

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

Untuk menghindari makna ganda dalam pengukuran, analisis, serta simpulan, maka semua konsep yang ada dalam penelitian ini dibuat batasan dalam istilah yang operasional

1. Mekanisme adalah urutan kejadian yang merupakan respons dari sel terhadap suatu penyebab, dari stimulus awal sampai ke ekspresi suatu penyakit (Cotran, 1999)
2. Stresor, adalah sesuatu yang dapat menimbulkan stres. Stresor yang dimaksud dalam penelitian ini adalah stresor biologis HIV. Diukur melalui pemeriksaan kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70
3. Stres psikologis, adalah stimuli psikologis yang dapat menimbulkan stres yang pada penelitian ini adalah akibat pernyataan di diagnosis terinfeksi HIV. Diukur melalui pemeriksaan kadar ACTH, kortisol Hsp70, antiHsp70.
4. ACTH, adalah hormon yang dihasilkan oleh basofil di hipofisis anterior. Kadar dalam darah diukur dengan metode ELISA, hasilnya dinyatakan dalam ng/ml (IBL, 2000)
5. Kortisol, yaitu hormon yang dihasilkan oleh spongiosit pada zona fasikulata korteks adrenal yang terdapat dalam darah. Kadar dalam darah diukur dengan metode ELISA, hasilnya dinyatakan dalam ng/ml (IBL, 2000).
6. Hsp70 dan anti Hsp70 : merupakan protein respons stres yang terekspresi bila individu mengalami stres. Diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), hasilnya dinyatakan dalam ng/ml.

7. Fragmentasi DNA, adalah disintegrasi DNA berupa fragmen oligonukleosom karena adanya kerusakan kromatin internukleosom oleh endonuklease endogen. Fragmentasi DNA dilakukan dalam rangka penentuan kematian sel melalui apoptosis dilakukan dengan *cell death detection ELISA^{plus}, one-step sandwich ELISA colorimetric* yang sekaligus membedakan kematian sel apoptosis dengan nekrosis. Sel yang apoptosis di ketahui dari sel yang mengalami lisis, dan diikuti penentuan secara imunokimia dari histon- fragmen DNA limfosit T-CD4 pada mikrotiter terdapat fragmen-fragmen DNA.
8. Limfosit T-CD4, adalah petanda permukaan sel limfosit T. Jumlahnya ditentukan dengan cara menghitung dan hasilnya dinyatakan dalam sel/mm³
9. Hitung CD4 menentukan beratnya penyakit infeksi HIV/AIDS secara laboratorik. Derajat penurunan adalah :
 1. Derajat ringan : CD4 \geq 500-1000 sel/mm³
 2. Derajat sedang : CD4 \geq 200-499 sel/mm³
 3. Derajat berat : CD4 $<$ 200 sel/mm³
 4. Derajat sangat berat : CD4 $<$ 100 sel/mm³
10. Paradigma psikoneuroimunologi adalah kerangka berfikir yang didasari oleh beberapa variabel yang berorientasi pada koplementasi antara perilaku, sistem saraf pusat, sistem neurohormonal dan ketahanan tubuh (Ader, 1991).
12. Risiko tinggi HIV : adalah individu yang berada dalam risiko untuk tertular infeksi HIV dan kemungkinan harus diuji (Kaplan, 2003). Termasuk dalam kerlompok risiko tinggi adalah homoseksual, heteroseksual dengan multipartner, pengguna narkotika intravena, pasangan seks dari kelompok tersebut, pengguna narkotika intravena juga aktif kontak seks homo/hetetroseksual.

13. Lama kontak : adalah waktu individu pertama kali kontak (seksual, pemakaian jarum suntik bersamaan) dengan kelompok risiko tinggi hingga dinyatakan terinfeksi HIV/AIDS pertama kali. Lama kontak ditentukan kurang dari 3 bulan (periode jendela 6 minggu - 6 bulan); 3 bulan- 3 tahun (3 tahun waktu terpendek muncul AIDS); 3 – 13 tahun (waktu tersering terjadi perkembangan HIV ke AIDS).
14. Efek pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS: merupakan pengaruh atas penyampaian status terinfeksi HIV/AIDS terhadap perilaku, sistem saraf pusat, sistem neurohormonal dan ketahanan tubuh. Diukur melalui pemeriksaan kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70, jumlah limfosit, CD4, dan *cell death*.
15. Kriteria diagnosis terinfeksi HIV bila individu risiko tinggi dan pada pemeriksaan serologi HIV tiga metode menunjukkan hasil reaktif semua (WHO, 2001).

4.4 Sampel Penelitian

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah darah penderita terinfeksi HIV/AIDS, yang diambil dari darah vena di tampung dalam tabung *BD vacutainer* dengan maupun tanpa EDTA. Sampel darah diambil tiga kali:

1. Sampel darah pertama diambil pada saat penderita menyatakan bersedia mengikuti prosedur penelitian, tetapi belum mengetahui status terinfeksi HIV.
2. Sampel darah kedua diambil hari ke-7 sejak mengetahui status terinfeksi HIV
3. Sampel darah ketiga diambil hari ke-31 sejak mengetahui terinfeksi HIV

Tempat pengambilan darah di ruang perawatan intermediate penyakit infeksi RSU Dr. Soetomo pada jam 8-9 pagi

4.4.1 Penanganan spesimen darah

1. Darah dalam 2 buah tabung *BD vacutainer* @ 7 ml dibiarkan membeku 20-30 menit terlebih dahulu, baru dipusingkan pada 5.200 rpm selama 5-15 menit serum untuk pemeriksaan kadar kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, SGPT, albumin, serum kreatinin. Limfosit yang diperoleh untuk pemeriksaan apoptosis.
2. Keadaan serum diperhatikan dan dicatat: lipemik, ikterik, atau hemolitik; keadaan seperti ini sedapat mungkin dihindarkan
3. Serum disimpan pada suhu -20°C , setelah semua sampel terkumpul baru dilakukan pemeriksaan sekaligus.
4. Darah dalam 4 tabung *BD vacutainer* EDTA @ 3 ml : 2 tabung untuk pemeriksaan CD4, 1 tabung untuk pemeriksaan darah lengkap, 1 tabung untuk pemeriksaan ACTH.

4.4.2 Bahan dan Peralatan Penelitian

1. Untuk persiapan pemeriksaan ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70 diambil serum darah kemudian dibekukan -20°C . Setelah terkumpul semua baru serentak diperiksa
2. Kortisol diperiksa dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent* (ELISA), menggunakan Kit: Cortisol ELISA (Catalog Number: RE 520 61) IBL Immuno-Biological- Laboratories, Hamburg.

3. ACTH diperiksa dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent* (ELISA), menggunakan Kit: DSL ACTIVE[®] ACTH ELISA USA (Catalog Number: DSL-10-5100)
4. Hsp70 diperiksa dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent* (ELISA), menggunakan Kit: StressXpress Hsp70 ELISA Kit (Catalog Number: EKS-700) Stressgen Biotechnologises.
5. Anti Hsp70 diperiksa dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent* (ELISA), menggunakan Kit: StressXpress Anti-Human Hsp70 (IgG/A/M) ELISA Kit (Catalog Number: EKS-750) Stressgen Biotechnologises.

4.5 Peralatan Penelitian

1. Lemari es, untuk menyimpan sediaan dan reagensia
2. Pipet otomatis untuk pengenceran dan penetesan reagensia, serta tabung reaksi
3. Inkubator untuk pengeraman
4. Rotator dengan pengatur kecepatan, untuk memutar tabung reaksi

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Ruang Perawatan Intermediate Penyakit Infeksi RSU Dr Soetomo Surabaya, tahun 2004, pengambilan sampel darah dilakukan jam 08.00-09.00 WIB

4.7 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan data

4.7.1 Prosedur Pengambilan sampel darah

1. Lengan penderita dalam posisi lurus, tidak membengkok disiku (tenaga analis dari laboratorium Prodia Surabaya).
2. Penderita diminta untuk mengepalkan tangan.
3. *Torniquet* dipasang.
4. Dicari v. mediana kubiti atau sefalika.
5. Kulit pada bagian yang akan diambil darahnya dibersihkan dengan alkohol 70%; pada saat diambil darahnya, kulit dalam keadaan kering untuk mencegah terjadinya hemolisis atau rasa terbakar. Kulit yang sudah bersih tidak boleh dipegang lagi.
6. Bagian vena ditusuk dengan lubang jarum menghadap keatas, dengan sudut kemiringan 45 derajat; tabung *BD vacutainer* ditekan sehingga vakumnya bekerja dan darah terhisap kedalam tabung. Pada pemeriksaan pertama, darah diambil melalui 2 buah tabung *BD vacutainer @ 7 ml* dilanjutkan 4 tabung *BD vacutainer EDTA @ 3 ml*.
7. Setelah volume darah dianggap cukup, *torniquet* dilepaskan dan penderita diminta membuka kepalan tangannya.
8. Jarum dilepaskan, dan segera diberi kapas alkohol 70% untuk menekan bagian tersebut selama 2 menit. Setelah darah berhenti, plester bagian ini selama 15 menit.

4.7.2 Pemeriksaan sel darah tepi serta kimia darah

1. Pemeriksaan dilakukan dengan metode standard yang sudah baku.
2. Untuk pemeriksaan kimia darah digunakan alat merek Hitachi 911, dengan *automatic analyzer spectrophotometri*.
3. Pemeriksaan dilakukan di laboratorium klinik Prodia di Surabaya yang sudah berpengalaman.

4.7.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar ACTH

1. Kertas mikrotitrasi dipersiapkan dan ditandai sebelum digunakan.
2. Dengan menggunakan pipet standar 100 μL tambahkan 50 μL antibodi Biotin yang dikonjugasi ke dispenser semiotomatik.
3. Dengan menggunakan *orbital microplate shaker* dilakukan pengguncangan secara berkala dengan kecepatan 500-700 rpm pada suhu -20°C selama 3 jam.
4. Dilakukan aspirasi dan pencucian 5 kali dengan larutan pencuci menggunakan mikroplate otomatis. Endapan dikeringkan memakai lempengan yang mengandung bahan penyerap.
5. Tambahkan 100 μL larutan Streptavidin-Enzyme yang dikonjugasi pada masing-masing dispenser semiotomatik.
6. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu -25°C dengan mengguncangkan secara berkala 500-700 rpm menggunakan *microplate shaker*.

7. Dilakukan aspirasi dan pencucian masing-masing 5 menit dengan larutan pencuci menggunakan pencuci microplate otomatis. Keringkan endapan pada plate yang mengandung bahan penyerap.
8. Tambahkan 100 μ L larutan chromogen TMB ke masing-masing dispenser semiotomatik.
9. Diinkubasi selama 10-25 menit pada suhu -25°C dengan mengguncangkan secara berkala 500-700 rpm. Hindari paparan sinar matahari.
10. Ditambahkan 100 μ L *Stopping Solution* (0.2M sulfuric acid) ke masing-masing dispenser semiotomatik.
11. Pembacaan hasil dengan bantuan alat pembaca microplate yang mampu membaca hingga 450 nm.

4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Kortisol

1. Alat : Immulite
2. Prinsip : Sampel penderita dan reagen berupa kortisol yang dikonjugasi dengan enzim alkali fosfatase secara bersamaam dimasukkan ke dalam tes unit yang berisi manik-manik berlapis antibodi monoklonal spesifik terhadap kortisol dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dengan pengguncangan secara berkala. Selama waktu inkubasi ini kortisol dalam sampel berkompetisi dengan kortisol yang dilabel dengan enzim untuk mendapatkan tempat berikatan yang terbatas pada antibodi yang dilekatkan pada manik-manik. Lalu konjugat enzim yang tidak berikatan disingkirkan dengan pencucian secara pemusingan, setelah

itu ditambahkan substrat dan Tes Unit diinkubasi lagi selama 10 menit. Substrat chemiluminescent, suatu ester fosfat dari adamantly dioxetan dengan adanya alkali fosfatase mengalami hidrolisa menghasilkan suatu senyawa yang tidak stabil. Terbentuknya senyawa ini secara terus-menerus menghasilkan emisi sinar yang berlangsung cukup lama. Kompleks yang terikat dan dengan demikian juga jumlah proton dipancarkan yang diukur dengan luminometer berbanding terbalik dengan konsentrasi kortisol dalam sampel.

3. Sampel :

1. Jenis : Serum
2. Jumlah : 500 μ l (300 μ l)
3. Stabilitas : 2-8⁰ C : 7 hari, -20⁰C : 3 bulan
4. Catatan : Sampel lipemik

4. Prosedur :

1. Masukkan reagen wedge ke dalam carousel reagent dan tekan (GO) pada alat untuk membaca barcode reagent. Cek status reagent pada layar monitor
2. Urutkan sampel sesuai lembar kerja dengan cara urutan dari kiri ke kanan dengan lubang no.1 dikosongkan
3. Tuang serum ke dalam sampel cup holder, setelah dituang serum ditaruh ke lubang yang kosong begitu seterusnya
4. Masukkan sampel cup holder diikuti Tes Unit kortisol ke alat Immulite dan untuk selanjutnya program pemeriksaan sampel penderita

5. Pembacaan Hasil :

Secara otomatis hasil tampak di layar komputer dan akan dicetak pada printer.

Hasil dinyatakan dalam satuan mg/dl

4.7.5 Prosedur Penentuan Apoptosis

Prinsip : Untuk menentukan apoptosis digunakan cara *ELISA^{plus} – sandwich*.

Alat yang digunakan adalah tipe *one-step sandwich ELISA, colorimetric*. Alat ini dapat mendeteksi tiga jam setelah induksi apoptosis. Metode: dilakukan lisis limfosit dilanjutkan penentuan *histone-complexed DNA fragments* pada mikrotiter secara imunokimia. Prinsip tes : dilakukan penentuan aktivitas nukleosom menggunakan *one-step-sandwich immunoassay*. Kit terdiri dari: anti-histone antibody (clone H11-4), anti-DNA antibody (clone M-CA-33), DNA- histone complex. Pemeriksaan dilakukan dilaboratorium klinik Prodia Pusat Jakarta. Signifikansi kit : dapat menentukan secara kuantitatif histone-fragmen DNA kompleks (mono dan oligonukleosom) dari sitoplasma sel setelah induksi apoptosis atau setelah dilepaskan dari sel yang mengalami nekrosis.

Prosedur :

1. Dilakukan inkubasi sel didalam dinding blood mikro titer (misalnya : 104 sel manusia dalam 200 m/L biakan) dengan penggunaan induser kematian sel (misalnya: camptothecin). Setelah diinkubasi sel dipisahkan dengan melakukan pemusingan supernatan yang didapat (mengandung DNA dari sel yang nekrotik terpisah dari membran selama inkubasi).

2. Dilakukan pengadukan serta inkubasi sel dalam bufer lisis. Setelah lisis nuklei yang intake dipisahkan dengan cara pemusingan.
3. Pindahkan supernatan yang terikat streptavidin secara hati-hati ke cawan mikrotiter.
4. Dilakukan pengikatan nukleosom pada supernatan menggunakan dua antibodi monoklonal, antihistone (dilabel biotin) dan anti DNA (yang terkonjugasi peroksidase). Kompleks antibodi-nukleosom pada plate mikrotiter terikat streptavidin.
5. Dilakukan pencucian kompleks antibodi-histone yang telah terfiksasi 3 kali untuk memindahkan komponen sel yang tidak imunoreaktif.
6. Sampel diinkubasi dengan substrat peroksidase.
7. Ditentukan jumlah produk yang diwarnai secara spectrophotometrically.
8. Metode ELISA mampu mendeteksi apoptosis melalui nukleosom minimal 600 sel.

Spesifitas : metode ELISA ini spesifik untuk nukleosom yang mengandung untai DNA tunggal maupun ganda. Tidak spesifik spesies.

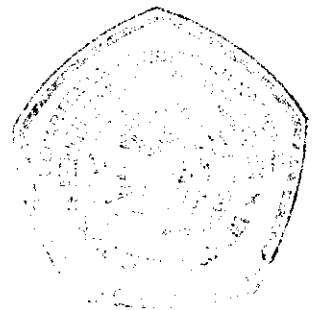
4.7.6 Prosedur Pengukuran Hsp70

1. Dipersiapkan peralatan pada suhu ruangan : cawan immunoassay Hsp70, buffer pencuci 10X, pengencer sampel, pengencer Biotin anti-Hsp70, Avidin-terkonjugasi HRP, substrate TMB, acid stop solution.
2. Persiapan sampel : Pada penelitian ini dipakai sampel serum penderita terinfeksi HIV/AIDS. Pengenceran serum dilakukan dengan perbandingan 1:5

(v/v) dengan menambahkan larutan pengencer sehingga dicapai suatu nilai sesuai kurve standar.

3. Sebelum dan sesudah rehidrasi dilakukan pemusingan lyophilized Hsp70 rekombinan standar.
4. Dilakukan pengenceran Hsp70 rekombinan standar kemudian di masukkan kedalam sampel.
5. Ditambahkan 100 μ l preparat standar serta sampel pada cawan Hsp70 immunoassay kemudian ditutup secara pelan-pelan.
6. Dilakukan inkubasi cawan tersebut pada suhu ruangan selama 2 jam.
7. Dilakukan 6 kali pencucian, dilanjutkan 1 kali pencucian menggunakan Buffer.
8. Ditambahkan 100 μ l biotin anti-Hsp70 pada cawan immunoassay lalu ditutup pelan-pelan.
9. Dilakukan inkubasi cawan selama 1 jam.
10. Dilakukan 6 kali pencucian, satu kali pencucian menggunakan Buffer.
11. Tambahkan 100 μ l avidin-yang terkonjugasi HRP secara hati-hati kemudian cawan immunoassay ditutup pelan-pelan.
12. Dilakukan inkubasi cawan pada suhu kamar selama 1 jam.
13. Dilakukan 6 kali pencucian, satu kali pencucian menggunakan Buffer.
14. Dilakukan penambahan 100 μ l substrat TMB secara pelan-pelan.
15. Dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.
16. Dilakukan penambahan 100 μ l *acid stop solution* dengan hati-hati.

17. Dilakukan pengukuran penyerapan pada 450 nm, atau 450nm dengan koreksi pada 540 atau 570nm.
18. Ditetapkan kurve standar Hsp70 pada 7 titik dari 0.78-50 ng/ml, kemudian ditentukan kadar Hsp70
19. Penentuan Hasil-Kadar Hsp70 :
 - Ditentukan ukuran rata-rata penyerapan dari masing-masing standar dan sampel. Kemudian ditentukan ukuran penyerapan dari 0 ng/ml Hsp70 standar.
 - Substrate rata-rata diperoleh (0 ng/ml) Hsp70 standar dari nilai yang diperoleh dari langkah pertama (standar dan sampel).
 - Ditentukan skala kadar standar Hsp70 rekombinan (ng/ml) pada sumbu X, dan penyerapan diukur sesuai dengan standar Hsp70 pada sumbu Y.
 - Penentuan kadar sampel dari kurve standar dan pengandaan dengan pengenceran kadar Hsp70 sampel. Contoh : jika sampel diencerkan 1 : 25 sebelum pengukuran maka nilai berikutnya dari kurve standar harus diperbanyak dengan penghitungan 25 pada kadar Hsp70.



BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5

ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan peran infeksi HIV terhadap apoptosis limfosit T-CD4 melalui jalur *heat shock protein70* (Hsp70) pada kelompok risiko tinggi yang terinfeksi HIV dengan kelompok risiko tinggi yang secara serologis belum terinfeksi HIV sebagai pembanding. Pada setiap subyek dari kedua kelompok di lakukan *follow-up* selama 30 hari. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *panel study*, subyek yang sama dilakukan pemeriksaan berulang pada waktu yang berbeda. Pada kedua kelompok di lakukan pemeriksaan kadar ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4, jumlah CD4. Pada penelitian ini digunakan pembanding dari kelompok risiko tinggi tetapi secara serologis belum terinfeksi HIV sehingga perubahan kadar ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70, apoptosis limfosit T-CD4, jumlah CD4 diakibatkan oleh infeksi HIV.

Guna memperoleh kesahihan (validitas) interna yang tinggi atau asosiasi yang diperoleh hanya dipengaruhi variabel yang diteliti, dilakukan berbagai upaya meminimalkan kesalahan acak, nilai bias, dan faktor perancu (*confounding*), maka penetapan subyek terpilih (*eligible subjects*) atau sampel yang dikehendaki (*intended sample*) yang merupakan bagian dari populasi terjangkau yang direncanakan untuk diteliti langsung.

Faktor transmisi HIV mempengaruhi perjalanan penyakit yang diduga akan mempengaruhi hasil penelitian (jumlah CD4), karena itu perlu dilakukan stratifikasi

jenis faktor risiko. Hal tersebut dimaksudkan agar diperoleh subkelompok (strata) yang lebih homogen. Randomisasi dilakukan pada tiap strata secara terpisah, kemudian subyek yang terpilih digabungkan kembali dalam kelompok yang sesuai. Jadi dalam penelitian ini dilakukan randomisasi dalam strata (*stratified randomization*), dengan menggunakan sampling acak sederhana.

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

5.2.1. *Homogeneity of variance* IIDN ($0, \sigma$)

IIDN($0, \sigma$) singkatan dari identik; independen dan berdistribusi normal dengan rerata sama dengan nol dan mempunyai besaran yang sama dalam interval.

Dikatakan mempunyai probabilitas normal sekumpulan data mengelompok pada nilai rerata dan berbentuk gunung yang simetris atau pada grafik *normal probability paper* sekumpulan data berada disekitar garis linier. Hasil analisis IIDN ($0, \sigma$) dapat dilihat dalam (lampiran 3) dengan hasil signifikan.

5.2.2 Uji data penelitian

- a. Uji beda data psikoneuroimunologi antara HIV+ dan HIV- pada pengamatan hari pertama.

Karena nilai satuan pada setiap variabel tidak sama, maka perlu dilakukan

konversi guna menghilangkan perbedaan dengan menggunakan rumus ($\frac{y - \bar{y}}{sd}$).

y : nilai data asli

\bar{y} : nilai rerata data asli

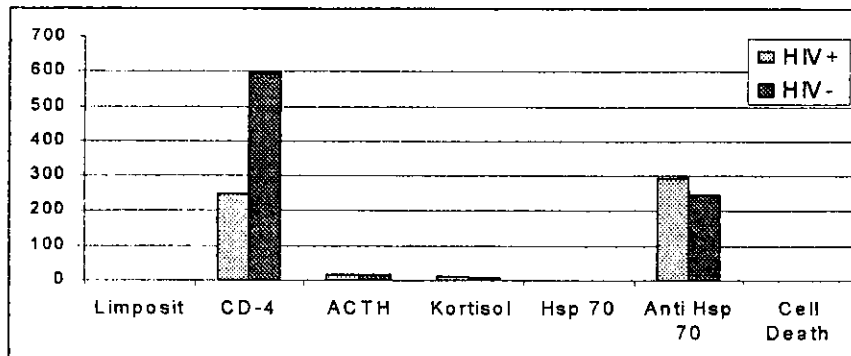
sd : nilai penyimpangan baku (standart deviasi)

$y - \bar{y}$: tingkat kesalahan data (hasil ini bisa terjadi nilai positif dan negatif)

Hasil perhitungan labolatoris dapat dilihat pada tabel 5.4 dan gambar 5.1a dan 5.1b (Lampiran 3.1).

Tabel 5.4 : Rerata variabel psikoneuroimunologi pemeriksaan hari pertama

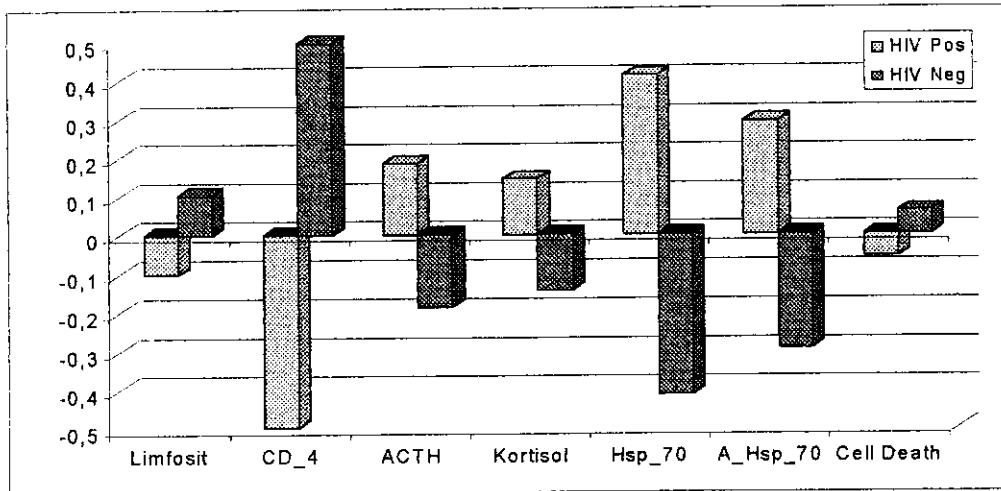
| | Kelompok terinfeksi | | | |
|-------------|---------------------|----------|----------|---------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Limposit | 1.6271 | 0.4349 | 1.7171 | 0.4540 |
| CD4 | 250.29 | 230.15 | 598.50 | 370.70 |
| ACTH | 17.6893 | 11.4647 | 13.9971 | 8.1523 |
| Kortisol | 10.9814 | 4.3933 | 9.6950 | 4.1062 |
| HSP 70 | 1.3007 | 0,6904 | 0.8214 | 0.3157 |
| Anti HSP 70 | 291.8214 | 107.8165 | 244.3429 | 29.0051 |
| Cell death | 0.29307 | 0.43161 | 0.33371 | 0.24749 |



Gambar 5.1a : Rerata variable psikoneuroimunologi pemeriksaan hari pertama

Setelah dilakukan uji tingkat kesalahan, sama dengan nol atau tidak serta dilakukan standarisasi dapat dilihat pada tabel dan gambar 5.1b berikut. Gambar 5.1b menunjukkan adanya penurunan jumlah limfosit, CD4 dan *cell death*. Kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70 mengalami peningkatan pada kelompok HIV positif. Pada kelompok HIV negatif terjadi peningkatan jumlah limfosit, CD4. Penurunan ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70.

| | Limfosit | CD_4 | ACTH | Kortisol | Hsp_70 | A_Hsp_70 | Cell Death |
|---------|----------|---------|---------|----------|---------|----------|------------|
| HIV Pos | -0,1025 | -0,4962 | 0,1857 | 0,1436 | 0,4129 | 0,2925 | -0,0587 |
| HIV Neg | 0,1027 | 0,4962 | -0,1857 | -0,1435 | -0,4126 | -0,2925 | 0,05877 |



Gambar 5.1b : Rerata variabel psikoneuroimunologi pemeriksaan hari pertama

Uji perbedaan antara kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) dengan menghitung semua variabel secara bersama-sama (multivariat) dengan metode *Willks' Lambda* di dapat $F_{hitung} = 0.627$ dan $p = 0.165$ ($\alpha > 0.05$) berarti tidak signifikan.

Kedua kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) secara bersama sama tidak ada perbedaan, tetapi secara individu semua variabel tidak ada beda kecuali CD4 dan Hsp 70 yang ada beda.

Untuk mendapatkan variabel yang dominan dalam membedakan antara HIV+ dan HIV- dilakukan analisis diskriminan dan hasil perhitungan dapat dilihat pada (lampiran 3.2). Empat variabel yang dianalisis ternyata hanya variabel CD4 yang secara kuat membedakan antara HIV+ dengan HIV- melalui metode *Willks' Lambda*

didapat $F_{hitung} = 0.745$ dan $p = 0.006$ sedangkan kekuatan pengelompokan kembali = 71,4 %.

Model Diskriminan yang mewakili setiap kelompok infeksi (dalam analisis diskriminan disebut *Fisher's Linear discriminant function*) lihat tabel 5.5

Tabel 5.5 : Koefisien diskriminan linier Fisher's

| | Kelompok terinfeksi | |
|----------|---------------------|----------|
| | HIV + | HIV - |
| CD4 | 0.0021629 | 0.006287 |
| Constant | -1.022 | -2.575 |

Nilai konstanta CD4 pada kelompok HIV+ dan HIV-, menunjukkan nilai besaran yang mempengaruhi perubahan CD4 pada kedua kelompok (tabel 5.5).

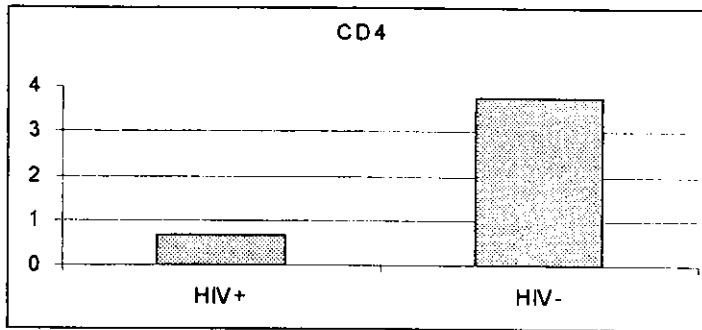
Dari model tersebut setelah di substitusi dengan data asli di dapatkan pola untuk menggambarkan kekuatan CD4 terhadap kelompok infeksi, dapat dilihat pada tabel 5.6 Gambar 5.2 (lampiran 3.3)

Tabel 5.6 : Pola kontribusi

| | Kelompok terinfeksi | | | |
|-----|---------------------|-------|--------|--------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| CD4 | 0.658 | .6051 | 3.7628 | 2.3306 |

Pola kontribusi merupakan model regresi yang dibentuk melalui analisis diskriminan guna mendapatkan pengaruh CD4 dari kelompok HIV positif maupun kelompok HIV negatif. Model Diskriminan untuk infeksi HIV positif adalah :

$D = -1.022 + CD4 \times 0.0021629$. Model Diskriminan untuk HIVnegatif adalah :
 $D = -2.575 + CD4 \times 0.006287$, sehingga diperoleh pola kontribusi pada tabel 5.6 dan gambar 5.2



Gambar 5.2 : Pola kontribusi terhadap infeksi HIV

Pola kontribusi terhadap infeksi HIV (gambar 5.2) merupakan hasil perkalian antara nilai data asli CD4 dengan nilai pengaruh perubahan yang HIV positif maupun negatif terhadap perubahan jumlah CD4. Pada kelompok yang terinfeksi HIV positif nampak pengaruhnya begitu kuat terhadap penurunan CD4, sedangkan pada kelompok HIV negatif penurunan CD4 tidak sekuat kelompok HIV positif.

Sehubungan penurunan CD4 tersebut, sesuai dengan hasil penelitian ini (lampiran 3.1). Baik pada kelompok yang terinfeksi HIV maupun kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV keduanya menunjukkan kecenderungan penurunan CD4 sehingga kurang dari 1.000 CD4/mm^3 .

Keberadaan Hsp70 tersebut di induksi oleh pengaruh stresor biologis HIV yang telah mengintervensi limfosit T dan meningkatkan ekspresi reseptor CD40. Dari hasil penelitian ini (lampiran 3.1) ditunjukkan bahwa peningkatan kadar Hsp70 lebih

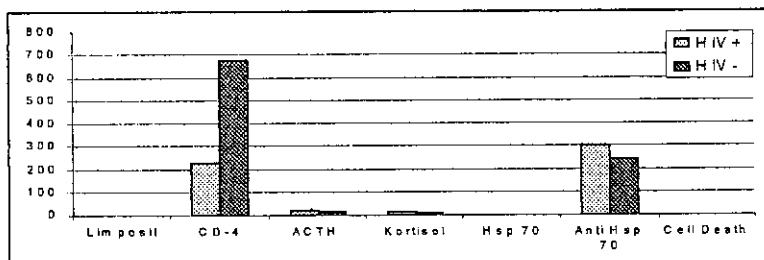
menonjol. Hal tersebut dimungkinkan karena Hsp70 termasuk protein kecil (kDa) yang diperlukan oleh HIV sebagai ligand. HIV sendiri memerlukan peran reseptor CD40 guna mengikat Hsp70 (Hsp70 sebagai ligand CD40).

- b. Uji beda data psikoneuroimulogi antara HIV+ dan HIV- pada pengamatan hari ke tujuh.

Hasil perhitungan labolatoris yang merupakan data baku pada penilaian hari ke tujuh diperoleh rerata dari data asli dapat dilihat pada tabel 5.7 dan gambar 5.3a dan 5.3b (Lampiran 4.1)

Tabel 5.7 : Rerata variabel psikoneuroimunologi pemeriksaan hari ke tujuh

| | Kelompok terinfeksi | | | |
|-------------|---------------------|----------|----------|---------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Limposit | 1.7271 | 0.3202 | 1.7507 | 0.2237 |
| CD4 | 227.71 | 200.58 | 677.86 | 488.61 |
| ACTH | 22.125 | 16.4585 | 13.925 | 6.4434 |
| Kortisol | 12.3771 | 4.0465 | 8.65 | 3.2127 |
| HSP 70 | 1.5757 | 0.8127 | 0.9579 | 0.3969 |
| Anti HSP 70 | 300.8786 | 171.8802 | 237.8929 | 33.879 |
| Cell Death | 0.34036 | 0.52735 | 0.42871 | 0.47416 |

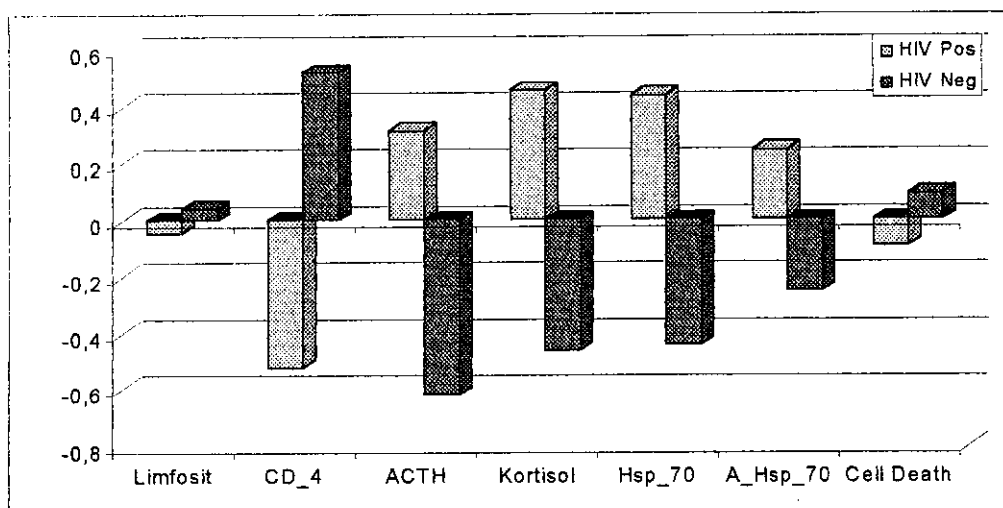


Gambar 5.3a : Rerata variabel psikoneuroimunologi pemeriksaan hari ke tujuh

Setelah dilakukan uji tingkat kesalahan, sama dengan nol atau tidak serta dilakukan standarisasi dapat dilihat pada tabel dan gambar 5.3b berikut. Gambar 5.3b menunjukkan adanya penurunan jumlah limfosit, CD4 dan *cell death*. Kadar ACTH,

kortisol, Hsp70, anti Hsp70 mengalami peningkatan pada kelompok HIV positif. Pada kelompok HIV negatif terdapat peningkatan limfosit, CD4. Penurunan ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70.

| | Limfosit | CD_4 | ACTH | Kortisol | Hsp_70 | A_Hsp_70 | Cell Death |
|---------|----------|---------|---------|----------|---------|----------|------------|
| HIV Pos | -0,0433 | -0,5207 | 0,3165 | 0,4594 | 0,44 | 0,2488 | -0,0932 |
| HIV Neg | 0,04355 | 0,5207 | -0,6165 | -0,4596 | -0,4401 | -0,2488 | 0,09316 |



Gambar 5.3b : Rerata variabel psikoneuroimunologi pemeriksaan hari ke tujuh

Uji perbedaan antara kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) dengan menghitung semua variabel secara bersama-sama (multivariat) dengan metode *Wilks' Lambda* didapat $F_{hitung} = 0.475$ dan $p = 0.020$ ($\alpha < 0.05$) berarti ada beda signifikan. Dengan kata lain ke dua kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) secara bersama sama ada perbedaan. Secara individu variabel ACTH; Anti Hsp 70 tidak ada beda kecuali CD4, kortisol dan Hsp 70 yang ada beda.

Untuk mendapatkan variabel yang dominan dalam membedakan antara HIV+ dan HIV- dilakukan analisis diskriminan dan hasil perhitungan dapat dilihat pada (lampiran 4.2). Empat variabel yang dianalisis ternyata variabel CD4 dan Hsp70 dapat membedakan antara HIV+ dan HIV- (*Willks' Lambda*, $F_{hitung} = 0.563$ dan $p = 0.007556$, sedangkan kekuatan pembeda = 75.0 %).

Model Diskriminan yang mewakili setiap kelompok infeksi (dalam analisis diskriminan disebut *Fisher's Linear discriminant function*) lihat tabel 5.8

Tabel 5.8 : Koefisien diskriminan linier Fisher's

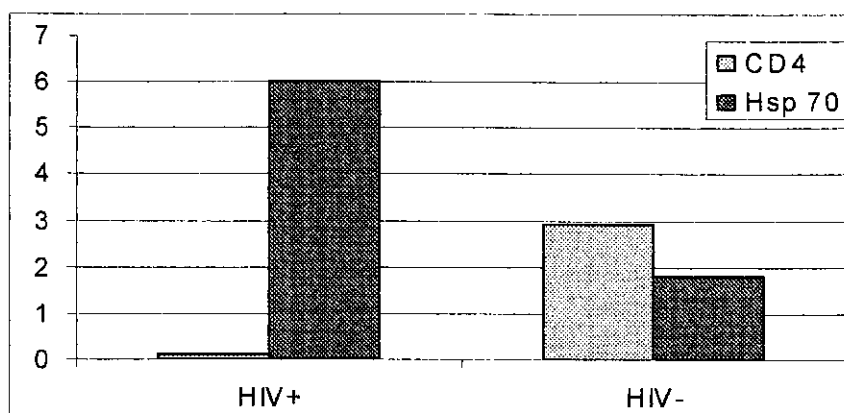
| | Kelompok terinfeksi | |
|----------|---------------------|-----------|
| | HIV + | HIV - |
| CD4 | 0.0004838 | 0.0004286 |
| Hsp70 | 3.803 | 1.901 |
| Constant | -3.744 | -3.056 |

Pola kontribusi merupakan model regresi yang dibentuk melalui analisis diskriminan guna mendapatkan pengaruh CD4 dan Hsp70 dari kelompok HIV positif maupun kelompok HIV negatif. Model Diskriminan untuk infeksi HIV positif terhadap perubahan CD4 dan Hsp70 adalah $D = -3.744 + CD4 \times 0.0004838 + Hsp70 \times 3.803$. Sedangkan model Diskriminan untuk HIV negatif adalah $D = -3.056 + CD4 \times 0.0004286 + Hsp70 \times 1.901$. Untuk mendapatkan nilai kontribusi CD4, diasumsikan Hsp70 sama dengan nol, guna mendapatkan nilai kontribusi Hsp70 diasumsikan CD4 sama dengan nol. Sehingga diperoleh pola kontribusi pada tabel 5.9 dan gambar 5.4

Dari model tersebut setelah di substitusi dengan data asli di dapatkan pola untuk menggambarkan kekuatan CD4 terhadap kelompok infeksi dan dapat dilihat pada tabel 5.9 Gambar 5.4 (lampiran 4.3)

Tabel 5.9 : Pola kontribusi

| | Kelompok terinfeksi | | | |
|-------|---------------------|--------|--------|--------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| CD4 | 0.1102 | 0.097 | 2.9053 | 2.0942 |
| Hsp70 | 5.9924 | 3.0906 | 1.8209 | 0.7545 |



Gambar 5.4 : Pola kontribusi terhadap infeksi HIV

Pola kontribusi terhadap infeksi HIV (gambar 5.4), kekuatan penurunan CD4 pada kelompok terinfeksi HIV positif mendorong peningkatan kadar Hsp70. Kelompok HIV negatif terdapat penurunan CD4 yang kurang progresif sehingga pengaruh terhadap peningkatan Hsp70 kurang kuat.

Perbedaan kadar kortisol pada pemeriksaan kedua ini seiring dengan pengaruh stres akut yang dipicu oleh stresor diagnosis terinfeksi HIV sebagai pemicu stres akut. Stres akut umumnya terjadi di dalam minggu pertama dari awal paparan stresor,

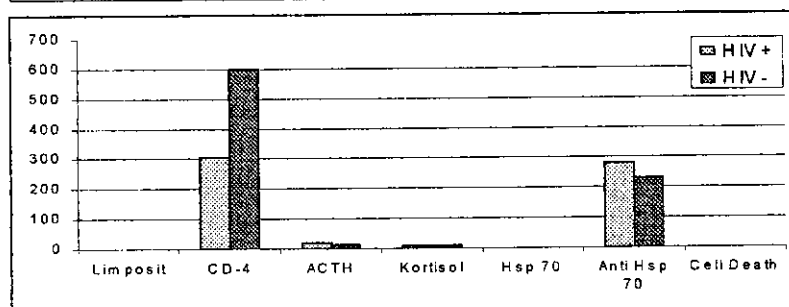
dengan puncak stres pada hari ke-7. Sesuai dengan pernyataan tersebut pada pemeriksaan ke-2 yang dilakukan pada hari ke-7 sejak diagnosis terinfeksi HIV dikemukakan, di dapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok yang terinfeksi HIV dengan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi (12.377 ± 4.046 vs 8.650 ± 3.213).

- c. Uji beda data psikoneuroimunologi antara HIV+ dan HIV- pada pengamatan hari tiga puluh satu

Hasil perhitungan laboratoris dan analisis statistik dapat dilihat pada tabel 5.10 gambar 5.5a dan 5.5b (Lampiran 5.1)

Tabel 5.10 : Rerata variable psikoneuroimunologi pemeriksaan hari tiga puluh satu

| | Kelompok terinfeksi | | | |
|-------------|---------------------|---------|----------|---------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Limposit | 1.6029 | 0.3891 | 1.7586 | 0.2819 |
| CD4 | 305.14 | 265.00 | 598.79 | 373.57 |
| ACTH | 17.2100 | 10.7262 | 11.205 | 5.1106 |
| Kortisol | 9.1321 | 4.0378 | 6.800 | 3.1472 |
| HSP 70 | 1.6907 | 0.9175 | 0.8464 | 0.3608 |
| Anti HSP 70 | 278.4143 | 58.9133 | 231.3643 | 47.27 |
| Cell death | 0.30829 | 0.40400 | 0.72357 | 0.68682 |

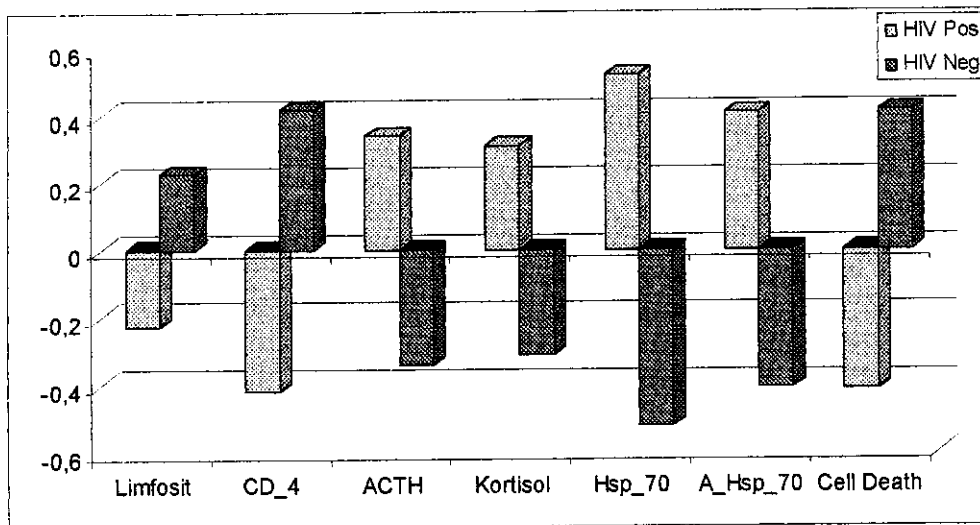


Gambar 5.5a : Rerata variable psikoneuroimunologi pemeriksaan hari tiga puluh satu

Setelah dilakukan uji tingkat kesalahan, sama dengan nol atau tidak serta dilakukan standarisasi dapat dilihat pada tabel dan gambar 5.5b berikut. Gambar

5.5b menunjukkan adanya penurunan jumlah limfosit, CD4 dan *cell death*. Kadar ACTH, kortisol, Hsp70, anti Hsp70 mengalami peningkatan. pada kelompok terinfeksi HIV positif. Pada kelompok HIV negatif didapatkan peningkatan jumlah limfosit dan CD4 serta *cell deat*. Penurunan kadar ACTH, kortisol, Hsp70 dan anti Hsp70.

| | Limfosit | CD_4 | ACTH | Kortisol | Hsp_70 | A_Hsp_70 | Cell Death |
|---------|----------|--------|---------|----------|---------|----------|------------|
| HIV Pos | -0,2271 | -0,418 | 0,3415 | 0,3113 | 0,5224 | 0,4082 | -0,4137 |
| HIV Neg | 0,2272 | 0,418 | -0,3415 | -0,3113 | -0,5224 | -0,4082 | 0,4137 |



Gambar 5.5b : Rerata variable psikoneuroimunologi pemeriksaan hari ke tiga puluh satu

Peningkatan kadar Hsp70 pada pemeriksaan ke tiga ini akibat pengaruh stresor biologis HIV. Dari waktu ke waktu pengaruhnya semakin kuat. Kuatnya pengaruh tersebut sehubungan dengan replikasi HIV yang terus berlangsung dengan kecepatan rerata mencapai 10^9 - 10^{11} partikel virus per hari (Drew, 2001; Barat, 2002; Hirschel, 2003). Selain itu juga semakin banyak limfosit T yang terlibat. Juga

pengaruh sel-sel yang mampu mengekspresi CD4, serta semakin padatnya HIV (*viral load*) di dalam sirkulasi.

Uji perbedaan antara kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) dengan menghitung semua variabel seara bersama-sama (multivariat) dengan metode *Willks' Lambda* didapat $F_{hitung} = 0.505$ dan $p = 0.033$ ($\alpha < 0.05$) berarti ada beda signifikan. Dengan kata lain ke dua kelompok infeksi (HIV+ dan HIV-) secara bersama sama ada perbedaan, tetapi secara individu variabel CD4, Hsp70 dan anti Hsp70 yang ada beda.

Untuk mendapatkan variabel yang dominan dalam membedakan antara HIV+ dan HIV- dilakukan analisis diskriminan dan hasil perhitungannya dapat dilihat pada (lampiran 5.2). Empat variabel yang dianalisis ternyata hanya variabel Hsp 70 yang dapat membedakan antara HIV+ dan HIV- dengan metode *Willks' Lambda* didapat $F_{hitung} = 0.717$ dan $p = 0.004$ sedangkan kekuatan pembeda = 71.4 %.

Model Diskriminan yang mewakili setiap kelompok infeksi (dalam analisis diskriminan disebut *Fisher's Linear discriminant function*) lihat tabel 5.11

Tabel 5.11 : Koefisien diskriminan linier Fisher's

| | Kelompok terinfeksi | |
|----------|---------------------|--------|
| | HIV + | HIV - |
| Hsp 70 | 3.479 | 1.742 |
| Constant | -3.634 | -1.143 |

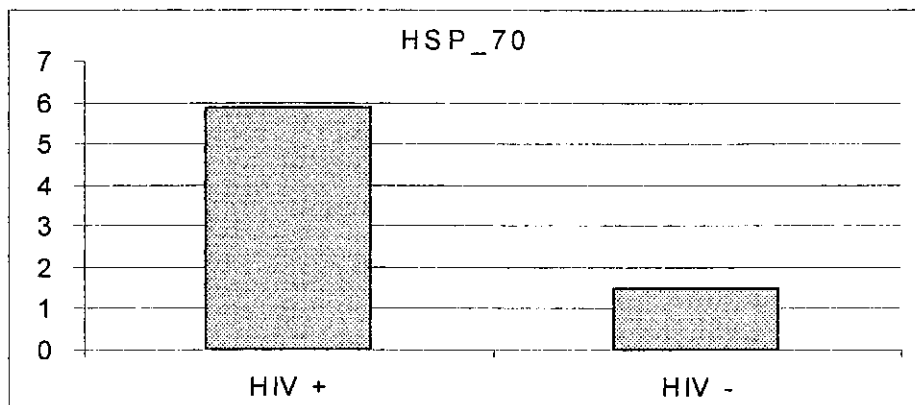
Dari analisis diskriminan diperoleh model regresi yang mewakili setiap kelompok yaitu kelompok HIV positif dan kelompok HIV negatif. Model Diskriminan infeksi HIV positif terhadap perubahan Hsp70 adalah $D = -3.634 +$

Hsp70 X 3.479. Sedangkan model Diskriminan HIV negatif adalah $D = -1.143 + \text{Hsp70} \times 1.742$. Sehingga diperoleh pola kontribusi pada tabel 5.12 dan gambar 5.6

Dari model tersebut setelah di substitusi dengan data asli di dapatkan pola untuk menggambarkan kekuatan Hsp 70 terhadap kelompok infeksi dan dapat dilihat pada tabel 5.12 Gambar 5.6 (lampiran 5.3)

Tabel 5.12 : Pola kontribusi

| | Kelompok terinfeksi | | | |
|--------|---------------------|-------|--------|--------|
| | HIV + | | HIV - | |
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Hsp 70 | 5.882 | 3.192 | 1.4745 | 0.6286 |

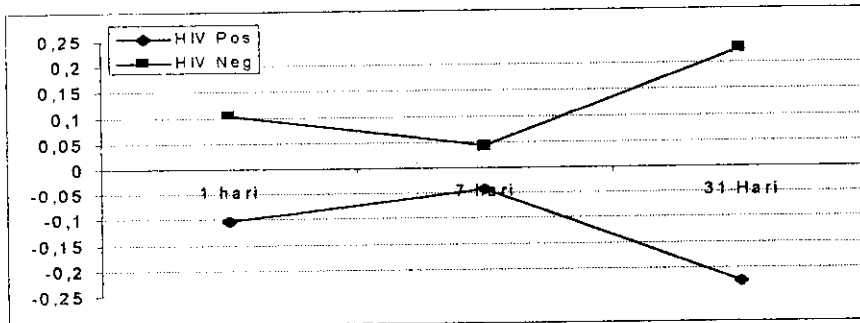


Gambar 5.6 : Pola kontribusi terhadap infeksi HIV

Pada kelompok HIV positif terjadi peningkatan Hsp70 lebih menonjol dibandingkan kelompok HIV negatif (gambar 5.6).

Dengan demikian difahami bahwa kontribusi Hsp70 pada kelompok yang terinfeksi HIV lebih menonjol dalam menghambat laju apoptosis. Peningkatan kadar Hsp70 yang berlebihan justru dapat memicu apoptosis limfosit T.

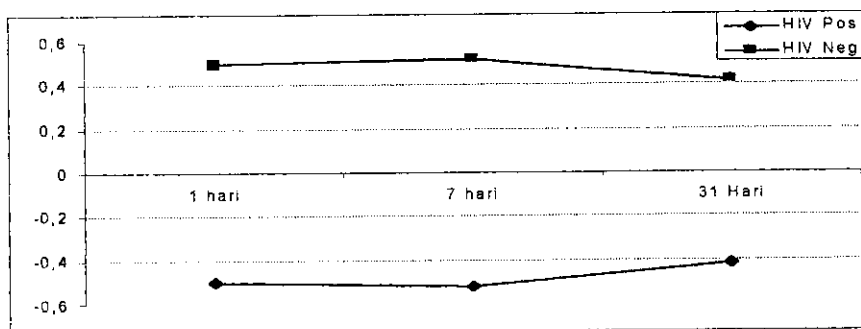
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | -0,1025 | -0,0433 | -0,2271 |
| HIV Neg | 0,1027 | 0,04355 | 0,2272 |



Gambar 5.7 : Grafik perubahan jumlah limfosit pengamatan hari ke 1, 7, 31

Kelompok HIV positif terjadi peningkatan jumlah limfosit pada pemeriksaan hari ke tujuh dan terjadi penurunan yang tajam pada pemeriksaan hari ke tiga puluh satu. Pada kelompok HIV negatif terjadi penurunan pada pemeriksaan hari ke tujuh, pada pemeriksaan hari ke tiga puluh satu terjadi peningkatan yang tajam (gambar 5.7).

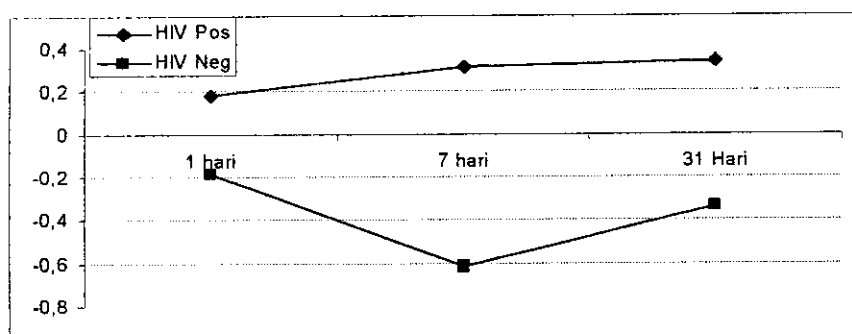
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | -0,4962 | -0,5207 | -0,418 |
| HIV Neg | 0,4962 | 0,5207 | 0,418 |



Gambar 5.8 : Grafik perubahan jumlah CD4 pengamatan hari ke 1, 7, 31

Pada kelompok HIV positif sejak pemeriksaan pertama maupun pemeriksaan hari ke tujuh terjadi penurunan jumlah CD4, hanya saja pemeriksaan hari ke tujuh sedikit dibawah pemeriksaan pertama. Setelah itu cenderung terjadi peningkatan hingga pemeriksaan hari ke tiga puluh satu. Pada kelompok HIV negatif terjadi sedikit peningkatan kemudian cenderung mengalami penurunan hingga pemeriksaan hari ke tiga puluh satu (gambar 5.8).

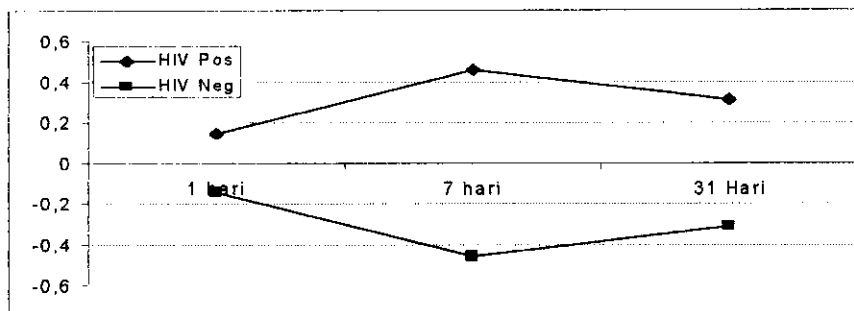
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | 0,1857 | 0,3165 | 0,3415 |
| HIV Neg | -0,1857 | -0,6165 | -0,3415 |



Gambar 5.9 : Grafik perubahan kadar ACTH pengamatan hari ke 1, 7, 31

Kadar ACTH pada kelompok terinfeksi HIV cenderung mengalami peningkatan pada pemeriksaan hari ke tujuh dan ketiga puluh satu. Pada kelompok HIV negatif terjadi penurunan yang tajam kadar ACTH pada pemeriksaan hari ketujuh, dan cenderung meningkat pada pemeriksaan hari ketiga puluh satu. Peningkatan kadar ACTH tersebut masih dibawah kadar ACTH pemeriksaan pertama.

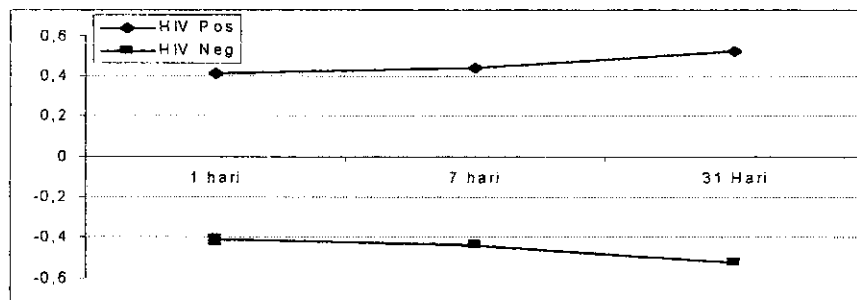
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | 0,1436 | 0,4594 | 0,3113 |
| HIV Neg | -0,1435 | -0,4596 | -0,3113 |



Gambar 5.10 : Grafik perubahan kadar kortisol pengamatan hari ke 1, 7, 31

Kelompok HIV positif terjadi peningkatan kadar kortisol pada pemeriksaan hari ketujuh dan cenderung menurun hari ketiga puluh satu. Kelompok HIV negatif terjadi penurunan kadar kortisol pada pemeriksaan hari ketujuh, cenderung meningkat pada pemeriksaan hari ketiga puluh satu tetapi tidak dapat mencapai kadar pemeriksaan pertama.

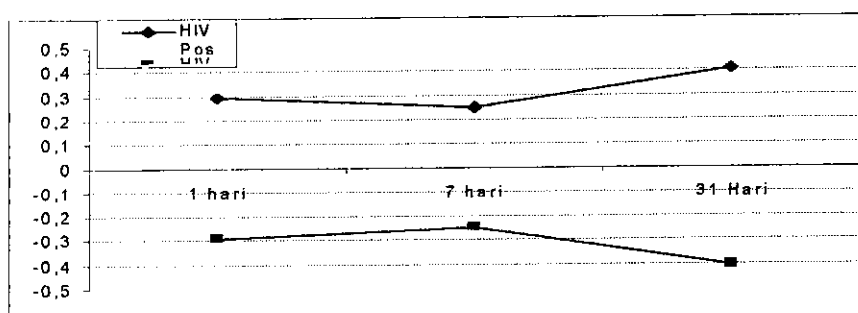
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | 0,4129 | 0,44 | 0,5224 |
| HIV Neg | -0,4126 | -0,4401 | -0,5224 |



Gambar 5.11 : Grafik perubahan Hsp70 pengamatan hari ke 1, 7, 31

Kelompok HIV positif mengalami peningkatan kadar Hsp70 pada pemeriksaan hari ketujuh dan hari ketiga puluh satu dibandingkan pemeriksaan pertama. Kelompok HIV negatif mengalami penurunan pada pemeriksaan hari ketujuh dan semakin menurun hari ketiga puluh satu.

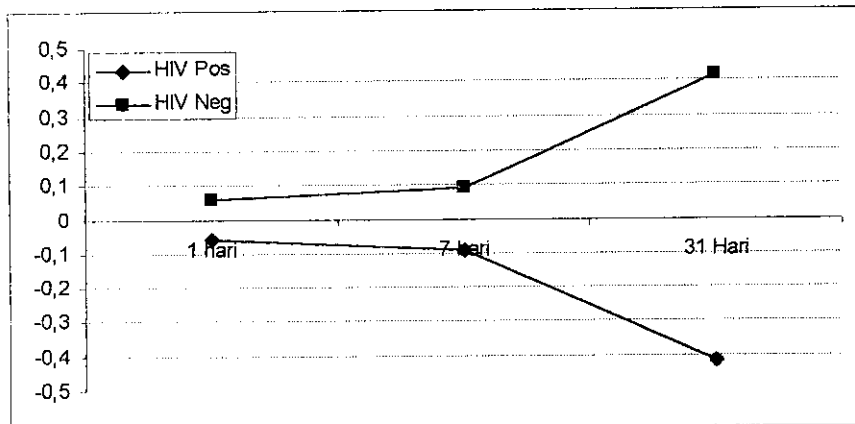
| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | 0,2925 | 0,2488 | 0,4082 |
| HIV Neg | -0,2925 | -0,2488 | -0,4082 |



Gambar 5.12 : Grafik perubahan anti Hsp70 pengamatan hari ke 1, 7, 31

Kadar anti Hsp70 pada kelompok HIV positif terjadi penurunan pada hari ketujuh dan meningkat hari ketiga puluh satu yang melampaui hasil pemeriksaan pertama. Kelompok HIV negatif terjadi peningkatan kadar anti Hsp70 pada pemeriksaan hari ketujuh dan cenderung terjadi penurunan hari ketiga puluh satu.

| | 1 hari | 7 hari | 31 Hari |
|---------|---------|---------|---------|
| HIV Pos | -0,0587 | -0,0932 | -0,4137 |
| HIV Neg | 0,05877 | 0,09316 | 0,4137 |



Gambar 5.13 : Grafik perubahan jumlah *cell death* pengamatan hari ke 1, 7, 31

Jumlah *cell death* pada kelompok HIV positif terjadi penurunan pada pemeriksaan hari ketujuh, menurun tajam pada pemeriksaan hari ketiga puluh satu. Kelompok HIV negatif terjadi peningkatan jumlah *cell death* pada pemeriksaan hari ketujuh dan cenderung terus meningkat tajam pada pemeriksaan hari ketiga puluh satu.

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Transmisi HIV masuk ke dalam tubuh manusia melalui 3 cara, yaitu : (1) secara vertikal dari ibu ke anak, (2) secara transeksual (homoseksual maupun heteroseksual), (3) secara horizontal yaitu kontak antar darah (pemakaian jarum suntik bersama-sama secara bergantian, tatto, tindik, transfusi darah, transplantasi organ, tindakan hemodialisis, perawatan gigi, khitanan masal, dll).

Target infeksi HIV dapat mengenai berbagai sel tubuh terutama yang mampu mengekspresi reseptor CD4 seperti astrosit, mikroglia, monosit-makrofag, limfosit T, limfosit B, dendritik, fibroblas, dan Langerhan's.

Meskipun berbagai sel dapat menjadi target, tetapi HIV cenderung memilih target limfosit T. Limfosit T menjadi pilihan utama karena permukaannya terdapat reseptor CD4 yang merupakan pasangan ideal dan mampu mengikat erat gp120 (*surface glycoprotein 120*) pada permukaan luar HIV (*enveloped*) (Schols, 1996; McCloskey, 1998; Badley, 2000). Walaupun demikian kompleks gp120 dan reseptor CD4 yang terbentuk masih belum memungkinkan HIV masuk kedalam limfosit T melalui proses internalisasi. Proses internalisasi ke limfosit T di tubuh host perlu dibantu oleh peran koreseptor CCR5 dan CXCR4 yang juga berada di permukaan limfosit T (Zavasky, 2001; Oppenheim, 2003). Internalisasi HIV yang didukung reseptor CD4 dan koreseptor CCR5 serta CXCR4 tersebut di kendalikan oleh gp 41. Peran gp 41 transmembran (*transmembrane glycoprotein 41*), menyebabkan permukaan luar dari HIV akan terjadi fusi dengan membran plasma limfosit T-CD4,

sedangkan inti (*core*) HIV melanjutkan masuk ke dalam limfosit T sambil membawa enzim *reverse transcriptase* (Pavlakis, 1997; Lawrence, 2001; Gill, 2004). Enzim *reverse transcriptase* berperan mentranskrip RNA virus menjadi DNA bila virus memasuki sel target. Begitu memasuki sitoplasma limfosit T yang terinfeksi, maka bagian inti HIV yaitu RNA (*single-stranded RNA*) akan berusaha menyesuaikan dengan konfigurasi *double-stranded DNA* dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* yang telah dipersiapkan tersebut. Selanjutnya terjadi penyatuan virion dengan DNA polimerase dan terbentuklah cDNA atau proviral DNA. Begitu terbentuk proviral DNA, proses berikutnya adalah upaya masuk ke dalam inti limfosit T dengan bantuan enzim integrase, maka terjadilah rangkaian proses integrasi, transkripsi yang dilanjutkan dengan translasi protein virus, serta replikasi HIV virion. Jumlah HIV virion yang berlipat ganda kemudian meninggalkan inti. Setelah mengalami modifikasi, saling melengkapi, kemudian berusaha keluar menembus membran limfosit (*budding*). Virion baru yang terbentuk siap menginfeksi limfosit T-CD4 berikutnya. Demikian proses ini terus berlangsung sehingga jumlah limfosit T-CD4 cenderung terus menurun (Drew, 2001; Brooke, 2002; Gill, 2004).

Sehubungan penurunan CD4 tersebut, sesuai dengan hasil penelitian ini (lampiran 3.1). Baik pada kelompok yang terinfeksi HIV maupun kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV keduanya menunjukkan kecenderungan penurunan CD4 sehingga kurang dari 1.000 CD4/mm³. Laju penurunan CD4 pada kelompok yang terinfeksi HIV lebih dramatis daripada kelompok yang belum terinfeksi HIV. Pada kelompok yang terinfeksi HIV penurunan CD4 berlangsung lebih progresif karena memang limfosit T merupakan target utama HIV. Limfosit T

selain terdapat reseptor CD4 pada permukaannya juga dilengkapi dua koreseptor, yaitu CCR5 dan CXCR4 yang semakin mempererat ikatan dengan gp120 pada permukaan luar HIV. Sedangkan pada kelompok yang belum terinfeksi HIV penurunan CD4 masih mungkin akibat intervensi HIV. Meskipun pada saat pemeriksaan serologi HIV dinyatakan non reaktif tetapi bukan berarti bahwa mereka terbebas dari infeksi HIV. Bagaimanapun juga anggota kelompok ini termasuk risiko tinggi (homoseksual, heteroseksual multipartner, pengguna narkoba intravena secara bergantian), sehingga pada saat dilakukan pemeriksaan serologi HIV mereka masih dalam periode jendela (*window periode*). Periode jendela ini terjadi dalam tahap awal dari infeksi, yaitu suatu keadaan seronegatif selama kurun waktu 6 minggu sampai 6 bulan sesudah infeksi. Antibodi spesifik terhadap gp41 dapat dilacak beberapa minggu atau beberapa bulan lebih awal daripada antibodi terhadap p24, dan tetap ada selama perjalanan penyakit. Kadar antibodi spesifik terhadap p24 meningkat mencapai kadar yang dapat di deteksi, dan dapat juga lenyap setelah suatu periode yang pendek. Hal ini terjadi bersamaan dengan peningkatan kadar antigen *core* di dalam serum; diperkirakan sebagai akibat sekuesterisasi antibodi dalam kompleks imun (Handoyo, 2004). Dalam respon imun humoral tersebut dibentuk juga antibodi (*neutralizing antibodies*) terhadap gp120 (bagian luar envelop), dan terhadap gp41 protein transmembran yang merupakan tempat penting pada infeksi HIV (Levy, 1989; Handoyo, 2004). Jadi hasil seronegatif pada kelompok tersebut menunjukkan adanya perkembangan respon imun humoral (pembentukan antibodi) terhadap berbagai macam antigen HIV yang belum memadai.

Begitu kontak dengan limfosit T, maka HIV sebagai stresor biologis akan memicu limfosit T sehingga mengalami stres dengan berbagai perubahan. Perubahan diawali dari ekspresi reseptor CD43 (*sialophorin*) pada permukaan limfosit T. Reseptor CD43 yang terekspresi tersebut kemudian menjadi aktivator, baik terhadap limfosit T-CD4 sendiri maupun terhadap HIV (Barat, 2002; Brown, 2003). Selain itu rCD43 juga berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi reseptor CD69 dan CD40 (Schols, 1996; Barat, 2002).

CD40 merupakan glikoprotein 40-50 kDa, anggota superfamili reseptor *tumour necrosis factor* (TNF). Akhir-akhir ini diketahui bahwa CD40 merupakan ligand untuk Hsp70 (Lehner, 2005). Aktivitas limfosit T-CD4 yang meningkat akibat terinfeksi HIV tersebut menginduksi Th-1 untuk mensekresi IL-1 β , IL-2, TNF- α , dan IFN- γ sehingga kadar dalam darah meningkat. Peningkatan sitokin dan interferon tersebut berpengaruh terhadap peningkatan kadar ROS (Ledru, 1998; Barat, 2002; Oppenheim, 2003). IL-1 β , IL-2, TNF- α , dan IFN- γ , serta CD69 dan CD40 yang terekspresi secara simultan dan meningkatkan aktivitas berbagai protein yang terlibat dalam proses sinyaling, termasuk protein kinase C (PKC), serta mobilisasi kalsium transmembran mitokondria limfosit T-CD4. Peningkatan aktivitas PKC dan mobilisasi kalsium tersebut berpengaruh terhadap mitokondria sehingga meningkatkan produksi ATP dan produksi *reactive oxygen species* (ROS) meningkat (Atanackovic, 2002).

HIV yang telah berada di dalam limfosit T-CD4 tersebut juga teraktivasi oleh pengaruh rCD43, kemudian menginduksi pembentukan kompleks TCR-CD3 dan

bersama-sama CD28 mempengaruhi HIV menjadi lebih aktif. Keadaan tersebut mengakibatkan terjadi peningkatan aktivitas transkripsi, translasi protein, dan replikasi HIV lebih progresif sehingga di dalam sirkulasi mencapai jumlah sangat tinggi, terbentuk berjuta-juta genom HIV per ml. Produksi selama infeksi aktif mencapai 10^9 - 10^{11} partikel virus per hari (Drew, 2001; Barat, 2002; Hirschel, 2003). Bila infeksi berlangsung tanpa upaya pengobatan jumlah virus bisa mencapai 500-1.000.000 kopi HIV-RNA per ml. Viremia yang terus meningkat tersebut akan berusaha menyerang limfosit T-CD4 berikutnya. Pada infeksi akut penurunan tersebut berlangsung dramatis sehingga kurang dari 1.000 CD4/mm^3 . Kemudian naik lagi pada saat serokonversi, dalam fase kronik turun terus dengan laju penurunan 70 sel/ μl setiap tahunnya (Hirschel, 2003). Bila jumlah CD4 mencapai atau melampaui batas kritis $\leq 200 \text{ sel/mm}^3$, maka berarti telah memasuki stadium AIDS dengan atau tanpa manifestasi klinis. Manifestasi klinis dapat terjadi pada jumlah limfosit T-CD4 relatif normal ($\text{CD4} \geq 500 \text{ sel/mm}^3$) atau saat terjadi penurunan sedang ($\text{CD4} 200\text{-}500 \text{ sel/mm}^3$), penurunan berat ($\text{CD4} \leq 200 \text{ sel/mm}^3$). Demikian proses ini akan berjalan berkesinambungan. Tanpa diimbangi upaya intervensi maka dari waktu ke waktu jumlah limfosit T-CD4 akan semakin rendah, membuka peluang infeksi oportunistik dan muncul manifestasi klinis AIDS hingga sepsis (Barat, 2002).

Begitu proses internalisasi limfosit T oleh HIV, selain terjadi perubahan melalui aktivasi limfosit T-CD4 maupun HIV, juga membangkitkan timbulnya protein stres termasuk *heat shock protein*70 (Hsp70). Induktor sintesis Hsp adalah lingkungan stres, ROS, serta banyaknya polipeptida yang tidak terlipat (Stryer, 1995).

Protein Hsp70 (stres-70) terdiri atas bagian ATPase dan bagian pengikat peptida. Bagian ATPase berlobus dua dengan celah di antaranya; nukleotida terikat di dasar celah ini (Stryer, 1995).

Peran Hsp70 antara lain adalah :

1. mengarahkan protein ke berbagai situs di dalam sel, seperti lisosom, mitokondria, dan inti. Pemilahan ini terjadi ketika protein mulai disintesis. Suatu ribosom tetap bebas dalam sitosol, sampai dibimbing ke retikulum endoplasma oleh suatu urutan sinyal dalam protein nasens yang sedang disintesis. Rantai polipeptida nasens yang dibentuk oleh ribosom yang terikat pada membran dipindahkan melintasi membran RE. Dalam lumen RE banyak protein mengalami glikosilasi dan diubah dengan berbagai cara. Selanjutnya protein tersebut dibawa ke kompleks Golgi dan diubah lebih lanjut. Akhirnya protein tersebut dipilah dan diserahkan ke lisosom, vesikel sekresi, dan membran plasma. Sinyal pemandu protein melintasi membran retikulum endoplasma dengan urutan yang sama mengirim protein ke membran plasma untuk mensekresikannya.
2. Hsp70 membantu pelipatan dengan menghadang interaksi molekul yang tidak lazim. Dengan demikian Hsp70 mendapatkan molekul chaperone. Rantai polipeptida nasens dalam lumen RE tidak segera melipat. Polipeptida ini mengikat protein Hsp sehingga tetap tidak terlipat untuk beberapa menit, kemudian Hsp akan mengikat konformasi . Tanpa Hsp polipeptida nasens niscaya akan terjalin kusut. Hsp akan mempertahankan nasens yang baru muncul sampai sintesis lengkap terlaksana. Hsp akan melepaskan polipeptida

nasens pada saat yang tepat. Kompleks Hsp-ADP memiliki afinitas yang tinggi hanya terhadap polipeptida yang belum terlipat dan tidak terhadap protein alamiah. Pengikatan penggalan polipeptida yang belum terlipat ke Hsp akan membebaskan ADP, sehingga ATP yang baru dapat masuk ke dalam situs katalitik Hsp. Kompleks ATP-Hsp membebaskan penggalan peptida. Hidrolisis berikutnya yang dialami ATP yang terikat ini memungkinkan Hsp untuk kembali mengikat penggalan lain yang belum terlipat. Waktu antara pengikatan dan pembebasan ditentukan oleh laju hidrolisis. Bersamaan dengan berlangsungnya pelipatan, makin sedikit rantai peptida nasens yang dapat diikat oleh Hsp. Pada hakekatnya Hsp berusaha menunda waktu yang tepat sehingga pelipatan yang tepat ini merupakan masalah termodinamika.

3. Hsp70 merupakan protein protektif endogen (Hung, 2002; Kirchhoff, 2002). Hsps mempunyai peranan penting dalam proses biologis seperti pelipatan protein, translokasi, dan kehidupan sel (Hung, 2002). Respon seluler terhadap infeksi virus dan induksi Hsps sangat tergantung dari tipe virus yang menginfeksi dan tipe sel (Hung, 2002). Meskipun berbagai virus disebutkan dapat menginduksi Hsps tetapi penelitian ke arah itu masih belum dilakukan. Infeksi oleh virus influenza melibatkan Hsp40 dan terlibat dalam pengendalian P68 protein kinase (PKR) yang memediasi respons interferon. Hsp40 membentuk kompleks dengan p58, dan menghambat PKR di dalam sel (Hung, 2002). Selama berlangsungnya infeksi virus influenza, kompleks inhibitor melepaskan ikatan P58 ke PKR, memblokir fosforilasi pada

subunit α dari faktor 2 dari eukaryotic, dan merangsang sintesis protein di dalam sel yang terinfeksi virus (Hung, 2002).

4. mengendalikan struktur sekunder, tersier, dan kuartener sebagian besar protein. Secara spontan setelah sintesis kemungkinan informasi setelah konformasi protein yang aktif secara biologik (native) sudah disandikan di dalam urutan asam aminonya. Dalam keadaan fisiologik, pelipatan protein menguntungkan struktur alamiah (native) protein. Keadaan dimana protein kehilangan konformasi alamiahnya disebut denaturasi protein. Denaturasi terjadi bila nilai pH terlalu ekstrim, pada temperatur yang tinggi atau sebagai akibat pemberian zat pelarut atau substansi lain yang dapat mendenaturasi. Konformasi protein dapat distabilkan dengan bantuan interaksi, seperti jembatan hidrogen, jembatan disulfida, interaksi elektrostatis, dan pembentukan kompleks dengan ion logam, serta efek hidrofobik. Mengenai urutan asam amino suatu protein menentukan struktur tiga dimensi dan bagaimana suatu rantai polipeptida yang tidak terlipat memperoleh bentuk protein alami, hal itu perlu ada yang mengatur dan mengendalikan. Protein tidak dapat melipat dengan mencari konformasi secara acak. Pembentukan lipatan protein terjadi dengan stabilisasi berbagai zat antara yang terjadi secara progresif. Suatu rantai polipeptida yang terurai dengan cepat memadat yang mempunyai lebih banyak bersifat struktur sekunder, bukan struktur tersier yang tersusun padat seperti strukturnya yang alamiah. Pembentukan susunan yang padat disebabkan karena berbagai rantai samping hidrofobik

perlu dilindungi. Pembentukan lipatan protein ternyata diarahkan oleh interaksi yang juga menstabilkan bentuk akhir protein yang terlipat. Berbagai unit lipatan menstabilkan struktur lain yang kurang stabil. Penglipatan protein dalam sel kebanyakan berlangsung dengan bantuan enzim. Protein disulfida isomerase mengkatalisis pengacakan ikatan disulfida untuk menemukan pasangan yang cocok. Peptidil prolil isomerase juga memainkan peran kunci dalam pembentukan lipatan dengan cara mempercepat isomerase cis-trans ikatan peptida prolil. Dalam suasana yang penuh sesak di dalam sel, protein-protein nasens akan melipat secara abnormal bila tidak bertemu pendamping Hsp (molekul chaperone). Protein pemandu, banyak mendapat tenaga dari ATP, memperkecil kemungkinan agregasi protein dan menguraikan semua agregat yang telah terbentuk. Struktur tiga dimensi dari urutan asam amino, satu dimensi dapat dijadikan suatu arsitektur tiga dimensi yang merupakan penentu aktivitas biologik. Penglipatan protein dalam sel dibantu oleh katalis. *Protein disulfida isomerase* (PDI) mempercepat pertukaran disulfida beberapa ribu lipat pada bentuk antara yang ditangkap secara kinetik. *Peptidil prolil isomerase* (PPIase) sangat mempercepat isomerisasi ikatan-ikatan peptida. Protein yang terentang dan yang terlipat sebagian dalam konsentrasi tinggi cenderung beragregasi. Hsp sebagai protein pendamping menghambat perlekatan yang tidak benar dan membongkar hubungan yang tidak benar. Aksi pembongkaran oleh Hsp digerakkan oleh hidrolisis ATP. Langkah pertama dalam ramalan struktur adalah terletak pada suatu protein baru serupa dengan protein lain

yang struktur tiga demensinya sudah diketahui. Bila urutan dua protein lebih dari 40% identik, konformasi tulang punggungnya sangat mungkin hampir sama di bagian yang identik. Sepasang protein yang nyata berbeda urutannya secara esensial dapat mempunyai struktur tulang punggung yang pada dasarnya sama bila pola hidrofiliknya serupa. Motif fungsional dalam protein dapat juga diidentifikasi dengan meninjau sekilas urutan asam amino.

Pada penelitian ini, protein stres yang dominan pada pemeriksaan pertama ditandai oleh peningkatan kadar *Heat shock protein70* (Hsp70) seperti yang tertera pada lampiran 3.1. Dari data (lampiran 3.1) tersebut dapat dicermati adanya dominasi kadar Hsp70 pada pemeriksaan pertama yang dilakukan pada saat individu belum mengetahui status serologi HIVnya. Peningkatan Hsp70 tersebut bisa terjadi oleh pengaruh lingkungan internal yang stres akibat di picu stresor biologis HIV. Stresor biologis HIV mempengaruhi ekspresi reseptor CD40 pada permukaan luar limfosit. Reseptor CD40 tersebut di peruntukkan bagi Hsp70 (Lehner, 2005). Oleh karena itu wajar bila induktor HIV memicu peningkatan Hsp70 pada kelompok yang terinfeksi HIV sebagaimana ditampilkan pada hasil penelitian ini.

Mekanisme HIV sebagai induktor aktivitas Hsp70 sebagai berikut. Beberapa faktor bertindak sebagai induktor Hsp70. HIV merupakan salah satu dari induktor sintesis Hsp70 dan HSF1. Aktivitas yang mengganggu HSF1 mempengaruhi interaksi regulatori negatif antara Hsp70 dan HSF1. Aktivitas makrofag yang meningkat pada infeksi HIV cenderung mendorong peningkatan metabolisme asam arakhidonat yang berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas HSF1. Dan penurunan temperatur akan semakin meningkatkan induksi Hsp. Karena asam arakhidonat sebagai mediator

utama serta prekursor respons inflamasi yang berupaya beradaptasi terhadap aktivitas Hsp70 di dalam atau mendekati sel yang terinfeksi. Mekanisme induksi dan akumulasi Hsp70 intraseluler potensial sebagai pengendali dan pencegah kesalahan lipatan protein sehingga menghindarkan progresivitas penyakit. HIV memicu peningkatan kadar Hsp70 melalui reseptor CD40. Jadi induksi Hsp70 sangat efektif mencegah atau meminimalkan progresivitas infeksi HIV ke AIDS.

Keberadaan Hsp70 tersebut di induksi oleh pengaruh stresor biologis HIV yang telah mengintervensi limfosit T dan meningkatkan ekspresi reseptor CD40. Dari hasil penelitian ini (lampiran 3.1) ditunjukkan bahwa peningkatan kadar Hsp70 lebih menonjol dan munculnya mendahului stress protein yang lain termasuk kortisol. Hal tersebut dimungkinkan karena Hsp termasuk protein kecil (kDa) sehingga mampu tampil lebih awal dan diperlukan oleh HIV sebagai ligand Hsp70. HIV sendiri memerlukan peran reseptor CD40 guna mengikat Hsp70 (Hsp70 sebagai ligand CD40).

HIV yang masuk ke tubuh merupakan stresor biologis yang berdampak luas (Mayer, 2003). HIV dapat mempengaruhi seluruh organ tubuh termasuk otak, sistem imun, organ-organ visera (Mayer, 2003). Stresor HIV akan di respons oleh sistem saraf pusat yang melibatkan otak, hipotalamus, batang otak, hipofisis, serta saraf perifer (Black, 1994). Dampak dari stresor biologis HIV tersebut akan menstimulir sel otak untuk memproduksi dan sekresi berbagai molekul sinyal seperti neurotransmitter, neuropeptida, neurohormon, maupun neuroendokrin molekul efektor. Molekuler sinyal tersebut dapat memodulasi respons imun.

Begitu diagnosis terinfeksi HIV disampaikan, maka hal tersebut merupakan stresor psikologis yang menyebabkan stres. Hal ini karena neuron pada *paraventricular nuclei* (PVN) menerima persarafan dari berbagai lokasi antara lain dari sistem limbik (*limbic system*) dan korteks serebri (*cerebral cortex*). Hantaran sinyal yang berasal dari pemicu psikis diperkirakan mencapai PVN melalui sistem limbik, sedangkan yang berasal dari pemicu fisik melalui korteks serebri (Suryohudoyo, 1999).

Stresor psikologis akan menyebabkan ekspresi astrosit di amigdala – hipotalamus serta mikroglia. Akibatnya astrosit dan mikroglia tersebut menjadi aktif dan mensekresi berbagai interleukin yaitu : IL-1 β , IL-2, IL-6 serta IFN- α . Demikian juga infeksi HIV dapat menginduksi IFN- α , IL-1 β , TNF- α yang menstimulasi *paraventricularis nucleus* (PVN) di hipotalamus sehingga memproduksi molekul sinyal, yaitu *corticotropin-releasing factors* (CRF) dan dapat menyebabkan neuroinflamasi atau neuro-AIDS. *Corticotropin-releasing factors* (CRF) tersebut mempunyai peranan ganda yaitu sebagai neurotransmitter dan neuroendokrin yang dapat mempengaruhi reseptor sel basofil di hipofisis anterior. Sel basofil menjadi aktif dan mensekresi *POMC* (*pro opio melanocortin*), pasca translasi akan menghasilkan hormon *ACTH* (*adeno corticotropic hormon*), α, β, γ -*MSH* (*melanosit stimulating hormon*), dan β -*endorfin* (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Viviani, 2001). Hormon *ACTH* mengikuti aliran darah sistemik, kemudian mempengaruhi spongiosit (sel-sel zone fasikulata korteks) adrenal sehingga memicu peningkatan kadar kortisol, serta berpengaruh pada sel medula adrenal sehingga mengakibatkan peningkatan kadar

katekolamin (epinifrin, norepinefrin, dopamin) dalam darah (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Nair, 2000).

Sejalan dengan teori yang dikemukakan tersebut, hasil penelitian ini juga menunjukkan peningkatan kadar kortisol pada kelompok yang terinfeksi HIV daripada kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV. Seperti yang terungkap pada hasil pemeriksaan kedua (hari ke-7) ditandai kadar kortisol yang lebih tinggi pada kelompok yang terinfeksi HIV daripada kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV (lampiran 4.1). Perbedaan kadar kortisol pada pemeriksaan kedua ini seiring dengan pengaruh stres akut yang dipicu oleh stresor diagnosis terinfeksi HIV sebagai pemicu stres akut. Stres akut umumnya terjadi di dalam dua minggu pertama dari awal paparan stresor, dengan puncak stres pada hari ke-7. Sesuai dengan pernyataan tersebut pada pemeriksaan ke-2 yang dilakukan pada hari ke-7 sejak diagnosis terinfeksi HIV dikemukakan, di dapatkan perbedaan kadar kortisol yang signifikan antara kelompok yang terinfeksi HIV dengan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi (12.377 ± 4.046 vs 8.650 ± 3.213).

Guillemin dan Rosenberg (1955) telah menunjukkan pengaruh hipotalamus pada kelenjar hipofise melalui *corticotropin releasing factor* (CRF) atau corticotropin releasing hormone (CRH) atau kortikoliberin. Mekanisme kerja CRH melalui pengaktifan adenilat siklase, mengadakan ikatan dengan reseptor di kelenjar hipofise dan ikatan tersebut mengubah ATP menjadi c AMP yang selanjutnya menstimulir pengeluaran *adenocorticotrophin hormone* (ACTH). ACTH merupakan polipeptida rantai tunggal yang mengandung 39 asam amino, berasal dari *pro-opiomelanokortin*

(POMC) di hipofise. Dua puluh tiga asam amino pertama dalam rantai membentuk “inti” aktif molekul dan peptida sintetik yang mengandung 23 asam amino dengan aktivitas penuh dari peptida 39 asam amino. Sehingga asam amino 24-39 merupakan “ekor” yang menstabilisasi molekul tersebut. Waktu paruh ACTH di dalam sirkulasi sekitar 10 menit (Umar Kasan, 1987).

Hasil pemeriksaan ACTH dari pemeriksaan pertama, kedua dan ketiga dari kelompok yang terinfeksi HIV dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil pemeriksaan ACTH pertama, kedua, dan ketiga dari kelompok yang terinfeksi HIV maupun kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal tersebut dimungkinkan karena kedua kelompok mempunyai potensi yang sama dalam mengalami kegelisahan, kecemasan. Kedua kelompok kiranya menyadari adanya risiko terinfeksi HIV. Kelompok yang serologi negatif mempunyai dua makna yaitu memang betul-betul tidak terinfeksi HIV yang dalam hal ini perlu dilakukan pemeriksaan berulang dua atau tiga bulan mendatang. Sedangkan kemungkinan kedua mereka dalam fase jendela sehingga saat pemeriksaan reaksi antigen antibodinya masih negatif akibat belum cukupnya kadar antibodi untuk merespons antigen tersebut. Untuk itu perlu dilakukan pemeriksaan antigen komponen HIV, yaitu pemeriksaan terhadap gp120, gp41, p18, dan p24.

Stresor akut pada penelitian ini dimaknakan sebagai penetapan diagnosis (pernyataan kepada subyek bahwa dirinya terinfeksi HIV), berdampak terhadap peningkatan kortisol. Berarti dalam pemeriksaan kedua ini selain pengaruh stresor biologis dari HIV juga berkembang pengaruh stresor psikologis akibat pernyataan

terinfeksi tersebut. Namun pengaruh stresor psikologis lebih dominan (lampiran 4.1). Dalam hal ini tubuh merespons melalui korteks serebri sebagai respons fisik terhadap stresor HIV dan melalui sistem limbik merespon stresor psikologis. Aktivasi dari korteks serebri dan limbik tersebut meningkatkan aktivitas aksis hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA), yang berdampak terhadap berbagai sel tubuh termasuk sel saraf antara lain astrosit, mikroglia. Astrosit dan mikroglia menjadi aktif memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamatori (IL-1 β , IL-6, TNF- α), produksi *reactive oxygen species* (ROS). Sitokin proinflamatori tersebut, bersama serotonin, norepinefrin, dan asetilkolin, akan mempengaruhi *paraventriculer nucleus* (PVN) di hipotalamus, kemudian memproduksi molekul sinyal berupa *corticotropin-releasing factors* (CRF). CRF tersebut bertindak sebagai koordinator respons stres. Berbagai neuron juga memproduksi CRF tetapi kadar tertinggi didapatkan di PVN (Black, 1994). Dalam waktu singkat yaitu dalam hitungan menit sejak terjadi stres akut akan meningkatkan mRNA CRF, disusul peningkatan kadar CRF pada PVN. CRF kemudian bergerak menelusuri akson ke bagian medial hipotalamus dan akhirnya dilepaskan pada penghujung pembuluh darah kapiler dalam pleksus venous hipofisialportal yang merupakan muara kelenjar hipofisis anterior. CRF kemudian mengaktifkan reseptor basofil pada hipofisis anterior, dan menginduksi polipeptid *proopiomelanocortin* (POMC) yang pasca translasi memproduksi ACTH, α, β, γ *melanosit stimulating hormone* (MSH), dan β endorfin. ACTH menstimuler spongiosa pada zona fasikulata korteks adrenal untuk memproduksi kortisol sebagai hormon stres (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Viviani, 2001). Hormon *ACTH*

mengikuti aliran darah sistemik, kemudian mempengaruhi spongiosit (sel zone fasikulata korteks) adrenal sehingga memicu peningkatan kadar kortisol, serta berpengaruh pada sel chromafin medula adrenal sehingga mengakibatkan peningkatan kadar katekolamin (epinifrin, norepinefrin, dopamin) dalam darah (Chrousos, 1995; Seeley, 1998; Nair, 2000).

Respons melalui sensitisasi CRF ternyata menstimuler dua komponen yang berbeda, yaitu hormonal dan non-hormonal (Mayer, 2003). Respons stres dapat menyebabkan aktifnya reseptor CRF1 (CRF1R) pada neuron non-hipotalamus dan menghasilkan perubahan regulasi sebagai *feedback* terhadap aksis HPA dengan meningkatkan aktivitas ekspresi reseptor mineralokortikoid di hipokampus (Mayer, 2003). CRF1, yang juga lazim disebut CRH mempunyai kaitan erat dengan peptida, mediator-mediator dengan respons yang terintegrasi, baik adaptif maupun maladaptif. Sejak diketahui 20 tahun yang silam neuropeptida CRF dan reseptornya menunjukkan keterkaitan stres dengan sistem saraf pusat dan perifer dengan berbagai molekul sinyal. Pengaruh CRF juga dikendalikan oleh tiga *agonist endogen* CRF (CRF, urocortin (Ucn), Ucn II dan Ucn III) yang berinteraksi dengan ketiga reseptor protein G (CRF1R, CRF2R, dan CRF3R) di berbagai tempat di otak (Mayer, 2003). CRF1Rs penting didalam mempengaruhi perilaku, neuroendokrin dan memodulasi respon nyeri terhadap stres. CRF2Rs berperan untuk *counter* regulasi terhadap aktivitas CRF/CRF1R melalui pengendalian nafsu makan dan fungsi kardiovaskuler. CRF2R memediasi neuroendokrin atau aksis HPA dan *behavioral response* terhadap stres (Mayer, 2003)

Dengan demikian dapat difahami bahwa peran otak melalui produksi dan sekresi mediator, ROS, dan sitokin dalam merespon stres begitu hebat dan salah satu respons berakibat peningkatan kadar kortisol (Black, 1994). Di antara ketiga sitokin (IL-1, IL-6, TNF α), peran IL-1 lebih dominan dalam menginduksi terjadi peningkatan kadar kortisol dalam darah daripada IL-6 dan TNF- α (Besedovsky, 2001).

Oleh karena itu dalam pemeriksaan kedua ini (lampiran 4.1) dapat diamati adanya peningkatan kadar kortisol disertai peningkatan kadar Hsp70. Pemeriksaan kedua (hari ke-7) ini kadar Hsp70 rerata lebih tinggi dari pada hasil pemeriksaan pertama (1.5757 ± 0.8127 vs 0.9579 ± 0.3969). Kadar Hsp70 yang tinggi pada pemeriksaan pada hari ke-7 ini dapat dijelaskan kalau pada pemeriksaan pertama munculnya Hsp70 lebih di induksi oleh paparan stresor biologis HIV yang berhasil mengintervensi limfosit melalui aktivasi reseptor CD40. Pada pemeriksaan hari ke-7 ini meningkatnya kadar Hsp70 selain dipicu stresor biologis HIV terhadap limfosit T, juga oleh stres psikologis dari pernyataan terinfeksi HIV, serta dari berbagai produk dari beberapa jenis sel sistem imun lain maupun sel non imun. Reseptor CD40 yang diperuntukkan bagi Hsp70, tetapi juga terdapat di sel epitel (Lehner, 2005). Perkembangan selanjutnya semakin banyak sel yang terlibat dan semakin banyak jumlah virus. Produksi selama infeksi aktif bisa mencapai 10^9 - 10^{11} partikel virus per hari (Drew, 2001; Barat, 2002; Hirschel, 2003). Bila infeksi berlangsung tanpa upaya pengobatan jumlah virus bisa mencapai 500-1.000.000 kopi HIV-RNA per ml. Viremia yang terus meningkat tersebut akan berusaha menyerang limfosit T-CD4 berikutnya.

Pada analisis diskriminan ternyata antara kortisol dan Hsp70 tidak saling terkait. Kortisol dipicu oleh stresor psikologis yang disalurkan melalui sistem limbik. Sedangkan Hsp70 oleh pengaruh stresor biologis yang disalurkan melalui korteks serebri. Antara kortisol dengan Hsp70 saling berinteraksi. Interaksi tersebut dimungkinkan karena Hsp70 merupakan salah satu regulator protein termasuk regulator reseptor glukokortikoid. Interaksi terjadi melalui *head shock proteins-receptor glukokortikoid* (Smith, 1998).

Kortisol berpengaruh tidak langsung terhadap proses *folding* protein. Pengaruh tersebut ditunjukkan melalui *head shock proteins* (Hsp) yang berinteraksi terhadap berbagai sinyal protein. Hsp90 dan Hsp70 merupakan regulator protein termasuk regulator reseptor glukokortikoid, sehingga terjadi interaksi *Head shock proteins-receptor glukokortikoid* (Smith, 1998). Beberapa molekul sinyal mempunyai peranan di dalam rangkaian *folding* protein antara lain : Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40. Dari beberapa Hsp tersebut yang mempunyai peranan penting dalam rangkaian *folding* adalah Hsp90, Hsp70, Hsp60 dan Hsp40. Retikulum endoplasmik (RE) memiliki kompleks Hsp. Ada dua RE *chaperonins* yaitu Bip/Grp78 dan Grp94/gp96, yang berturut-turut merupakan anggota dari famili Hsp70 dan Hsp90 (Benjamin, 1998; Ranford, 2000; Nollen, 2002).

Batasan stres akut dan kronis umumnya 14 hari dari paparan stresor, dengan tingkat stres tertinggi pada hari ke-7. Ketika stres kronik berlangsung maka pasien yang telah mendapatkan konseling pasca pemeriksaan serologi HIV akan semakin menerima kenyataan, mengambil hikmah dari peristiwa masa lalu. Pasien juga akan menghadapi dampak stresor psikologis dari pernyataan terinfeksi melalui sikap

positif. Untuk mempertahankan stabilitas internal, sel akan berusaha keras merespon pengaruh lingkungan internal yang stres melalui mekanisme homeostasis. Konsep homeostasis pertama diperkenalkan oleh W.B.Cannon tahun 1939, yang kemudian dipertajam pada proses-proses internal oleh Hipokrates bapak kedokteran dan Claude Bernard bapak fisiologi. Jadi homeostasis meliputi lingkungan internal dan eksternal. Keseimbangan psikologis dan fisiologis yang dikendalikan melalui berbagai mekanisme baik secara sistem saraf otonom maupun endokrin. Bila stres berlangsung berkepanjangan dapat berakibat upaya mempertahankan homeostasis fisiologis tidak efektif, sementara homeostasis psikologis akan dipertahankan melalui *coping*.

Upaya mempertahankan diri melalui perilaku *coping* (*coping-behavior*) yang efektif, walaupun stres meningkat tetapi psikopatologi dapat dicegah. Keberhasilan tersebut dilalui, karena *coping* alamiah yang dipercepat oleh pengaruh konseling secara berkesinambungan dan pendampingan sehingga kadar ACTH tidak meningkat pada penelitian ini. Setiap manusia memiliki *coping* alamiah yang merupakan respons terhadap berbagai peristiwa. Hal ini dapat mempengaruhi proses pembelajaran (*learning process*) diberbagai sel otak sehingga astrosit, mikroglia, neuron mengurangi produksi dan sekresi. Sehubungan rangkainan proses penerimaan penyakit terminal dan kematian yang dikemukakan Dr. Kubler-Ross (*Denial and isolation, anger, depression, bargaining, and acceptance*), maka mekanisme pertahanan alamiah serta pengaruh konseling dan pendampingan diharapkan memperpendek rangkain tersebut dari *denial* ke *bargaining* bahkan *acceptance*. Dampak percepatan penerimaan penyakit tersebut mempengaruhi mekanisme *coping*

dan menurunkan aktivitas HPA. Penurunan aktivitas HPA berpengaruh terhadap penurunan produksi dan sekresi neuromodulator beserta neurotransmitter. Selanjutnya terjadi pengurangan produksi dan sekresi kortisol oleh spongiosa zona fasikulata korteks adrenal.

Keberhasilan pasien terinfeksi HIV mempertahankan homeostasis sel pada penelitian ini ditandai kadar yang rendah atau tidak muncul kortisol. Hsp70 dan anti Hsp70 justru lebih menonjol pada pemeriksaan ke-3 yang dilakukan pada hari ke-31. Selama stres kronis berlangsung pasien maupun keluarga terdekatnya diberikan konseling berulang sehingga dampak stres psikologis maupun stres psikososial diminimalkan. Menurunnya stres psikologis dan psikososial tersebut akan mempengaruhi aktivitas sistem limbik, aksis HPA dan menurunnya kadar kortisol seperti yang di dapatkan pada penelitian ini (lampiran 5.1)

Pada pemeriksaan ke tiga (hari ke-31) yang menonjol adalah kenaikan kadar Hsp70 dan anti Hsp70 seperti yang tertera pada lampiran 5.1. Karena dampak stres psikologis diredam melalui *coping* alamiah yang diperkuat adanya pendampingan dan konseling maka kortisol tidak lagi muncul pada pemeriksaan ketiga. Hsp70 meningkat secara signifikan pada kelompok terinfeksi HIV (1.6907 ± 0.9175 vs 0.8464 ± 0.3608) pada pemeriksaan ketiga (hari ke-31), dibandingkan dengan pemeriksaan pertama (1.3007 ± 0.6904 vs 0.8214 ± 0.3157), dan kedua (hari ke-7) (1.5757 ± 0.8127 vs 0.9579 ± 0.3969). Terdapat kecenderungan peningkatan Hsp70 dari stres akut ke kronis. Peningkatan kadar Hsp70 tersebut terjadi dalam rangka upaya untuk mempertahankan kelangsungan hidup limfosit T melalui sifat sitoprotektor

Hsp70 pada fase awal. Tetapi bila kadar Hsp70 terus menerus tinggi, maka dapat menyebabkan timbulnya *injury cell*. Melalui peran sitoprotektif Hsp70 pada fase awal tersebut progresivitas apoptosis limfosit T dapat dihambat.

Perubahan biologis dari kehadiran HIV tentunya akan melahirkan perubahan biologis sesuai konsep *General Adaptation Syndrome* (GAS), yaitu *alarm stage*, *the stage of resistance or adaptation*, dan *the stage of exhaustion* seperti halnya hasil penelitian Hans Selye pada tahun 1946 (Putra, 1999). Menurut Selye, penampilan respons biologis terhadap stressor ada tiga, yaitu respons dengan penampilan alarm, adaptasi atau *eustress*, dan kelelahan dapat berakibat apoptosis. Stresor biologis dapat menginduksi terbentuknya protein tertentu yang disebut stres protein. Awalnya protein ini dihasilkan sel sebagai upaya melindungi diri agar bertahan hidup. Selanjutnya protein tersebut terlibat sebagai *molecular chaperones*, yang dapat menimbulkan perubahan kualitas protein fungsional. Respons sel terhadap stresor tergantung pada jenis, lama, dan beratnya. Efek yang ditimbulkan sangat tergantung pada jenis (labil, stabil, permanen), status, dan kemampuan adaptasi sel. Sel normal mempunyai keseimbangan fungsi yang harus dipertahankan. Kemampuan tersebut dimungkinkan karena sel mempunyai inti, organela, dan sitosol sebagai media cair. Bila keseimbangan ini terganggu atau bahkan tidak dapat dipertahankan maka sel akan mengalami apoptosis.

Peningkatan Hsp70 pada penelitian ini akibat pengaruh stresor biologis HIV yang dari waktu ke waktu pengaruhnya cenderung semakin kuat. Kuatnya pengaruh tersebut sehubungan replikasi HIV yang terus berlangsung dengan kecepatan rerata mencapai 10^9 - 10^{11} partikel virus per hari yang semakin menambah padatnya HIV

(*viral load*) di dalam sirkulasi (Drew, 2001; Barat, 2002; Hirschel, 2003). Selain itu juga semakin banyak limfosit T serta pengaruh sel yang mengekspresi CD4 yang secara simultan terus bertambah. HIV yang mengikuti sirkulasi sistemik akan mempengaruhi berbagai sel yang mempunyai protein CD4 pada permukaannya seperti astrosit, mikroglia, monosit-makrofag, dendritik, Langerhan's. Berbagai sel tersebut teraktivasi untuk memproduksi Hsp70. Epitel pada permukaan saluran pencernaan pun ikut teraktivasi atas pengaruh langsung dari gp41 HIV. Epitel juga potensial mengekspresikan Hsp70 dengan dimilikinya reseptor CD40 yang merupakan reseptor Hsp70.

Pada pemeriksaan ke-3 (lampiran 5.1) juga ditandai oleh peningkatan kadar anti Hsp70 pada kelompok yang terinfeksi HIV daripada kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV. Berarti sel sistem imun pada kelompok subyek pada penelitian ini masih memberikan respons terhadap Hsp70. Responsnya semakin menurun dari waktu ke waktu terutama pada kelompok yang terinfeksi HIV. Hal ini dapat diamati dari hasil pemeriksaan pertama kadar anti Hsp70 pada kelompok yang terinfeksi HIV dan yang belum terinfeksi HIV (291.821 ± 107.816 vs 244.343 ± 29.005). Sedangkan pada pemeriksaan ke dua (hari ke-7) (300.879 ± 171.880 vs 237.893 ± 39.879) dan terus menunjukkan kecenderungan penurunan kadar anti Hsp70 pada pemeriksaan ke tiga (hari ke-31) (278.414 ± 58.913 vs 231.364 ± 47.270). Kecenderungan penurunan kadar anti Hsp70 tersebut dapat mencerminkan semakin lemah respons sel dalam mempertahankan homeostasis melalui GAS. Penyebab lain

adalah stresor biologis HIV yang semakin kuat, semakin tinggi kadar ROS akibat hiperaktivitas mitokondria selama infeksi berlangsung.

Human immunodeficiency virus (HIV) tentunya merupakan stresor biologis yang berpengaruh terhadap stres dan berkembang menjadi distress akibat diagnosis dinyatakan terinfeksi HIV bagi penderitanya. Distres yang dialami individu tersebut akan mempengaruhi berbagai komponen tubuh termasuk sel dan protein termasuk *heat shock protein* (Hsp). ROS yang banyak diproduksi selama infeksi HIV tentunya akan memperberat stres protein, memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstraseluler yaitu *receptor mediated pathway* dan jalur intraseluler yaitu *mitochondrial mediated pathway*.

Peranan *heat shock proteins* (Hsp) pada apoptosis limfosit T-CD4 belum sepenuhnya diketahui. Awalnya over ekspresi dari Hsp bertujuan untuk mencegah terbentuknya agregat protein dan menghindari terjadinya apoptosis limfosit T-CD4 (Kobayashi, 2000). Aktivitas yang berlebihan akibat pengaruh ROS, maka peran sitoprotektif Hsp diduga terjadi penurunan sehingga terjadi apoptosis limfosit T-CD4 patologis yang dipercepat. Beberapa jalur dapat ditempuh dalam rangka mempertahankan kehidupan sel, stabilitas protein, melalui peran *molecular chaperone*. Untuk itu ditempuh melalui jalur sinyal dengan menginduksi Hsp, misalnya pada Hsp72 dan Hsp27, dengan jalan aktivasi sinyal protein kinase ekstraseluler. Adanya aktivasi *stress* kinase, *c-Jun NH2-terminal kinase*, hal ini akan menentukan terjadi atau tidaknya kematian sel melalui apoptosis.

Hsp mulai banyak dibicarakan pada akhir abad ke-20 sebagai respons terhadap stresor yang menyebabkan stres yang mampu menginduksi ekspresi protein

tertentu dalam upaya mempertahankan kelangsungan hidup sel tersebut. Pada perkembangan lebih lanjut, yaitu pada abad ke-21 Hsp diketahui sebagai molekuler sinyal (Ranford, 2000). Hsp merupakan imunogen yang potent, dalam arti mempunyai kemampuan menginduksi serta memberi respons terhadap sistem imun spesifik sangat kuat.

Berbagai peran Hsp terutama dalam proses metabolisme, pertumbuhan, deferensiasi, kematian sel terprogram (apoptosis), serta mempengaruhi aktivasi berbagai enzim dan reseptor (Ranford, 2000; Sullivan, 2002). Di dalam sitoplasma, Hsp berinteraksi dengan berbagai protein lain sehingga memungkinkan berlangsungnya mekanisme *folding, refolding*. Oleh karena itu peran Hsp dikenal luas dalam berbagai fungsi utama sel.

Hsp merupakan subkelompok oligomeric *molecular chaperones*, termasuk subklas GroE dan TCP-1 (*T-complex polypeptide 1*). Termasuk subklas GroEL adalah *chaperonin 60* dan termasuk GroES adalah *chaperonin 10*. GroEL maupun GroES berperan penting dalam *folding* protein di dalam sel baik dalam kondisi normal maupun kondisi stres. Ewalt dkk (1997), mengemukakan bahwa dalam kondisi normal GroEL menentukan *folding* 10-15% dari seluruh protein sitoplasma, sedangkan pada kondisi stres (*heat stress*) terjadi peningkatan *folding* menjadi 30%.

Kadar Hsp90, Hsp70, Hsp60 merupakan stres protein, akan meningkat bila individu atau sel mengalami stres termasuk akibat terinfeksi HIV.

Mitokhondria merupakan tempat pembentukan energi sel dan banyak menghasilkan radikal bebas endogen. Ironisnya mtDNA tidak mempunyai intron dan

histon yang protektif sehingga rentan terhadap kerusakan akibat radikal bebas. Pada kondisi normal radikal bebas endogen dikelola melalui berbagai reaksi yang dikatalisasi oleh katalase dan glutathion peroksidase-reduktase serta ferro dan copper katalase yang terjadi pada reaksi Fenton (Putra, 2003). Pada keadaan patologis atau pada kejadian infeksi terjadi akumulasi stres oksidatif. Akibat produksi stres oksidatif yang begitu tinggi selama berlangsungnya infeksi, mekanisme pengelolaan (*coping mechanisme*) ini mulai menurun sehingga terjadi penurunan kualitas keseimbangan (*eustress*) dan bahkan terjadi ketidakseimbangan yang berat atau terjadi kondisi *distres*.

Akibat stresor biologis yang terus menerus dan kegagalan dalam mekanisme pengelolaan, penurunan Hsp70, meningkatnya antibodi anti Hsp70 maka protektif sel menurun, kualitas kontrol menurun maka struktur tiga dimensi protein tidak bisa terbentuk dan atau gagal dipertahankan. Semuanya berakibat terganggunya mekanisme pelipatan protein, terjadi agregasi dan denaturasi protein. Padahal protein merupakan komponen penting dari sel, fragmentasi DNA mitokhondria tidak dapat dihindarkan, terjadi apoptosis.

Perubahan pada limfosit yang terpapar HIV potensial berpengaruh terhadap mutasi mtDNA. Mutasi tersebut akan mempercepat penurunan jumlah limfosit T-CD4 dan semakin membuka peluang tumbuh kembangnya berbagai mikroorganisme. Mempercepat progresivitas infeksi HIV ke AIDS. Untuk mengendalikan keseimbangan maka mutasi gen akibat HIV harus diperbaiki melalui mekanisme DNA repair. Apabila DNA repair tidak mampu mengatasi, maka limfosit T yang menjadi target utama HIV harus dimusnahkan melalui apoptosis. Demikian juga bila

terjadi kegagalan dalam pengendalian apoptosis melalui mitokhondria. Untuk mengeksekusi sel yang terpapar HIV tersebut melalui respons imun khususnya respons imun seluler.

Mitokondria merupakan kunci penting dalam pengaturan program kematian sel, disisi lain dijelaskan bahwa gangguan fungsi mitokhondria merupakan salah satu faktor yang sangat besar terhadap perkembangan infeksi HIV ke AIDS. Mitokondria DNA (mtDNA) tidak memiliki intron dan tidak memiliki histon protektif sehingga tidak terlindungi dari ancaman ROS serta penurunan efek protektif Hsp. Karena itu mtDNA lebih mudah mengalami mutasi dari pada mitokondria inti. Gangguan fungsi mitokondria karena adanya mutasi dapat menimbulkan atau memperberat penyakit termasuk mempercepat laju HIV ke AIDS.

Secara fisiologis permeabilitas membran mitokondria diatur oleh *mitochondria permeability transtition pore* (MPTP) yang tersusun oleh suatu protein yang menghubungkan antara membran dalam dan membran luar dari mitokondria. Pada infeksi terjadi ekspresi yang berlebihan BCL-2 dan BCL-XL yang berperan menghambat pembukaan porus pada membran mitokondria dan menekan ekspresi gen BAX dan Bad. Protein BAX fungsinya memicu pembukaan porus pada membran mitokondria. ROS dan P53 aktif akan menekan ekstresi BCL-2 dan meningkatkan ekspresi BAX (Sudiana, 2003).

Stres protein dalam sitosolik pada paska translasi protein di import ke dalam mitokondria dengan difasilitasi Hsp70 (cHsp70). Di sitosol Hsp70 berikatan dengan *unfold* protein dan melepaskan beberapa protein serta hidrolisis ATP. Beberapa pengaruh Hsp terhadap *unfold* polipeptida pertama, mengalami pelipatan awal setelah

membentuk kompleks dengan GroEL dan GroES akan terjadi pelipatan protein sempurna (Bhutani, 2002). Kedua, terjadi pelipatan yang belum sempurna tetapi kemudian terbentuk agregasi khususnya yang memiliki berat molekul rendah dan berakhir dengan pembentukan *inclusion body*. Ketiga, dari pelipatan yang belum sempurna tersebut terbentuk kompleks dengan DnaK dan DnaJ sehingga tidak terjadi *folding*. Keempat, dari *unfold* langsung mengalami degradasi (Gragerov, 1998; Gabai, 2002). Peran dalam proses pelipatan protein adalah Hsp70 disandi oleh berbagai gen famili SSA (SSA1, SSA2, SSA3, dan SSA4) (Endo, 1998). Mekanisme terjadinya import protein ke dalam mitokondria kinerja Hsp70 dan Hsp40 dikendalikan oleh DnaJ.

Di dalam proses kematian, Hsp berperan dalam dua peristiwa utama yaitu degradasi dan agregasi protein. Ada dua jalur degradasi yang melibatkan *chaperonins* yaitu jalur proteolisis lisosomal dan proteosome (*the death machine*). Hsp mempunyai peranan yang penting didalam interaksi protein dengan *molecular chaperones*, *folding* protein, pada berbagai peristiwa kehidupan terutama dalam sintesis, import protein, translokasi dan degradasi protein (Stuart, 1998). Selama kehidupan individu, protein diperlukan dalam tiga peristiwa penting yaitu kelahiran, tumbuh - kembang, serta kematian. Dalam ke tiga peristiwa tersebut Hsp mempunyai peranan penting baik Hsp umum yang sering dikenal seperti Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp100 maupun yang lebih spesifik seperti *calnexin*. Peran dalam mekanisme *folding* maupun maturasi protein, translokasi protein transmembran, serta berbagai fungsi *chaperonins* sebagai *pro-peptides*, proline dan isomerisasi disulfide. Dalam peristiwa

kematian sel *chaperonins* juga berperan, terutama dalam degradasi proteolitik serta insolubilisasi ireversibel.

Penentuan struktur tertentu serta supaya dapat menjalankan fungsinya, Hsp tersebut semuanya tidak lepas dari peranan gen pengendali. GroEL dari famili Hsp60 dan dengan kombinasi dengan *co-Hsp* GroES memfasilitasi terjadinya *folding* protein terutama mencegah terjadinya agregasi protein. Peran dalam *folding* berbagai protein, Hsp dibantu oleh dua kofaktor yaitu *protein disulfide isomerase* (PDI) dan *peptidyl prolyl isomerase* (PPI) yang terdapat di dalam retikulum endoplasmik.

Folding protein dikendalikan melalui kode genetik termasuk dalam proses translasi asam amino dari struktur dimensi tunggal hingga struktur tiga dimensi (Brewer, 1998; Bhattacharyya, 2002). *Missfolding* protein juga dapat terjadi akibat kendali GroER melalui upaya melambankan mekanisme maupun mencegah terjadinya *folding* protein.

Heat shock protein 70 kDa (Hsp70) merupakan famili protein protektif endogen. Hsp70 merupakan protein terlarut sitosol yang utama dapat ter ekspresi pada kondisi normal maupun stres, berperan sebagai transduksi sinyal, hormon respon, respon stres dan kematian sel yang mekanisme belum diketahui (Beck, 2000; Nollen, 2002). Hsp70 merupakan molekuler *chaperone* yang teraktivasi oleh berbagai keadaan termasuk kondisi *heat stress*. Hsp70 akan berkoordinasi dengan *chaperone* dan *cochaperone* yang lain dan berinteraksi intra-molekul antara N-terminal dan inter-molekul serta C-terminal domain. Aktivitas molekuler *chaperone heat shock protein 70-kDa* (Hsp70) adalah dalam hal fungsi, mencegah agregasi, dan regulasi stabilitas protein selular yang penting termasuk reseptor hormon steroid, protein

kinases, regulasi siklus sel dan kematian sel terprogram, termasuk calmodulin, Raf1, (Tanaka, 2001; Bhutani, 2002; Nollen, 2002). Kondisi tersebut menunjukkan adanya berbagai tempat pengikatan peptida pada Hsp70. Bila sel dihadapkan pada kondisi stres maka Hsp termasuk Hsp70 mempunyai peranan penting untuk melindungi sel dari pengaruh stres, jadi bersifat sitoproteksi (Nollen, 2002). Didalam menjalankan fungsinya sebagai transduksi sinyal Hsp70 didampingi oleh *co-chaperone* Bag 1, sebagai hormon respon didampingi oleh *co-chaperone* Bag 1 dan Hip, yang akan berinteraksi dengan reseptor steroid maupun apaf-1 yang mekanismenya belum diketahui (Nollen, 2002).

Stresor biologis HIV secara medikofisiologis merupakan respons biologis terhadap stresor HIV. Dengan demikian stres sel, stres protein yang timbul akibat respons biologis terhadap stresor HIV. Termasuk respons mitokhondria terhadap stresor radikal bebas atau perilaku mitokhondria yang stres (Putra, 2003).

Tiga molekul makro yang menjadi sasaran radikal bebas endogen adalah lemak, asam nukleat, dan protein. Radikal bebas akan menimbulkan peroksidasi lemak, kerusakan DNA dan protein. Mutasi DNA akan meningkatkan produksi radikal bebas. Tiga komponen yang menentukan kualitas stres oksidatif adalah pembentukan oksidan, perlindungan antioksidan, dan perbaikan kerusakan oksidatif.

Limfosit yang terpapar HIV akan mengekspresi r CD43 dan dapat memicu respons imun baik humoral maupun seluler. Respons imun seluler sebenarnya lebih protektif karena limfosit akan mengekspresikan Fas pada permukaannya, sedangkan sel NK (*Natural Killer Cell*) dan CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*) mengekspresikan ligan pada permukaan sel NK ataupun CTL, serta adanya ekspresi ekspresi Fas pada

permukaan limfosit T, maka terjadilah ikatan Fas-ligan. Pada sitosol limfosit T yang terpapar HIV akan terjadi aktifitas FADD (*Fas Associated Protein Death Domain*). Adanya aktivitas FADD inilah akan memicu kaskade dari caspase sehingga limfosit mengalami apoptosis.

Sehubungan import protein ke dalam mitokondria, maka protein yang akan di translokasikan harus berada dalam bentuk terbentang atau tidak terlipat (*Stretched or uncoiled*) (Artika, 2004). Kondisi siap translokasi ini dicapai berkat adanya pengikatan ATP, serta distabilkan oleh kelompok protein chaperon seperti Hsp70 yang berdomisili di sitosol. Setelah protein yang ditranslokasi berinteraksi dengan reseptor pada membran luar, protein tersebut selanjutnya menuju saluran yang melintasi kedua membran. Segera setelah protein memasuki matriks, peptida sinyal diputus oleh enzim protease yang terdapat pada matriks. Selanjutnya Hsp70 mitokondria (mt-Hsp70) menarik protein dan menuntaskan proses translokasinya menuju mitokondria. Seperti halnya Hsp70 sitosol, mt-Hsp70 menunjukkan avinitas tinggi terhadap polipeptida yang tidak melipat mulai muncul di matriks. Hsp70 akan menempel secara kuat pada protein tersebut dan kemudian melepaskan diri melalui suatu tahap yang memerlukan energi (ATP). Siklus pengikatan dan pelepasan mt-Hsp70 dari protein yang ditranslokasi turut menarik protein tersebut memasuki matriks mitokondria. Selain mt-Hsp70, pada matriks mitokondria juga terdapat mt-Hsp60 yang berinteraksi dengan rantai polipeptida yang tidak melipat. Hsp ini membantu proses pelipatan protein melalui suatu tahap yang memerlukan energi ATP (Artika, 2004).

Peningkatan ekspresi Hsp70 akan semakin meningkatkan resistensi terhadap apoptosis (Mosser, 2000). Stres dapat menginduksi apoptosis dengan diawali dari pelepasan sitokrom c dari ruang antar membran mitokondria. Ikatan sitokrom c dengan d ATP yang kemudian menginduksi *apoptotic protease –activating factor-1* (Apaf-1) di sitoplasma menyebabkan Apaf-1 mengekspose N-terminal procaspase 9. Procaspase 9 bersama apoptosom mengaktifkan caspase 9 dan berdampak pada aktifnya caspase 3, 6 dan 7 berdampak pada kematian sel.

Peningkatan ekspresi Hsp70 dapat memblokir proses kematian tersebut, melalui blokade pada poli (ADP-ribose) polimerase caspase 3. Proteksi oleh Hsp70 dapat berpengaruh terhadap penurunan pelepasan sitokrom c dengan menghambat sitokrom c- d ATP.

Sinyaling stres melalui jalur JNK menuju apoptosis diekspose oleh stres protein seperti Hsp atau respons terhadap non protein seperti akibat stimulasi sitokin interleukin (IL-1) dan *tumor necrosis factor* (TNF- α). Hsp70 diketahui menghambat aktivitas JNK dan mencegah apoptosis melalui kerusakan protein maupun stimulasi psikologis. Kemampuan Hsp70 memblokir aktivitas JNK tidak dapat dideteksi di dalam sel tetapi melalui ekspresi Hsp70 (Mosser, 2000).

Sel yang mengalami stres dapat mencetuskan penghancuran dirinya sendiri melalui apoptosis (Mosser, 2000). Dalam menghadapi stres, sel memberikan respons untuk adaptasi dengan meningkatkan toleransi dan berada tetap normal. Ekspresi Hsp70 dapat meningkatkan proteksi sel dari ancaman apoptosis. Hsp70 diketahui dapat berperan *upstream* atau *downstream* terhadap aktivitas caspase, dan

mempunyai pengaruh protektif secara dependent maupun independent terhadap blokade aktivitas JNK. Hsp70 memblokade procaspase3 dan 9 sehingga caspase 3 dan 9 aktif tidak terbentuk. Hsp70 juga menghambat pelepasan sitokrom c di mitokondria (Mosser, 2000)

HIV merupakan stresor biologis, termasuk stresor internal yang dapat berpengaruh bahkan menimbulkan stres sel. Persepsi dan pengaruh stresor terhadap sel tentunya bersifat holistik dan sangat individual yang bisa berpengaruh positif maupun negatif terhadap kelangsungan hidup sel tergantung respons pertahanan melalui mekanisme *coping*. Bila sel mampu menjaga keseimbangan homeostasis terhadap pengaruh stresor maka akan dicapai adaptasi yang tidak mempengaruhi kelangsungan hidup sel. Respons sel terhadap stresor, stres dan adaptasi akan menentukan apakah akan tetap sel bertahan hidup atau sakit bahkan mengalami kematian. Sel tentunya akan selalu berinteraksi dengan lingkungan luar maupun dalam yang diupayakan agar tetap homeostasis.

Hasil penelitian ini selama stres akut yang menonjol adalah Hsp70 dan kortisol, stres kronis yang menonjol adalah Hsp70. Agar progresivitas penyakit infeksi HIV dapat dikendalikan perlu upaya mengoptimalkan dan meningkatkan efektivitas *coping* alamiah serta dilaksanakan program pendampingan. Pelaksanaan pendampingan diharapkan dapat mengurangi derajat beratnya stres. Proses penerimaan penyakit dan kematian akan dialami oleh individu. Proses penerimaan penyakit terminal dan kematian seperti yang dikemukakan oleh Dr. Elizabeth Kubler-Ross (2005), yaitu : *denial and isolation, anger, depression and withdrawal, bargaining, acceptance*. *Coping* alamiah yang disertai dengan konseling dan

pendampingan terhadap pasien yang terinfeksi HIV diharapkan dapat memperpendek proses penahanan penerimaan tersebut, yaitu dari *denial* langsung ke *bargaining* untuk menuju *acceptance*. *Coping* alamiah yang efektif dapat memperpendek fase penerimaan tersebut, sehingga kadar kortisol turun dan imunitas diuntungkan.

Perilaku patologis *chaperonins* mengakibatkan terjadinya komunikasi antar sel yang ikut dalam proses sinyal terganggu sehingga terjadi : (1) peningkatan aktivitas kinase *JNK* (*c-Jun NH2-terminal kinase*), (2) meningkatkan *ERK* (*extracellularly responsive kinase*), meningkatkan aktivitas kinase Akt (*AGE-1 PI3 kinase Transduce*), dan p38 (Miyata, 2001; Suhara, 2001). Ketiga tipe *mitogen-activated protein* (MAP) kinase tersebut akan saling berinteraksi satu sama lain. Bila aktivitas kinase *JNK* dan *ERK* yang dominan maka akan mendorong terjadinya apoptosis limfosit T-CD4, sebaliknya bila aktivitas kinase Akt yang dominan akan menghambat apoptosis limfosit T-CD4.

Meskipun dominasi aktivitas kinase *JNK* dan *ERK* berpotensi menyebabkan apoptosis limfosit T-CD4, tetapi jalur yang ditempuh ternyata berbeda. Aktivasi kinase *JNK* akan mempengaruhi reseptor Fas dan bersama-sama Fas ligand akan meningkatkan aktifitas caspase-8 (Katsikis, 1997; Mosser, 2000; Miura, 2001; Oppenheim, 2003). Peningkatan aktifitas kinase *JNK* juga mengaktifkan reseptor p55, dan mengaktifkan caspase-8. Sedangkan peningkatan aktifitas *ERK* oleh pengaruh *ROS*, akan memicu sekresi sitokrom C dari mitokondria limfosit T-CD4. Sitokrom C tersebut akan mengaktifasi caspase-9 (Mosser, 2000; Sparagna, 2000; Gabai, 2002). Caspase-9 bersama-sama dengan caspase-8, diduga berinteraksi dengan *Chaperonins* khususnya Hsp60 akan menginduksi caspase-3 guna menjalankan fungsinya sebagai

eksekutor yang berakibat terjadinya hidrolisis ATP, fragmentasi DNA mitokondria, dan berakhir dengan kematian limfosit T-CD4 melalui apoptosis (Katsikis, 1997; Xanthoudakis, 1999; Mosser, 2000).

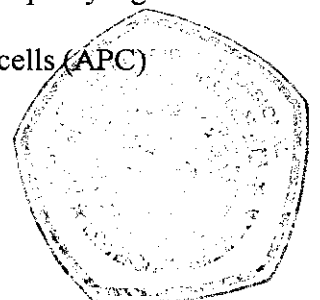
Awalnya ekspresi berlebihan *Chaperonins* bertujuan untuk mencegah terbentuknya agregat protein dan menghindari terjadi apoptosis limfosit T-CD4 pada penderita terinfeksi HIV (Kobayashi, 2000), tetapi aktivitas yang berlebihan akibat ROS seperti terjadi akibat *stressor* HIV, maka peran sitoprotektif *chaperonins* diduga terjadi penurunan sehingga terjadi apoptosis limfosit T-CD4 patologis yang dipercepat.

Akhir-akhir ini diketahui bahwa aktivasi kinase oleh *heat shock* dapat mengendalikan sintesis dan fungsi dari *chaperonins*, selanjutnya akan memodulasi atau menentukan hidup atau matinya sel melalui apoptosis (Vladimir, 2002).

Hsp70 merupakan suatu stimulator yang sangat efektif untuk menghasilkan khemokin. Khemokin yang terstimulasi oleh Hsp70 adalah MIP-1 α dan MIP-1 β , yang mempunyai peran terhadap berbagai sel imunologis (monosit, dendritik, limfosit T dan B) dan dapat menguatkan respon imun pada *vaccine adjuvant*. (Lehner, 2000; Wang, 2001). Hsp70 bukan hanya sebagai stimulator khemokin saja tetapi juga menstimulir produksi sitokin (IL-12, TNF- α , dan NO) yang sangat kuat menstimulir respon imun dari *killer cells*. Hsp70 berperan penting sebagai protektor guna melawan infeksi dan kanker, karena mempunyai reseptor terhadap protein virus dan peptida protein antigen. (Wang, 2002). Hsp70 sebagai imunomodulator pada penyakit imunodefisiensi, tumor ganas, dan penuaan. Pengaruh Hsp70 melalui peran

khemokin, IL-12, TNF- α , dan NO menguatkan peran imunomodulator dengan menguatkan peran TH-1. Hsp70 yang mempunyai hubungan dengan berbagai mikroba tersebut dapat diperankan didalam vaksinasi aktif. Hsp70 sebagai ligand dari peptida CCR5 dan CCR4 dapat digunakan sebagai imunoterapi infeksi HIV.

Hsp70 dapat menghambat berbagai Viral protein R (Vpr) yaitu CD40, CCR5, CXCR4 yang mempunyai kontribusi kuat terhadap patogenesis infeksi HIV. Over ekspresi Hsp70 yang merupakan kebalikan terhadap *Vpr-induced G2 arrest*, mencegah kematian melalui *Vpr-expressing cells*, dan menghambat translokasi inti Vpr. Hsp70 sebagai protektor limfosit T yang terinfeksi HIV melalui *Vpr induced growth arrest* serta menghambat apoptosis tanpa mempengaruhi replikasi virus. Dengan demikian Hsp70 dapat berfungsi sebagai faktor imunitas bawaan yang melindungi sel dari *Vpr-mediated G2 arrest* dan apoptosis. Sehingga Hsp70 merupakan imunitas bawaan yang mampu melawan infeksi HIV tanpa harus menekan replikasi virus. Hsp70 sebagai *intracellular chaperones* terdapat pada manusia dan mikroorganisme mempunyai 3 komponen fungsional : *N-terminal 44 kDa ATPase (amino acids 1-358)*, diikuti *18 kDa peptide-binding domain (amino acids 359-494)*, dan *C-terminal 10 kDa fragmen (amino acids 495-609)*. Hsp70 mempunyai 3 fungsi imunologis yang berbeda didalam mestimulir monosit dan dendritik tetapi belum sepenuhnya diketahui. C-terminal portion (amino acids 359-610) menstimulir produksi CC khemokin, IL-12, TNF- α , NO dan maturasi dendritik serta berfungsi sebagai adjuvan pada induksi respon imun. CD40 merupakan reseptor, Hsp70 yang merupakan ligan yang memungkinkan interaksi antara antigen-presenting cells (APC)



dengan limfosit T. Hsp70 merupakan ligan alternatif terhadap CD40r. interaksi Hsp70-CD40 mempunyai peranan penting didalam infeksi HIV terutama dalam toleransi terhadap imunitas (Carpino, 2004; Lehner, 2005).

Pada penelitian ini pemeriksaan fragmentasi DNA untuk mengetahui kematian limfosit T tidak menunjukkan perbedaan antara kelompok yang terinfeksi dan kelompok yang secara serologis belum terinfeksi. Hasil pemeriksaan pertama (0.29307 ± 0.43161 vs 0.33371 ± 0.24749) (lampiran 3.1), kedua (0.34036 ± 0.52735 vs 0.42871 ± 0.42971) (lampiran 4.1), dan ketiga (0.30829 ± 0.40400 vs 0.72357 ± 0.68682) (lampiran 5.1), tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok. Demikian juga dari pemeriksaan pertama hingga pemeriksaan ketiga tidak didapatkan kecenderungan peningkatan kematian sel yang progresif. Pada kelompok yang secara serologis belum terinfeksi HIV apoptosis limfosit T justru lebih rendah dari pada kelompok yang terinfeksi HIV. Keadaan tersebut dapat dijelaskan bahwa pada penelitian ini terdapat peningkatan kadar Hsp70 sebagai sitoprotektor pada kelompok terinfeksi HIV selama tenggang waktu penelitian longitudinal 30 hari. Dengan kata lain, hal tersebut menunjukkan bahwa tubuh masih mampu menghambat laju apoptosis limfosit T selama kurun waktu 30 hari. Untuk kematian limfosit T melalui apoptosis secara nyata kiranya diperlukan waktu yang lebih lama lagi, sejalan dengan semakin menurunnya jumlah CD4 dalam fase kronik turun terus dengan laju penurunan 70 sel/mm^3 setiap tahunnya (Hirschel, 2003).

Karena dampak stressor sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu besar, lama, jenis stressor. Dipengaruhi juga oleh ketahanan individu yang mendapat

terpaan stresor yaitu tergantung dari tingkat pendidikan, pengendalian emosi, umur, jenis kelamin dan lain-lain. Sehingga stres yang timbul individu yang satu dengan yang lain tentunya tidak sama.

Pada penelitian ini terdapat tiga subyek yang menunjukkan gambaran kelainan laboratoris yang menonjol terutama derajat penurunan CD4. Subyek nomor 3, nomor 8, dan nomor 23 menunjukkan penurunan jumlah CD4 yang sangat tajam ($<100 \text{ sel/mm}^3$), menurut WHO masuk ke derajat penurunan sangat berat. Jumlah CD4 yang sedemikian rendah mestinya pada ketiga subyek tersebut sudah terdapat berbagai infeksi sekunder. Tetapi kenyataan pada ke tiga subyek belum di dapatkan infeksi sekunder. Ketiga subyek tersebut berasal dari kelompok yang terinfeksi HIV/AIDS. Jumlah CD4 yang rendah pada ketiga subyek sejak pemeriksaan pertama menunjukkan betapa kuat pengaruh stresor biologis HIV terhadap perubahan kadar CD4. Kalau diamati jumlah CD4 pada pemeriksaan hari pertama, hari ketujuh, dan hari ketiga puluh satu terdapat kecenderungan penurunan CD4. Kecenderungan penurunan CD4 ini dipengaruhi oleh stresor biologis HIV yang dari waktu ke waktu semakin kuat akibat jumlah HIV bertambah (akibat replikasi) dan limfosit T yang terdesak terus bertambah banyak. Penurunan CD4 dari pemeriksaan awal hingga pemeriksaan akhir selain akibat pengaruh stresor biologis HIV, juga dipengaruhi oleh stresor psikologis akibat dinyatakan terinfeksi HIV/AIDS.

Penderita nomor 3, kadar ACTH lebih tinggi daripada kadar rerata kelompok, tetapi kadar kortisol normal. Hal ini menunjukkan rangkaian proses ketahanan menuju adaptasi biologis cukup berlangsung baik. Hal tersebut dipengaruhi oleh

faktor individu dan juga dampak dari konseling pre dan post pemeriksaan serologis HIV. Pada penderita nomor 3 ini kadar Hsp70 juga lebih tinggi daripada rerata kelompok. Peningkatan kadar Hsp70 tersebut merupakan respons sel terhadap stres biologis yang dipicu HIV. Hal yang sama terjadi selain pada penderita nomor 3, juga penderita nomor 23. Penderita nomor 3 terdapat peningkatan kadar anti Hsp70 pada pemeriksaan hari pertama, hari ketujuh, hari ketiga puluh satu melampaui kadar rerata anti Hsp70 kelompok. Situasi ini menunjukkan bahwa sel masih memberikan respons meskipun dalam kondisi terinfeksi HIV.

Jumlah *Cell death* pada subyek nomor 3 dan nomor 8 menunjukkan kecenderungan penurunan dari pemeriksaan hari pertama, hari ketujuh dan hari ketiga puluh satu. Hal tersebut menunjukkan bahwa Hsp70 masih menunjukkan peran sitoprotektif hingga hari ketiga puluh satu. Pada fase stres akut (14 hari) terjadi kematian sel yang begitu tinggi pada subyek nomor 3 kemudian mencapai angka kematian sel yang begitu rendah pada stres kronis pemeriksaan hari ketiga puluh satu.

Yang menarik dari ketiga subyek tersebut berasal dari kelompok terinfeksi HIV yang mengalami penurunan CD4 yang sangat berat ($< 100 \text{ sel/mm}^3$) tetapi perilaku fisik secara klinis masih baik (*Karnofsky Score* = 100). Kalau hanya berdasarkan jumlah CD4 pada ketiga subyek tersebut mestinya *Karnofsky Score* nya sudah menunjukkan angka dibawah 40. Bukti bahwa CD4 bukan satu-satunya indikator bagi infeksi HIV/AIDS, tetapi terdapat indikator penting lain yaitu Hsp70. Masih primanya penampilan fisik ke tiga subyek merupakan realisasi penerimaan dini (*acceptance*) dari penyakit HIV yang diderita. Hal tersebut dimungkinkan

sehubungan konseling pre dan post pemeriksaan serologis HIV, program pendampingan para ODHA dan keluarga, program pengobatan oleh tenaga medis dan program perawatan oleh tenaga paramedis seperti yang dilakukan di Unit Perawatan Intermediet Penyakit Infeksi (UPIPI) RSUD Dr. Soetomo.

Bila diperhatikan pada ketiga subyek dari kelompok terinfeksi HIV tersebut ternyata karakteristik subyek nomor 3 adalah pelaku aktif homoseks yang berlangsung lebih dari 4 tahun, pendidikan lulus SMP, mempunyai pekerjaan tetap. Subyek nomor 8 adalah seorang heteroseks yang sering berganti-ganti pasangan telah berlangsung lebih dari 3 tahun, pendidikan S1, mempunyai pekerjaan tetap. Subyek nomor 23 adalah pengguna narkoba intravena berlangsung lebih 6 tahun yang juga aktif kontak heteroseksual lebih dari 14 tahun, pendidikan lulus SMU, mempunyai pekerjaan tetap. Berdasarkan karakteristik ketiga subyek, maka HIV yang masuk kedalam limfosit T melalui cara transmisi yang berbeda. Meskipun ketiga subyek menunjukkan pola yang sama dalam penurunan CD4, tetapi cara transmisinya berbeda. Untuk mengevaluasi pengaruh transmisi HIV terhadap penurunan CD4 tentunya diperlukan penelitian lebih lanjut dengan mempertimbangkan berbagai peran penting *molecular chaperones* pada berbagai cara transmisi HIV.

Tiga subyek lain yang menarik untuk dikaji adalah subyek nomor 5, nomor 16 dan nomor 17. Ke tiga subyek menunjukkan jumlah CD4 menurun hingga mencapai derajat berat ($> 100 - < 200 \text{ sel/mm}^3$), tetapi kadar ACTH, kortisol normal. Kadar Hsp70 yang lebih tinggi dari kadar rerata kelompok, jumlah *cell death* yang lebih rendah daripada rerata kelompok. Subyek nomor 5 adalah homoseks aktif

berlangsung lebih 5 tahun, pendidikan lulus SMU, pekerjaan salon, berasal dari kelompok pembanding. Subyek nomor 16 dari kelompok terinfeksi HIV, pengguna narkoba aktif selama lebih 5 bulan, pendidikan lulus SMP, bekerja tidak tetap. Subyek nomor 17 dari kelompok terinfeksi HIV, pengguna narkoba aktif lebih 2 bulan dan heteroseksual, pendidikan lulus SMU, pekerjaan satpam diskotik. Jumlah CD4 yang rendah pada ketiga subyek ternyata tidak diikuti peningkatan kadar ACTH, kortisol, maupun peningkatan jumlah *cell death*. Jumlah CD4 yang rendah pada subyek nomor 5 lebih diakibatkan oleh stres karena rasa kecemasan. Temuan penelitian ini sejalan dengan penelitian Lasserma (1999) yang mengemukakan adanya *stress-associated reduction in killer lymphocytes in HIV-infected men at baseline*. Pengaruh biologis HIV belum dapat dipertanggung jawabkan karena pemeriksaan serologis HIV menunjukkan hasil non reaktif selama penelitian berlangsung. Meskipun demikian pengaruh stresor biologis HIV masih belum dapat disingkirkan dan perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Tetapi mekanisme ketahanan cukup efektif karena subyek mendapat dukungan penuh dari kelompoknya (PERWAKOS), dukungan ASA (aksi stop AIDS) Surabaya, yayasan Ners, dukungan medis dan paramedis selama bergabung di UPIPI RSUD Dr. Soetomo.

Subyek nomor 16 dan 17 mengalami problem psikologis yang berat. Setelah diketahui terinfeksi HIV/AIDS kedua subyek ditolak keluarga dan lingkungan tempat tinggalnya. Kelemahan penelitian ini tidak dilakukan psikometrik, tetapi mekanisme ketahanan pada subyek berlangsung cukup efektif ditunjukkan oleh kadar ACTH dan kortisol normal. kedua subyek juga diusahakan percepatan proses penerimaan dini

terhadap penyakit yang diderita melalui program *case manager*, pendampingan, dan perawatan yang di kembangkan di UPIPI.

Penelitian ini menunjukkan betapa uniknya kehidupan subyek berisiko tinggi terinfeksi HIV, antara stresor psikologis dan biologis sulit dipisahkan. Subyek yang parameter biologis menunjukkan kelainan begitu berat, ternyata infeksi sekunder belum didapatkan dan penampilan fisik normal (*Karnofsky score* = 100). Subyek yang mendapat tekanan psikologis berat akibat tidak diterima kembali oleh keluarga dan masyarakat, tetapi kadar ACTH, kortisol normal. Hal ini berbeda dengan penelitian Liang (2002), yang menunjukkan sebagian besar subyek mengalami kecemasan dan depresi.

Uniknya kehidupan subyek berisiko tinggi, tercapainya percepatan penerimaan dini terhadap penyakit infeksi HIV/AIDS, aktivitas jalur HPA yang terkedali dalam posisi homeostasis, efektifnya *learning proses* tingkat sel, sikap dan perilaku tenaga kesehatan yang bijaksana terutama dalam penyampaian pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS dengan mempertahankan tahapan-tahapan yang menyejukkan. Semua tersebut sengaja diciptakan di UPIPI melalui penatalaksanaan penderita secara holistik melalui konseling pre dan post pemeriksaan serologi HIV, konseling ruangan UPIPI, konseling keluarga, konseling lanjutan, konseling pemberian ARV; pemberian terapi oleh tenaga medis; perawatan oleh paramedis; pendampingan oleh ODHA, LSM, keluarga, masyarakat peduli AIDS, serta perhatian berbagai lembaga pemerintah dan non pemerintah; pemberian nutrisi berbasis

makronutrien dan mikronutrien; pembinaan olahraga dan latihan pernafasan secara rutin.

Suasana tersebut sangat berbeda dengan kondisi sebelum diterapkannya penatalaksanaan secara holistik. Awalnya penatalaksanaan penderita hanya bertitik tumpu pada pelaksanaan program terapi dan perawatan semata. Penatalaksanaan secara holistik UPIPI mampu memperkecil angka kematian dari hampir 100% ke 27,9% pada akhir Maret 2005. Banyak kejadian kematian penderita yang tidak terduga sebelumnya. Penderita sore hari nampak bugur esok paginya menjadi mayat. Penderita tiba-tiba meninggal setelah keluar dari kamar mandi. Berbagai kegawatan medis yang mengantarkan kematian penderita ditinjau dari sisi disiplin ilmu Penyakit Dalam. Penderita yang mengalami infeksi dapat berkembang menjadi sepsis dan syok septik; penderita mengalami infeksi berkembang ke distres akut pernafasan dan gagal nafas; infeksi disusul terjadi perdarahan otak yang berkembang ke kegagalan pusat kardiovaskuler; penderita mengalami infeksi berkembang ke gangguan konduksi jantung; penderita mengalami infeksi yang mengalami kekurangan cairan tubuh terjadi syok hipovolemik. Berbagai kegawatan medik yang lazim mengantarkan penderita ke pintu gerbang kematiannya tersebut sering tidak didapatkan pada penderita AIDS. Hal tersebut menggugah peneliti untuk berusaha mengungkap mekanisme kematian sel melalui apoptosis sebagai penyebab kematian. Apoptosis limfosit T-CD4 hanya merupakan salah satu dari rangkaian kematian sel. Kuatnya dugaan peneliti bahwa progresivitas penyakit dan kematian melalui apoptosis karena tidak ditemukannya bukti klinis, bukti parameter biologis melalui nekrosis yang

seharusnya disertai akumulasi sel radang. Ekspresi yang berlebihan Hsp70 menginduksi *injury* sel akibat kelelahan atau *exhausted*. Kematian yang tidak diduga sebelumnya dan sering terjadi pada penderita HIV/AIDS, berdasarkan parameter biologis hasil penelitian ini diduga kuat terjadi apoptosis patologis difus dipercepat setelah sel gagal mempertahankan kondisi homeostasis. Dari hasil penelitian ini dipastikan apoptosis patologis difus dipercepat tidak terjadi sebelum hari ke-31 post pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS.

BAB 7
SIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

1. Pernyataan diagnosis terinfeksi HIV/AIDS menyebabkan peningkatan kadar Hsp70, kadar kortisol akibat stres psikologis yang meningkatkan aktivitas aksis HPA pada stres akut. Peningkatan kadar Hsp70, penurunan kadar kortisol, penurunan jumlah *cell death*, sehubungan penerimaan (*acceptance*) dini pada stres kronis.
2. HIV selain menyebabkan depleksi CD4, pada kondisi tertentu merupakan stimulator Hsp70 yang berperan penting dalam mekanisme sitoprotektif terhadap lingkungan mikro yang penuh stresor. CD4 bukan satu-satunya parameter biologis pada infeksi HIV/AIDS, tetapi terdapat parameter biologis lain yang penting yaitu Hsp70.
3. Penerimaan (*acceptance*) dini terhadap kondisi terinfeksi HIV/AIDS dapat mengoptimalkan peran Hsp70 pada fase awal. Hsp70 sebagai molekul chaperon mencegah agregasi protein, mengatur irama pelipatan protein, mempertahankan struktur protein 3 dimensi yang fungsional sehingga peran enzim, hormon, reseptor menjadi alami. Hsp70 sebagai ligand dapat mempunyai peran protektif terhadap HIV.

7.2 Saran

Berdasarkan berbagai peran penting Hsp70, maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan batas kadar Hsp70 sebagai sitoprotektor dengan Hsp70 sebagai stimulator apoptosis guna pengembangan diagnosis dan terapi penderita HIV/AIDS.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Artika IM, 2004. Biogenesis Mitokondria. Dalam (Suryadi H, Malik SG, Sudoyo H, Marzuki S, eds). *Mitochondrial Medicine*. Eijkman Institute for Molecular Biology. Jakarta, hlm 37-64.
- Atanackovic D, Brunner-Weinzierl MC, Kroger H, Serke S, Deter HC, 2002. Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species. *Immunol Invest* 31: 1-12.
- Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH, 2000. Mechanisms of HIV-Associated Lymphocyte Apoptosis. *Blood* 96: 2951-2964.
- Bailey CK, Andriola IFM, Kampinga HH, Merry DE, 2002. Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine retreat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 11: 515- 523.
- Barat C, Tremblay MJ, 2002. Engagement of CD43 Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcriptional Activity and Virus Production that is Induced upon TCR/CD3 Stimulation. *J. Biol. Chem.* 277: 1-22.
- Becher MW, 2004. Infectious Diseases of the Nervous system Available from: <http://hsc.unm.edu/brainpath> Accessed 10/02/2004.
- Beck FX, Neuhofer W, Muller E, 2000. Molecular chaperones in the Kidney: Distribution, Putative Roles, and Regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 203- 215.
- Berecklen, 1998. SEM is a large-sample technique. In (Kline RB, ed). *Principles and Practice of Structural Equation Modeling*. The Gullfprd Press. New York, pp 3-13.
- Benjamin IJ, McMillan DR, 1998. Stress (Heat Shock) Proteins Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 83 : 117-132.
- Besedovsky HO, Rey AD, 2001. Cytokines as Mediators of Central and Peripheral Immune-Neuroendocrine Interactions. In (Ader R, Felten DL, Cohen N, eds). *Psychoneuroimmunology*, vol 1, third ed. New York, pp 1- 17.

- Bhattacharyya J, Das K, 1999. Molecular Chaperone-like Properties of an Unfolded Protein, α -Casein. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 15505-15509.
- Bhutani N, Udgaonkar JB, 2002. Chaperonins as protein-folding machines. *Current Science* 83: 1337- 1351.
- Boven LA, Gomes L, Hery C, Gray F, Verhoef J, 1999. Increased Peroxynitrite Activity in AIDS Dementia Complex: Implications for the Neuropathogenesis of HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology* 162: 4319-4327.
- Brewer JW, Hendershot LM, 1998. Early Events in the Biosynthesis of Secretory Pathway Proteins: Role of Molecular Chaperones. In (Fink AL, Goto Y, eds). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. New York, pp 415- 434.
- 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.
- Brown-Borg HM, Harman SM, 2003. Hormones and oxidative stress. In (Cutler RG, Rodriguez H, eds). *Critical reviews of oxidative stress and aging, advances in basic science, diagnostics and intervention, vol.II*, Singapore : World science publishing co. ptc. Ltd, pp 1070-1119.
- Buchman TG, 2000. Untimely Apoptosis in human SIRS, Sepsis, and MODS. In (Baue AE, Faist E, Fry DE, eds). *Multiple Organ Failure Pathophysiology, prevention, and Therapy*. New York, Inc., pp 131-133.
- Burns DL, Kessel M, Arciniega JL, Karpas A, Kostka JG, 1992. Immunochemical Location of a Region of Chaperonin-60 Important for Productive Interaction with Chaperonin-10. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 25632-25635.
- Burt AM, 1993. Blood-Brain, Blood-CSF, and CSF-Brain Exchanges. In (Burt AM, ed). *Textbook of Neuroanatomy*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 176-178.
- Bush KT, George SK, Zhang PL, Nigam SK, 1999. Pretreatment with inducers of ER molecular chaperones protects epithelial cells subjected to ATP depletion. *Am. J. Physiol.* 277: 211-217.
- Carpino N, 2004. Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2. *Immunity* 20: 37 – 46.

- Cassarino DS, Bennett JP, 1999. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews* 29: 1-25.
- Chrousos GP, 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine* 332: 1351-1362.
- Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC, 1997. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. *The Journal Histochemistry and Cytochemistry* 45 (7): 923- 934.
- Cupler EJ, 1997. Acquired Immunodeficiency Syndrome. In (Rolak LA, Harati Y, eds). *Neuroimmunology for the Clinician*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp 393-418.
- Depkes RI, 2003. Berbagai Jenis Konseling HIV Menurut Tujuannya. Dalam: *Pedoman Nasional Perawatan, Dukungan dan Pengobatan Bagi ODHA*. Jakarta, hlm 53-57.
- DLD Diagnostika-catecholamine-ELISA, 2003. Assay Catecholamine ELISA. Available from: http://www.dld-diagnostika.de/products/ELISA-catecholamine/elisa-catecholamine_e.htm Accessed 10/16/2003
- Drew WL, 2001. HIV & Other Retroviruses. In (Wilson WR, Sande MA eds). *Current Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases*. Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division. New York, pp 442- 447.
- Elyana, 2004. Pengaruh Stres terhadap Perubahan Respons Imun Mukosa dan Motilitas Usus Tikus. *Workshop Psikoneuroimunologi, GRAMIK, Unair*, hlm 1-3.
- Endo T, 1998. Roles of Molecular Chaperonines in Mitochondrial Protein Import. In (Fink AL, Goto Y, eds). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. New York, pp 435-466.
- Epstein LG, 2000. Studies of Brain Infection with the AIDS Virus Suggest Opportunities for Neuroprotection in Other Neurologic Conditions in Children. Available from: <file://A:\Studies%20of%20Brain%20Infection%20With%20the%20AIDS%20Virus%>. Accessed 10/02/2004
- Erkut ZA, Klooker T, Endert E, Hultinga I, Swaab DF, 2003. Stress of Dying is not Suppressed by High-dose Morphine or by Dementia. *Neuropsychopharmacology* 29: 152-157.

- Esser MT, Bess JW, Suryanarayana K, Chertova E, Marti D, 2001. Partial Activation and Induction of Apoptosis in CD4+ and CD8+ T Lymphocytes by Conformationally Authentic Noninfectious Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 75: 1152-1164.
- Fink AL, 1998. The Hsp70 Reaction Cycle and its Role in Protein Folding. In (Fink AL, Goto Y, eds). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. New York, pp 123-150.
- Gabai VL, Sherman MY, 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review : Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* 92: 1743-1748.
- Gill GV, Beeching NJ, 2004. HIV infection and Disease in the Tropics. In (Gill GV, Beeching NJ, eds). *Tropical Medicine*. Massachusetts: Blackwell Publishing, pp 98- 111.
- Gragerov A, 1998. Major heat-shock chaperones in protein folding and inclusion body formation. In (Fink AL, Goto Y, eds). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. New york, pp 169-181.
- Granner DK, 2003. Hormon Korteks Adrenal. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). *Harper's Biochemistry*. Mc Graw Hill, pp 547-559.
- Hackeng CM, Bruijn LAM, Douw CM, Visser MPD, 2000. Soluble Fas in serum of patients with HIV/AIDS. *Clinical Chemistry* 46: 1863-1864.
- Hagen TM, Ingersoll RT, Wehr CM, Lykkesfeldt, Vinarsky V, 1998. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial fencion and ambulatory activity. *PNAS* 95: 1 – 7.
- Halestrap AP, 2002. The mitochondrial permeability transition-a pore way for the heart to die. *J Clin Basic Cardiol* 5: 29- 41.
- Handojo I, 2004. Imunoasai untuk penyakit infeksi dengan HIV atau AIDS. Dalam (Handojo I). *Imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi*. Surabaya, hlm 149-162.
- Hirschel B, 2003. HIV Infection. In (Southwick FS, ed). *Infectious Diseases in 30 Days*. New York, pp 477-524.
- Horowitz PM, 1998. Some Structural Aspects of Chaperonin-Assisted Folding by GroEL and GroES. In (Fink AL, Goto Y, eds). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. New York, pp 275- 300.

- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Hui JJ, Chang KC, Swanson PE, Drewry AM, Buchman TG, Karl IE, 2000. P53-Dependent and-Independent Pathways of Apoptotic Cell Death in Sepsis. *The Journal of Immunology* 164: 3675-3680.
- Hung JJ, Chung CS, Chang TR, 2002. Molecular Chaperone Hsp90 Is Important for Vaccinia Virus Growth in Cells. *American Society for Microbiology* 76: 1379-1390.
- IBL Immuno-biological laboratories, 2000. Cortisol ELISA instructions for use. Available from: <http://www.ibl-hamburg.com> Accessed 10/10/2003
- IBL Immuno-biological laboratories, 2002. Glutathione peroxidase colorim/kinetic assay. Available from: <http://www.ibl-hamburg.com> Accessed 10/10/2003
- Kamiya biomedical company, 2002. Superoxide dismutase (SOD) assay kit. Available from: techsupport@kamiyabiomedical.com
www.kamiyabiomedical.com Accessed 10/10/2003.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, 1995. Synaptic Integration. In (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds). *Essentials of Neural Science and Behavior*. Prentice Hall International, Inc. USA, pp 219-241.
- Kaplan & Sadock's, 2003. Neuropsychiatric Aspects of HIV Infection and AIDS. In (Sadock BJ, Sadock VA, eds). *Synopsis of Psychiatry*, ninth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 371-379.
- Kaplan & Sadock's, 2003. Adusmant Disorders. In (Sadock BJ, Sadock VA, eds). *Synopsis of Psychiatry*, ninth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 795- 799.
- Kaspan F, 2002. Respons Imun Penyakit Infeksi. Dalam (Soedarmo, Garna, Hadinegoro ed). *Infeksi dan Penyakit Tropis*. Ed 1, Jakarta FKUI, hlm 17-26.
- Katsikis PD, Garcia-Ojeda ME, Torres-Roca JF, Tijoe IM, Smith CA, Herzenberg LA, 1997. Interleukin-1 β converting enzyme-like protease involvement in fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J. Exp. Med* 186: 1365-1372 .
- Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA, 2002. Cytosolic Heat Shock Protein 60, Apoptosis, and Myocardial Injury. *Circulation* 105: 2899-2904.

- Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, 2000. Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *The Journal of Biological Chemistry* 275 : 8772-8778.
- Kottler JA, Brown RW, 1996. Why Does Therapeutic Counseling Work? In (Kottler JA, Brown RW, eds). *Therapeutic Counseling*, third ed. Washington: Brooks/Cole Publishing Company, pp 15-21.
- Krzysiek R, Rudent A, Delbos LB, Foussat A, Boutillon C, 2001. Preferential and Persistent Depletion of CCR5+ T-helper lymphocytes with nonlymphoid Homing Potential Despite Early Treatment of Primary HIV Infection. *Blood* 98: 3169-3171.
- Kubler E-Ross, 2005. The stages of death and dying. Available from: hdlind@adelphia.net. Accessed 1/31/2005.
- Launer RP, Huttner S, Buisson M, Hossle JP, Albigetti M, 1995. T-Cell death by apoptosis in vertically human immunodeficiency virus-infected children coincides with expansion of CD8+/Interleukin-2 receptor-/HLA-DR+ T cells: Sign of a possible role for herpes viruses as cofactors? *The American Society of Hematology* 86: 1400-1407.
- Ledru E, Lecoq 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.
- Lehner T, Wang Y, Whittal T, McGowan E, Kelly CG, Singh M, 2005. Functional domains of Hsp70 stimulated generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 1–8.
- Lesserman J, Jackson ED, Petitto JM, Golden RN, Silva SG, 1999. Progression to AIDS: The Effects of Stress, Depressive Symptoms, and Social Support. *Psychosomatic Medicine* 61: 397-406.
- Levy JA, 1995. Cytopathic Properties of HIV. In (Levy JA, ed). *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. ASM Press, Washington DC, pp 77-82.
- Liang W, 2002. HIV Psychological Responses to Seropositive Test Results. Available from: <http://www.infoweb.org/library/misc/aidslink043e.html>. Accessed 18/11/2002
- Lutz CA, Przytulski KR, 1994. Body Mass Index. In (Lutz CA, Przytulski KR). *Nutrition and Diet Therapy*. FA Davis Company, Philadelphia, pp.432-437.

- Mandel GL, 2000. Human immunodeficiency virus. In (Bleck TP, Brook I, Fekety R, Lorber B, Mildvan D, eds). *Essential atlas of infectious diseases*, 2nd ed. Philadelphia: Current Medicine, Inc, pp 5-16.
- Mayer EA, Fanselow MS, 2003. Dissecting the Components of the Central Response to Stress. *Nature Neuroscience* 6: 1011-1012.
- McCloskey TW, Baskshi S, Than S, Arman P, Pahwa S, 1998. Immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells undergoing in vitro apoptosis after isolation from human immunodeficiency virus-infected children. *Blood* 92: 4230 - 4237.
- McCallum CD, Do H, Johnson AE, Frydman J, 2000. The Interaction of the Chaperonin Tailless Complex Polypeptide 1 (TCP1) Ring Complex (TriC) with Ribosome- bound Nascent Chains Examined Using Photo-Cross-linking. *The Journal of Cell Biology* 149: 591-601.
- Meyerhoff DJ, 2001. Effects of Alcohol and HIV Infection on the Central Nervous System. *Alcohol Research & Health* 25: 288-298.
- Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, 2001. Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J. Exp. Med.* 193: 651 - 658.
- Mossalayi MD, Becherel PA, Debre P, 1999. Critical role of nitric oxide during the apoptosis of peripheral blood leukocytes from patients with AIDS. *Mol Med* 12: 812-816.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 20: 7146-7159.
- Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, 1998. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNA ase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95: 9123- 9128.
- Miyata Y, Ikawa Y, Shibuya M, Nishida E, 2001. Specific Association of a Set of Molecular Chaperones Including Hsp90 and Cdc37 with MOK, a Member of the Mitogen- activated Protein Kinase Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 21841-21848.
- Nair MPN, Mahajan S, Hou J, Sweet AM, Schwartz SA, 2000. The stress hormone, cortisol, synergizes with HIV-1 gp-120 to induce apoptosis of normal human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Mol Biol* 7 : 1227-1233.

- Nollen EAA, Morimoto RI, 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperons as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell sciences* 115: 2809-2816.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, 2003. Cytokines. In (Parslow TG, Stites Dp, Terr AI, Imboden JB, eds). *Medical immunology*. Tenth ed. International edition, San Fransisco, pp 48-166.
- Osthoﬀ KS, Walczak H, Droge W, Krammer PH, 1994. Cell Nucleus and DNA Fragmentation Are Not Reuquired for Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 127: 15-20.
- Pavlakis GN, 1997. The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 regulatory genes of HIV. In (DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds). *AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. Fourth Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 45-74.
- Putra ST, 1999. Perkembangan Paradigma dan Konsep Psikoneuroimunologi. Kumpulan Materi Workshop Psikoneuroimunologi. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran, Surabaya: FK Unair, hlm 8-12.
- Putra ST, 2003. Patobiologi Molekuler Mitokhondria Tua. Dalam (Sargowo D, Widodo A, Ali M, Wahono D, Ratnawati R, Winarsih S, eds). *Basic Molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine*. Malang: FKUB, hlm 47-53.
- Quade WMC, Aikman A, 1987. Bagaimana Tubuh Menghadapi Stres. Dalam (Quade WMC, Aikman A eds). *Stress*. Penerbit Erlangga, Jakarta, hlm 98-107.
- Ramachandran A, Moellering DR, Ceaser E, Xu J, Darley-Usman V, 2002. Inhibition of mitochondrial protein synthesis results in increased endothelial cell susceptibility to nitric oxide- induce apoptosis. *PNAS* 99: 6643 – 6648.
- Ranford JC, Coates ARM, Henderson B, 2000. Chaperonins are cell-signaling proteins : the unfolding biology of molecular chaperones. In : *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge University Press, London, pp 1-17.
- Ransohoff RM, 2003. Snip-snip, kill-kill: truncated SDF-1 and HIV-associated neurodegeneration. *Nature Neuroscience* 6: 1009- 1011.
- Rasola A, Far DF, Hofman P, Rossi B, 1999. Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl-efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J* 13: 1711-1723.

- Rasola A, Gramaglia D, Boccaccio C, Comoglio PM, 2001. Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein. *J Immunol* 1: 81-88.
- Robertson JM, 2002. The Astrocentric Hypothesis: Proposed Role of Astrocytes in Consciousness and Memory Formation. *Journal of Physiology* 96: 251-255.
- Russell PJ, 2002. Gen Expression: Translation. In (Russell PJ, ed). *i Genetics*. Library of Congress Cataloging-in- Publication Data. San Francisco, pp 138-160.
- Sastroasmoro S, 2002. Pemilihan Subyek Penelitian. Dalam: (Sastrasmoro S, Ismael S, ed). *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta, hlm 67-77.
- Schols D, Clercq ED, 1996. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induce anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *Journal of Virology* 70: 4953 – 4960.
- Schleifer SJ, Keller SE, 1992. Stressfull Event, Depressive Disorders, and Immunity. In (Schmoll HJ, Tewes U eds.). *Psychoneuroimmunology Interaction Between Brain, Nervus System, Behavior, Endocrine and Immune System*. Lewiston: Hogrefe & Huber Publishers, pp 91-99.
- Scholz GM, Cartledge K, Hall NE (2001). Identification and Characterization of Hsc70, a Novel Hsp90-associating Relative of Cdc37. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 30971-30979.
- Seeley RR, Stephens TD, Tate P, 1998. Neurotransmitters and neuromodulators. In: *Anatomy & physiology*, 4th ed. McGraw-Hill, Boston, pp 365- 368.
- Singh KK, Luccy BM, Zullo SJ, 2003. Mitochondria, oxidative stress and mitochondrial diseases. In (Cutler RG, Rodriguez H, eds). *Critical reviews of oxidative stress and aging, advances in basic science, diagnostics and intervention*, vol.II, Singapore : World science publishing co. ptc. Ltd, pp 452-466.
- Sismindari, 2000. Konsep Dasar Biologi Sel dan Biologi Molekuler. Dalam (Sismindari,ed). *Biologi Molekuler Konsep Dasar Biologi dan Biologi Molekuler*. Ed 1, Yogyakarta: Gajah mada press, hlm 1-10.
- Smith DF, Whitesell L, Katsanis E, 1998. Molecular Chaperones: Biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacological Reviews* 50: 493–513.

- Solimun, 2002. Sample size. Dalam (Solimun, ed). Structural Equation Modeling Lisrel dan Amos. Ed 1, Malang: University press, hlm 65-84.
- Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH, 2003. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins, Ku70 and Ku80, and apoptosis in pancreatic acinar AR42j cells. Tokyo: JBC papers in press, pp 1-41.
- Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB, 2000. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 : 2124- 2132.
- Stuart JK, Myszka DG, Joss L, Mitchell RS, McDonald SM, 1998. Characterization of Interactions between the Anti-apoptotic Protein BAG-1 and Hsc70 Molecular Chaperones. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 22506-22514.
- Stryer L, 1995. Protein Kejut Panas yang digerakkan ATP Berfungsi Sebagai Chaperon yang mengikat dan Membantu Melipat Protein Nasens. Dalam (Soebiato ed). *Biokimia*. Vol 3. Ed 4, Jakarta: EGC, hlm 918-920.
- Sudiana IK, 2003. The Contribution of Mitochondrial Defect on Development and Progression of the Cancer. Dalam (Sargowo D, Widodo A, Ali M, Wahono D, Ratnawati R, Winarsih S,eds). *Basic molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine*. Malang: FKUB, hlm 91-98.
- Suhara T, Mano T, Oliveria BE, Walsh K, 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Res*. 89: 13-19.
- Sullivan CS, pipas JM, 2002. T antigens of simian virus 40 : Molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 179-202.
- Sumitro SB, Wiyarti S, Permatasari, 2003. Visualisasi dan Distribusi Mitokondria dengan Mikroskop Fluorescent Menggunakan Mitochondrion-Selective Probes. Dalam (Sargowo, Ali, Soeatmadji, Ratnawati, Winarsih, eds). *Basic Molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine*. Malang: FKUB, hlm 1-4.
- Suryohudoyo P, 1999. Hantaran Sinyal antar Sel. Kumpulan Materi Workshop Psikoneuroimunologi. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran, Surabaya: FK unair, hlm 1-12.

- Suwendra P, 2002. Human Immunodeficiency Virus. Dalam (Soedarmo, Garna, Hadinegoro ed). *Infeksi dan Penyakit Tropis*. Ed 1, Jakarta: FKUI, hlm 281-302.
- Tanaka E, Nemoto TK, Ono T, 2001. Liberation of the Intramolecular as the Mechanism of Heat - induced Activation of Hsp90 Molecular Chaperone. *Eur.J.Biochem* 268: 5270-5277.
- Umar Kasan, 1997. Kortikotropin. Dalam (Umar Kasan ed.). *Hormon Kortikosteroid*. Jakarta: Penerbit Hipokrates, hlm 21-27.
- 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.
- Vladimir L, Gabai and Sherman MY, 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Interplay between Molecular Chaperones and Signaling in Survival of Heat Shock. *J Appl Physiol* 92: 1743-1748.
- Waxman SG, 2003. Blood-Brain Barrier. In (Waxman SG, ed). *Twenty-fifth Edition*. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, pp 160-162.
- Weaver VM, Carson CE, Walker PR, Chaly N, Lach B, 1996. Degradation of Nuclear Matrix and DNA Cleavage in Apoptotic Thymocytes. *Journal of Cell Science* 109: 45-56.
- WHO, 2002. AIDS epidemic update. UNAIDS/WHO, pp 1-42.
- Widodo MA, 2003. Calcium dan Generasi Spesies Oksigen Reaktif pada Fungsi Mitokondria. Dalam (Sargowo D, Widodo MA, Ali M, Wahono D, Ratnawati R, Winarsih S, eds). *Basic Molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine*. Malang: FKUB, hlm 15-32.
- Wolfsdorf GF, Born J, Nagel D, Zenz H, Fehm HL, 1992. Corticosteroids as Modulators of Sensory Processing in Man. In (Schmoll HJ, Tewes U eds). *Psychoneuroimmunology Interaction Between Brain, Nervus System, Behavior, Endocrine and Immune System*. Lewiston: Hogrefe & Huber Publishers, pp 48-59.
- Stressfull Event, Depressive Disorders, and Immunity Winter DB, Gearhart PJ, Bohr VA, 1988. Homogenous rate of Degradation of Nuclear DNA During Apoptosis. *Nucleic acids research* 26: 4422-4425.

- Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, 1999. Hsp60 Accelerates the Maturation of Pro-caspase-3 by Upstream Activator Proteases During Apoptosis. *The Embo Journal* 18: 2049-2056.
- Yoon YS, Kim JW, Kang KW Kim YS, Choi KH, 1996. Poly (ADP-ribosyl) action of Histone H1 Correlates with Internucleosomal DNA Fragmentation during Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 9129-9134.
- Yuswanto, 2000. Signal sel. Dalam (Sismindari, ed). *Konsep Dasar Biologi Sel dan Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Gajah Mada press, hlm 1- 16.
- Zavasky DM, Gerberding JL, MD, Sande MA, 2001. Patients With AIDS. In (Wilson WR, Sande MA, eds). *Current Diagnosis & Treatments in Infectious Disease*. New York : International Edition, pp 315-327.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

JADWAL KEGIATAN

| KEGIATAN | BULAN | | | | | |
|---|-------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Persiapan pasien dan pengadaan bahan | X | | | | | |
| Pemeriksaan pasien dan pengambilan sampel | | | X | | | |
| Pengolahan data dan penyusunan laporan | | | | | | X |

RINCIAN BIAYA

1. Pemeriksaan laboratorium 32 subyek

| No | Pemeriksaan | Biaya (rupiah) |
|-----|--|----------------|
| 1. | Darah lengkap | 3.100.000 |
| 2. | SGPT | 800.000 |
| 3. | Albumin | 560.000 |
| 4. | Serum keratin | 560.000 |
| 5. | Tes serologi HIV dengan 3 metode | 3.250.000 |
| 6. | IgM anti HBc | 5.125.000 |
| 7. | CD4 | 8.400.000 |
| 8. | ACTH | 5.180.000 |
| 9. | Kortisol | 4.520.000 |
| 10. | Hsp70 | 15.000.000 |
| 11. | Anti Hsp70 | 15.000.000 |
| 12. | Cell death detection ELISA ^{plus} | 4.500.000 |
| | Jumlah | 65.999.000 |

2. Foto thoraks 32 subyek

1.600.000

3. Biaya administrasi dan penyusunan laporan

1.400.000

4. Biaya tak terduga

6.001.000

Total biaya

75.000.000

(Tujuh puluh lima juta Rupiah)

PENJELASAN PENGAMBILAN SAMPEL DARAH

Tujuan

Mendapatkan sampel darah untuk kemudian dilakukan pemeriksaan laboratorium sehingga dapat diketahui kondisi / keadaan pasien berdasarkan hasil laboratorium.

Manfaat

Dapat ditentukan tindakan medik selanjutnya terhadap pasien

Cara Pengambilan darah

- dilakukan sterilisasi pada daerah yang akan dilakukan pengambilan darah
- diambil darah memakai 2 tabung *BD vacutainer* @ 7 ml dilanjutkan dengan 4 tabung *BD vacutainer* EDTA @ 3 ml, kemudian dilakukan penutupan dan proteksi pada tempat pengambilan sampel darah tersebut
- prosedur selesai

Risiko yang mungkin terjadi

- Nyeri pada daerah tempat pengambilan sampel darah
- Terjadi hematoma (bengkak kebiruan) pada daerah tempat pengambilan darah
- Terjadi infeksi pada daerah tempat pengambilan darah, bila dilakukan tidak secara benar
- Meskipun jarang tetapi terdapat kemungkinan pengaruh rasa sakit dan takut yang bisa menimbulkan syok pada subyek

SURAT PERSETUJUAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : -----

Dengan ini menyatakan bahwa saya telah mendapatkan penjelasan dengan cukup jelas tentang infeksi HIV sehubungan dengan kondisi saya saat ini, dan telah memahami sepenuhnya.

Oleh karena itu saya menyatakan persetujuan saya dengan sukarela untuk menjalani tes HIV dan bersedia/tidak bersedia diberitahu statusnya, serta bersedia/tidak bersedia dibuka statusnya (coret yang tidak perlu)

Demikian pernyataan ini saya buat tanpa adanya tekanan dari pihak manapun juga.

Surabaya,-----

Petugas yang menjelaskan

Yang menyatakan

Nasronudin, dr., Sp.PD-KPTI

SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN SEBAGAI SUBYEK PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :
Umur/ Kelamin :Tahun, laki-laki / perempuan
Alamat :
Bukti diri KTP :
Status Perkawinan : Kawin / Belum Kawin / Duda / Janda

Setelah memperoleh penjelasan sepenuhnya dan menyadari tujuan, manfaat serta risiko yang mungkin timbul, dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya telah memberikan **PERSETUJUAN** untuk diikuti sertakan dan bersedia berperan serta dalam penelitian berjudul :

EFEK DIAGNOSIS TERINFEKSI HIV/AIDS TERHADAP MEKANISME APOPTOSIS LIMFOSIT T-CD4 PADA PENDERITA HIV/AIDS

Studi Kasus Di Unit Perawatan Intermediet Penyakit Infeksi (UPIPI) RSUD Dr. Soetomo

Terhadap diri saya sendiri / isteri / suami / anak / ayah / ibu saya, dengan :

Nama :
Umur / Kelamin : Tahun, laki-laki / perempuan
Alamat :
Bukti diri / KTP :

Demikian pernyataan persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya,2004

Yang membuat pernyataan

Mengetahui
Penanggung jawab Penelitian

()

Nasronudin, dr., Sp.PD-KPTI

Saksi

..... (.....)

PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :
Umur/ Kelamin : Tahun, laki-laki / perempuan
Alamat :
Bukti diri KTP :
Status perkawinan : Kawin/ belum kawin/ duda/ janda

Dengan ini menyatakan dengan se4ungguhnya telah memberikan **PERSETUJUAN** untuk dilakukan tindakan medis berupa pengambilan sampel darah terhadap diri saya sendiri / isteri / suami / anak / ibu saya, dengan :

Nama :
Umur / Kelamin : Tahun, laki-laki / perempuan
Alamat :
Bukti diri / KTP :

Yang tujuan, sifat dan perlunya tindakan medis tersebut diatas, serta risiko yang dapat ditimbulkannya telah cukup dijelaskan oleh dokter dan telah saya mengerti sepenuhnya.

Demikian pernyataan persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya,2004

Yang membuat pernyataan

Mengetahui
Penanggung jawab Penelitian

()

Nasronudin, dr., Sp.PD-KPTI

Saksi

..... (.....)

PROSEDUR PEMANTAUAN UNTUK KESELAMATAN SUBYEK PENELITIAN

1. Prosedur pengambilan sample dilakukan secara benar dan se-aseptis mungkin
2. Disediakan peralatan untuk penanggulangan kegawatan bila terjadi syok (oksigen, infus set, dan lain-lain)
3. Bila setelah meninggalkan rumah sakit terjadi kelainan pada tempat pengambilan sample darah, subyek dapat menghubungi peneliti melalui telpun 5014077, 5949335, 081-1372497 atau IRD RSUD Dr Soetomo

UPAYA PENGAMANAN TAMBAHAN

1. Petugas menggunakan peralatan kewaspadaan universal
2. Darah yang terpercik kelantai disiram dengan bayclin atau larutan klorin dan dibiarkan selama 10 menit baru dibersihkan sebagaimana umumnya
3. Dilakukan pengamanan terhadap peralatan habis pakai
4. Dipilih pasien terinfeksi HIV/ AIDS tanpa infeksi oportunistik

CARA MELINDUNGI KERAHASIAAN SUBYEK

1. Peneliti akan menjunjung tinggi etika profesi untuk menjaga kerahasiaan subyek
2. Kerahasiaan hanya akan dibuka atas seijin subyek untuk keperluan: asuransi, saksi ahli, atas perintah jabatan, atas daya paksa



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 21/Panke.KKE/2004

PANITIA KELAIKAN ETIK FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA - RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

" Efek Diagnosis Terinfeksi HIV/AIDS
" Terhadap Mekanisme Apoptosis Limfosit T-CD4
Pada Penderita HIV/AIDS "

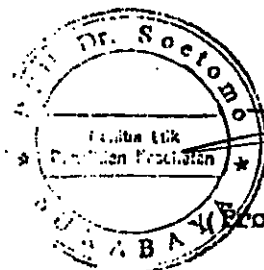
PENELITI UTAMA : Dr. Nasronudin, SpPD-KPTI

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSU Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

SURABAYA, 11 07 2004

KETUA



[Signature]
Prof. dr. H.R. hariadi, SpOG-K

Lampiran
Hasil Data Penelitian

| No | KELOMPOK | INF_HIV | NOI_NAMA | BB | TB_L | LENGAN | SGPT | ALBUMIN | KREATININ | LIMF_1 | LIMF_2 | LIMF_3 | CD4_1 | CD4_2 | CD4_3 | ACTH_1 | ACTH_2 |
|----|----------|---------|-----------|----|------|--------|------|---------|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 1 Tn. Hnd | 59 | 167 | 29 | 42 | 5 | 1.1 | 1.21 | 1.93 | 1.74 | 257 | 426 | 275 | 13.9 | 8.44 |
| 2 | 1 | 1 | 2 Tn. Jna | 72 | 169 | 32 | 19 | 4 | 1.0 | 2.55 | 1.96 | 1.89 | 135 | 256 | 259 | 18.8 | 22.40 |
| 3 | 1 | 1 | 3 Tn. Sso | 45 | 167 | 20 | 14 | 4 | .7 | 2.08 | 1.33 | 1.71 | 31 | 5 | 4 | 4 | 55.71 |
| 4 | 1 | 2 | 1 Tn. Rin | 63 | 180 | 28 | 20 | 5 | .9 | 2.08 | 2.04 | 1.65 | 454 | 900 | 625 | 16.2 | 13.06 |
| 5 | 1 | 2 | 2 Tn. Dno | 75 | 166 | 32 | 21 | 4 | .9 | 1.33 | 1.83 | 2.03 | 44 | 114 | 176 | 11.9 | 6.63 |
| 6 | 1 | 2 | 3 Tn. Ssw | 89 | 170 | 33 | 30 | 5 | .6 | 1.97 | 1.90 | 1.93 | 451 | 130 | 427 | 19.1 | 16.77 |
| 7 | 2 | 1 | 1 NV. Kli | 45 | 142 | 21 | 8 | 4 | .5 | 1.05 | 2.21 | 1.73 | 304 | 66 | 330 | 10.0 | 6.88 |
| 8 | 2 | 1 | 2 Tn. Djp | 56 | 159 | 28 | 28 | 4 | 1.0 | 2.04 | 1.96 | 1.93 | 29 | 23 | 30 | 14.2 | 14.75 |
| 9 | 2 | 1 | 3 Tn. Ims | 72 | 170 | 28 | 21 | 5 | 1.3 | 1.33 | 1.33 | 1.74 | 735 | 375 | 962 | 16.5 | 12.50 |
| 10 | 2 | 1 | 4 Ny. Enk | 56 | 142 | 26 | 15 | 4 | .7 | 1.37 | 1.97 | 1.90 | 252 | 200 | 232 | 12.8 | 22.10 |
| 11 | 2 | 2 | 1 NV. Btr | 55 | 169 | 28 | 11 | 4 | .7 | 1.33 | 1.96 | 1.68 | 980 | 1829 | 725 | 15.3 | 15.04 |
| 12 | 2 | 2 | 2 NV. Jlk | 61 | 153 | 27 | 20 | 4 | .7 | 1.48 | 1.33 | 2.00 | 923 | 994 | 1534 | 38.6 | 17.06 |
| 13 | 2 | 2 | 3 NV. Rts | 67 | 155 | 26 | 29 | 5 | .8 | 1.38 | 1.33 | 1.87 | 255 | 872 | 280 | 7.9 | 13.90 |
| 14 | 2 | 2 | 4 NV. Hwl | 49 | 150 | 24 | 13 | 4 | .6 | 2.24 | 1.97 | 1.83 | 235 | 255 | 350 | 9.5 | 14.75 |
| 15 | 3 | 1 | 1 Tn. Tts | 64 | 168 | 27 | 52 | 5 | 1.1 | 1.52 | 1.33 | 1.33 | 480 | 476 | 595 | 20.3 | 30.47 |
| 16 | 3 | 1 | 2 Tn. Chr | 42 | 159 | 26 | 60 | 3 | 1.2 | 1.33 | 1.33 | 1.96 | 79 | 112 | 145 | 6.4 | 8.70 |
| 17 | 3 | 1 | 3 Tn. Hrn | 51 | 165 | 28 | 23 | 4 | 1.0 | 1.90 | 1.96 | 1.33 | 63 | 47 | 298 | 8.4 | 15.04 |
| 18 | 3 | 1 | 4 Tn. Dns | 97 | 170 | 28 | 97 | 5 | .9 | 1.81 | 1.89 | 1.83 | 656 | 624 | 589 | 13.3 | 19.41 |
| 19 | 3 | 2 | 1 NV. Asc | 64 | 167 | 30 | 15 | 5 | .6 | 2.44 | 1.76 | 1.33 | 1175 | 895 | 724 | 13.3 | 10.31 |
| 20 | 3 | 2 | 2 NV. Dyr | 56 | 160 | 29 | 20 | 5 | .7 | 1.33 | 1.70 | 1.76 | 931 | 971 | 979 | 11.7 | 31.75 |
| 21 | 3 | 2 | 3 NV. Wwa | 55 | 158 | 28 | 46 | 5 | .8 | 1.65 | 1.63 | 1.39 | 869 | 754 | 489 | 7.4 | 6.88 |
| 22 | 3 | 2 | 4 NV. Iml | 50 | 158 | 30 | 27 | 5 | .6 | 2.38 | 1.76 | 1.33 | 923 | 944 | 1018 | 7.4 | 10.04 |
| 23 | 2 | 1 | 1 Tn. Ily | 70 | 178 | 23 | 94 | 4 | 1.0 | 2.00 | 1.86 | .50 | 9 | 11 | 27 | 25.5 | 59.99 |
| 24 | 3 | 1 | 2 Tn. Fry | 54 | 170 | 22 | 110 | 4 | .8 | 1.26 | 1.79 | 1.52 | 238 | 395 | 395 | 22.7 | 20.30 |
| 25 | 1 | 1 | 3 Tn. Fra | 49 | 165 | 26 | 20 | 4 | .8 | 1.33 | 1.33 | 1.33 | 236 | 172 | 131 | 12.0 | 13.06 |
| 26 | 3 | 2 | 1 NV. Nke | 44 | 152 | 29 | 11 | 4 | .7 | 1.96 | 1.92 | 2.08 | 267 | 139 | 282 | 8.4 | 11.12 |
| 27 | 1 | 2 | 2 Tn. Smr | 79 | 170 | 27 | 22 | 5 | .9 | 1.01 | 1.55 | 1.55 | 711 | 540 | 468 | 19.1 | 19.41 |
| 28 | 2 | 2 | 3 NV. Yvi | 43 | 155 | 26 | 14 | 5 | .8 | 1.46 | 1.83 | 2.19 | 161 | 153 | 306 | 10.0 | 8.23 |

| ACTH_3 | KORT_1 | KORT_2 | KORT_3 | HSP_1 | HSP_2 | HSP_3 | AHSP_1 | AHSP_2 | AHSP_3 | CELD_1 | CELD_2 | CELD_3 | SEX | MTBB_IB |
|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|----------|
| 11.12 | 24.2 | 13.4 | 9.49 | .38 | 2.39 | .78 | 382.4 | 278.8 | 252.1 | .281 | .109 | .163 | Laki-laki | 21.15592 |
| 27.01 | 10.5 | 15.2 | 11.80 | 1.46 | 1.57 | 1.24 | 302.5 | 315.9 | 303.3 | .240 | .164 | .057 | Laki-laki | 25.20920 |
| 44.61 | 9.8 | 12.3 | 5.46 | 1.59 | 2.42 | 2.32 | 593.3 | 882.3 | 367.1 | .310 | .266 | .099 | Laki-laki | 16.13539 |
| 14.75 | 4.6 | 4.2 | 7.74 | .70 | .86 | .90 | 260.9 | 234.8 | 242.7 | .029 | .014 | .332 | Laki-laki | 19.44444 |
| 6.60 | 6.9 | 8.2 | 7.07 | 1.07 | 1.18 | 1.20 | 220.9 | 156.7 | 182.5 | .246 | .178 | .164 | Laki-laki | 27.21730 |
| 18.52 | 6.4 | 8.9 | 11.80 | 1.16 | 1.03 | 1.33 | 242.3 | 262.2 | 255.8 | .450 | .121 | .866 | Perempuan | 30.79585 |
| 11.12 | 16.3 | 20.1 | 8.98 | 1.13 | 1.39 | 1.06 | 255.7 | 221.3 | 262.9 | .467 | 1.050 | .866 | Perempuan | 22.31700 |
| 16.19 | 5.0 | 9.6 | 7.14 | .74 | .42 | .70 | 252.2 | 239.0 | 277.5 | .055 | .015 | .029 | Laki-laki | 19.60716 |
| 8.18 | 8.7 | 9.1 | .99 | .24 | 1.05 | .82 | 195.9 | 207.2 | 195.3 | .016 | 1.895 | .345 | Laki-laki | 24.91349 |
| 11.67 | 9.8 | 12.8 | 5.17 | .88 | .99 | 1.33 | 258.5 | 254.7 | 389.3 | .045 | .318 | .160 | Perempuan | 27.77227 |
| 18.23 | 12.7 | 12.0 | 9.37 | .72 | 1.66 | .92 | 260.6 | 260.3 | 256.1 | .162 | .035 | .264 | Perempuan | 19.25703 |
| 19.41 | 10.6 | 9.5 | 7.43 | .56 | .66 | .68 | 245.1 | 255.5 | 242.1 | .164 | 1.432 | .272 | Perempuan | 26.05835 |
| 7.66 | 14.7 | 11.7 | .99 | 1.64 | 1.66 | 1.24 | 275.8 | 260.4 | 280.9 | .443 | .551 | 2.027 | Perempuan | 24.60973 |
| 10.31 | 6.8 | 4.6 | 3.76 | .66 | .72 | .42 | 256.8 | 262.0 | 259.0 | .461 | .038 | .588 | Perempuan | 21.77778 |
| 24.84 | 9.0 | 10.8 | 10.90 | .80 | .62 | 2.37 | 417.4 | 314.4 | 269.2 | 1.690 | .100 | 1.362 | Laki-laki | 22.49858 |
| 6.38 | 7.0 | 4.5 | 11.20 | 2.68 | 1.13 | 3.30 | 185.3 | 170.1 | 211.3 | .019 | .011 | .045 | Laki-laki | 16.61327 |
| 10.58 | 10.8 | 15.5 | 7.12 | 1.64 | 1.28 | 2.06 | 254.8 | 261.3 | 366.3 | .081 | .007 | .015 | Laki-laki | 18.73278 |
| 16.48 | 7.1 | 6.7 | 10.90 | 2.27 | 2.22 | .74 | 206.8 | 252.4 | 222.7 | .051 | .035 | .009 | Laki-laki | 33.56401 |
| 3.24 | 12.0 | 13.2 | 8.10 | .74 | 1.20 | .50 | 259.0 | 256.2 | 244.4 | .335 | .227 | 1.182 | Perempuan | 22.94812 |
| 13.06 | 6.5 | 6.5 | 11.10 | .48 | .22 | .15 | 161.1 | 193.2 | 178.6 | 125 | .238 | .457 | Perempuan | 21.87500 |
| 10.04 | 11.5 | 8.5 | 6.40 | 1.09 | 1.03 | .94 | 243.5 | 154.4 | 119.4 | .839 | .709 | 2.161 | Perempuan | 22.03173 |
| 6.63 | 6.1 | 7.7 | 5.90 | .54 | .54 | 1.33 | 258.0 | 262.0 | 274.0 | .759 | .975 | .850 | Perempuan | 20.02884 |
| 15.32 | 7.9 | 15.9 | 13.10 | 1.48 | 1.78 | 1.31 | 263.1 | 270.8 | 258.1 | .475 | .530 | .759 | Laki-laki | 22.09317 |
| 29.52 | 12.4 | 15.1 | 17.70 | 1.07 | 3.45 | 3.30 | 257.9 | 257.0 | 254.8 | .247 | .184 | .226 | Laki-laki | 18.58512 |
| 7.92 | 15.2 | 12.2 | 7.90 | 1.85 | 1.35 | 2.34 | 259.7 | 287.1 | 267.9 | .126 | .081 | .181 | Laki-laki | 17.78197 |
| 8.44 | 6.6 | 7.9 | 1.20 | .82 | 1.01 | .66 | 259.2 | 258.2 | 253.0 | .443 | .680 | 1.266 | Perempuan | 19.04432 |
| 13.34 | 11.4 | 4.2 | 7.06 | .70 | .70 | .60 | 215.5 | 241.0 | 179.8 | .141 | .736 | .252 | Laki-laki | 27.33564 |
| 6.64 | 19.0 | 14.1 | 7.28 | .62 | .94 | .98 | 262.1 | 273.6 | 270.8 | .075 | .068 | .078 | Perempuan | 17.89802 |

LAMPIRAN 1

Lampiran 1

Oneway

Descriptives

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--------------|-------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | | Berat Badan | HIV positif | | |
| | HIV negatif | 14 | 60.71 | 13.38 | 3.58 | 52.99 | 68.44 | 43 | 89 |
| | Total | 28 | 60.05 | 13.81 | 2.61 | 54.70 | 65.41 | 42 | 97 |
| Tinggi Badan | HIV positif | 14 | 164.43 | 10.32 | 2.76 | 158.47 | 170.38 | 142 | 178 |
| | HIV negatif | 14 | 162.36 | 8.59 | 2.30 | 157.40 | 167.32 | 150 | 180 |
| | Total | 28 | 163.39 | 9.37 | 1.77 | 159.76 | 167.03 | 142 | 180 |
| Ling. Lengan | HIV positif | 14 | 25.98 | 3.38 | .90 | 24.03 | 27.93 | 20 | 32 |
| | HIV negatif | 14 | 28.29 | 2.43 | .65 | 26.88 | 29.69 | 24 | 33 |
| | Total | 28 | 27.13 | 3.11 | .59 | 25.92 | 28.34 | 20 | 33 |

ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Berat Badan | Between Groups | 12.223 | 1 | 12.223 | .062 | .806 |
| | Within Groups | 5135.946 | 26 | 197.536 | | |
| | Total | 5148.170 | 27 | | | |
| Tinggi Badan | Between Groups | 30.036 | 1 | 30.036 | .333 | .569 |
| | Within Groups | 2342.643 | 26 | 90.102 | | |
| | Total | 2372.679 | 27 | | | |
| Ling. Lengan | Between Groups | 37.260 | 1 | 37.260 | 4.313 | .048 |
| | Within Groups | 224.621 | 26 | 8.639 | | |
| | Total | 261.881 | 27 | | | |

General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N | |
|------------|-------------|-------------|----|
| Terimfeksi | 1 | HIV positif | 14 |
| | 2 | HIV negatif | 14 |

Descriptive Statistics

| | Terinfeksi | Mean | Std. Deviation | N |
|-----------|-------------|-------|----------------|----|
| SGOT | HIV positif | 43.07 | 34.46 | 14 |
| | HIV negatif | 21.36 | 9.43 | 14 |
| | Total | 32.21 | 27.15 | 28 |
| Albumin | HIV positif | 4.15 | .48 | 14 |
| | HIV negatif | 4.59 | .37 | 14 |
| | Total | 4.37 | .48 | 28 |
| Kreatinin | HIV positif | .936 | .217 | 14 |
| | HIV negatif | .736 | .115 | 14 |
| | Total | .836 | .199 | 28 |

Multivariate Tests^b

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|---------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .992 | 954.660 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .008 | 954.660 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 119.333 | 954.660 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 119.333 | 954.660 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| INF_HIV | Pillai's Trace | .549 | 9.732 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .451 | 9.732 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 1.216 | 9.732 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 1.216 | 9.732 ^a | 3.000 | 24.000 | .000 |

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+INF_HIV

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | SGOT | 3300.571 ^a | 1 | 3300.571 | 5.170 | .031 |
| | Albumin | 1.329 ^b | 1 | 1.329 | 7.180 | .013 |
| | Kreatinin | .280 ^c | 1 | .280 | 9.282 | .005 |
| Intercept | SGOT | 29057.286 | 1 | 29057.286 | 45.517 | .000 |
| | Albumin | 534.189 | 1 | 534.189 | 2886.222 | .000 |
| | Kreatinin | 19.556 | 1 | 19.556 | 648.295 | .000 |
| INF_HIV | SGOT | 3300.571 | 1 | 3300.571 | 5.170 | .031 |
| | Albumin | 1.329 | 1 | 1.329 | 7.180 | .013 |
| | Kreatinin | .280 | 1 | .280 | 9.282 | .005 |
| Error | SGOT | 16598.143 | 26 | 638.390 | | |
| | Albumin | 4.812 | 26 | .185 | | |
| | Kreatinin | .784 | 26 | 3.016E-02 | | |
| Total | SGOT | 48956.000 | 28 | | | |
| | Albumin | 540.330 | 28 | | | |
| | Kreatinin | 20.620 | 28 | | | |
| Corrected Total | SGOT | 19898.714 | 27 | | | |
| | Albumin | 6.141 | 27 | | | |
| | Kreatinin | 1.064 | 27 | | | |

a. R Squared = .166 (Adjusted R Squared = .134)

b. R Squared = .216 (Adjusted R Squared = .186)

c. R Squared = .263 (Adjusted R Squared = .235)

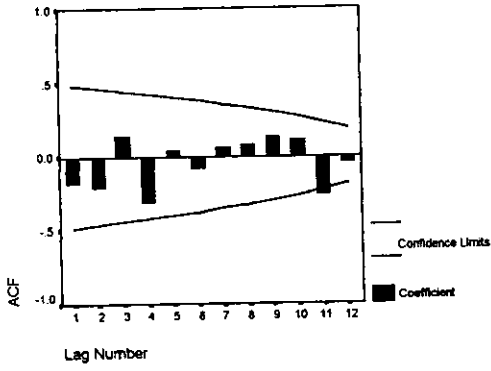
Estimated Marginal Means

Terinfeksi

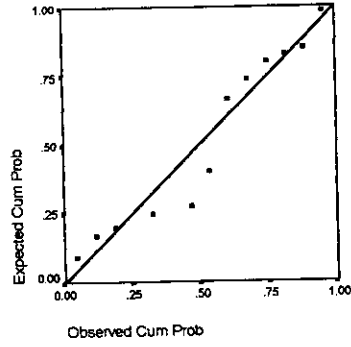
| Dependent Variable | Terinfeksi | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|--------------------|-------------|--------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| SGOT | HIV positif | 43.071 | 6.753 | 29.191 | 56.952 |
| | HIV negatif | 21.357 | 6.753 | 7.477 | 35.238 |
| Albumin | HIV positif | 4.150 | .115 | 3.914 | 4.386 |
| | HIV negatif | 4.586 | .115 | 4.349 | 4.822 |
| Kreatinin | HIV positif | .936 | .046 | .840 | 1.031 |
| | HIV negatif | .736 | .046 | .640 | .831 |

LAMPIRAN 2

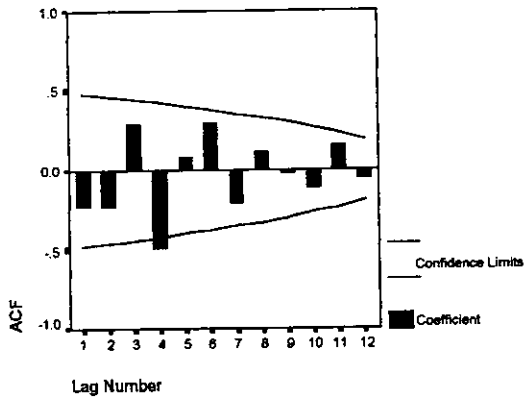
Limfosit - 1



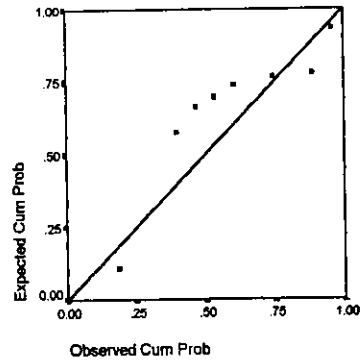
Normal P-P Plot of Limfosit - 1



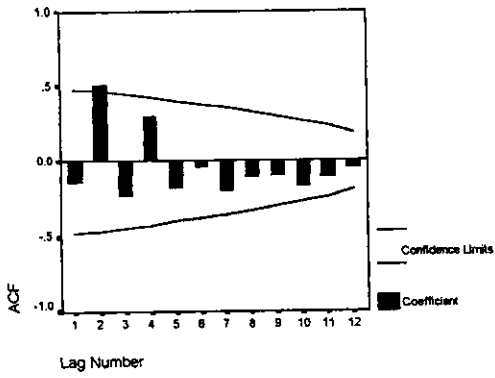
Limfosit - 2



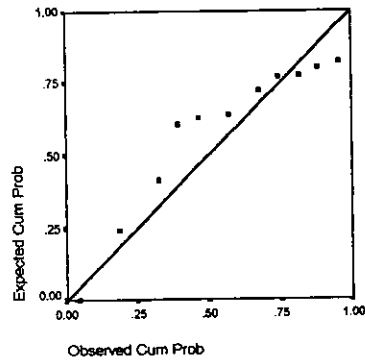
Normal P-P Plot of Limfosit - 2



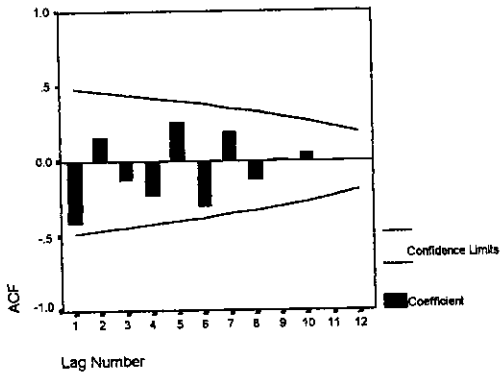
Limfosit - 3



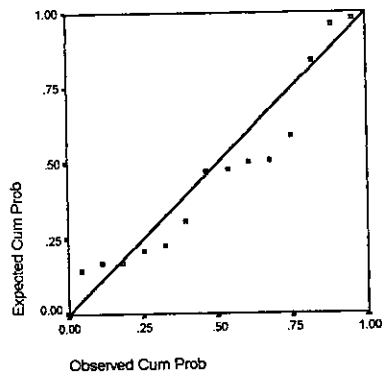
Normal P-P Plot of Limfosit - 3



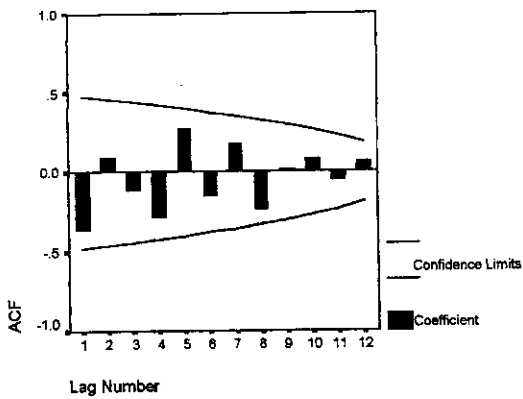
CD4 - 1



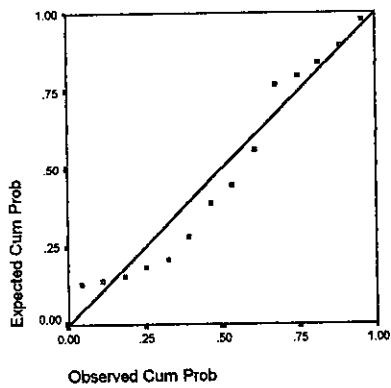
Normal P-P Plot of CD4 - 1



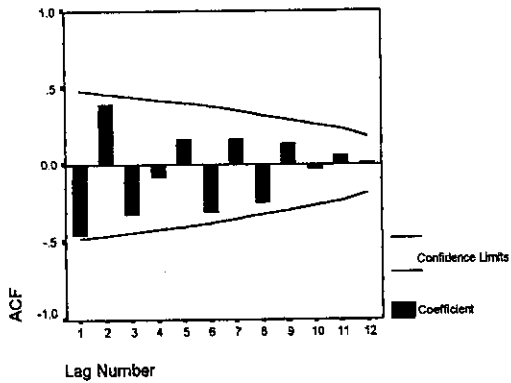
CD4 - 2



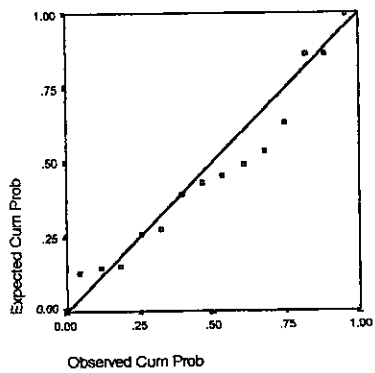
Normal P-P Plot of CD4 - 2



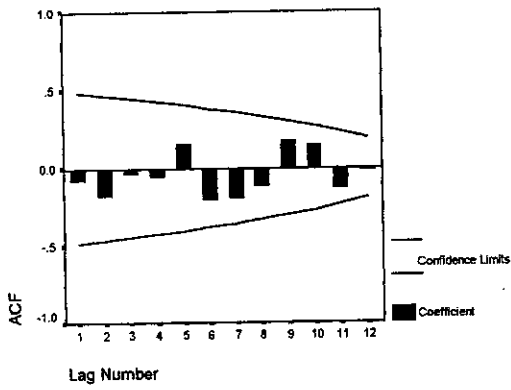
CD4 - 3



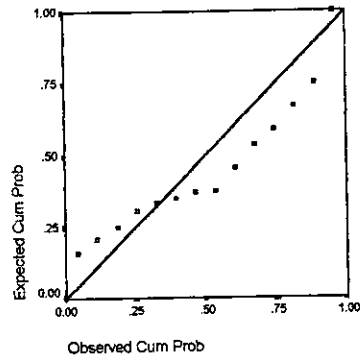
Normal P-P Plot of CD4 - 3



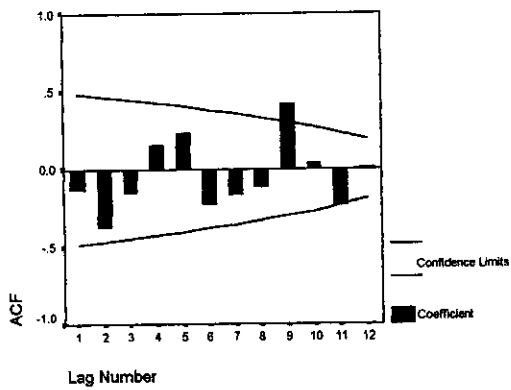
ACTH - 1



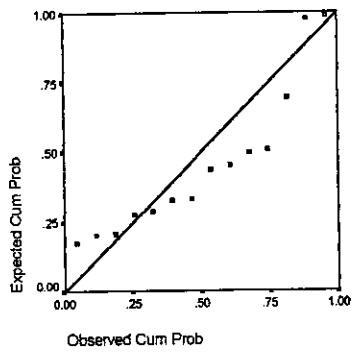
Normal P-P Plot of ACTH - 1



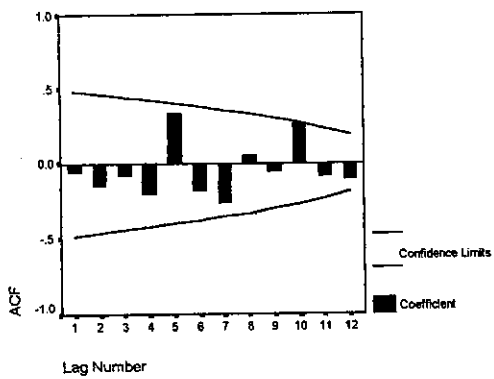
ACTH - 2



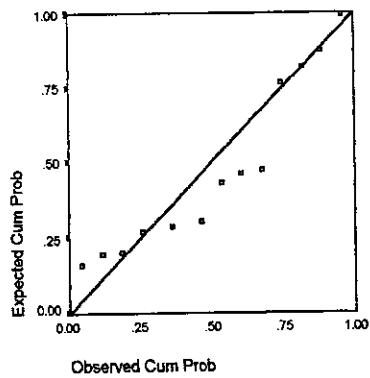
Normal P-P Plot of ACTH - 2



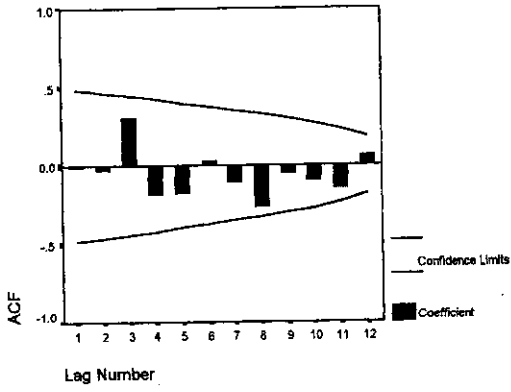
ACTH - 3



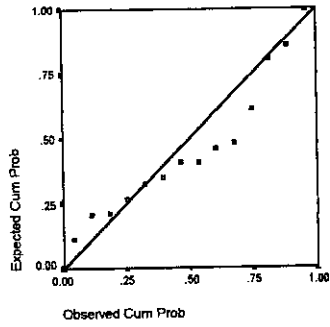
Normal P-P Plot of ACTH - 3



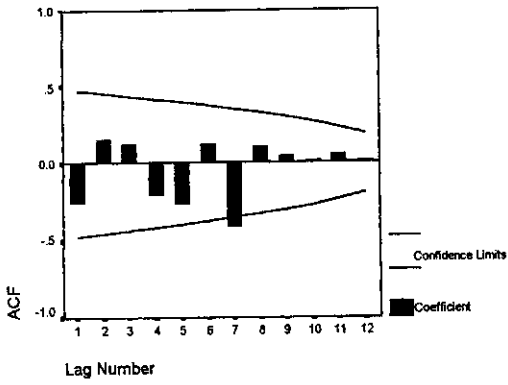
Kortisol - 1



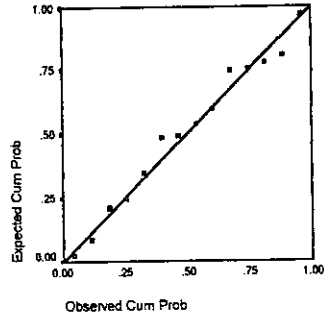
Normal P-P Plot of Kortisol - 1



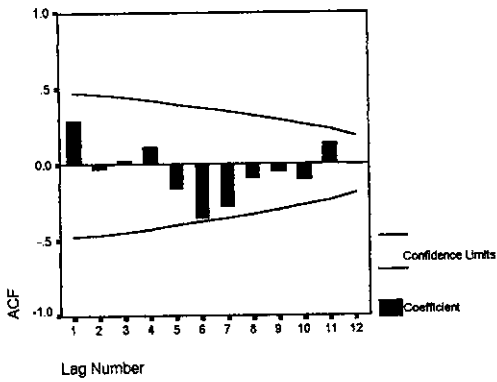
Kortisol - 2



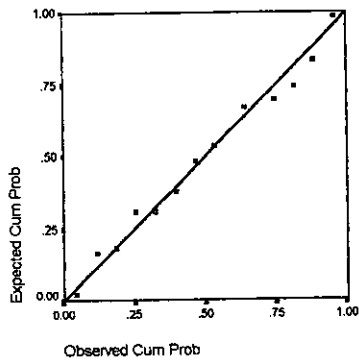
Normal P-P Plot of Kortisol - 2



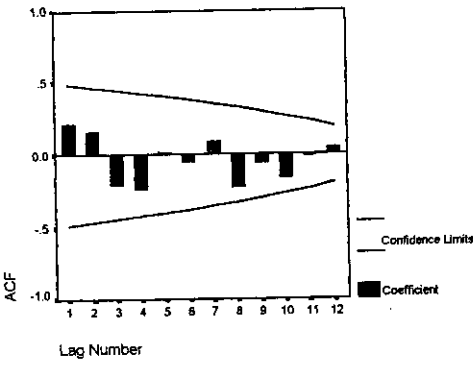
Kortisol - 3



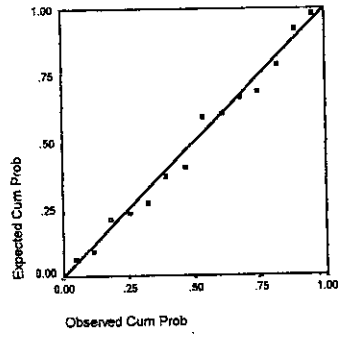
Normal P-P Plot of Kortisol - 3



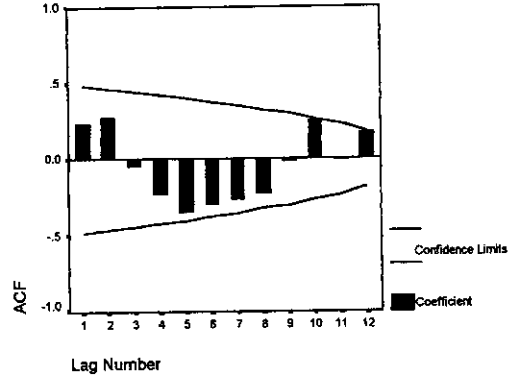
Hsp 70 - 1



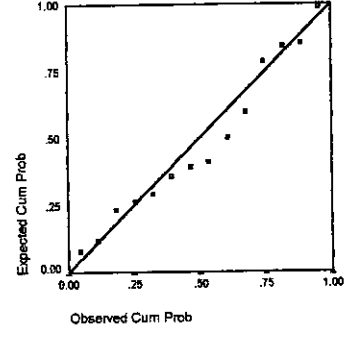
Normal P-P Plot of Hsp 70 - 1



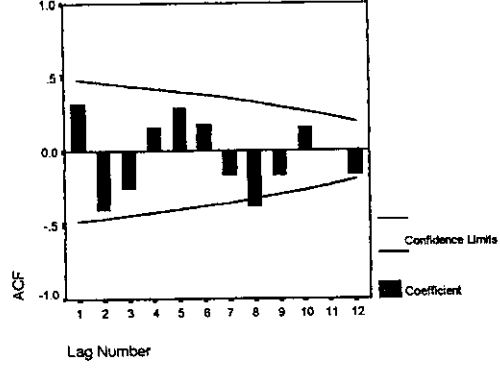
Hsp 70 - 2



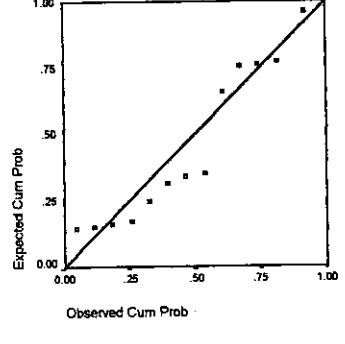
Normal P-P Plot of Hsp 70 - 2



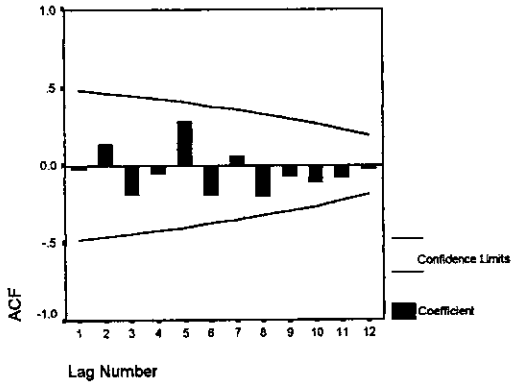
Hsp 70 - 3



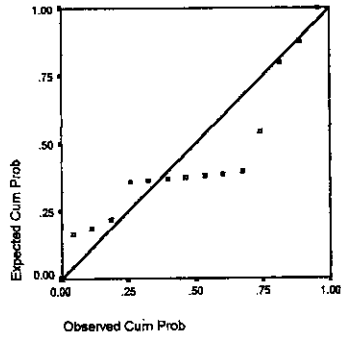
Normal P-P Plot of Hsp 70 - 3



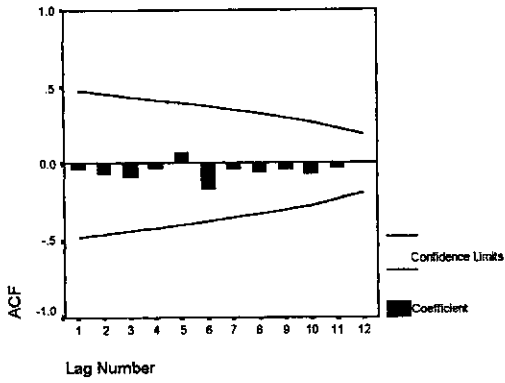
Anti Hsp 70 - 1



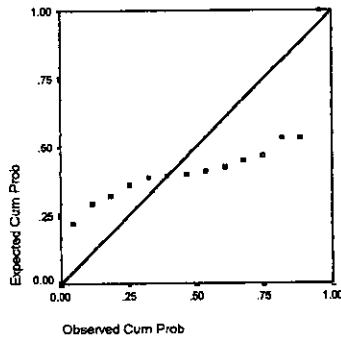
Normal P-P Plot of Anti Hsp 70 - 1



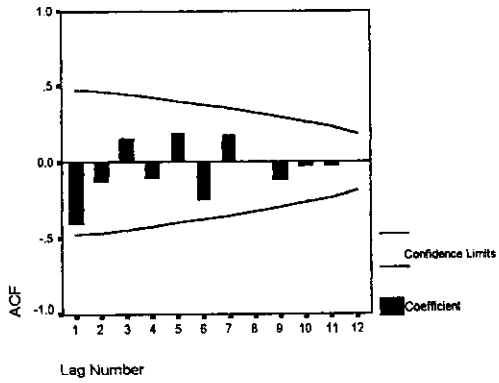
Anti Hsp 70 - 2



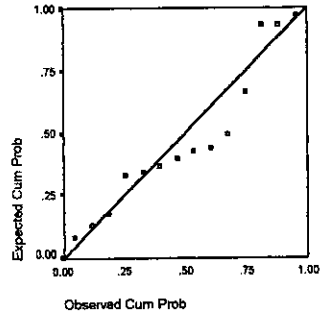
Normal P-P Plot of Anti Hsp 70 - 2



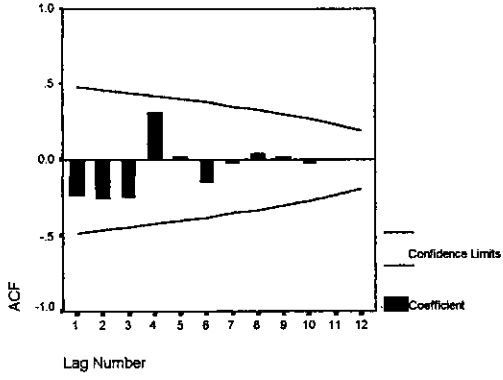
Anti Hsp 70 - 3



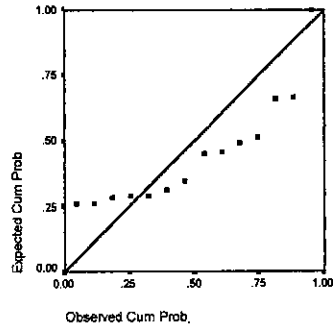
Normal P-P Plot of Anti Hsp 70 - 3



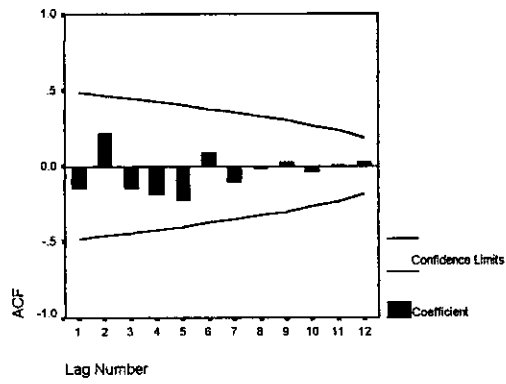
Cell Death - 1



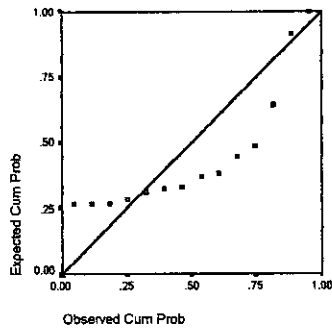
Normal P-P Plot of Cell Death - 1



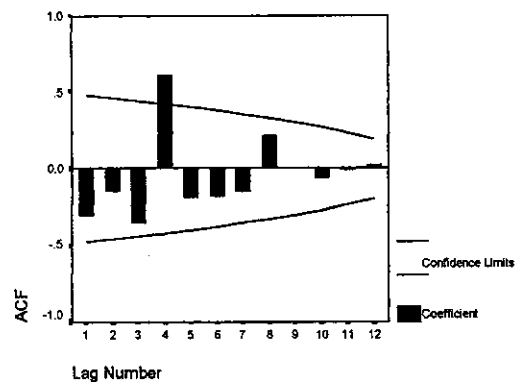
Cell Death - 2



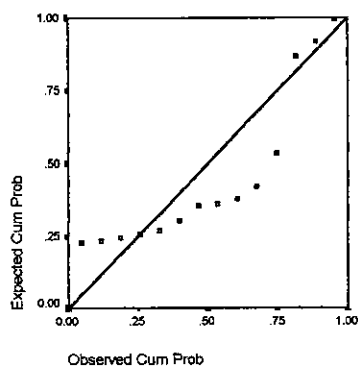
Normal P-P Plot of Cell Death - 2



Cell Death - 3



Normal P-P Plot of Cell Death - 3



LAMPIRAN 3

Lampiran 3.1 General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | | Value Label | N |
|------------|---|-------------|----|
| Terinfeksi | 1 | HIV positif | 14 |
| | 2 | HIV negatif | 14 |

Descriptive Statistics

| | Terinfeksi | Mean | Std. Deviation | N |
|-------------|-------------|---------|----------------|----|
| Limfosit | HIV positif | 1.6271 | .4349 | 14 |
| | HIV negatif | 1.7171 | .4540 | 14 |
| | Total | 1.6721 | .4387 | 28 |
| CD 4 | HIV positif | 250.29 | 230.15 | 14 |
| | HIV negatif | 598.50 | 370.70 | 14 |
| | Total | 424.39 | 350.86 | 28 |
| ACTH | HIV positif | 17.689 | 11.465 | 14 |
| | HIV negatif | 13.997 | 8.152 | 14 |
| | Total | 15.843 | 9.941 | 28 |
| Kortisol | HIV positif | 10.981 | 4.893 | 14 |
| | HIV negatif | 9.695 | 4.106 | 14 |
| | Total | 10.338 | 4.481 | 28 |
| Hsp 70 | HIV positif | 1.3007 | .6904 | 14 |
| | HIV negatif | .8214 | .3157 | 14 |
| | Total | 1.0611 | .5806 | 28 |
| Anti Hsp 70 | HIV positif | 291.821 | 107.816 | 14 |
| | HIV negatif | 244.343 | 29.005 | 14 |
| | Total | 268.082 | 81.157 | 28 |
| Cell Death | HIV positif | .29307 | .43161 | 14 |
| | HIV negatif | .33371 | .24749 | 14 |
| | Total | .31339 | .34585 | 28 |

Multivariate Tests^b

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|--------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .981 | 149.675 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .019 | 149.675 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 52.386 | 149.675 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 52.386 | 149.675 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| INF_HIV | Pillai's Trace | .373 | 1.703 ^a | 7.000 | 20.000 | .165 |
| | Wilks' Lambda | .627 | 1.703 ^a | 7.000 | 20.000 | .165 |
| | Hotelling's Trace | .596 | 1.703 ^a | 7.000 | 20.000 | .165 |
| | Roy's Largest Root | .596 | 1.703 ^a | 7.000 | 20.000 | .165 |

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+INF_HIV

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | Limfosit | 5.670E-02 ^a | 1 | 5.670E-02 | .287 | .597 |
| | CD 4 | 848772.321 ^b | 1 | 848772.321 | 8.916 | .006 |
| | ACTH | 95.423 ^c | 1 | 95.423 | .964 | .335 |
| | Kortisol | 11.584 ^d | 1 | 11.584 | .568 | .458 |
| | Hsp 70 | 1.608 ^e | 1 | 1.608 | 5.580 | .026 |
| | Anti Hsp 70 | 15779.503 ^f | 1 | 15779.503 | 2.532 | .124 |
| | Cell Death | 1.156E-02 ^g | 1 | 1.156E-02 | .093 | .762 |
| Intercept | Limfosit | 78.290 | 1 | 78.290 | 396.128 | .000 |
| | CD 4 | 5043060.321 | 1 | 5043060.321 | 52.978 | .000 |
| | ACTH | 7028.208 | 1 | 7028.208 | 71.028 | .000 |
| | Kortisol | 2992.603 | 1 | 2992.603 | 146.675 | .000 |
| | Hsp 70 | 31.524 | 1 | 31.524 | 109.386 | .000 |
| | Anti Hsp 70 | 2012304.989 | 1 | 2012304.989 | 322.855 | .000 |
| | Cell Death | 2.750 | 1 | 2.750 | 22.219 | .000 |
| INF_HIV | Limfosit | 5.670E-02 | 1 | 5.670E-02 | .287 | .597 |
| | CD 4 | 848772.321 | 1 | 848772.321 | 8.916 | .006 |
| | ACTH | 95.423 | 1 | 95.423 | .964 | .335 |
| | Kortisol | 11.584 | 1 | 11.584 | .568 | .458 |
| | Hsp 70 | 1.608 | 1 | 1.608 | 5.580 | .026 |
| | Anti Hsp 70 | 15779.503 | 1 | 15779.503 | 2.532 | .124 |
| | Cell Death | 1.156E-02 | 1 | 1.156E-02 | .093 | .762 |
| Error | Limfosit | 5.139 | 26 | .198 | | |
| | CD 4 | 2474994.357 | 26 | 95192.091 | | |
| | ACTH | 2572.686 | 26 | 98.949 | | |
| | Kortisol | 530.478 | 26 | 20.403 | | |
| | Hsp 70 | 7.493 | 26 | .288 | | |
| | Anti Hsp 70 | 162053.958 | 26 | 6232.845 | | |
| | Cell Death | 3.218 | 26 | .124 | | |
| Total | Limfosit | 83.485 | 28 | | | |
| | CD 4 | 8366827.000 | 28 | | | |
| | ACTH | 9696.318 | 28 | | | |
| | Kortisol | 3534.665 | 28 | | | |
| | Hsp 70 | 40.626 | 28 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 2190138.450 | 28 | | | |
| | Cell Death | 5.980 | 28 | | | |
| Corrected Total | Limfosit | 5.195 | 27 | | | |
| | CD 4 | 3323766.679 | 27 | | | |
| | ACTH | 2668.109 | 27 | | | |
| | Kortisol | 542.062 | 27 | | | |
| | Hsp 70 | 9.101 | 27 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 177833.461 | 27 | | | |
| | Cell Death | 3.230 | 27 | | | |

- a. R Squared = .011 (Adjusted R Squared = -.027)
- b. R Squared = .255 (Adjusted R Squared = .227)
- c. R Squared = .036 (Adjusted R Squared = -.001)
- d. R Squared = .021 (Adjusted R Squared = -.016)
- e. R Squared = .177 (Adjusted R Squared = .145)
- f. R Squared = .089 (Adjusted R Squared = .054)
- g. R Squared = .004 (Adjusted R Squared = -.035)

Lampiran 3.2 Discriminant

Analysis Case Processing Summary

| Unweighted Cases | | N | Percent |
|------------------|---|----|---------|
| Valid | | 28 | 100.0 |
| Excluded | Missing or out-of-range group codes | 0 | .0 |
| | At least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Total | 0 | .0 |
| Total | | 28 | 100.0 |

Group Statistics

| Terimfeksi | | Mean | Std. Deviation | Valid N (listwise) | |
|-------------|-------------|-----------|----------------|--------------------|----------|
| | | | | Unweighted | Weighted |
| HIV positif | Limfosit | 1.62714 | .43487 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 250.28571 | 230.14826 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 17.68929 | 11.46469 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 10.98143 | 4.89334 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | 1.30071 | .69045 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 291.82143 | 107.81647 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .29307 | .43161 | 14 | 14.000 |
| HIV negatif | Limfosit | 1.71714 | .45405 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 598.50000 | 370.69659 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 13.99714 | 8.15229 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 9.69500 | 4.10624 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | .82143 | .31571 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 244.34286 | 29.00514 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .33371 | .24749 | 14 | 14.000 |
| Total | Limfosit | 1.67214 | .43865 | 28 | 28.000 |
| | CD 4 | 424.39286 | 350.85962 | 28 | 28.000 |
| | ACTH | 15.84321 | 9.94077 | 28 | 28.000 |
| | Kortisol | 10.33821 | 4.48067 | 28 | 28.000 |
| | Hsp 70 | 1.06107 | .58058 | 28 | 28.000 |
| | Anti Hsp 70 | 268.08214 | 81.15679 | 28 | 28.000 |
| | Cell Death | .31339 | .34585 | 28 | 28.000 |

Tests of Equality of Group Means

| | Wilks' Lambda | F | df1 | df2 | Sig. |
|-------------|---------------|-------|-----|-----|------|
| Limfosit | .989 | .287 | 1 | 26 | .597 |
| CD 4 | .745 | 8.916 | 1 | 26 | .006 |
| ACTH | .964 | .964 | 1 | 26 | .335 |
| Kortisol | .979 | .568 | 1 | 26 | .458 |
| Hsp 70 | .823 | 5.580 | 1 | 26 | .026 |
| Anti Hsp 70 | .911 | 2.532 | 1 | 26 | .124 |
| Cell Death | .996 | .093 | 1 | 26 | .762 |

Pooled Within-Groups Matrices

| | Limfosit | CD 4 | ACTH | Kortisol | Hsp 70 | Anti Hsp 70 | Cell Death |
|----------------------|----------|-------|-------|----------|--------|-------------|------------|
| Correlation Limfosit | 1.000 | -.068 | .126 | -.450 | .088 | .251 | .129 |
| CD 4 | -.068 | 1.000 | .049 | .014 | -.274 | -.171 | .117 |
| ACTH | .126 | .049 | 1.000 | -.079 | -.111 | .621 | .020 |
| Kortisol | -.450 | .014 | -.079 | 1.000 | -.175 | .220 | -.023 |
| Hsp 70 | .088 | -.274 | -.111 | -.175 | 1.000 | -.121 | -.117 |
| Anti Hsp 70 | .251 | -.171 | .621 | .220 | -.121 | 1.000 | .416 |
| Cell Death | .129 | .117 | .020 | -.023 | -.117 | .416 | 1.000 |

Analysis 1

Box's Test of Equality of Covariance Matrices

Log Determinants

| | Rank | Log Determinant |
|----------------------|------|-----------------|
| Terimfeksi | | |
| HIV positif | 1 | 10.877 |
| HIV negatif | 1 | 11.831 |
| Pooled within-groups | 1 | 11.464 |

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Test Results

| | | |
|---------|---------|----------|
| Box's M | | 2.848 |
| F | Approx. | 2.745 |
| | df1 | 1 |
| | df2 | 2028.000 |
| | Sig. | .098 |

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

| Step | Entered | Wilks' Lambda | | | | | | | |
|------|---------|---------------|-----|-----|--------|-----------|-----|--------|------|
| | | Statistic | df1 | df2 | df3 | Exact F | | | |
| | | | | | | Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1 | CD 4 | .745 | 1 | 1 | 26.000 | 8.916 | 1 | 26.000 | .006 |

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- Maximum number of steps is 14.
- Maximum significance of F to enter is .05.
- Minimum significance of F to remove is .10.
- F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Variables in the Analysis

| Step | | Tolerance | Sig. of F to Remove |
|------|------|-----------|---------------------|
| 1 | CD 4 | 1.000 | .006 |

Variables Not in the Analysis

| Step | | Tolerance | Min. Tolerance | Sig. of F to Enter | Wilks' Lambda |
|------|-------------|-----------|----------------|--------------------|---------------|
| 0 | Limfosit | 1.000 | 1.000 | .597 | .989 |
| | CD 4 | 1.000 | 1.000 | .006 | .745 |
| | ACTH | 1.000 | 1.000 | .335 | .964 |
| | Kortisol | 1.000 | 1.000 | .458 | .979 |
| | Hsp 70 | 1.000 | 1.000 | .026 | .823 |
| | Anti Hsp 70 | 1.000 | 1.000 | .124 | .911 |
| | Cell Death | 1.000 | 1.000 | .762 | .996 |
| 1 | Limfosit | .995 | .995 | .536 | .733 |
| | ACTH | .998 | .998 | .349 | .718 |
| | Kortisol | 1.000 | 1.000 | .507 | .731 |
| | Hsp 70 | .925 | .925 | .186 | .693 |
| | Anti Hsp 70 | .971 | .971 | .362 | .720 |
| | Cell Death | .986 | .986 | .970 | .745 |

Wilks' Lambda

| Step | Number of Variables | Lambda | df1 | df2 | df3 | Exact F | | | |
|------|---------------------|--------|-----|-----|-----|-----------|-----|--------|----------|
| | | | | | | Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1 | 1 | .745 | 1 | 1 | 26 | 8.916 | 1 | 26.000 | .088E-03 |

Pairwise Group Comparisons^a

| Step | Terimfeksi | | HIV positif | HIV negatif |
|------|-------------|------|-------------|-------------|
| 1 | HIV positif | F | | 8.916 |
| | | Sig. | | .006 |
| | HIV negatif | F | 8.916 | |
| | | Sig. | .006 | |

a. 1, 26 degrees of freedom for step 1.

Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

| Function | Eigenvalue | % of Variance | Cumulative % | Canonical Correlation |
|----------|-------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| 1 | .343 ^a | 100.0 | 100.0 | .505 |

a. First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Wilks' Lambda

| Test of Function(s) | Wilks' Lambda | Chi-square | df | Sig. |
|---------------------|---------------|------------|----|------|
| 1 | .745 | 7.519 | 1 | .006 |

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

| | Function |
|------|----------|
| | 1 |
| CD 4 | 1.000 |

Structure Matrix

| | Function |
|--------------------------|----------|
| | 1 |
| CD 4 | 1.000 |
| Hsp 70 ^a | -.274 |
| Anti Hsp 70 ^a | -.171 |
| Cell Death ^a | .117 |
| Limfosit ^a | -.068 |
| ACTH ^a | .049 |
| Kortisol ^a | .014 |

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions. Variables ordered by absolute size of correlation within function.

a. This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

| | Function |
|------------|----------|
| | 1 |
| CD 4 | .003 |
| (Constant) | -1.376 |

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

| | Function |
|-------------|----------|
| | 1 |
| Terimfeksi | 1 |
| HIV positif | -.564 |
| HIV negatif | .564 |

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics

Classification Processing Summary

| | | |
|----------------|--|----|
| Processed | | 28 |
| Excluded | Missing or out-of-range group codes | 0 |
| | At least one missing discriminating variable | 0 |
| Used in Output | | 28 |

Prior Probabilities for Groups

| | Prior | Cases Used in Analysis | |
|-------------|-------|------------------------|----------|
| | | Unweighted | Weighted |
| Terimfeksi | | | |
| HIV positif | .500 | 14 | 14.000 |
| HIV negatif | .500 | 14 | 14.000 |
| Total | 1.000 | 28 | 28.000 |

Classification Function Coefficients

| | Terimfeksi | |
|------------|-------------|-------------|
| | HIV positif | HIV negatif |
| CD 4 | 2.629E-03 | 6.287E-03 |
| (Constant) | -1.022 | -2.575 |

Fisher's linear discriminant functions

Classification Results ^{b,c}

| | | | Predicted Group Membership | | Total |
|------------------------------|-------|------------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | | | HIV positif | HIV negatif | |
| Original | Count | Terimfeksi HIV positif | 11 | 3 | 14 |
| | | HIV negatif | 5 | 9 | 14 |
| | % | HIV positif | 78.6 | 21.4 | 100.0 |
| | | HIV negatif | 35.7 | 64.3 | 100.0 |
| Cross-validated ^a | Count | HIV positif | 11 | 3 | 14 |
| | | HIV negatif | 5 | 9 | 14 |
| | % | HIV positif | 78.6 | 21.4 | 100.0 |
| | | HIV negatif | 35.7 | 64.3 | 100.0 |

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 71.4% of original grouped cases correctly classified.

c. 71.4% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Lampiran 3.3 Oneway

Descriptives

POLA_CD4

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| HIV positif | 14 | .6580 | .6051 | .1617 | .3087 | 1.0074 | .02 | 1.93 |
| HIV negatif | 14 | 3.7628 | 2.3306 | .6229 | 2.4171 | 5.1084 | .28 | 7.39 |
| Total | 28 | 2.2104 | 2.3001 | .4347 | 1.3185 | 3.1023 | .02 | 7.39 |

ANOVA

POLA_CD4

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 67.477 | 1 | 67.477 | 23.277 | .000 |
| Within Groups | 75.369 | 26 | 2.899 | | |
| Total | 142.847 | 27 | | | |

LAMPIRAN 4

Lampiran 4.1 General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|------------|---------------|----|
| Terimfeksi | 1 HIV positif | 14 |
| | 2 HIV negatif | 14 |

Descriptive Statistics

| | Terimfeksi | Mean | Std. Deviation | N |
|-------------|-------------|---------|----------------|----|
| Limfosit | HIV positif | 1.7271 | .3202 | 14 |
| | HIV negatif | 1.7507 | .2237 | 14 |
| | Total | 1.7389 | .2713 | 28 |
| CD 4 | HIV positif | 227.71 | 200.58 | 14 |
| | HIV negatif | 677.86 | 488.61 | 14 |
| | Total | 452.79 | 432.26 | 28 |
| ACTH | HIV positif | 22.125 | 16.458 | 14 |
| | HIV negatif | 13.925 | 6.443 | 14 |
| | Total | 18.025 | 12.956 | 28 |
| Kortisol | HIV positif | 12.377 | 4.046 | 14 |
| | HIV negatif | 8.650 | 3.213 | 14 |
| | Total | 10.514 | 4.056 | 28 |
| Hsp 70 | HIV positif | 1.5757 | .8127 | 14 |
| | HIV negatif | .9579 | .3969 | 14 |
| | Total | 1.2668 | .7020 | 28 |
| Anti Hsp 70 | HIV positif | 300.879 | 171.880 | 14 |
| | HIV negatif | 237.893 | 39.879 | 14 |
| | Total | 269.386 | 126.564 | 28 |
| Cell Death | HIV positif | .34036 | .52735 | 14 |
| | HIV negatif | .42871 | .42971 | 14 |
| | Total | .38454 | .47416 | 28 |

Multivariate Tests^b

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|--------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .988 | 230.520 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .012 | 230.520 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 80.682 | 230.520 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 80.682 | 230.520 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| INF_HIV | Pillai's Trace | .525 | 3.160 ^a | 7.000 | 20.000 | .020 |
| | Wilks' Lambda | .475 | 3.160 ^a | 7.000 | 20.000 | .020 |
| | Hotelling's Trace | 1.106 | 3.160 ^a | 7.000 | 20.000 | .020 |
| | Roy's Largest Root | 1.106 | 3.160 ^a | 7.000 | 20.000 | .020 |

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+INF_HIV

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|--------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | Limfosit | 3.889E-03 ^a | 1 | 3.889E-03 | .051 | .823 |
| | CD 4 | 1418400.143 ^b | 1 | 1418400.143 | 10.169 | .004 |
| | ACTH | 470.680 ^c | 1 | 470.680 | 3.013 | .094 |
| | Kortisol | 97.241 ^d | 1 | 97.241 | 7.285 | .012 |
| | Hsp 70 | 2.672 ^e | 1 | 2.672 | 6.534 | .017 |
| | Anti Hsp 70 | 27770.401 ^f | 1 | 27770.401 | 1.784 | .193 |
| | Cell Death | 5.465E-02 ^g | 1 | 5.465E-02 | .236 | .631 |
| Intercept | Limfosit | 84.668 | 1 | 84.668 | 1109.914 | .000 |
| | CD 4 | 5740417.286 | 1 | 5740417.286 | 41.155 | .000 |
| | ACTH | 9097.218 | 1 | 9097.218 | 58.241 | .000 |
| | Kortisol | 3094.985 | 1 | 3094.985 | 231.873 | .000 |
| | Hsp 70 | 44.933 | 1 | 44.933 | 109.865 | .000 |
| | Anti Hsp 70 | 2031922.566 | 1 | 2031922.566 | 130.531 | .000 |
| | Cell Death | 4.140 | 1 | 4.140 | 17.894 | .000 |
| INF_HIV | Limfosit | 3.889E-03 | 1 | 3.889E-03 | .051 | .823 |
| | CD 4 | 1418400.143 | 1 | 1418400.143 | 10.169 | .004 |
| | ACTH | 470.680 | 1 | 470.680 | 3.013 | .094 |
| | Kortisol | 97.241 | 1 | 97.241 | 7.285 | .012 |
| | Hsp 70 | 2.672 | 1 | 2.672 | 6.534 | .017 |
| | Anti Hsp 70 | 27770.401 | 1 | 27770.401 | 1.784 | .193 |
| | Cell Death | 5.465E-02 | 1 | 5.465E-02 | .236 | .631 |
| Error | Limfosit | 1.983 | 26 | 7.628E-02 | | |
| | CD 4 | 3626594.571 | 26 | 139484.407 | | |
| | ACTH | 4061.173 | 26 | 156.199 | | |
| | Kortisol | 347.042 | 26 | 13.348 | | |
| | Hsp 70 | 10.634 | 26 | .409 | | |
| | Anti Hsp 70 | 404730.573 | 26 | 15566.560 | | |
| | Cell Death | 6.016 | 26 | .231 | | |
| Total | Limfosit | 86.656 | 28 | | | |
| | CD 4 | 10785412.0 | 28 | | | |
| | ACTH | 13629.070 | 28 | | | |
| | Kortisol | 3539.268 | 28 | | | |
| | Hsp 70 | 58.239 | 28 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 2464423.540 | 28 | | | |
| | Cell Death | 10.211 | 28 | | | |
| Corrected Total | Limfosit | 1.987 | 27 | | | |
| | CD 4 | 5044994.714 | 27 | | | |
| | ACTH | 4531.853 | 27 | | | |
| | Kortisol | 444.283 | 27 | | | |
| | Hsp 70 | 13.306 | 27 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 432500.974 | 27 | | | |
| | Cell Death | 6.070 | 27 | | | |

- a. R Squared = .002 (Adjusted R Squared = -.036)
- b. R Squared = .281 (Adjusted R Squared = .254)
- c. R Squared = .104 (Adjusted R Squared = .069)
- d. R Squared = .219 (Adjusted R Squared = .189)
- e. R Squared = .201 (Adjusted R Squared = .170)
- f. R Squared = .064 (Adjusted R Squared = .028)
- g. R Squared = .009 (Adjusted R Squared = -.029)

Lampiran 4.2 Discriminant

Analysis Case Processing Summary

| Unweighted Cases | | N | Percent |
|------------------|---|----|---------|
| Valid | | 28 | 100.0 |
| Excluded | Missing or out-of-range group codes | 0 | .0 |
| | At least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Total | 0 | .0 |
| Total | | 28 | 100.0 |

Group Statistics

| Terimfeksi | | Mean | Std. Deviation | Valid N (listwise) | |
|-------------|-------------|-----------|----------------|--------------------|----------|
| | | | | Unweighted | Weighted |
| HIV positif | Limfosit | 1.72714 | .32018 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 227.71429 | 200.58163 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 22.12500 | 16.45846 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 12.37714 | 4.04649 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | 1.57571 | .81268 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 300.87857 | 171.88015 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .34036 | .52735 | 14 | 14.000 |
| HIV negatif | Limfosit | 1.75071 | .22373 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 677.85714 | 488.60600 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 13.92500 | 6.44338 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 8.65000 | 3.21270 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | .95786 | .39690 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 237.89286 | 39.87900 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .42871 | .42971 | 14 | 14.000 |
| Total | Limfosit | 1.73893 | .27130 | 28 | 28.000 |
| | CD 4 | 452.78571 | 432.26341 | 28 | 28.000 |
| | ACTH | 18.02500 | 12.95555 | 28 | 28.000 |
| | Kortisol | 10.51357 | 4.05647 | 28 | 28.000 |
| | Hsp 70 | 1.26679 | .70200 | 28 | 28.000 |
| | Anti Hsp 70 | 269.38571 | 126.56443 | 28 | 28.000 |
| | Cell Death | .38454 | .47416 | 28 | 28.000 |

Tests of Equality of Group Means

| | Wilks' Lambda | F | df1 | df2 | Sig. |
|-------------|---------------|--------|-----|-----|------|
| Limfosit | .998 | .051 | 1 | 26 | .823 |
| CD 4 | .719 | 10.169 | 1 | 26 | .004 |
| ACTH | .896 | 3.013 | 1 | 26 | .094 |
| Kortisol | .781 | 7.285 | 1 | 26 | .012 |
| Hsp 70 | .799 | 6.534 | 1 | 26 | .017 |
| Anti Hsp 70 | .936 | 1.784 | 1 | 26 | .193 |
| Cell Death | .991 | .236 | 1 | 26 | .631 |

Pooled Within-Groups Matrices

| | Limfosit | CD 4 | ACTH | Kortisol | Hsp 70 | Anti Hsp 70 | Cell Death |
|----------------------|----------|-------|-------|----------|--------|-------------|------------|
| Correlation Limfosit | 1.000 | -.125 | -.182 | .300 | .082 | -.249 | -.316 |
| CD 4 | -.125 | 1.000 | -.007 | .011 | .176 | -.079 | .077 |
| ACTH | -.182 | -.007 | 1.000 | .035 | .107 | .590 | -.047 |
| Kortisol | .300 | .011 | .035 | 1.000 | .329 | .102 | .072 |
| Hsp 70 | .082 | .176 | .107 | .329 | 1.000 | .290 | -.167 |
| Anti Hsp 70 | -.249 | -.079 | .590 | .102 | .290 | 1.000 | -.093 |
| Cell Death | -.316 | .077 | -.047 | .072 | -.167 | -.093 | 1.000 |

Lampiran 4.3 General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|--------------|-------------|----|
| Terimfeksi 1 | HIV positif | 14 |
| 2 | HIV negatif | 14 |

Descriptive Statistics

| | Terimfeksi | Mean | Std. Deviation | N |
|----------|-------------|--------|----------------|----|
| POLA_CD4 | HIV positif | .1102 | 9.704E-02 | 14 |
| | HIV negatif | 2.9053 | 2.0942 | 14 |
| | Total | 1.5077 | 2.0351 | 28 |
| POLA_HSP | HIV positif | 5.9924 | 3.0906 | 14 |
| | HIV negatif | 1.8209 | .7545 | 14 |
| | Total | 3.9067 | 3.0634 | 28 |

Multivariate Tests ^b

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|-------|---------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .806 | 51.837 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .194 | 51.837 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 4.147 | 51.837 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 4.147 | 51.837 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| INF_HIV | Pillai's Trace | .667 | 25.053 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .333 | 25.053 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 2.004 | 25.053 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 2.004 | 25.053 ^a | 2.000 | 25.000 | .000 |

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+INF_HIV

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|-------------|--------|------|
| Corrected Model | POLA_CD4 | 54.689 ^a | 1 | 54.689 | 24.887 | .000 |
| | POLA_HSP | 121.813 ^b | 1 | 121.813 | 24.071 | .000 |
| Intercept | POLA_CD4 | 63.651 | 1 | 63.651 | 28.966 | .000 |
| | POLA_HSP | 427.337 | 1 | 427.337 | 84.445 | .000 |
| INF_HIV | POLA_CD4 | 54.689 | 1 | 54.689 | 24.887 | .000 |
| | POLA_HSP | 121.813 | 1 | 121.813 | 24.071 | .000 |
| Error | POLA_CD4 | 57.134 | 26 | 2.197 | | |
| | POLA_HSP | 131.574 | 26 | 5.061 | | |
| Total | POLA_CD4 | 175.475 | 28 | | | |
| | POLA_HSP | 680.724 | 28 | | | |
| Corrected Total | POLA_CD4 | 111.823 | 27 | | | |
| | POLA_HSP | 253.388 | 27 | | | |

a. R Squared = .489 (Adjusted R Squared = .469)

b. R Squared = .481 (Adjusted R Squared = .461)

LAMPIRAN 5

Lampiran 5.1 General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|------------|---------------|----|
| Terinfeksi | 1 HIV positif | 14 |
| | 2 HIV negatif | 14 |

Descriptive Statistics

| | Terinfeksi | Mean | Std. Deviation | N |
|-------------|-------------|---------|----------------|----|
| Limfosit | HIV positif | 1.6029 | .3891 | 14 |
| | HIV negatif | 1.7586 | .2819 | 14 |
| | Total | 1.6807 | .3427 | 28 |
| CD 4 | HIV positif | 305.14 | 265.00 | 14 |
| | HIV negatif | 598.79 | 373.57 | 14 |
| | Total | 451.96 | 351.23 | 28 |
| ACTH | HIV positif | 17.210 | 10.726 | 14 |
| | HIV negatif | 11.205 | 5.111 | 14 |
| | Total | 14.208 | 8.793 | 28 |
| Kortisol | HIV positif | 9.132 | 4.038 | 14 |
| | HIV negatif | 6.800 | 3.147 | 14 |
| | Total | 7.966 | 3.746 | 28 |
| Hsp 70 | HIV positif | 1.6907 | .9175 | 14 |
| | HIV negatif | .8464 | .3608 | 14 |
| | Total | 1.2686 | .8080 | 28 |
| Anti Hsp 70 | HIV positif | 278.414 | 58.913 | 14 |
| | HIV negatif | 231.364 | 47.270 | 14 |
| | Total | 254.889 | 57.627 | 28 |
| Cell Death | HIV positif | .30829 | .40400 | 14 |
| | HIV negatif | .72357 | .68682 | 14 |
| | Total | .51593 | .59197 | 28 |

Multivariate Tests^b

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|---------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .992 | 356.597 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .008 | 356.597 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 124.809 | 356.597 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 124.809 | 356.597 ^a | 7.000 | 20.000 | .000 |
| INF_HIV | Pillai's Trace | .495 | 2.803 ^a | 7.000 | 20.000 | .033 |
| | Wilks' Lambda | .505 | 2.803 ^a | 7.000 | 20.000 | .033 |
| | Hotelling's Trace | .981 | 2.803 ^a | 7.000 | 20.000 | .033 |
| | Roy's Largest Root | .981 | 2.803 ^a | 7.000 | 20.000 | .033 |

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+INF_HIV

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | Limfosit | .170 ^a | 1 | .170 | 1.470 | .236 |
| | CD 4 | 603582.893 ^b | 1 | 603582.893 | 5.754 | .024 |
| | ACTH | 252.420 ^c | 1 | 252.420 | 3.576 | .070 |
| | Kortisol | 38.072 ^d | 1 | 38.072 | 2.905 | .100 |
| | Hsp 70 | 4.990 ^e | 1 | 4.990 | 10.267 | .004 |
| | Anti Hsp 70 | 15495.917 ^f | 1 | 15495.917 | 5.432 | .028 |
| | Cell Death | 1.207 ^g | 1 | 1.207 | 3.803 | .062 |
| Intercept | Limfosit | 79.094 | 1 | 79.094 | 685.106 | .000 |
| | CD 4 | 5719608.036 | 1 | 5719608.036 | 54.529 | .000 |
| | ACTH | 5651.886 | 1 | 5651.886 | 80.073 | .000 |
| | Kortisol | 1776.832 | 1 | 1776.832 | 135.586 | .000 |
| | Hsp 70 | 45.060 | 1 | 45.060 | 92.712 | .000 |
| | Anti Hsp 70 | 1819119.343 | 1 | 1819119.343 | 637.702 | .000 |
| | Cell Death | 7.453 | 1 | 7.453 | 23.477 | .000 |
| INF_HIV | Limfosit | .170 | 1 | .170 | 1.470 | .236 |
| | CD 4 | 603582.893 | 1 | 603582.893 | 5.754 | .024 |
| | ACTH | 252.420 | 1 | 252.420 | 3.576 | .070 |
| | Kortisol | 38.072 | 1 | 38.072 | 2.905 | .100 |
| | Hsp 70 | 4.990 | 1 | 4.990 | 10.267 | .004 |
| | Anti Hsp 70 | 15495.917 | 1 | 15495.917 | 5.432 | .028 |
| | Cell Death | 1.207 | 1 | 1.207 | 3.803 | .062 |
| Error | Limfosit | 3.002 | 26 | .115 | | |
| | CD 4 | 2727146.071 | 26 | 104890.234 | | |
| | ACTH | 1835.193 | 26 | 70.584 | | |
| | Kortisol | 340.725 | 26 | 13.105 | | |
| | Hsp 70 | 12.636 | 26 | .486 | | |
| | Anti Hsp 70 | 74168.029 | 26 | 2852.617 | | |
| | Cell Death | 8.254 | 26 | .317 | | |
| Total | Limfosit | 82.266 | 28 | | | |
| | CD 4 | 9050337.000 | 28 | | | |
| | ACTH | 7739.498 | 28 | | | |
| | Kortisol | 2155.629 | 28 | | | |
| | Hsp 70 | 62.686 | 28 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 1908783.290 | 28 | | | |
| | Cell Death | 16.915 | 28 | | | |
| Corrected Total | Limfosit | 3.171 | 27 | | | |
| | CD 4 | 3330728.964 | 27 | | | |
| | ACTH | 2087.613 | 27 | | | |
| | Kortisol | 378.797 | 27 | | | |
| | Hsp 70 | 17.626 | 27 | | | |
| | Anti Hsp 70 | 89663.947 | 27 | | | |
| | Cell Death | 9.461 | 27 | | | |

- a. R Squared = .054 (Adjusted R Squared = .017)
- b. R Squared = .181 (Adjusted R Squared = .150)
- c. R Squared = .121 (Adjusted R Squared = .087)
- d. R Squared = .101 (Adjusted R Squared = .066)
- e. R Squared = .283 (Adjusted R Squared = .256)
- f. R Squared = .173 (Adjusted R Squared = .141)
- g. R Squared = .128 (Adjusted R Squared = .094)

Lampiran 5.2 Discriminant

Analysis Case Processing Summary

| Unweighted Cases | | N | Percent |
|------------------|---|----|---------|
| Valid | | 28 | 100.0 |
| Excluded | Missing or out-of-range group codes | 0 | .0 |
| | At least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable | 0 | .0 |
| | Total | 0 | .0 |
| Total | | 28 | 100.0 |

Group Statistics

| Terimfeksi | | Mean | Std. Deviation | Valid N (listwise) | |
|-------------|-------------|-----------|----------------|--------------------|----------|
| | | | | Unweighted | Weighted |
| HIV positif | Limfosit | 1.60286 | .38915 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 305.14286 | 264.99778 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 17.21000 | 10.72616 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 9.13214 | 4.03790 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | 1.69071 | .91752 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 278.41429 | 58.91331 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .30829 | .40400 | 14 | 14.000 |
| HIV negatif | Limfosit | 1.75857 | .28189 | 14 | 14.000 |
| | CD 4 | 598.78571 | 373.57281 | 14 | 14.000 |
| | ACTH | 11.20500 | 5.11059 | 14 | 14.000 |
| | Kortisol | 6.80000 | 3.14721 | 14 | 14.000 |
| | Hsp 70 | .84643 | .36082 | 14 | 14.000 |
| | Anti Hsp 70 | 231.36429 | 47.27002 | 14 | 14.000 |
| | Cell Death | .72357 | .68682 | 14 | 14.000 |
| Total | Limfosit | 1.68071 | .34272 | 28 | 28.000 |
| | CD 4 | 451.96429 | 351.22690 | 28 | 28.000 |
| | ACTH | 14.20750 | 8.79312 | 28 | 28.000 |
| | Kortisol | 7.96607 | 3.74560 | 28 | 28.000 |
| | Hsp 70 | 1.26857 | .80797 | 28 | 28.000 |
| | Anti Hsp 70 | 254.88929 | 57.62714 | 28 | 28.000 |
| | Cell Death | .51593 | .59197 | 28 | 28.000 |

Tests of Equality of Group Means

| | Wilks' Lambda | F | df1 | df2 | Sig. |
|-------------|------------------|--------|-----|-----|------|
| Limfosit | .946 | 1.470 | 1 | 26 | .236 |
| CD 4 | .819 | 5.754 | 1 | 26 | .024 |
| ACTH | .879 | 3.576 | 1 | 26 | .070 |
| Kortisol | .899 | 2.905 | 1 | 26 | .100 |
| Hsp 70 | .717 | 10.267 | 1 | 26 | .004 |
| Anti Hsp 70 | .827 | 5.432 | 1 | 26 | .028 |
| Cell Death | .872 | 3.803 | 1 | 26 | .062 |

Pooled Within-Groups Matrices

| | Limfosit | CD 4 | ACTH | Kortisol | Hsp 70 | Anti Hsp 70 | Cell Death |
|----------------------|----------|-------|-------|----------|--------|-------------|------------|
| Correlation Limfosit | 1.000 | -.059 | .045 | -.245 | -.088 | .109 | -.385 |
| CD 4 | -.059 | 1.000 | .052 | .088 | -.185 | -.190 | -.055 |
| ACTH | .045 | .052 | 1.000 | .298 | .212 | .250 | -.141 |
| Kortisol | -.245 | .088 | .298 | 1.000 | .291 | -.244 | -.243 |
| Hsp 70 | -.088 | -.185 | .212 | .291 | 1.000 | .108 | .044 |
| Anti Hsp 70 | .109 | -.190 | .250 | -.244 | .108 | 1.000 | -.160 |
| Cell Death | -.385 | -.055 | -.141 | -.243 | .044 | -.160 | 1.000 |

Analysis 1

Box's Test of Equality of Covariance Matrices

Log Determinants

| Terimfeksi | Rank | Log Determinant |
|----------------------|------|--------------------|
| HIV positif | 1 | -.172 |
| HIV negatif | 1 | -2.039 |
| Pooled within-groups | 1 | -.722 |

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Test Results

| | | |
|---------|---------|----------|
| Box's M | | 9.982 |
| F | Approx. | 9.654 |
| | df1 | 1 |
| | df2 | 2028.000 |
| | Sig. | .002 |

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

| Step | Entered | Wilks' Lambda | | | | | | | |
|------|---------|---------------|-----|-----|--------|-----------|-----|--------|------|
| | | Statistic | df1 | df2 | df3 | Exact F | | | |
| | | | | | | Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1 | Hsp 70 | .717 | 1 | 1 | 26.000 | 10.267 | 1 | 26.000 | .004 |

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a. Maximum number of steps is 14.
- b. Maximum significance of F to enter is .05.
- c. Minimum significance of F to remove is .10.
- d. F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Variables in the Analysis

| Step | | Tolerance | Sig. of F to Remove |
|------|--------|-----------|---------------------|
| 1 | Hsp 70 | 1.000 | .004 |

Variables Not in the Analysis

| Step | | Tolerance | Min. Tolerance | Sig. of F to Enter | Wilks' Lambda |
|------|-------------|-----------|----------------|--------------------|---------------|
| 0 | Limfosit | 1.000 | 1.000 | .236 | .946 |
| | CD 4 | 1.000 | 1.000 | .024 | .819 |
| | ACTH | 1.000 | 1.000 | .070 | .879 |
| | Kortisol | 1.000 | 1.000 | .100 | .899 |
| | Hsp 70 | 1.000 | 1.000 | .004 | .717 |
| | Anti Hsp 70 | 1.000 | 1.000 | .028 | .827 |
| | Cell Death | 1.000 | 1.000 | .062 | .872 |
| 1 | Limfosit | .992 | .992 | .445 | .700 |
| | CD 4 | .966 | .966 | .140 | .656 |
| | ACTH | .955 | .955 | .314 | .688 |
| | Kortisol | .915 | .915 | .510 | .704 |
| | Anti Hsp 70 | .988 | .988 | .110 | .646 |
| | Cell Death | .998 | .998 | .094 | .640 |

Wilks' Lambda

| Step | Number of Variables | Lambda | df1 | df2 | df3 | Exact F | | | |
|------|---------------------|--------|-----|-----|-----|-----------|-----|--------|----------|
| | | | | | | Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1 | 1 | .717 | 1 | 1 | 26 | 10.267 | 1 | 26.000 | .566E-03 |

Pairwise Group Comparisons^a

| Step | Terinfeksi | | HIV positif | HIV negatif |
|------|-------------|------|-------------|-------------|
| 1 | HIV positif | F | | 10.267 |
| | | Sig. | | .004 |
| 1 | HIV negatif | F | 10.267 | |
| | | Sig. | .004 | |

a. 1, 26 degrees of freedom for step 1.

Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

| Function | Eigenvalue | % of Variance | Cumulative % | Canonical Correlation |
|----------|-------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| 1 | .395 ^a | 100.0 | 100.0 | .532 |

a. First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Wilks' Lambda

| Test of Function(s) | Wilks' Lambda | Chi-square | df | Sig. |
|---------------------|---------------|------------|----|------|
| 1 | .717 | 8.486 | 1 | .004 |

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

| | Function |
|--------|----------|
| | 1 |
| Hsp 70 | 1.000 |

Structure Matrix

| | | Function |
|-------------|---|----------|
| | | 1 |
| Hsp 70 | | 1.000 |
| Kortisol | a | .291 |
| ACTH | a | .212 |
| CD 4 | a | -.185 |
| Anti Hsp 70 | a | .108 |
| Limfosit | a | -.088 |
| Cell Death | a | .044 |

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions
Variables ordered by absolute size of correlation within function.

a. This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

| | Function |
|------------|----------|
| | 1 |
| Hsp 70 | 1.434 |
| (Constant) | -1.820 |

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

| | Function |
|-------------|----------|
| | 1 |
| Terimfeksi | .606 |
| HIV positif | .606 |
| HIV negatif | -.606 |

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics

Classification Processing Summary

| | | |
|----------------|--|----|
| Processed | | 28 |
| Excluded | Missing or out-of-range group codes | 0 |
| | At least one missing discriminating variable | 0 |
| Used in Output | | 28 |

Prior Probabilities for Groups

| | Prior | Cases Used in Analysis | |
|-------------|-------|------------------------|----------|
| | | Unweighted | Weighted |
| Terimfeksi | | | |
| HIV positif | .500 | 14 | 14.000 |
| HIV negatif | .500 | 14 | 14.000 |
| Total | 1.000 | 28 | 28.000 |

Classification Function Coefficients

| | Terimfeksi | |
|------------|-------------|-------------|
| | HIV positif | HIV negatif |
| Hsp 70 | 3.479 | 1.742 |
| (Constant) | -3.634 | -1.430 |

Fisher's linear discriminant functions

Classification Results ^{b,c}

| | | | Predicted Group Membership | | Total |
|------------------------------|-------|------------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | | | HIV positif | HIV negatif | |
| Original | Count | Terimfeksi HIV positif | 8 | 6 | 14 |
| | | HIV negatif | 2 | 12 | 14 |
| | % | HIV positif | 57.1 | 42.9 | 100.0 |
| | | HIV negatif | 14.3 | 85.7 | 100.0 |
| Cross-validated ^a | Count | HIV positif | 8 | 6 | 14 |
| | | HIV negatif | 2 | 12 | 14 |
| | % | HIV positif | 57.1 | 42.9 | 100.0 |
| | | HIV negatif | 14.3 | 85.7 | 100.0 |

- a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.
- b. 71.4% of original grouped cases correctly classified.
- c. 71.4% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Lampiran 5.3
Oneway

Descriptives

POLA_HSP

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| HIV positif | 14 | 5.8820 | 3.1920 | .8531 | 4.0390 | 7.7250 | 2.44 | 11.48 |
| HIV negatif | 14 | 1.4745 | .6286 | .1680 | 1.1116 | 1.8374 | .26 | 2.32 |
| Total | 28 | 3.6782 | 3.1832 | .6016 | 2.4439 | 4.9125 | .26 | 11.48 |

ANOVA

POLA_HSP

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 135.983 | 1 | 135.983 | 25.696 | .000 |
| Within Groups | 137.595 | 26 | 5.292 | | |
| Total | 273.578 | 27 | | | |

5.1.1 Uji homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk memenuhi persyaratan dalam perhitungan dan analisis statistik, agar dapat dipertanggung jawabkan validitasnya.

Uji homogenitas melalui beberapa tahapan sebagai berikut.

- a. Randomisasi sampel yaitu pengambilan dan pemilhan sampel penelitian sudah diusahakan memenuhi randomisasi agar dapat mewakili populasi
- b. Uji data sampel, bertujuan untuk mengetahui apakah sampel yang terpilih tersebut sudah memenuhi homogenitas data. Sedangkan variabel-variabel yang di uji adalah variabel klinik (Berat badan; Tinggi Badan dan Lingkar lengan) dan variabel labolatoris (SGOT; Albumin dan Kreatinin). Untuk melihat nilai hasil data penelitian yang diperoleh kondisinya sesuai yang diharapkan yaitu homogen.

Hasil perhitungan berat badan dapat dilihat pada tabel 5.1 (Lampiran 1)

Tabel 5.1 : Rerata berat Badan

| | HIV+ | | HIV - | |
|-------------|--------|-------|--------|-------|
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Berat badan | 59.39 | 14.70 | 60.71 | 13.38 |

Uji perbedaan berat badan antara kelompok (HIV+ & HIV-) didapat $F_{hitung} = 0.062$ dan $p = 0.806$ ($\alpha > 0.05$) berarti tidak signifikan. Dengan kata lain ke dua kelompok (HIV+ & HIV-) tidak ada perbedaan berat badan atau homogen.

Hasil perhitungan tinggi badan dapat dilihat pada tabel 5.2 (Lampiran 1)

Tabel 5.2 : Rerata tinggi Badan

| | HIV+ | | HIV - | |
|--------------|--------|-------|--------|------|
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| Tinggi Badan | 164.43 | 10.32 | 162.36 | 8.59 |

Uji perbedaan tinggi badan antara kelompok (HIV+ & HIV-) didapat $F_{hitung} = 0.333$ dan $p = 0.569$ ($\alpha > 0.05$) berarti tidak signifikan. Dengan kata lain ke dua kelompok (HIV+ & HIV-) tidak ada perbedaan tinggi badan atau homogen.

Hasil perhitungan labolatoris dapat dilihat pada tabel 5.3 (Lampiran 1)

Tabel 5.3 : Rerata Variabel Kendali

| Variabel | HIV + | | HIV - | |
|-----------|--------|-------|--------|-------|
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| SGOT | 43.07 | 34.46 | 21.36 | 9.43 |
| Albumin | 4.15 | 0.48 | 4.59 | 0.37 |
| Kreatinin | 0.936 | 0.217 | 0.736 | 0.115 |

Uji perbedaan variabel kendali antara kelompok (HIV+ & HIV-) secara multivariat dengan metode *Willks' Lambda* didapat $F_{hitung} = 0.451$ dan $p = 0.000$ ($\alpha < 0.05$) berarti signifikan. Dengan kata lain ke dua kelompok (HIV+ & HIV-) ada perbedaan pada variabel kendali

LAMPIRAN KONVERSI DATA

Data penelitian perlu dilakukan konversi, dengan tujuan untuk menghilangkan perbedaan nilai satuan pada setiap variabel, konversi tersebut menggunakan rumus ($\frac{y - \bar{y}}{sd}$).

Dimana y : nilai data asli

\bar{y} : nilai rata-rata data asli

sd : nilai penyimpangan baku (standart deviasi)

$y - \bar{y}$: tingkat kesalahan data (hasil ini bisa terjadi nilai positif dan negatif)

Hasil data setelah dikonversi dengan rumus tersebut dapat dilihat pada lembar hasil olahan statistika.

Hasil olahan statistika tersebut dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. hasil data tersebut dapat dikatakan sebagai data perubahan, karena jika yang dihasilkan memperoleh nilai positif disebut juga mengalami peningkatan, dan jika nilai negatif disebut juga mengalami penurunan.
2. gambar diagram yang didapat, jika kelompok HIV positif mempunyai nilai negatif maka HIV negatif mempunyai nilai positif.
3. Hasil analisis Diskriminan yang diperoleh sama dengan hasil analisis diskriminan dari data asli, yaitu :
 - a. pengamatan pertama (1 hari) variabel diskriminatornya adalah CD4
 - b. pengamatan ke dua (7 hari) variabel diskriminatornya adalah CD4 dan HSP70
 - c. Pengamatan ke tiga (31 hari) variabel diskriminatornya adalah HSP70