

**Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit
CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400
Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

Double Blind - Randomized Controlled Trial
di Instalasi Rawat Jalan Poliklinik HIV/AIDS RS Dr. Soetomo Surabaya



OLEH:

- 1. Dr. Erwin Astha Triyono, dr., Sp. PD, K-PTI, FINASIM**
- 2. Joni Susanto, dr., M. Kes, PA**
- 3. Drs. James S. Hutagalung, M. Kes**
- 4. Lilis Masyfufah A.S., S.KM, M. Kes**
- 5. Dimas Aji Perdana, dr.**

**SMF DEPARTEMEN PENYAKIT DALAM
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
SURABAYA
2020**

ABSTRAK

Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Erwin Astha Triyono, Joni Susanto, James Hutagalung, Lilis Masyfufah, Dimas Aji Perdana

Latar Belakang: Infeksi HIV berdampak pada sistem imun yang menyebabkan turunnya kadar CD4. Studi terdahulu melaporkan bahwa penggunaan suplemen nutrisi pada pasien HIV cukup tinggi. Propolis merupakan salah satu suplemen nutrisi yang dilaporkan bermanfaat pada sistem imun. Penelitian mengenai pengaruh pemberian propolis terhadap kadar CD pada pasien HIV, sehingga perlu diteliti manfaat klinis propolis dalam suatu uji klinis dengan desain yang baik dan benar.

Tujuan: Mengetahui pengaruh suplementasi nutrisi propolis terhadap peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 dibawah 400 Sel/ μ L yang mendapat terapi ARV.

Metode: Desain studi adalah *double blind - randomized controlled trial, pre and post-test control group*, diikuti 40 pasien HIV dengan kadar CD4 dibawah 400 Sel/ μ L yang mendapat terapi ARV yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pasien dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (propolis) dan kelompok kontrol (plasebo). Kadar CD4 diukur pada awal penelitian dan setelah intervensi 1 bulan.

Hasil: Empat puluh subjek berhasil mencapai akhir penelitian, terdiri dari 20 subjek pada kelompok propolis dan 20 subjek pada kelompok plasebo. Rasio laki-laki dan perempuan 77,5% : 22,5%. Jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan menunjukkan p-value yang signifikan (<0.005), yaitu 0.001 (menggunakan uji paired sample test) dan 0.002 (menggunakan Uji Wilcoxon), sehingga dapat diartikan bahwa terdapat hubungan antara jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan. Kelompok kontrol memiliki p-value 0,730 (>0.005) sehingga dapat diartikan bahwa tidak ada peningkatan yang signifikan. Kelompok propolis menunjukkan peningkatan signifikan peningkatan jumlah CD4 dengan nilai signifikansi 0.000. Tidak didapatkan efek samping yang teramati setelah suplementasi nutrisi propolis.

Kesimpulan: Pengaruh suplementasi nutrisi propolis terhadap peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV yang telah mendapat terapi ARV bermakna secara statistik.

Kata Kunci: HIV, kadar CD4, ARV, Propolis

ABSTRACT

Use of Propolis Against Increased T Lymphocyte Levels of CD4 In Adult HIV Patients With CD4 Levels Below 400 Cells / μ L At Dr. Soetomo Hospital Surabaya

Erwin Astha Triyono, Joni Susanto, James Hutagalung, Lilis Masyfufah, Dimas Aji Perdana

Background: HIV infection impacts the immune system causing a drop in CD4 levels. Previous studies have reported that the use of nutrient supplements in HIV patients is quite high. Propolis is one of the nutrient supplements that are reportedly beneficial to the immune system. Research on the effect of propolis administration on CD levels in HIV patients, so it is necessary to research the clinical benefits of propolis in a clinical trial with good and correct design. .

Goal: Knowing the effect of propolis nutrient supplementation on increased CD4 levels in HIV patients with CD4 levels below 400 Cells / μ L who received ARV therapy.

Method: The study design was a double blind-randomized controlled trial, pre and post-test control group, followed by 40 HIV patients with CD4 levels below 400 Cells/ μ L who received ARV therapy that met the inclusion and exclusion criteria. Patients were divided into two groups: the treatment group (propolis) and the control group (placebo). CD4 levels were measured at the beginning of the study and after a 1-month intervention.

Results: Forty subjects made it to the end of the study, consisting of 20 subjects in the propolis group and 20 subjects in the placebo group. The ratio of men and women is 77.5%: 22.5%. The CD4 count before and after the test shows a significant p-value ($<0,005$), which is 0.001 (using the paired sample test) and 0.002 (using the Wilcoxon Test), so it can be interpreted that there is a relationship between the CD4 count before and after the treatment. The control group had a p-value of 0.730 (>0.005) so it could be interpreted that there was no significant increase. The propolis group showed a negated increase in CD4 counts with a signification value of 0.000. No side effects were observed after propolis nutrient supplementation.

Conclusion: The effect of propolis nutrient supplementation on increased CD4 levels in HIV patients who have received ARV therapy is statistically meaningful.

Keywords: HIV, CD4 levels, ARVs, Propolis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DALAM	i
ABSTRAK.....	ii
<i>ABSTRACT</i>	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat bagi ilmu pengetahuan.....	5
1.4.2 Manfaat bagi pelayanan kesehatan	5
1.4.3 Manfaat bagi subjek penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Infeksi HIV	7
2.1.1 Patogenesis HIV.....	11
2.1.2 Limfosit T, CD4 dan CD8 pada HIV.....	16
2.1.3 Diagnosis HIV	21
2.2 ARV.....	21
2.2.1 Rejimen dan Indikasi ARV.....	22
2.2.2 Mekanisme Kerja ARV.....	24
2.3 Propolis.....	28
2.3.1 Kandungan dan komposisi propolis.....	30
2.3.2 Absorpsi, transport, distribusi dan bioavailabilitas propolis.....	33
2.3.3 Pengaruh propolis terhadap aktivitas anti HIV	33
2.3.4 Studi toksisitas	37
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	40
3.2 Hipotesis Penelitian.....	49
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	50
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	50
4.3 Teknik Pengambilan Sampel.....	50

4.4	Kriteria inklusi.....	52
4.5	Kriteria eksklusi	52
4.6	Kriteria putus uji (<i>drop out</i>)	53
4.7	Variabel Penelitian	53
4.8	Definisi Operasional.....	54
4.9	Bahan dan Produk penelitian.....	57
4.10	Protokol Penelitian	59
4.11	Analisis Data	59
BAB 5 HASIL PENELITIAN		
5.1	Karakteristik Subjek dan Hasil Penelitian	61
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Karakteristik Subjek Penelitian	64
6.2	Tingkat Kemaknaan Kadar CD4 Sebelum dan Sesudah Perlakuan pada Kelompok Propolis dan Plasebo.....	65
6.3	<i>Adverse Event</i> dan <i>Serious Adverse Event</i>	67
6.4	Kelemahan dan Keterbatasan Penelitian	67
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		
7.1	Kesimpulan.....	85
7.2	Saran.....	86
DAFTAR PUSTAKA		87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Virus HIV.....	8
Gambar 2.2 Siklus hidup virus HIV	9
Gambar 2.3 Respon adaptif terhadap infeksi HIV	16
Gambar 2.4 Respon sel T CD8 pada infeksi HIV	20
Gambar 2.5 Cara kerja obat golongan entry/ fusion inhibitor	25
Gambar 2.6 Cara kerja obat NRTI dan NNRTI.....	26
Gambar 2.7 Mekanisme kerja CAPE menghambat enzim integrase	35
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	40
Gambar 4.1 Alur Protokol Penelitian.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Stadium klinis infeksi HIV	20
Tabel 2.2 Kategori ARV dan obatnya.....	22
Tabel 2.3 Paduan terapi ARV	23
Tabel 5.1 Karakteristik Subjek Penelitian	61
Tabel 5.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data	62
Tabel 5.3 Hubungan Kadar CD4 Sebelum dan Sesudah Perlakuan	62
Tabel 5.4 Hubungan Kadar CD4 Berdasar Kelompok Perlakuan	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Persetujuan Komite Etik	98
Lampiran 2	Informed consent.....	99
Lampiran 3	Lembar Pengumpul Data	100
Lampiran 4	Data Penelitian	105
Lampiran 5	Rincian Anggaran Biaya.....	107

DAFTAR SINGKATAN

3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
ARV	Antiretroviral
AZT	Zidovudin
Zn	<i>Zink (besi)</i>
CAPE	<i>Caffeic acid phenethyl ester</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor 5 (gene)</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
cPLA2	<i>Cytosolic phospholipase A2</i>
d4T	Stavudin
ddI	Didanosin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRV/r	Darunavir/ ritonavir
DTG	Dolutegravir
EFV	Efavirenz
eGFR	<i>Estimated glomerular filtration rate</i>
ETR	Etravirin
FTC	Emcitabin
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
Gp	<i>Glycoprotein</i>
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
GSSG	<i>Oxidized glutathione</i>
H ₂ O ₂	<i>Hydrogen peroxide</i>
HSV	Herpes simplek virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	<i>Inhibit cellular proliferation by 50%</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
TGF β	<i>Tumor growth factor</i>
INN	Enfuvirtide
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IQR	<i>Interquartile range</i>

LD ₅₀	<i>Lethal dose by 50%</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LT	Leukotrien
LOX	<i>Lipoxygenase</i>
LPS	Lipopolisakarida
LPV/r	Lopinavir/ ritonavir
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
Mn	Mangan
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MVC	Maraviroc
NFκB	<i>Nuclear factor kappa beta</i>
NFκB-RE	<i>Nuclear factor kappa beta-response element</i>
NRTI	<i>Nucleoside/ nucleotide reverse transcriptase inhibitors</i>
NNRTI	<i>Non nucleoside/ nucleotide reverse transcriptase inhibitors</i>
NVP	Nevirapin
OONO ⁻	<i>Peroxynitrite</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Protein kinase C
RAL	Raltegravir
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPV	Rilpivirin
Se	Selenium
SGOT	<i>Serum glutamic-oxaloacetic transaminase</i>
SGPT	<i>Serum glutamic-pyruvic transaminase</i>
sPLA ₂	<i>Secretory phospholipase A2</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TDF	Tenofovir
Cu	Tembaga
Th	<i>T helper</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
WHO	<i>World health organization</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengobatan HIV/AIDS di Indonesia mengacu pada terapi standar WHO yaitu dengan menggunakan rejimen antiretroviral (ARV) yang bertujuan menekan *viral load* HIV dan mencegah perkembangannya menjadi AIDS (Kemenkes, 2015). Implementasi terapi ARV ini dipengaruhi oleh berbagai faktor yang menyebabkan terapi ARV belum berjalan sebagaimana mestinya. Salah satunya adalah *barrier therapy* seperti pengetahuan dan adanya efek samping ARV, yang mempengaruhi kepatuhan pasien dan kecenderungan pasien untuk mengkombinasi terapi ARV dengan terapi alternatif atau suplemen (Peltzer *et al.*, 2010; Reda & Biadgilign, 2012; Yuniar *et al.*, 2013). Penggunaan suplemen semakin meluas sejalan dengan adanya laporan tentang manfaatnya untuk kekebalan tubuh, peningkatan status antioksidan dan membantu aktivitas antiretroviral (Hasan *et al.*, 2010; Su & Li, 2011; Cichello *et al.*, 2014). Salah satu suplemen yang banyak digunakan saat ini adalah propolis, yaitu bahan resin yang dikumpulkan lebah dari tunas dan eksudat tanaman (Oses *et al.*, 2016); namun masih belum jelas apakah penggunaannya sebagai suplemen terhadap obat standar HIV mempunyai efek yang baik terhadap pasien secara klinis dan imunologis.

Infeksi HIV merupakan pandemi global yang menjadi ancaman bagi individu di seluruh dunia. Pada akhir 2013, diperkirakan 35 juta orang hidup dengan infeksi HIV (Hyle & Sax, 2013; Fauci & Lane, 2015). Di Indonesia, sejak tahun 1999 telah terjadi peningkatan jumlah pasien HIV dengan prevalensi rerata sebesar 0,4% sehingga menjadikan Indonesia termasuk kategori epidemi HIV

terkonsentrasi. Pada tahun 2012, terdapat 591.823 orang dengan HIV positif di Indonesia dan hanya 8,3% yang tercatat mendapatkan terapi ARV (Kemenkes, 2015). Selain itu, suatu studi pada pasien HIV yang sudah mendapat terapi ARV melaporkan bahwa penggunaan terapi suplemen dan alternatif berkisar antara 60% hingga 90% (Jernewall *et al.*, 2005). Hal tersebut mungkin dipicu oleh ketidakmengertian pasien tentang proses patologis yang mendasari penyakitnya dan pentingnya ARV sebagai upaya mengatasi proses patologis yang terjadi. Bila kondisi tersebut tidak segera diselesaikan maka besar kemungkinan pasien akan menghentikan ARV sebagai tulang punggung terapi HIV dan lebih mempercayai obat-obatan lain yang sebenarnya hanya sebagai suplemen. Hal tersebut dapat makin meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien HIV/AIDS dengan segala konsekuensi medik maupun sosioekonominya (Suarez-Garcia *et al.*, 2014).

Saat ini, terdapat kecenderungan pasien untuk menggunakan obat ARV bersama suplemen seperti propolis. Hal ini mungkin disebabkan harganya yang relatif murah, lebih mudah diakses dan adanya laporan serta testimoni bahwa propolis dapat menurunkan efek samping ARV atau sebagai pendukung sistem imun (Power *et al.*, 2002; Cichello *et al.*, 2014). Propolis terdiri dari lebih 300 senyawa dari golongan flavonoid, terpen, dan fenolat yang diantaranya memiliki efek antioksidan dan imunomodulasi (Sforcin, 2007; Coneac *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2014). Penelitian pada hewan coba melaporkan bahwa propolis dapat meningkatkan fungsi makrofag dalam menghasilkan IL-1, IL-1 β , IL-6, IFN- γ dan meningkatkan daya tahannya terhadap infeksi bakteri (Dimov *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 2014), meningkatkan produksi H₂O₂ dan menekan produksi NO (Orsi *et al.*, 2000). Namun efek propolis pada limfosit dilaporkan bervariasi dan

kontroversial. Dimov *et al.* (1991) melaporkan bahwa propolis tidak mampu merangsang proliferasi limfosit. Sá-Nunes *et al.* (2003) menyimpulkan bahwa propolis menekan proliferasi limfosit di limpa walaupun meningkatkan produksi IFN- γ sedangkan Orsatti *et al.* (2010) melaporkan propolis menghambat produksi IFN- γ . Sebaliknya, Tao *et al.* (2014) melaporkan bahwa propolis mampu meningkatkan proliferasi limfosit di limpa serta meningkatkan kadar IgG serum. *Cinnamic acid*, suatu asam fenolat dalam propolis, dilaporkan dapat merangsang proliferasi limfosit (Ivanovska *et al.*, 1995), namun kandungannya dalam propolis sangat kecil (<3%) dan dianggap bukan efek yang dominan. Berkaitan dengan efek anti-viral, propolis dilaporkan menghambat multiplikasi beberapa jenis virus, seperti virus Herpes simplek tipe 1&2, Adenovirus, dan poliovirus type 2 (Amoros *et al.*, 1992). Sebagai anti HIV, propolis dilaporkan dapat menghambat ekspresi antigen p24, menghambat *viral entry*, dan dalam konsentrasi tertentu memiliki efek sinergistik bersama Zidovudin (Harish *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001; Gekker *et al.*, 2005). Beberapa komponen propolis diklaim dapat mengganggu aktivitas enzim HIV seperti *reverse transcriptase* (Tan *et al.*, 1991; Moore & Pizza, 1992), dan *integrase* (Fesen *et al.*, 1993; Fesen *et al.*, 1994), atau menghambat akumulasi RNA HIV (Critchfield *et al.*, 1996). Namun, perlu diingat bahwa kandungan propolis sangat beragam sehingga sulit untuk distandarisasi (Bankova, 2005). Selain itu masih belum jelas bagaimana mekanisme penghambatan replikasi HIV, dan sampai saat ini belum ada peneliti yang mengkonfirmasi klaim tersebut.

Penggunaan suplemen seperti propolis perlu dievaluasi dan diawasi, agar tidak terjadi pergeseran pemahaman dan kepercayaan yang berlebihan terhadap penggunaan suplemen pada pasien HIV/AIDS. Beberapa penelitian telah

menunjukkan bahwa pasien yang menggunakan suplemen semacam itu lebih cenderung tidak patuh dengan ARV atau melewatkan jadwal kontrol ke dokter (Jernewall *et al.*, 2005; Peltzer *et al.*, 2010; Tamuno, 2011). Manfaat klinis propolis perlu diteliti dalam suatu uji klinis dengan disain yang baik dan benar. Salah satu parameter imunologis yang dapat dievaluasi pada pasien HIV adalah kadar CD4. Berdasarkan data dan informasi yang telah dipaparkan diatas, maka peneliti ingin mengetahui pengaruh suplementasi nutrisi propolis terhadap kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ L yang mendapat ARV di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Diharapkan penelitian ini merupakan studi informatif yang dapat dikembangkan menjadi penelitian lanjutan yang lebih baik dan dapat menjadi acuan ilmiah tentang penggunaan propolis bersama dengan obat ARV.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh suplementasi nutrisi propolis terhadap peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ L yang mendapat terapi ARV?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

1.3.2 Menganalisis pengaruh suplementasi Propolis terhadap peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ L.

1.3.3 Tujuan khusus

1. Mengidentifikasi karakteristik subyek penelitian dan pola penggunaan ARV pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ L
2. Mengidentifikasi kadar CD4 pasien HIV yang mendapat terapi ARV
3. Menganalisis peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ L yang mendapat terapi ARV sesudah suplementasi Propolis selama 1 bulan.
4. Menganalisis tingkat kemaknaan selisih kadar CD4 sebelum dan sesudah suplementasi Propolis selama 1 bulan pada pasien HIV dengan kadar CD4 < 400

sel/ μ l yang telah mendapat terapi ARV

5. Mengidentifikasi adverse event selama penggunaan Propolis.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi ilmu pengetahuan

1. Mengetahui manfaat klinis dan imunologis suplementasi nutrisi propolis pada pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ l yang mendapatkan terapi ARV
2. Merupakan penelitian lanjutan yang terkait tentang peranan obat suplemen pada pasien HIV.

1.4.2 Manfaat bagi pelayanan kesehatan

Sebagai bahan pertimbangan tentang penggunaan suplemen nutrisi propolis dan untuk menilai keamanan penggunaannya pada pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ l yang sudah mendapatkan terapi ARV.

1.4.3 Manfaat bagi subjek penelitian

1. Subjek penelitian mendapat informasi dan edukasi tentang manfaat terapi ARV terhadap kesehatannya secara umum dan terhadap kendali infeksi HIV yang dideritanya.
2. Subjek penelitian mendapat informasi dan edukasi tentang kemungkinan manfaat propolis sebagai suplemen terhadap obat ARV, dipantau secara seksama tentang semua *adverse event* atau *serious adverse event* yang mungkin terjadi selama dilibatkan dalam penelitian ini dan diatasi hingga pulih.

BAB 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

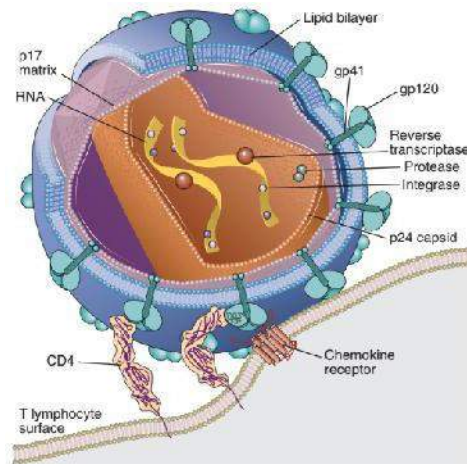
2.1 Infeksi HIV

Infeksi HIV adalah infeksi yang disebabkan oleh *human immunodeficiency virus* (HIV) yang berefek pada sistem kekebalan tubuh manusia. Virus HIV berasal dari kelas retrovirus yang menginfeksi dan menghancurkan sel limfosit T, makrofag dan sel dendritik. Virus ini terdiri dari dua jenis, yaitu HIV-1 dan HIV-2. HIV-1 merupakan penyebab sebagian besar infeksi HIV global, sedangkan HIV-2 dominan terdapat di Afrika Barat (Cichello *et al.*, 2014; Fauci & Lane, 2015).

Ciri utama infeksi HIV adalah defisiensi imun yang nyata akibat berkurangnya subset limfosit T secara progresif, yaitu sel *T helper*, baik dari sisi jumlah maupun kemampuannya. Fenotip sel *T helper* dikenal dengan adanya molekul CD4 pada permukaannya, yang berfungsi sebagai reseptor utama HIV. Virus ini menginfiltrasi sel dengan bantuan koreseptor untuk bisa mengikat, mengalami fusi dan kemudian masuk ke dalam sel target (Fauci & Lane, 2015).

Partikel HIV memiliki bentuk bulat dan ukuran sekitar 100 nm, terdiri dari mantel luar, disebut *envelop* virus, dan kapsid yang mengandung dua *single stranded ribonucleic acid* (RNA), seperti terlihat pada Gambar 2.1. RNA terdiri dari sembilan gen yaitu gag, pol, env, tat, rev, nef, vif, vpr dan vpu. Gag mengkodekan protein untuk pembentukan inti virion (termasuk antigen p24); pol mengkodekan enzim yang bertanggung jawab untuk pembentukan enzim *protease*, *reverse transcriptase*, dan *integrase*; dan env mengkodekan

glikoprotein amplop. Keenam gen lainnya bertugas mengkode protein yang terlibat dalam modifikasi sel inang untuk meningkatkan pertumbuhan virus dan regulasi ekspresi gen virus (Fauci & Lane, 2015).

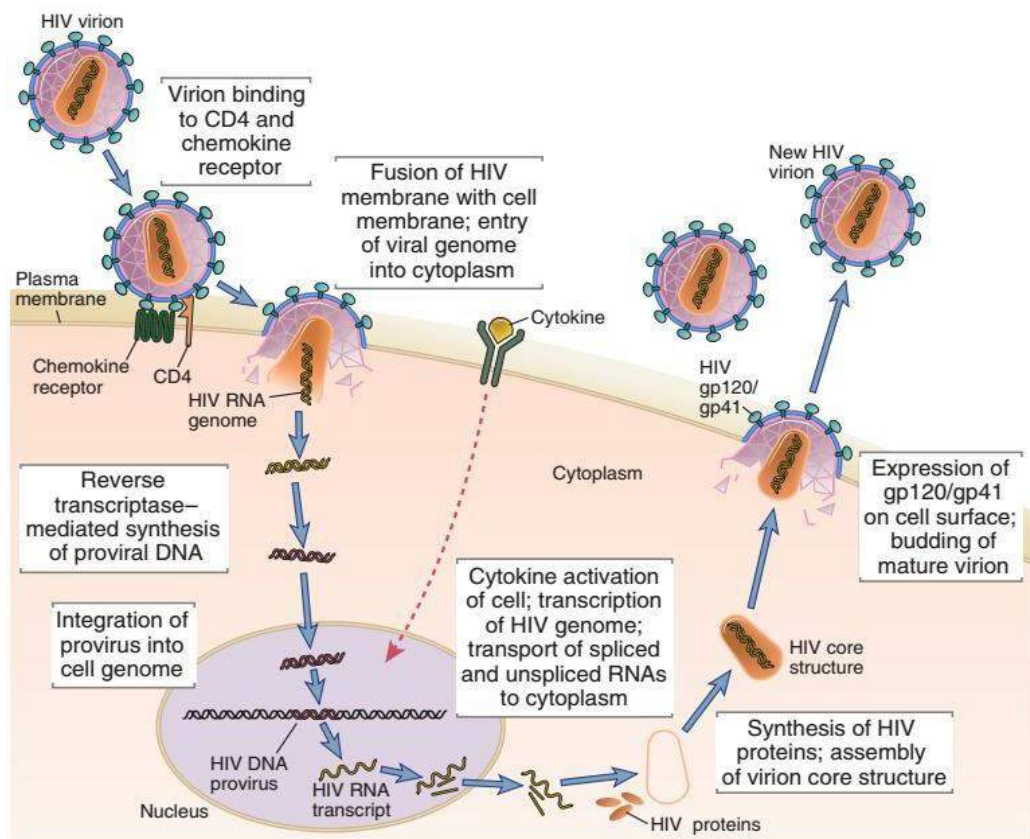


Gambar 2.1 Virus HIV

Struktur virus HIV terdiri dari *envelope* di bagian luar dan *core* (inti) di bagian dalam. *Envelope* terdiri dari membran fosfolipid yang berasal dari sel inang dan selubung matriks protein p17 untuk menstabilkan protein membran virus (gp41 dan gp120). *Core* mengandung materi genetik RNA HIV dan enzim untuk proses replikasinya, terbungkus oleh cangkang berbentuk kerucut terdiri dari protein virus kapsid p24. Pada gambar terlihat virus HIV terikat dengan molekul CD4 sel limfosit dan koreseptornya (Abbas *et al.*, 2012; Engelman & Cherepanov, 2013)

Siklus hidup HIV dimulai ketika protein membran virus gp120, yang terdapat pada *envelope*, berikatan dengan molekul CD4. Env adalah bagian luar virus yang terdiri dari protein transmembran subunit gp41 dibagian dalam dan subunit gp120 dibagian luarnya (Gambar 2.2). Proses fusi virus dengan sel inang diawali dengan ikatan subunit gp120 pada molekul CD4. Ikatan ini semakin diperkuat dengan ikatan berikutnya pada koreseptor CXCR4 dan CCR5, keduanya merupakan koreseptor utama pada HIV. Ikatan ini menginduksi terjadinya perubahan konformasional dari subunit gp41 sehingga menjadi area hidrofobik, yang disebut domain peptida fusi, dan memungkinkan gp41 menjalankan fungsinya untuk memperantarai masuknya virus ke dalam sel target

sehingga terjadi fusi membran HIV dengan membran sel target (Abbas *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Siklus hidup virus HIV (Abbas *et al.*, 2012; De Haes *et al.*, 2012)

Setelah virus HIV memasuki sel, cangkang protein kapsid virus terbuka, sehingga kompleks nukleoprotein yang terdiri dari RNA virus, enzim-enzim HIV dan protein virus masuk ke sitoplasma sel dan siklus reproduksi virus baru dimulai. RNA HIV ditranskripsi menjadi DNA untai ganda oleh enzim *reverse transcriptase* virus, dan selanjutnya DNA virus memasuki inti sel inang. Di dalam inti sel, DNA virus berintegrasi dengan DNA sel inang, dikatalisis oleh enzim *integrase* virus. DNA HIV yang sudah terintegrasi dengan DNA sel inang ini disebut provirus (Abbas *et al.*, 2012). Provirus merupakan fase paling rentan dalam siklus hidup virus karena terdapat beberapa faktor yang dapat membatasi

proses transkripsi HIV, sehingga pada fase ini provirus tidak aktif melakukan proses transkripsi dan translasi yang disebut dengan *latency* (Fauci & Lane, 2015).

Faktor yang berperan membatasi transkripsi ini antara lain lokalisasi provirus pada subnuklear, tidak adanya faktor transkripsi seperti NFkB, adanya represor transkripsi, dan konsentrasi sub-optimal dari protein virus (Maartens *et al.*, 2014). Aktivasi sel *host* diperlukan untuk inisiasi transkripsi provirus DNA menjadi RNA genom atau mRNA. Aktivasi sel *host* dapat terjadi oleh induktor seperti, antigen, sitokin atau faktor lain yang dapat memicu *nuclear factor* seperti NFkB sehingga menjadi aktif (Maartens *et al.*, 2014; Fauci & Lane, 2015).

Perakitan partikel virus yang menular dimulai dengan transkripsi provirus menjadi RNA yang secara struktur berfungsi sebagai RNA genom dan mRNA. RNA genom keluar dari nukleus, sedangkan mRNA mengalami translasi menghasilkan polipeptida. Polipeptida akan bergabung dengan RNA menjadi inti virus baru. Langkah terakhir dari siklus hidup virus adalah aktivitas mengubah polipeptida immatur virus menjadi virion menular melalui proteolisis prekursor polipeptida gag dan gag-pol yang dilakukan oleh enzim *protease* untuk menghasilkan struktur virus yang terdiri dari komponen matriks, kapsid, nukleoprotein dan enzim *reverse transcriptase*, *integrase* dan *protease* (Engelman & Cherepanov, 2013). Inti beserta perangkat lengkap virion baru ini membentuk tonjolan (*budding*) pada permukaan sel *host*, menempel pada membran plasma, menangkap env dan glikoprotein sel inang sebagai bagian dari *envelop*-nya. Selanjutnya, virus ini akan keluar dari sel, dan akan menginfeksi

sel target berikutnya. Dalam satu hari HIV mampu melakukan replikasi hingga mencapai 10^9 - 10^{11} virus baru (Fauci & Lane, 2015).

2.1.1 Patogenesis HIV

Virus HIV menyerang sel yang mengekspresikan reseptor CD4 pada permukaan luar membran selnya seperti limfosit T, monosit, makrofag, langerhans, sel dendrit, astrosit dan mikroglia. Limfosit T CD4 aktif merupakan target utama virus HIV, selain itu ia juga menginfeksi limfosit T CD4 istirahat (*resting* CD4). CD4 diperlukan oleh HIV untuk berikatan dengan komponen glikoprotein virus HIV yaitu gp120 (Fauci & Lane, 2015).

Perjalanannya infeksi HIV secara klinis dapat dibagi dalam tiga tahap, yaitu fase primer atau infeksi akut, fase kronis (awalnya asimtomatik dan kemudian berkembang mengalami gejala) dan fase terminal berupa manifestasi AIDS (De Haes *et al.*, 2012). Penyakit HIV dimulai dengan infeksi akut dan kemudian menjadi infeksi kronis progresif pada jaringan limfoid perifer. Tahap awal infeksi akut ditandai dengan penurunan sel limfosit T CD4 memori secara progresif pada jaringan limfoid mukosa akibat kematian sel yang terinfeksi. Jaringan limfoid mukosa, yang dikenal dengan *mucosa associated lymphoid tissue* (MALT), merupakan reservoir terbesar sel limfosit T dan merupakan tempat utama *pooling* sel T memori sehingga destruksi sel CD4 di jaringan ini tercermin dari penurunan limfosit T yang besar (Appay & Sauce, 2008). Setelah fase akut, terjadi fase viremia dimana terjadi penyebaran virus ke seluruh tubuh, diperantarai sel dendritik yang bermigrasi ke kelenjar getah bening. Di jaringan limfoid, sel dendritik dapat menularkan virus HIV pada sel T CD4 disana dan dalam beberapa hari, replikasi virus dapat dideteksi di kelenjar getah bening.

Replikasi ini menyebabkan viremia, dimana sejumlah besar virus HIV beredar dalam darah pasien, yang disertai dengan sindrom HIV akut. Viremia memungkinkan virus untuk menyebar ke seluruh tubuh dan menginfeksi sel T *helper*, makrofag, dan sel dendritik di jaringan limfoid perifer. Sering dengan proses viremia ini, tubuh merespon dengan mengaktifkan sistem imun adaptif yang dimediasi oleh sel imun adaptif dan humoral. Respon imun ini hanya mengontrol sebagian infeksi dan produksi virus, yang tercermin dari penurunan *viral load* ke tingkat yang rendah namun tetap terdeteksi sekitar 12 minggu setelah paparan utama (Abbas et al., 2012).

Fase selanjutnya adalah fase kronis, dimana terjadi replikasi virus HIV yang terus menerus dan kerusakan sel di kelenjar getah bening dan limpa. Selama periode ini, sistem kekebalan tubuh tetap kompeten dalam menangani sebagian besar infeksi mikroba oportunistik, dan belum muncul manifestasi klinis infeksi HIV, sehingga fase ini disebut masa laten klinis. Selama fase ini replikasi virus terus berlangsung pada tingkat tertentu, dan jumlah sel T CD4 terus menurun. Di awal perjalanan penyakit, tubuh dapat terus membuat sel-sel CD4 baru, dan karena itu sel-sel ini bisa diganti secepat kematian selnya (Abbas et al., 2012).

Fase simptomatik adalah fase akhir perjalanan HIV dimana terjadi peningkatan jumlah virion secara berlebihan di dalam sirkulasi sistemik. Respons imun tidak mampu meredam jumlah virion yang berlebihan, sehingga limfosit semakin tertekan karena replikasi HIV yang semakin banyak. Dalam perjalanan penyakitnya, jumlah limfosit T CD4 pasien biasanya turun di bawah 200 sel/ μ L. Penurunan limfosit T ini mengakibatkan sistem imun menurun dan

pasien rentan terhadap berbagai macam penyakit infeksi sekunder dan dapat disertai dengan munculnya gejala-gejala immunosupresi yang berlanjut hingga pasien memperlihatkan penyakit-penyakit terkait AIDS (Fauci & Lane, 2015).

Replikasi virus HIV terjadi secara persisten, walaupun pasien telah mendapat terapi ARV secara poten dan *viral load* HIV sudah tidak terdeteksi dalam darah. Daya replikasi HIV mencapai 10^9 - 10^{11} virus baru per hari. Hal ini dibuktikan dalam 1 penelitian eksperimental pada 13 pasien yang menerima ARV selama 10 bulan dan *viral load* sudah tidak terdeteksi, kemudian dilakukan ekstraksi sel CD4. Aktivasi sel ekstraksi tersebut secara *in vitro*, didapatkan hasil berupa sel CD4 yang mampu menghasilkan virus yang menular. Analisis fenotip HIV pada sel CD4 yang diaktivasi tersebut mengungkapkan bahwa adanya *syncytia* yang menginduksi virus yang dapat menular, dan terdapat *unintegrated* DNA HIV pada sel *resting* CD4, yang walaupun tidak terdeteksi pada pemeriksaan *viral load* namun diduga berperan pada replikasi virus HIV yang persisten (Chun *et al.*, 1997; Tinago *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015). *Syncytia* merupakan suatu kondisi dimana beberapa sel CD4 mengalami fusi membentuk sel-sel besar dengan banyak inti (Maartens *et al.*, 2014).

Replikasi HIV yang persisten menyebabkan disregulasi sistem imun dengan manifestasi berupa aktivasi sistem imun persisten dan inflamasi kronik (Neuhaus *et al.*, 2010; Fauci & Lane, 2015).

Mekanisme aktivasi imun pada infeksi HIV disebabkan oleh beberapa hal, antara lain aktivasi sel dendritik dan penurunan sel CD4 mukosa (French *et al.*, 2009). Aktivasi sel dendritik akan meningkatkan produksi IFN- α yang memicu terjadinya hiperaktivasi sistem imun dan perkembangan penyakit

(Lehmann *et al.*, 2008). Mekanisme lain yang melatarbelakangi aktivasi imun terkait HIV adalah hipotesis “*leaky gut syndrome*” yang menyatakan bahwa depleksi sel CD4 yang besar pada *gut associated lymphoid tissue* (GALT) menyebabkan runtuhnya *barrier* mukosa usus sehingga toksin bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) dapat memasuki aliran darah yang disebut dengan tranlokasi mikroba. Tranlokasi mikroba menginduksi kelainan patologis berupa over-aktivasi sistem imun bawaan dan adaptif (De Haes *et al.*, 2012). Sel CD4 yang rendah pada jaringan limfoid mukosa akan menimbulkan mudahnya terjadi translokasi mikroba usus. Translokasi mikroba didefinisikan sebagai perpindahan mikroba dan/ atau produk mikroba tanpa ada bukti bakteremia, yang terjadi karena defek struktural atau fungsional saluran cerna. Translokasi mikroba melalui epitel usus secara terus-menerus bersamaan dengan kerusakan pada *microenvironment* epitel usus dan gangguan fungsi antimikrobanya dapat berefek pada aktivasi imun sistemik yang persisten dan salah satu kontributor penting pada inflamasi kronis yang akan semakin memperberat penurunan kadar CD4 dan memperlambat proses perbaikannya (Brenchley *et al.*, 2006). Indikator dari translokasi mikroba adalah terjadinya peningkatan lipopolisakarida bakteri secara signifikan pada individu dengan infeksi kronis HIV (Jiang *et al.*, 2009). Lipopolisakarida merupakan komponen dinding sel bakteri gram negatif yang merupakan sebagian besar penghuni mikrobiota usus dan bersifat *immuno-stimulatory product* yang poten (Brenchley *et al.*, 2006).

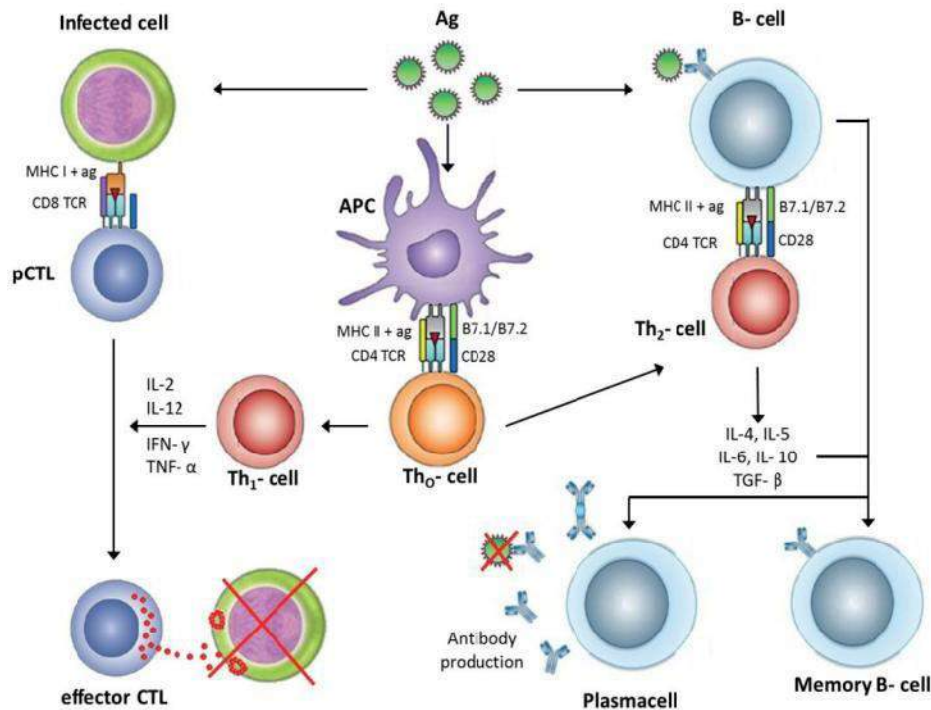
Aktivasi imun persisten ditandai dengan berbagai marker, antara lain aktivasi sel T dan B poliklonal, peningkatan *turnover* sel CD4 dan CD8 dengan *half-life* yang pendek, peningkatan frekuensi sel limfosit T aktif, dan

peningkatan kadar serum kemokin dan sitokin proinflamasi (Brenchley & Douek, 2008). Sebagian besar respon inflamasi yang terjadi tidak diarahkan pada HIV, namun berkembang ke arah peningkatan kerentanan sel target untuk infeksi HIV dan meningkatkan replikasi virus dalam sel yang sudah terinfeksi, yang mempercepat perkembangan penyakit. Aktivasi imun kronis ini menyebabkan kelelahan sel T dan apoptosis sel CD4 dan sel CD8. Peningkatan ekspresi HLA-DR dan CD38 pada sel CD8 menggambarkan tingkat aktivasi imun yang tinggi (De Haes *et al.*, 2012). Selain itu terjadi kerusakan jaringan limfoid yang menimbulkan disfungsi timus, diduga karena terkait dengan IFN- α dan fibrosis timus yang dimediasi TGF- β . Fibrosis kelenjar limfe ini berhubungan dengan retensi abnormal sel T efektor (Fauci & Lane, 2015).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa aktivasi imun menyebabkan homeostasis sel T yang abnormal berupa aktivasi sel T (Fauci & Lane, 2015). Konsekuensi langsung dari aktivasi sel T adalah peningkatan NF κ B intraseluler yang meningkatkan transkripsi integrasi virus sehingga meningkatkan produksi virion baru (Appay & Sauce, 2008).

Respon imun adaptif juga ikut berperan dalam menanggulangi infeksi HIV (Gambar 2.3). Setelah paparan partikel virus dengan APC, antigen virus disajikan pada sel dendritik, sel B dan sel T. Sel-sel yang terinfeksi mempresentasikan peptida MHC kelas I pada membran plasma. MHC-I dikenali oleh prekursor sel T sitotoksik CD8 (*cytotoxic T lymphocyte*-CTL). Sel-sel Th1 menghasilkan IL-2, IFN- γ , dan TNF- α sebagai respon dari APC. Hal ini menyebabkan aktivasi dan diferensiasi dari prekursor CTL menjadi CTL memori atau CTL efektor. CTL efektor dapat langsung membunuh sel yang

terinfeksi oleh produksi *perforines* dan *granzyme*. Sel Th2 yang diaktifkan oleh sel-sel APC, menghasilkan sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β . Sitokin ini mengaktifkan sel B naif dan menginduksi diferensiasi sel B menjadi sel B memori dan sel plasma yang menghasilkan sejumlah besar antibodi IgG, IgA, IgE yang mencegah infeksi virus lebih lanjut (De Haes *et al.*, 2012).



Gambar 2.3 Respon adaptif terhadap infeksi HIV dan pergeseran subset sel T (De Haes *et al.*, 2012)

2.1.2 Limfosit T, CD4 dan CD8 pada HIV

Sel limfosit T secara fungsional dibagi menjadi sel-sel yang berfungsi untuk kekebalan dan sel-sel yang memediasi proses sitotoksitas seluler. Limfosit T helper mengekspresikan marker berupa *cluster determinant 4* (CD4), sedangkan sel T sitotoksik mengekspresikan *cluster determinant 8* (CD8). Molekul-molekul CD4 dan CD8 adalah anggota dari superfamili imunoglobulin dan memediasi perlekatan pada MHC II dan I (Bartlett, 2009).

Homeostasis CD4 dan CD8 mengalami perubahan selama infeksi HIV. Keduanya mengalami peningkatan proliferasi dan selanjutnya mengalami kehilangan preferensial dari subset sel T naif bila infeksi tidak diobati. Infeksi HIV menginduksi penurunan awal CD4 naif, CD8 naif dan CD4 memori. Sebaliknya, sel CD8 memori dan CD8 aktif terus berkembang. Hasil akhirnya berupa penurunan cadangan sel CD4, peningkatan cadangan sel CD8 dan pergeseran produksi sitokin yang dihasilkan masing-masing subset imfosit T tersebut. Penurunan CD4 dikaitkan dengan peningkatan aktivasi CD8 dan peningkatan CD8 memori (Williams *et al.*, 2013; Tinago *et al.*, 2014).

Penurunan progresif kadar limfosit T CD4 disebabkan oleh mekanisme langsung dan tidak langsung. Penyebab utama penurunan limfosit T CD4+ adalah apoptosis yang diinduksi oleh HIV melalui berbagai jalur. Beberapa teori yang terkait mekanisme langsung penurunan CD4 antara lain adalah (Abbas *et al.*, 2012; Maartens *et al.*, 2014; Fauci & Lane, 2015):

1. Hilangnya integritas membran plasma karena *viral budding*

Sel CD4 yang terinfeksi dihancurkan secara langsung ketika sejumlah besar virus diproduksi dan menembus permukaan sel, merusak membran sel.

2. Akumulasi DNA virus yang tidak terintegrasi

Akumulasi DNA virus yang tidak terintegrasi atau RNA non fungsional yang terkumpul dalam sel mengganggu sistem selular dan bersifat toksik bagi sel yang terinfeksi sehingga menyebabkan kematian sel.

3. Proses autofusi gp120-CD4

Gp120 merupakan *soluble* protein virus yang dapat mengikat molekul CD4 dengan afinitas tinggi pada monosit, sel dendrit dan sel limfosit T yang

tidak terinfeksi. Sinyal intraseluler yang ditransduksi oleh autofusi gp120-CD4 dan CCR5/CXCR4 dapat mengganggu pengolahan protein normal dalam retikulum endoplasma dan menghambat ekspresi CD4 pada permukaan sel sehingga membuat sel tidak mampu menanggapi rangsangan antigen dan menurunkan respon imun terhadap antigen. Keadaan tersebut dikaitkan dengan proses apoptosis dan anergi.

4. Pembentukan *syncytia*

Syncytia merupakan suatu kondisi dimana beberapa sel CD4 yang terinfeksi mengalami fusi dengan sel-sel tetangganya membentuk sel raksasa dengan banyak inti. Proses pembentukan *syncytia* dapat bersifat lethal bagi sel T terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi.

Mekanisme tidak langsung yang berperan menurunkan CD4 antara lain:

1. Sinyal intraseluler yang menyimpang
2. Autoimunitas

Mekanisme autoimun yaitu pembentukan autoantibodi yang berperan untuk eliminasi sel yang terinfeksi.

3. Apoptosis, *pyroptosis*, autophagy

Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel terprogram yang merupakan mekanisme normal untuk memusnahkan sel tak berguna pada organogenesis serta dalam proliferasi sel yang terjadi selama respon imun normal. Sebagian besar proses apoptosis tergantung pada aktivasi sel. Aktivasi sel yang menyimpang pada infeksi HIV diduga menyebabkan apoptosis. Mekanismenya adalah ikatan Fas-FasL yang terjadi saat sel limfosit T CD4⁺ teraktivasi (*activation-induced-cell-death*) oleh APC atau disebabkan oleh protein virus

yaitu Tat, gp120 dan Nef yang dilepaskan dari sel yang terinfeksi. Selain apoptosis, juga terjadi *pyroptosis*, yaitu bentuk inflamasi dari kematian sel yang melibatkan peningkatan enzim proinflamasi caspase-1 dan pelepasan sitokin proinflamasi IL-1 β . *Pyroptosis* dikaitkan dengan efek *bystander* replikasi HIV pada sel CD4.

4. Penghambatan limfopoiesis akibat menurunnya survival sitokin dan integritas jaringan limfoid

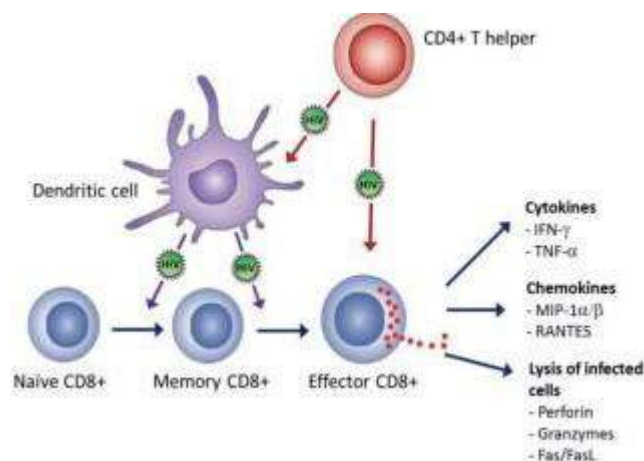
5. Aktivasi kematian sel yang diinduksi

Apoptosis terjadi pada limfosit T CD4+ yang telah teraktivasi sebelumnya akibat presentasi antigen oleh *antigen presenting cells* (APC) serta ikatan dengan protein HIV gp120 pada reseptor CD4, mekanisme ini dikenal dengan *activation-induced cell death*.

6. Eliminasi sel yang terinfeksi HIV oleh respon imun spesifik

Sel CD8 merupakan bagian dari respon imun selular yang berperan penting untuk mengatasi infeksi virus. Sel T CD8 sitotoksik memusnahkan sel-sel yang terinfeksi dengan bantuan proteasome untuk memproses antigen intraseluler. Peptida yang dihasilkan kemudian disajikan bersama-sama dengan molekul MHC-I pada membran sel yang terinfeksi. Gambar 2.5 mengilustrasikan proses pengenalan kompleks peptida-MHC-I oleh sel CD8 yang dibantu oleh sel CD4. Subset sel CD4, yaitu sel-sel Th1 memproduksi IL-2, IFN- γ , dan TNF- α , mengaktifkan CTL dan menjadikan CTL berdiferensiasi menjadi sel CD8 memori atau CD8 efektor. Sel CD8 efektor dapat langsung membunuh sel yang terinfeksi oleh produksi perforines dan granzyme

(McMichael & Rowland-Jones, 2001) atau, menginduksi apoptosis sel-sel yang terinfeksi setelah interaksi Fas ligan pada CD8 dengan reseptor Fas pada sel T yang terinfeksi. Sel CD8 juga mempunyai aktivitas antivirus non-sitotoksik yang melibatkan sitokin (IFN- γ , TNF- α) dan kemokin (MIP-1, RANTES) (De Haes *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Respon sel T CD8 pada infeksi HIV

Sel CD8 sitotoksik menghasilkan kemokin dan sitokin dalam rangka untuk mengeliminasi sel-sel yang terinfeksi. Sel CD4 membantu untuk merangsang sel dendritik dan CD8 untuk mempertahankan respon memori sel CD8 (De Haes *et al.*, 2012)

2.1.3 Diagnosis HIV

Diagnosis HIV mengacu pada kondisi klinis dan imunologis sesuai dengan kriteria diagnosis WHO tahun 2007 tentang stadium klinis infeksi HIV seperti terdapat pada tabel 2.1 di bawah (WHO, 2007; Depkes, 2012).

Tabel 2.1 Stadium klinis infeksi HIV (WHO, 2007; Depkes, 2012)

Stadium	Gejala
Stadium Klinis 1	<ul style="list-style-type: none"> · Tidak ada gejala · Limfadenopati generalisata persisten
Stadium Klinis 2	<ul style="list-style-type: none"> · Penurunan berat badan (BB) yang tak diketahui sebabnya (<10% dari BB sebelumnya) · Infeksi saluran pernafasan yang berulang (sinusitis, tonsillitis, otitis media, faringitis) · Herpes zoster · Keilitis angularis · Ulkus mulut yang berulang · Ruam kulit berupa papul yang gatal (<i>Papular pruritic eruption</i>) · Dermatitis seboroik · Infeksi jamur pada kuku
Stadium Klinis 3	<ul style="list-style-type: none"> · Penurunan BB yang tak diketahui sebabnya (> 10% dari BB sebelumnya) · Diare kronis yang tak diketahui sebabnya selama lebih dari 1 bulan · Demam menetap yang tak diketahui penyebabnya · Kandidiasis pada mulut yang menetap · <i>Oral hairy leukoplakia</i> · Tuberkulosis paru · Infeksi bakteri yang berat (pneumonia, empiema, infeksi tulang atau sendi) · Anemi yang tak diketahui sebabnya (<8g/dl), netropeni (<500 sel/μL) dan/atau trombositopeni kronis (<50.000/mm^3)
Stadium Klinis 4	<ul style="list-style-type: none"> · Sindrom <i>wasting</i> · <i>Pneumonia pneumocystis jiroveci</i> · Pneumonia bakteri berat yang berulang · Infeksi herpes simplek kronis selama lebih dari 1 bulan · Kandidiasis esofageal · Tuberkulosis ekstra paru · Sarkoma kaposi · Toksoplasmosis di sistem saraf pusat · Ensefalopati HIV

2.2 ARV

Pengobatan HIV saat ini terdiri dari kombinasi dua hingga tiga kategori obat yaitu *nucleoside/ nucleotide reverse transcriptase inhibitor, non nucleoside*

reverse transcriptase inhibitor, protease virus, integrase inhibitor, entry inhibitor dan fusion inhibitor (Fauci & Lane, 2015).

2.2.1 Rejimen dan Indikasi ARV

Obat-obatan untuk terapi ARV terdiri dari beberapa kelas kategori obat (Tabel 2.2) yang kemudian dijadikan rejimen terapi ARV. Pemberian rejimen yang telah ditentukan oleh WHO atau pedoman terapi nasional, biasanya terdiri dari 2 hingga 3 kategori obat (WHO, 2014).

Tabel 2.2 Kategori ARV dan obatnya (Fauci & Lane, 2015; Kemenkes, 2015)

Kelas	Nama
NRTI <i>Nucleoside/ Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors</i>	AZT – Zidovudin
	3TC – Lamivudin
	ABC – Abacavir
	d4T – Stavudin
	FTC – Emcitrabin
	TDF – Tenofovir
NNRTI <i>Nonnucleoside Reverse- Transcriptase Inhibitors</i>	NVP – Nevirapin
	EFV – Efavirenz
PI <i>Protease Inhibitors</i>	LPV/r – Lopinavir/ ritonavir
	DRV/r – Darunavir/ ritonavir
INSTI <i>Integrase Inhibitor</i>	RAL – Raltegravir
	DTG – Dolutegravir
EI <i>Entry Inhibitor</i>	INN - Enfuvirtide
	MVC – Maraviroc
FDC <i>Fixed dosed combination</i>	Zidovudine + lamivudin
	Tenofovir + lamivudin + efavirenz
	Tenofovir + emcitrabin + efavirenz

Rekomendasi WHO untuk pemilihan rejimen ARV didasarkan pada pertimbangan efektifitas, efek samping yang minimal, jumlah pil yang diminum, dan dosis yang lebih jarang. Rejimen standar terapi ARV terdiri dari kombinasi 2 jenis NRTI dengan NNRTI, atau *inhibitor protease* atau *integrase inhibitor*. Penggantian rejimen dilakukan bila terdapat alergi, intoleransi, atau resistensi terhadap rejimen standar (WHO, 2014)

Panduan terapi ARV di Indonesia mengacu pada pedoman nasional pengobatan antiretroviral yang diterbitkan oleh Menteri Kesehatan tahun 2014, seperti terdapat pada Tabel 2.3 di bawah ini (Kemenkes, 2015).

Tabel 2.3 Paduan terapi ARV (Depkes, 2012; Kemenkes, 2015)

	Paduan terapi tahun 2012	Paduan terapi tahun 2015
Pilihan pertama	- AZT + 3TC + NVP	- TDF + 3TC (atau FTC) + EFV
Pilihan alternatif	- AZT + 3TC + EFV	- AZT + 3TC + EFV (atau NVP)
	- TDF + 3TC (atau FTC) + NVP	- TDF + 3TC (atau FTC) + NVP
	- TDF + 3TC (atau FTC) + EVF	

Pilihan keputusan tentang rejimen terapi akan mempengaruhi respon pasien terhadap terapi dan berimplikasi pada pilihan rejimen terapi berikutnya di masa depan (bila pasien mengalami keadaan yang mengharuskan untuk perubahan rejimen terapi). Rejimen awal biasanya dipilih yang paling efektif dan tingkat resisten yang rendah. HIV mampu berkembang cepat dan menjadi resisten bila obat diberikan secara tunggal, oleh karena itu, terapi ARV harus diberikan sebagai kombinasi beberapa obat (Fauci & Lane, 2015).

Rejimen terapi AZT atau TDF + 3TC (atau FTC) + EFV atau NVP merupakan pilihan paduan yang sesuai untuk sebagian besar pasien. TDF + 3TC (atau FTC) + EFV merupakan kombinasi 3 obat dalam 1 tablet dan dianjurkan untuk menggunakan rejimen ini bila tersedia. Namun, pada umumnya rejimen terapi bersifat sangat individual, disesuaikan dengan ketersediaan obat dan keadaan pasien; sebagai contoh, NVP akan diganti EFV bila pasien alergi dan atau mengalami ko-infeksi TB. EFV merupakan pilihan utama pada pasien TB dibandingkan NVP dikarenakan interaksi antara rifampisin dengan NVP dapat menurunkan kadar aktif obat tersebut dalam darah dibanding EFV dan efek

hepatotoksik yang lebih ringan (Depkes, 2012; Kemenkes, 2015). Penggantian rejimen terapi juga diindikasikan antara lain bila penurunan RNA HIV dalam plasma kurang dari 1 log dalam 4 minggu setelah mulai terapi, penurunan CD4 yang berlanjut, perburukan klinis dan efek samping obat (Fauci & Lane, 2015).

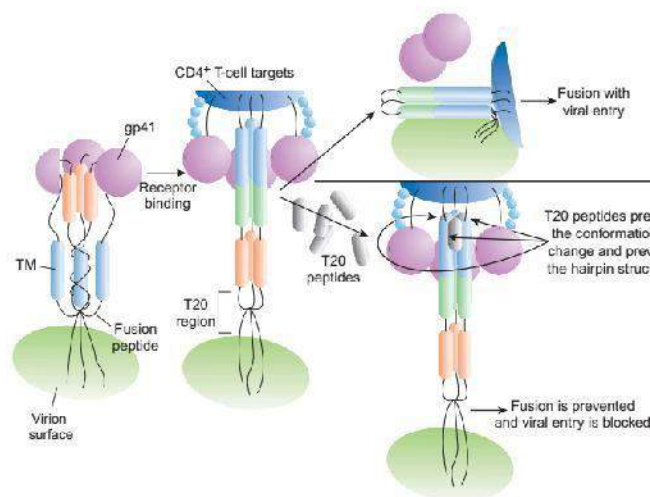
Selain itu, setiap akan memulai terapi ARV, pasien harus bersedia untuk berkomitmen terhadap pengobatan seumur hidup dan memahami pentingnya kepatuhan terhadap rejimen terapi yang ditentukan terhadap mereka. Kepatuhan pasien dapat dievaluasi dengan pengamatan kondisi klinis, peningkatan dalam kadar RNA HIV (bila obat dihentikan), dan penurunan cepat jumlah CD4 (Fauci & Lane, 2015).

2.2.2 Mekanisme Kerja ARV

Terapi antiretroviral (ARV), disebut juga *highly active antiretroviral therapy* (HAART) merupakan tulang punggung utama dari manajemen pasien dengan infeksi HIV dengan tujuan menekan replikasi virus HIV. Cara kerja obat ini berdasarkan dengan siklus hidup virus HIV (Maartens *et al.*, 2014).

Siklus hidup HIV diawali dengan pengenalan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) oleh *pattern recognition receptors* (PRR). Pada HIV, PAMP yang diwakili oleh gp120 akan berikatan dengan PRR yaitu reseptor CD4. Ikatan ini akan semakin diperkuat dengan ikatan berikutnya antara gp120 dengan koreseptor CXCR4 dan CCR5. Dua ikatan ini merupakan jalur masuk HIV pada sel inang. ARV golongan *entry inhibitor* mengganggu masuknya virus ke dalam sel inang dengan menghambat protein yang memediasi ikatan PAMP dan PRR serta menghambat perlekatan pada koreseptor (Smith *et al.*, 2013). Bila ikatan ini berlangsung sukses, maka proses berikutnya adalah perubahan

konformasional virus membentuk domain fusi yang difasilitasi oleh partikel virus gp41. Perubahan konformasional ini diperlukan untuk melakukan transfer material genetik virus melalui fusi membran sel. ARV golongan *fusion inhibitor* menghambat fusi membran tersebut dengan cara berikatan pada gp41 (Gambar 2.6) sehingga proses perubahan konformasional tidak terjadi (Tilton dan Doms, 2010). Obat pertama yang telah berlisensi pada golongan *fusion inhibitor* adalah enfuvirtid, yang kemudian diikuti dengan keluarnya golongan *entry inhibitor* dengan mekanisme CCR5 antagonis yaitu maraviroc (Fauci & Lane, 2015).



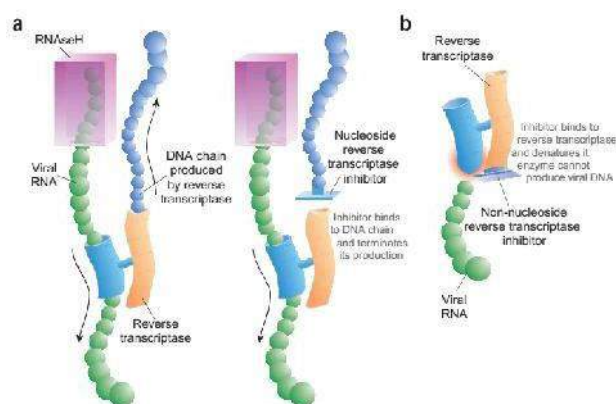
Gambar 2.5 Cara kerja obat golongan *entry/ fusion inhibitor*.

Enfuvirtide (T20) terikat pada protein transmembran gp41 (TM) dan menghambat jalur masuknya virus ke sel target (Poomerant, 2003)

Bila materi genetik virus berhasil masuk ke dalam sitoplasma sel inang, maka akan terjadi *reverse transcription* dimana RNA virus diubah menjadi DNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. ARV golongan NRTI bekerja dengan cara menghambat polimerisasi DNA. NRTI dapat meniru bentuk trifosfat nukleosida DNA virus dan memiliki afinitas tinggi terhadap enzim *reverse transcriptase* virus, sehingga dapat bergabung dalam untaian DNA virus (Smith *et al.*, 2013). NRTI bertindak sebagai terminator rantai DNA tersebut

dengan mengganti kelompok 3'-OH yang diperlukan virus untuk penggabungan nukleotida berikutnya dengan nukleotida tiruan sehingga proses pembentukan DNA virus terhenti. Beberapa contoh obat golongan NRTI adalah zidovudin, tenofovir, lamivudin dan emtricitabin (Engelman & Cherepanov, 2013).

Selain NRTI, terdapat golongan obat NNRTI yang dapat mengganggu proses *reverse transcription* DNA virus. NNRTI merupakan senyawa yang sesuai bentuknya dengan “saku” alosterik enzim *reverse transcriptase*, sehingga dapat mudah berikatan dengan enzim tersebut dan menyebabkan perubahan konformasi enzim (Gambar 2.7) dan membuatnya tidak aktif sehingga RNA viral tidak bisa ditranskripsikan menjadi DNA. Nevirapine dan efavirenz merupakan contoh obat golongan NNRTI (Engelman & Cherepanov, 2013; Fauci & Lane, 2015).



Gambar 2.6 Cara kerja obat NRTI dan NNRTI (Pomerantz & Horn, 2003)

Bila virus berhasil melewati proses transkripsi di atas dan membentuk DNA maka proses berikutnya adalah penggabungan DNA virus dengan material genetik sel inang di dalam nukleus yang dibantu oleh enzim *integrase*. Enzim *integrase* bekerja dalam dua langkah. Langkah pertama adalah *3' processing* yaitu menghilangkan dua nukleotida dari ujung terminal 3' pada DNA virus

sehingga menjadi gugus terminal 3'-OH. Langkah kedua, *transfer strand*, yaitu pemotongan untai DNA *host* dan kemudian digabungkan dengan ujung terminal 3' DNA virus (Pommier, 2005). ARV golongan *integrase inhibitor* bekerja menghambat kedua proses diatas dengan mengikat kofaktor enzim *integrase* dan menghambat penyisipan DNA virus pada gen sel inang sehingga proses integrasi virus dengan sel inang terganggu (Smith *et al.*, 2013). Raltegravir dan Dolutegravir merupakan golongan obat *integrase inhibitor*.

Pada tahap ini, material genetik HIV disebut dengan provirus DNA. Provirus ini merupakan fase paling rentan bagi virus dalam proses replikasinya karena terdapat beberapa faktor yang dapat membatasi transkripsi dan translasi sehingga pada fase ini provirus tidak aktif yang disebut dengan *latency*. Untuk mengaktifkannya, diperlukan aktivasi sel inang agar inisiasi transkripsi provirus DNA menjadi gen RNA genom atau mRNA dapat berlangsung. Aktivasi sel inang dapat terjadi oleh induktor seperti, antigen, sitokin atau faktor transkripsi seperti NFkB, IFN *regulatory factor* (IRF) 3/7, AP-1 dan aktivasi jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang mengakibatkan fosforilasi gen HIV yaitu *rev*, *tat*, *nef*, dan protein p17 untuk perkembangan proses replikasinya. Selain itu MAPK *signalling pathway* juga bertanggungjawab dalam menginduksi kematian sel melalui berbagai cara, seperti apoptosis, dan piroptosis (Mogensen *et al.*, 2010; Alhethel *et al.*, 2013).

Bila provirus berhasil melakukan proses transkripsi dan translasi maka akan rantai panjang provirus akan membentuk RNA yang secara stuktur berfungsi sebagai RNA genomik dan mRNA. RNA genomik keluar dari nukleus, sedangkan mRNA mengalami translasi menghasilkan polipeptida. Polipeptida

akan bergabung dengan RNA menjadi inti virus baru. Langkah terakhir dari siklus hidup virus adalah aktivitas mengubah polipeptida immatur virus menjadi virion menular melalui proteolisis polipeptida gag dan gag-pol untuk menghasilkan struktur virus menular yang terdiri dari komponen matriks, kapsid, nukleoprotein dan enzim-enzim HIV (*reverse transcriptase*, *integrase* dan *protease*). Proteolisis ini dimediasi oleh enzim *protease* dan terjadi bersamaan dengan atau segera setelah *budding*. Pada tahap ini, inti beserta perangkat lengkap virion baru membentuk tonjolan (*budding*) pada permukaan sel inang, menempel pada membran plasma, menangkap env dan glikoprotein sel inang untuk dijadikan bagian dari *envelop*-nya (Engelman & Cherepanov, 2013). ARV golongan *protease inhibitor* mengikat bagian aktif enzim *protease* virus dengan afinitas tinggi dan karena itu menghambat pembelahan polipeptida virus sehingga proses pematangan virion terganggu (Adamson, 2012). Contoh obat golongan ini adalah lopinavir, ritonavir dan darunavir (Fauci & Lane, 2015).

Bila semua proses di atas berhasil dilewati virus, maka selanjutnya virus ini akan keluar dari sel, menginfeksi sel target berikutnya dan kembali bereplikasi memulai siklus hidup baru.

2.3 Propolis

Nutrisi berbasis makronutrien dan mikronutrien terus dikembangkan dalam rangka meningkatkan status imun, menanggulangi sindrom *wasting* serta meningkatkan kualitas hidup pasien HIV/ AIDS. Salah satu bahan alami yang mengandung kedua zat nutrisi di atas adalah propolis (Nasronuddin, 2014). Penggunaan propolis sebagai suplemen nutrisi telah dilaporkan oleh Khayyal *et*

al. (2003) pada pasien asma dengan hasil yang memuaskan dimana secara klinis didapatkan pengurangan kejadian serangan asma.

Propolis adalah produk lebah yang diperoleh dari zat resin, yang dikumpulkan lebah madu dari bunga, tunas, dan eksudat tanaman dan dicampur dengan zat yang disekresi kelenjar liur lebah (enzim β -glukosidase). Kata "propolis" berasal dari Yunani yaitu pro dan polis. Pro berarti "di depan" dan polis berarti "masyarakat" atau "kota" yang mengandung makna yaitu suatu zat yang mempertahankan sarang lebah dalam kondisi steril dan terhindar dari gangguan bakteri, virus dan jamur. Ia merupakan bahan herbal natural yang populer di masyarakat karena memiliki spektrum dan aktivitas biologis yang luas (Toreti *et al.*, 2013; Nasronuddin, 2014; Silva Carvalho *et al.*, 2015).

Propolis terdiri dari campuran resin kompleks yang mengandung sekitar 50% dari resin dan balsam, 30% lilin, 10% minyak esensial dan aromatik, 5% serbuk sari, dan 5% zat lainnya. Ia bersifat lipofilik yang keras dan mudah hancur ketika dingin, namun lembut, fleksibel, dan sangat lengket (adhesif) ketika hangat; memiliki bau aromatik yang khas dan warna yang berbeda, antara lain coklat, hijau, dan merah (Toreti *et al.*, 2013; Silva Carvalho *et al.*, 2015).

Sifat-sifat biologis propolis terkait dengan komposisi kimianya, terutama senyawa fenolik. Sifat dan aktivitas biologisnya bervariasi dalam hal struktur dan konsentrasinya tergantung pada wilayah produksi, ketersediaan sumber flora, variabilitas genetik ratu lebah, teknik yang digunakan untuk produksi, dan musim propolis diproduksi (Toreti *et al.*, 2013).

Sifat biologis dari propolis telah banyak dilaporkan termasuk sebagai antioksidan (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Viuda Martos *et al.*, 2008), immuno-

modulator, antiseptik, anti bakteri, anti piretik, desinfektan mulut, antiinflamasi, zat sitotoksik, antiherpes, anti radikal bebas, antimikroba, dan memiliki aktivitas anti-HIV (Ito *et al.*, 2001; Gekker *et al.*, 2005). Karena berbagai manfaat biologis tersebut, propolis digunakan secara luas dengan tujuan untuk meningkatkan kesehatan dan mencegah penyakit (Toreti *et al.*, 2013).

2.3.1 Kandungan dan komposisi propolis

Komposisi kimia propolis telah banyak dipelajari, dan dilaporkan terdapat lebih dari 300 komponen yang telah diidentifikasi dan secara garis besar dikelompokkan menjadi beberapa komponen besar, seperti (Ahn *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2014; Silva Carvalho *et al.*, 2015):

1. Flavonoid (*flavones, flavanones, flavonols, dihydroflavonols chalcones, quercetin, galangin, naringenin, catechin, chrysin*)
2. Asam fenolat (*cinnamic acid, caffeic acid, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), dimethoxycinnamic acid*)
3. Terpenoid (*di, tri-terpenoid, moronic acid*)

Propolis juga mengandung zat mineral seperti magnesium, kalsium, yodium, kalium, natrium, tembaga, seng, mangan, dan besi; beberapa vitamin seperti B1, B2, B6, C, E, dan D, serta provitamin A; asam lemak; dan beberapa enzim yang berasal dari sekresi kelenjar liur lebah seperti *dehidrogenase succinate, trifosfatase adenosine*, glukosa-6-fosfat, asam fosfatase, α -amilase, β -amilase, α -laktamase, β -laktamase, maltase, esterase, dan transhidrogenase. Selain itu, senyawa polisakarida seperti pati, di- dan monosakarida (glukosa, fruktosa, ribosa, rhamnosa, talosa, gulosa, dan sakarosa) juga terdapat dalam propolis (Kurek-Gorecka *et al.*, 2014; Silva Carvalho *et al.*, 2015).

Senyawa yang terdapat pada resin propolis berasal dari tiga sumber, yaitu zat aktif yang dikeluarkan oleh tanaman yang dikumpulkan oleh lebah; zat yang berasal dari metabolisme lebah; dan zat yang ditambahkan dan atau dikurangi selama dalam proses pemurnian propolis (Miguel & Antunes, 2011; Huang *et al.*, 2014).

Komponen propolis yang bervariasi dan perbedaan sifat propolis yang dihasilkan dari tiap-tiap sumber produksi propolis menyebabkan aktivitas biologis yang dihasilkan propolis berbeda-beda, sehingga perlu dilakukan standarisasi terhadap propolis; namun hingga saat ini belum ada kriteria yang berlaku umum untuk standarisasi semua jenis propolis. Usaha yang dilakukan untuk menuju pada proses standarisasi ini antara lain dengan mengidentifikasi zat aktif dari komponen propolis sehingga memungkinkan para ilmuwan untuk menghubungkan bahan kimia propolis tertentu dengan aktivitas biologis yang dihasilkan dan merumuskan rekomendasi (Bankova, 2005; Toreti *et al.*, 2013).

Analisis komponen propolis dapat dilakukan dengan teknik identifikasi dan teknik *chemical fingerprint* (separasi zat kimia). Proses identifikasi dapat dilakukan dengan alat *mass spectroscopy* (MS), *gas chromatography and mass spectroscopy* (GC-MS), *nuclear magnetic resonance* (NMR), sedangkan teknik pemisahan dan pemurnian senyawa kimia dilakukan dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC), *thin layer chromatography* (TLC), *gas chromatography* (GC) (Huang *et al.*, 2014). GC dan GC-MS memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, lebih stabil dan diterima sebagai metode untuk analisis untuk konstituen yang mudah menguap. TLC adalah metode sidik jari umum untuk analisis herbal, dengan memberikan

gambar cahaya dan gambar fluoresensi, kemudian didapatkan berbagai tingkat profil dan data yang sesuai berdasarkan hasil *scanning* kromatografi dan pengolahan digital. Keuntungannya adalah sederhana, cepat dan relatif murah, kekurangannya antara lain resolusi dan sensitivitas rendah (Yongyu *et al.*, 2011).

Komposisi kimia propolis yang berbeda dari tiap lokasi geografis menarik peneliti untuk mempelajarinya. Bankova *et al.* (2000) melaporkan terdapat setidaknya enam jenis utama propolis, yaitu (Miguel & Antunes, 2011):

1. Propolis poplar dari tanaman *Populus* spp., ditemukan di Eropa, Amerika Utara, dan Asia.
2. Propolis *Birch* dari tanaman *Betula verrucosa* Ehrh, terdapat di Rusia.
3. Propolis hijau dari tanaman *Baccharis* spp., dari Brasil.
4. Propolis merah dari *Clusia* spp., dari Kuba dan Venezuela.
5. Propolis *Pacific*, sumber tanaman belum teridentifikasi, terdapat di Okinawa dan Taiwan.
6. Propolis *Canarian* dari yang sumber tanaman juga tidak diketahui dari Canary Island.

Zat aktif biologis utama dari jenis propolis poplar adalah flavon, flavanon, asam fenolik, dan esternya. Flavon dan flavonol mendominasi dalam propolis *Birch*. Propolis hijau dan merah banyak mengandung asam p-coumaric, terpenoid dan benzofenon polyprenylated (Miguel & Antunes, 2011).

Propolis yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tanaman poplar dan tanaman *Baccharis* spp. Proses analisisnya dilakukan dengan GC-MS dan diperoleh senyawa kompleks yang mengandung banyak senyawa flavonoid

(*chrysin*, *catechin*, *galangin*), asam fenolat (*caffeic acid*, CAPE), dan asam lemak (HDI, 2015).

2.3.2 Absorpsi, transport, distribusi dan bioavailabilitas propolis

Penelitian tentang farmakokinetik dan bioavailabilitas propolis masih terbatas. Studi *in vivo* pada tikus tentang absorpsi per oral naringenin, senyawa flavonon propolis, menunjukkan penyerapan yang baik dan cepat pada saluran pencernaan dan mempunyai bioavailabilitas tinggi. Konsentrasi naringenin pada serum darah tikus adalah 17,45 nmol/ml dengan T_{max} 60 menit, total *clearance* 9,35 ml/mn dan *area under curve* (AUC_{0-360}) 32.821 nmol/ml, dan volume distribusi (V_d) adalah 1.949,15 ml (Mesbah & Samia, 2011).

Studi pada manusia tentang absorpsi senyawa aktif propolis dilakukan dengan meminta sukarelawan sehat mengkonsumsi 5 mL ekstrak propolis yang mengandung 125 mg flavonoid. Sampel darah diambil sebelum, setiap jam selama 8 jam dan 24 jam setelah konsumsi propolis. Profil kinetik ditandai oleh dua T_{max} , masing-masing pada 1 jam dan 5 jam paska-konsumsi. Dua T_{max} diduga karena metabolisme propolis memasuki siklus enterohepatik. Di antara berbagai senyawa aktif propolis, *chrysin*, *pinocembrin*, *galangin*, *caffeic acid*, dan CAPE terdeteksi dalam plasma pada kadar tertentu dan menurun secara signifikan setelah 8 jam dan tidak lagi terdeteksi 24 jam setelah asupan propolis (Gardana *et al.*, 2007).

2.3.3 Pengaruh propolis terhadap aktivitas anti HIV

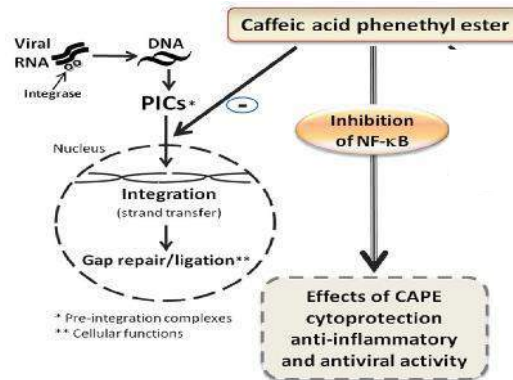
Propolis secara *in vitro* dilaporkan dapat menghambat ekspresi virus HIV pada kultur sel limfosit T CD4 dan sel mikroglia secara *dose dependent* dengan cara menghambat fusi virus pada sel target. Penambahan propolis pada obat

standar ARV (zidovudin) dilaporkan dapat menambah potensi kerja Zidovudin (Gekker *et al.*, 2005). Namun penelitian ini tidak menjelaskan secara detail zat aktif propolis yang terlibat dalam proses tersebut.

Propolis mengandung lebih dari 300 konstituen (Silva Carvalho *et al.*, 2015) yang diantaranya terbukti secara *in vitro* dapat menghambat enzim replikasi HIV (Gekker, 2005). Beberapa senyawa aktif dari propolis yang dilaporkan memiliki aktivitas anti HIV antara lain flavonoid (Critchfield *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000), turunan *moronic acid* (Ito *et al.*, 2001) dan *caffeic acid* (Burke *et al.*, 1995).

Mekanisme aktivitas anti HIV dari komponen propolis tersebut didasarkan pada prinsip *structure-activity relationship* (SAR). SAR adalah hubungan antar struktur kimia dan aktivitas farmakologi suatu komponen. SAR merupakan model eksperimental yang dapat menjelaskan hubungan kuantitatif antara sifat mikroskopis (struktur molekul) dan sifat makroskopis/empiris (aktivitas biologis) dari suatu molekul (Verbel, 2002).

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) merupakan komponen asam fenolat propolis yang secara *in vitro* memiliki aktivitas anti-HIV berdasarkan *structure-activity relationships*. Struktur CAPE berupa gugus hidroksil dapat menghambat aktivitas enzim *integrase* (Fesen, 1994) dengan cara inhibisi *transfer strand* (Gambar 2.9), yaitu salah satu mekanisme kerja enzim integrase (Pommier, 2005) sehingga mengganggu aktifitas enzim integrase (Fesen *et al.*, 1993; Fesen *et al.*, 1994; Burke *et al.*, 1995; Erdemli *et al.*, 2015).



Gambar 2.7 Mekanisme kerja CAPE menghambat enzim *integrase*. CAPE menghambat integrasi DNA secara inhibisi proses *transfer strand*. CAPE juga menghambat reaksi yang terlibat dalam aktivasi NF-κB (Erdemli, 2015)

Struktur molekul CAPE berupa cincin benzena yang unik dilaporkan dapat menghambat NFκB, transkripsi yang diperlukan virus untuk proses integrasinya ke dalam sel inang, sehingga bisa menekan proses replikasi virus. CAPE menekan aktivasi NFκB (Gambar 2.9) dengan mencegah translokasi subunit p65 dari NFκB ke nukleus sehingga menghambat interaksi antara protein NFκB dan DNA (Natarajan *et al.*, 1996; Armutcu *et al.*, 2015). Percobaan untuk mengubah struktur CAPE, seperti mengganti cincin benzena dengan cincin naftalena akan menghilangkan efek hambatan terhadap enzim (Zhang *et al.*, 2001), yang membuktikan bahwa cincin benzena dari CAPE memiliki hubungan struktur-aktivitas khusus dengan enzim integrase tersebut (Zhang *et al.*, 2014).

Komponen triterpenoid propolis yang berpotensi menghambat replikasi virus HIV adalah *moronic acid*. Studi *in vitro* pada kultur sel T limfosit H9 menunjukkan *moronic acid* menghambat replikasi HIV dengan daya inhibisi yang lemah (Yu *et al.*, 2006) dibandingkan obat standar ARV (Zidovudin), dimana Zidovudin 25x lebih poten dari derivat *moronic acid* (Ito *et al.*, 2001). Hambatan replikasi ini diduga terkait dengan *structure-activity relationships*

dari *moronic acid* yang memiliki gugus C-3 dan C-28. Eliminasi dan substitusi salah satu dari gugus tersebut dapat menurunkan daya hambatan replikasi virus pada kultur sel limfosit. Namun, mekanisme molekuler yang detail terkait aktivitas enzim HIV yang mana yang dihambat oleh *moronic acid* belum dapat ditentukan (Yu *et al.*, 2006). Penelitian lain menunjukkan bahwa bagian kutub terminal *moronic acid* mengandung asam karboksilat yang diperlukan untuk aktivitas hambatan replikasi virus. Hal ini memperkuat dugaan bahwa struktur dasar *moronic acid* berperan penting dalam aktivitas anti-HIV (Qian *et al.*, 2010).

Selanjutnya, komponen flavonoid propolis yang berpotensi sebagai anti HIV adalah *quercetin*. *Quercetin* dilaporkan dapat menghambat enzim protease HIV pada suatu penelitian *in vitro* menggunakan metode *fluorescence* dan HPLC *assay* dengan daya inhibisi IC_{50} berkisar 58.8 μ M. Inhibisi ini dikaitkan dengan jumlah dan posisi gugus hidroksil bebas pada flavonoid tersebut (Xu *et al.*, 2000). *Quercetin* juga dilaporkan mampu mengurangi pelepasan mediator inflamasi (TNF- α dan IL-1 β) sehingga mengurangi respon inflamasi dan berpotensi menekan aktivitas NF κ B dengan mekanisme penghambatan fosforilasi IKK (inhibitor κ B kinase) dan I κ B α (inhibitor κ B α) serta translokasi subunit p65 dan p50 dari NF κ B sehingga mampu menghambat jalur sinyal NF κ B (Afroz *et al.*, 2016). Selain itu, *chrysin* merupakan komponen flavonoid propolis lainnya yang disebut berpotensi memiliki aktivitas anti HIV. Hal ini dibuktikan dalam penelitian *in vitro* pada kultur sel OM-10.1, suatu model ekperimental infeksi HIV. *Chrysin* diidentifikasi dapat menghambat ekspresi

HIV pada sel kultur tersebut, ditandai dengan rendahnya akumulasi RNA HIV yang diukur dengan analisis Northern (Critchfield *et al.*, 1996).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan di RS Dr Sutomo, Surabaya tahun 2017 menunjukkan kesimpulan sebagai berikut (Triyono *et al.*, 2021) :

- a. Pada akhir studi, jumlah CD4 terus meningkat, namun peningkatannya tidak signifikan secara statistik
- b. Tidak ada abnormalitas pada hemoglobin, leukosit, trombosit, dan kualitas kehidupan pasien dalam kedua kelompok study
- c. pada subyek penelitian dengan jumlah CD4 <400 sel/ μ L, analisis selisih/perubahan rerata jumlah CD4 didapatkan perbedaan bermakna ($p=0,04$) pada 0- 3 bulan.

Kesimpulan pada poin b didasarkan pada kelompok subjek dengan cut of point jumlah CD4 <400 sel/ μ L sebanyak 17 responden (49% dari total responden dengan cut of point jumlah CD4 <400 sel/ μ L).

2.3.4 Studi toksisitas

Propolis dilaporkan sebagai produk alami yang bersifat non toksik. Studi keamanan dan toksisitas pada propolis didapatkan efek samping yang minimal pada hewan dan manusia, yang tidak berakibat fatal. Terdapat laporan kasus dermatitis alergi dan dermatitis kontak (Fida *et al.*, 2013), terutama pada peternak lebah. Reaksi alergi yang terjadi bersifat ringan dan tidak mengancam jiwa. Dari laporan tersebut, reaksi alergi diduga timbul akibat subjek mempunyai riwayat alergi terhadap madu atau alergen pada bunga dimana lebah mengambil sarinya (Callejo *et al.*, 2001; Sforcin, 2007; Yildirim *et al.*, 2016). Giusti *et al.* (2004) melakukan studi berupa tes tempel yang dilakukan pada 1255 anak dengan riwayat dermatitis kontak alergi dan melaporkan bahwa 5,9% anak yang mengalami dermatitis, dan tidak ada yang mengalami reaksi alergi yang

mengancam jiwa. Berdasarkan hal tersebut, propolis tidak direkomendasikan untuk digunakan pada pasien dengan predisposisi alergi, khususnya alergi terhadap serbuk sari (Farooqui & A Farooqui, 2010).

Kandungan propolis terbanyak, yaitu flavonoid dan CAPE telah dipelajari karakteristiknya dan dilaporkan tidak mempunyai efek toksik yang serius (Burdock, 1998; Erdemli *et al.*, 2015).

Beberapa peneliti menyebutkan bahwa propolis aman dikonsumsi. Studi *in vivo* berupa uji toksisitas pada hewan coba (tikus putih) berupa pemberian

propolis dengan konsentrasi yang berbeda (1, 3 dan 6 mg/kg/hari), ekstrak yang berbeda (air atau etanol) dan waktu pemberian yang bervariasi (30, 90 dan 150 hari), tidak mengakibatkan perubahan pada profil lipid, enzim hati (SGOT, SGPT), dan LDH dibanding kelompok normal. Pemberian propolis pada tikus selama 8 minggu dengan dosis 500 mg/kgBB juga dilaporkan tidak menyebabkan perubahan pada kadar urea dan kreatinin antara kelompok dan kelompok propolis (Burdock, 1998; Mani *et al.*, 2006; Sforcin, 2007; Ramadan *et al.*, 2012).

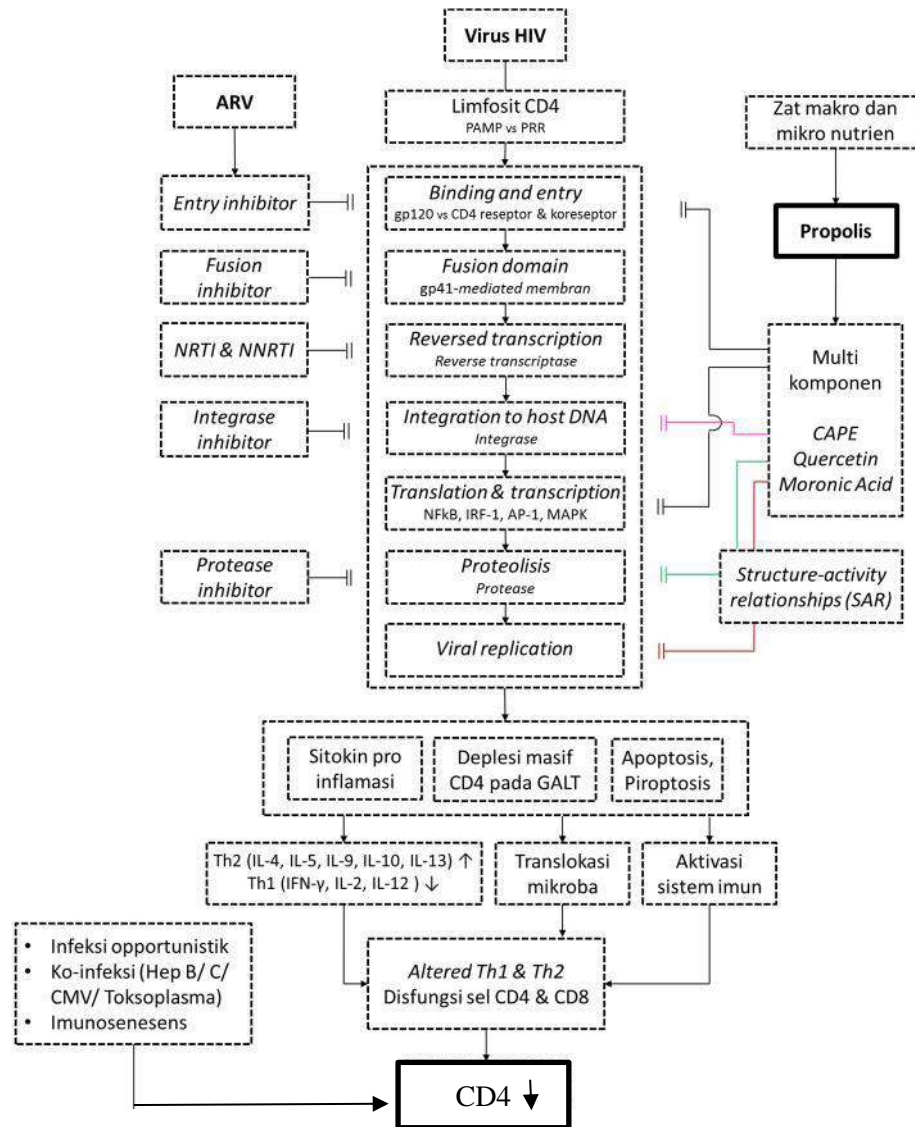
Penelitian serupa yang meneliti toksisitas ekstrak hidroetanol propolis per oral selama 14 hari pada mencit dilaporkan bahwa pada dosis 300 mg/kg tidak ada hewan yang mati, sehingga disimpulkan pada studi ini bahwa kadar LD₅₀ propolis dari 300 mg/kg. Namun diamati terdapat tanda-tanda toksisitas berupa mengantuk, dan diare yang membaik setelah pemberian propolis hari ketiga (da Silva *et al.*, 2015). Hal yang serupa dilaporkan oleh Araujo *et al.* (2011) yang memberikan ekstrak hidroalkohol propolis pada tikus dengan dosis 1000, 2000 dan 4000mg/kg selama 14 hari, tidak ada kematian yang terjadi selama masa percobaan tersebut. Namun didapatkan penurunan kadar SGPT dan alkali fosfatase dibandingkan kelompok kontrol (Araujo *et al.*, 2011).

Penelitian *in vivo* pada hewan melaporkan bahwa dosis letal (LD₅₀) propolis pada tikus lebih besar dari 7,3 g/kg/hari. Dosis tersebut bila dikonversikan pada manusia, berkisar \pm 50 gram/hari untuk individu dengan berat badan 70 kg (Hill, 2008).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan: : Diteliti \longrightarrow : Mempengaruhi
 : Tidak diteliti $\longrightarrow||$: Menghambat

Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Penjelasan kerangka konseptual:

Siklus hidup HIV diawali dengan pengenalan PAMP (gp120) oleh PRR (reseptor CD4) yang diperkuat dengan ikatan koreseptor CXCR4 dan CCR5. *Entry inhibitor* mengganggu masuknya virus ke dalam sel inang dengan menghambat protein yang memediasi ikatan PAMP dan PRR serta menghambat ikatannya pada koreseptor (Smith *et al.*, 2013). Proses berikutnya adalah perubahan konformasional oleh gp41 membentuk domain fusi untuk transfer material genetik virus. *Fusion inhibitor* menghambat fusi membran dengan cara berikatan pada gp4 (Tilton & Doms, 2010). Selanjutnya, terjadi *reverse transcription* dimana RNA virus diubah menjadi DNA oleh *reverse transcriptase*. NRTI meniru salah satu gugus DNA virus dan memiliki afinitas tinggi terhadap *reverse transcriptase* dan menyebabkan terminasi transkripsi karena DNA yang mengandung NRTI kekurangan gugus 3'-OH yang diperlukan untuk pembentukan DNA berikutnya. Selain itu, NNRTI merupakan senyawa yang sesuai bentuknya dengan “saku” alosterik enzim virus, sehingga dapat berikatan pada enzim tersebut dan merubah bentuk serta menjadikannya tidak aktif (Fauci & Lane, 2015).

Selanjutnya terjadi integrasi DNA virus dengan material genetik sel inang dalam nukleus menjadi provirus DNA, dibantu *integrase*. *Integrase inhibitor* mengikat kofaktor *integrase* dan menghambat penyisipan DNA pada sel inang. Provirus ini merupakan fase paling rentan selama siklus hidupnya sehingga cenderung tidak aktif (*latency*). Aktivasi sel inang diperlukan untuk mengaktifkan provirus, agar transkripsi dan translasi provirus DNA menjadi gen RNA dan mRNA dapat berlangsung. Aktivasi ini dapat terjadi oleh induktor seperti antigen, sitokin dan faktor transkripsi (NFkB, IRF 3/7, AP-1 dan aktivasi jalur MAPK). Setelah proses transkripsi dan translasi, provirus membentuk RNA genomik dan mRNA. RNA genomik keluar dari nukleus, mRNA mengalami translasi menghasilkan polipeptida. Langkah terakhir adalah proteolisis polipeptida untuk menghasilkan struktur dan enzim virus yang lengkap oleh *protease*. *Protease inhibitor* mengikat *protease* virus dan menghambat pembelahan polipeptida

sehingga proses pematangan virion terganggu (Adamson, 2012). Selanjutnya virus ini akan keluar dari sel, menginfeksi sel target berikutnya dan memulai siklus hidup baru.

Replikasi virus menyebabkan respon proinflamasi dan menginduksi kematian sel melalui berbagai cara, seperti apoptosis, dan piroptosis. Respon proinflamasi menyebabkan produksi sitokin, kemokin, molekul adhesi dan IFN-I. Produksi sitokin ini akan menginduksi respon imun adaptif (Mogensen *et al.*, 2010; Altheheel *et al.*, 2013) yang diperankan oleh limfosit B dan T. Limfosit B bertindak sebagai APC, limfosit T dibagi menjadi dua populasi yang berbeda: yaitu sel *T-helper* (Th) dan sel T sitotoksik. Sel Th mengekspresikan CD4 yang aktif berdiferensiasi menjadi subpopulasi Th-1 dan Th-2 efektor, dan T memori (Altheheel *et al.*, 2013).

Pada infeksi HIV, limfosit T CD4 mengalami perubahan keseimbangan antara Th1 dan Th2 dimana terjadi pergeseran ke arah Th2 yang menyebabkan aktivasi sekresi sitokin Th2 dan menekan aktivitas Th1. Sitokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, dan IL-13) yang bersifat proapoptosis akan meningkat dan sitokin Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12) yang bersifat menekan apoptosis akan menurun, sehingga jumlah CD4 terus menurun sebanding dengan progresivitas penyakit. Sel CD8 mensekresikan IFN- γ , *perforines*, dan *granzyme* untuk menghambat replikasi virus membunuh sel yang terinfeksi virus. Sel CD8 juga berdiferensiasi menjadi populasi sel efektor dan sel memori yang akhirnya menyebabkan rasio CD4/CD8 menjadi terbalik (Altheheel *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2013; Tinago *et al.*, 2014; Tudela *et al.*, 2014).

Infeksi virus HIV akut menyasar limfosit T pada *gut associated lymphoid tissue* (GALT) sehingga terjadi deplesi akut sel CD4 yang signifikan pada saluran cerna yang memudahkan replikasi virus dan menyebabkan bocornya barrier mukosa usus sehingga memungkinkan translokasi produk mikroba, seperti lipopolisakarida bakteri ke dalam sirkulasi, yang berperan penting dalam aktivasi imun persisten (Mogensen *et al.*, 2010).

Propolis mengandung lebih dari 300 konstituen makro dan mikronutrien (Silva Carvalho *et al.*, 2015) yang diantaranya dilaporkan dapat menghambat enzim replikasi HIV secara *in vitro* (Gekker, 2005). Mekanisme aktivitas anti HIV senyawa aktif

propolis ini diduga berdasarkan prinsip *structure-activity relationship* (SAR) yaitu hubungan antar struktur kimia suatu senyawa dengan aktivitas farmakologi suatu komponen (Verbel, 2002).

CAPE dilaporkan dapat menghambat aktivitas enzim integrase dengan cara inhibisi *transfer strand* (Fesen *et al.*, 1993; Fesen *et al.*, 1994; Burke *et al.*, 1995; Erdemli *et al.*, 2015). CAPE juga dilaporkan dapat menghambat NFκB dengan mencegah translokasi subunit p65 dari NFκB ke nukleus (Natarajan *et al.*, 1996; Armutcu *et al.*, 2015). Komponen propolis lainnya adalah *moronic acid* yang secara *in vitro* menghambat replikasi HIV pada kultur sel T limfosit H9 dengan daya inhibisi yang lemah (Yu *et al.*, 2006). Selanjutnya, *quercetin* dilaporkan dapat menghambat *protease* secara *in vitro*. Inhibisi ini dikaitkan dengan jumlah dan posisi gugus hidroksil bebas pada flavonoid tersebut (Xu *et al.*, 2000). *Quercetin* juga dilaporkan mampu menekan aktivitas NFκB (Afroz *et al.*, 2016). Suplementasi nutrisi propolis terhadap obat standar HIV diharapkan dapat berpengaruh terhadap proses replikasi virus yang secara tidak langsung menunjang pemulihan jumlah CD4.

Beberapa hal yang dilaporkan mempengaruhi CD4 adalah keadaan immunosenesen, ko-infeksi dengan hepatitis B/ C, infeksi toksoplasma dan toksomegalo virus (Leung *et al.*, 2013), tidak diteliti pada penelitian ini.

3.2 Hipotesis Penelitian

Suplementasi nutrisi propolis dapat berpengaruh pada peningkatan kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/μl yang mendapat terapi ARV.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah analitik eksperimental dengan desain uji acak terkontrol tersamar ganda (*double-blind randomized controlled trial*) dengan tujuan menganalisis pengaruh suplementasi nutrisi propolis terhadap kadar CD4 pada pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ l .

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah Unit Rawat Jalan Poliklinik HIV/AIDS, Divisi Tropik Infeksi Departemen/ SMF Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo – Surabaya, dilakukan pada bulan Juli 2021 – September 2021.

4.3 Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah seluruh penderita HIV stadium 1 dan 2 yang datang ke Poliklinik UPIPI, RSUD Dr. Soetomo - Surabaya.

4.3.2 Sampel penelitian

Unit sampel adalah seluruh penderita yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak didapatkan kriteria eksklusi.

4.3.3 Cara pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif dari pasien HIV yang datang ke poliklinik HIV/AIDS Dr. Soetomo yaitu dengan mengambil setiap subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi sampai sejumlah “n” (besar sampel) terpenuhi. Pasien yang datang ke poli, dijelaskan tentang prosedur, durasi, resiko dan manfaat penelitian ini dan ditanyakan kesediaannya untuk menjadi sampel penelitian. Pasien yang bersedia secara suka rela, akan diberikan lembar *informed consent*.

4.3.4 Cara alokasi subjek penelitian

Alokasi subjek penelitian kedalam kelompok penelitian dilakukan secara random menggunakan blok randomisasi. Baik peneliti maupun subjek penelitian tidak mengetahui jenis perlakuan yang diberikan. Pemberian propolis diberikan kode A dan plasebo diberikan kode B. Penentuan blok untuk subjek penelitian dilakukan oleh seorang petugas yang tidak terlibat dalam pelaksanaan penelitian. Petugas tersebut menetapkan urutan blok dengan sebagai berikut: AA-AB-BB-BA-AA-AB-BB-BA dan seterusnya hingga sampel terpenuhi. Selanjutnya responden yang telah memenuhi kriteria dan sudah ditentukan kelompoknya akan diberi resep yang bertanda A atau B untuk pengambilan produk penelitian (propolis atau plasebo) di farmasi.

4.3.5 Besar sampel

Besar total sampel pada penelitian analitik ini dihitung berdasarkan rumus berikut (Dahlan, 2010; Madiyono *et al.*, 2010).

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})\sigma}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2 = 2 \left[\frac{(1,65 + 1,2)1}{1} \right]^2 = 17$$

Z_{α} = kesalahan tipe 1 ditetapkan 5% = 1,645

Z_{β} = kesalahan tipe 2 ditetapkan 10% = 1,28

σ = Standar deviasi kedua kelompok

μ_1 = rata-rata rasio CD4/CD8 kelompok propolis

μ_2 = rata-rata rasio CD4/CD8 kelompok plasebo

Oleh karena penelitian ini belum pernah dilakukan sebelumnya, maka nilai $\sigma/\delta = 1$.

Koreksi besar sampel untuk mengantisipasi *drop out* pada penelitian eksperimental ini sebesar 20%, yang dihitung dengan rumus $n' = \frac{n}{1-f}$ (Madiyono *et al.*, 2010).

Dihitung besar sampel minimal $n' = \frac{1}{1-0,3} = 20$. Maka ditetapkan subjek penelitian yang mendapat propolis dan plasebo masing-masing 20 sampel atau 40 subjek penelitian untuk kedua kelompok.

4.4 Kriteria inklusi

1. Laki-laki dan perempuan berusia ≥ 21 tahun
2. Pasien HIV dengan kadar CD4 < 400 sel/ μ l
3. Pasien yang telah menjalani terapi ARV selama lebih dari 6 bulan (kepatuhan $> 95\%$)
4. Bersedia menandatangani *informed consent*

4.5 Kriteria eksklusi

1. Penderita dengan riwayat alergi
2. Penderita dengan riwayat putus obat (*compliance* buruk)
3. Penderita yang sedang atau pernah dirawat di RS dalam 6 bulan terakhir karena infeksi oportunistik
4. Hamil

4.6 Kriteria putus uji (*drop out*)

Subjek penelitian dinyatakan *drop out* bila:

1. Tidak taat pada aturan pengobatan ARV dan suplementasi nutrisi propolis dan atau tidak dapat diikuti (*lost to follow up*) selama penelitian.
2. Mengalami kejadian yang tidak diinginkan (*adverse event*) sehingga merugikan dan atau membahayakan kesehatan dan keselamatan jiwanya (*serious adverse event*) yang terkait dengan produk penelitian.
3. Hamil selama penelitian berlangsung
4. Pasien menolak melanjutkan penelitian dengan alasan apapun.

Bila ada subjek yang *drop out*, maka subjek tersebut akan dimasukkan dalam laporan hasil penelitian, tidak akan diganti dengan subjek yang lain dan serta dilaporkan dalam pengolahan data. Langkah yang ditempuh untuk meningkatkan *compliance* antara lain: edukasi tentang tujuan dan manfaat penelitian, menjaga hubungan baik pasien-peneliti, membentuk *peer group discussion* melalui sosial media (*whatsapp, blackberry messenger*), menghubungi subjek penelitian secara insidental, dan meminta pasien untuk kontrol tiap bulan.

4.7 Variabel Penelitian

Variabel tergantung : kadar CD4

Variabel bebas : suplementasi nutrisi propolis/ plasebo

Variabel perancu : infeksi Hepatitis B, hepatitis C, infeksi toksoplasma, infeksi sitomegalo virus, immunosenescens

4.8 Definisi Operasional

1. Kadar CD4

Yang dimaksud dengan kadar CD4 adalah jumlah absolut sel CD4 yang diperoleh dari serum darah subjek penelitian yang diproses sejak pengambilan spesimen darah. Penentuan jumlah absolut sel CD4 dan sel CD8 menggunakan alat *flow-cytometry FACS Calibur (Becton Dickinson Bioscience)* di laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. Soetomo. Hasilnya dinyatakan dalam bentuk angka mutlak dengan satuan sel/ μ l. Variabel ini merupakan data dengan skala rasio.

2. Suplementasi nutrisi propolis

Yang dimaksud dengan suplementasi nutrisi propolis adalah penambahan ekstrak propolis dengan merk Propoelix[®] sebesar 200mg kepada subjek penelitian di kelompok perlakuan yang telah mendapat terapi ARV. Suplementasi nutrisi propolis diberikan per oral dengan dosis 2 x 2 kapsul setiap hari selama 1 bulan, diminum 2 jam setelah konsumsi ARV. Ekstrak propolis dikemas dalam kapsul gelatin dengan bentuk, ukuran, warna serta bau yang serupa dengan kapsul plasebo. Variabel ini merupakan data dengan skala nominal.

3. Plasebo

Yang dimaksud dengan pemberian plasebo adalah penambahan plasebo kepada subjek penelitian di kelompok kontrol yang telah mendapat terapi ARV. Plasebo diberikan 2 x 2 kapsul setiap hari selama 1 bulan. Plasebo yang digunakan pada penelitian ini berisi *saccharin* yang dikemas dalam kapsul dengan bentuk, ukuran, warna dan bau serupa dengan propolis.

4. Infeksi HIV

Yang dimaksud dengan infeksi HIV adalah infeksi yang disebabkan oleh virus HIV yang menyerang sistem kekebalan tubuh manusia. Pada penelitian ini, infeksi HIV dibuktikan dengan hasil pemeriksaan HIV tiga metode dan didasarkan kondisi klinis yang terkait dengan infeksi HIV sesuai dengan klasifikasi WHO (Kemenkes, 2015).

5. ARV

Yang dimaksud dengan ARV adalah obat anti retro viral untuk terapi HIV/AIDS berdasarkan Pedoman Pemberian Terapi Anti Retroviral yang diterbitkan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia tahun 2015 yang terdiri dari 5 kategori yaitu NRTI, NNRTI, *protease inhibitor*, *entry inhibitor* dan *integrase inhibitor* (Kemenkes, 2015).

a. NRTI

NRTI adalah golongan obat ARV yang juga bekerja menghambat aktivitas enzim *reverse transcriptase*. Obat yang termasuk golongan NRTI adalah zidovudin, lamivudin, emcitabin, tenofovir, abacavir, dan stavudin. Empat obat pertama tersedia di Indonesia dan merupakan bagian dari terapi ARV lini pertama.

b. NNRTI

NNRTI adalah golongan obat ARV yang bekerja menghambat aktivitas enzim *reverse transcriptase*. Obat yang termasuk golongan NNRTI adalah nevirapin, efavirenz. Keduanya tersedia di Indonesia dan merupakan bagian dari terapi ARV lini pertama.

c. *Protease inhibitor*

Protease inhibitor adalah golongan obat ARV yang bekerja menghambat aktivitas enzim protease. Obat yang termasuk golongan *protease inhibitor* adalah lopinavir, ritonavir dan darunavir. Ketersediaannya di Indonesia tidak seluas NRTI dan NNRTI dan merupakan bagian dari terapi ARV lini kedua.

d. *Entry inhibitor*

Entry inhibitor adalah golongan obat ARV yang bekerja menghambat perlekatan gp120 pada reseptor dan koreseptor CD4. Obat yang termasuk golongan *entry inhibitor* adalah enfuvirtide dan maraviroc. Obat ini belum tersedia di Indonesia.

e. *Integrase inhibitor*

Integrase inhibitor adalah golongan obat ARV yang bekerja menghambat enzim *integrase*. Obat yang termasuk golongan *integrase inhibitor* adalah raltegravir, dolutegravir.

6. Infeksi oportunistik

Yang dimaksud dengan infeksi oportunistik pada penelitian ini adalah segala jenis infeksi yang termasuk ke dalam HIV stadium 3 dan 4 berdasarkan kriteria WHO, antara lain: sindrom *wasting*, *pneumonia pneumocystis jiroveci*, pneumonia bakteri berat yang berulang, infeksi herpes simplek kronis, kandidiasis esofageal, tuberkulosis ekstra paru, sarkoma kaposi, toksoplasmosis dan ensefalopati HIV (Kemenkes, 2015).

7. *Compliance* buruk

Yang dimaksud dengan *compliance* buruk pada penelitian ini adalah ketidakpatuhan pasien untuk minum obat sesuai aturan dengan berbagai alasan meskipun datang ke klinik dan mengambil obat secara rutin (Peltzer *et al.*, 2010). Dalam penelitian ini, *compliance* dianggap buruk bila $< 95\%$.

8. *Lost to follow up*

Yang dimaksud dengan *lost to follow-up* adalah ketidakhadiran pasien ke poliklinik untuk kontrol dan mengambil obat lebih dari satu bulan selama 6 bulan masa penelitian dan melewatkan kunjungan terakhir sesuai yang dijadwalkan selama dua bulan berturut-turut (Peltzer *et al.*, 2010).

9. *Adverse event* dan *serious adverse event*

Yang dimaksud dengan *adverse event* atau kejadian tidak diinginkan merupakan kejadian medik apapun yang tidak diinginkan yang terjadi pada subjek penelitian yang mendapat produk penelitian (propolis/plasebo) tanpa perlu adanya hubungan kausal dengan perlakuan pada penelitian ini.

Yang dimaksud dengan *serious adverse event* atau kejadian tidak diinginkan yang serius merupakan setiap kejadian medik yang tidak diinginkan, tanpa memandang besarnya dosis, yang dapat mengancam jiwa, memerlukan perawatan di rumah sakit, mengakibatkan cacat menetap dan mengakibatkan kematian (BPOM, 2001).

4.9 Bahan dan Produk penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan penelitian adalah sampel serum darah subjek penelitian untuk pemeriksaan CD4 dikumpulkan antara pukul 07.30-09.00WIB sebanyak 3 ml dalam tabung darah EDTA (Becton Dickinson).

Pemeriksaan CD4 dilakukan dengan alat *flowcytometry*. *Flowcytometry* merupakan metode standar yang diterima untuk penentuan jumlah absolut CD 4.

2. Produk penelitian

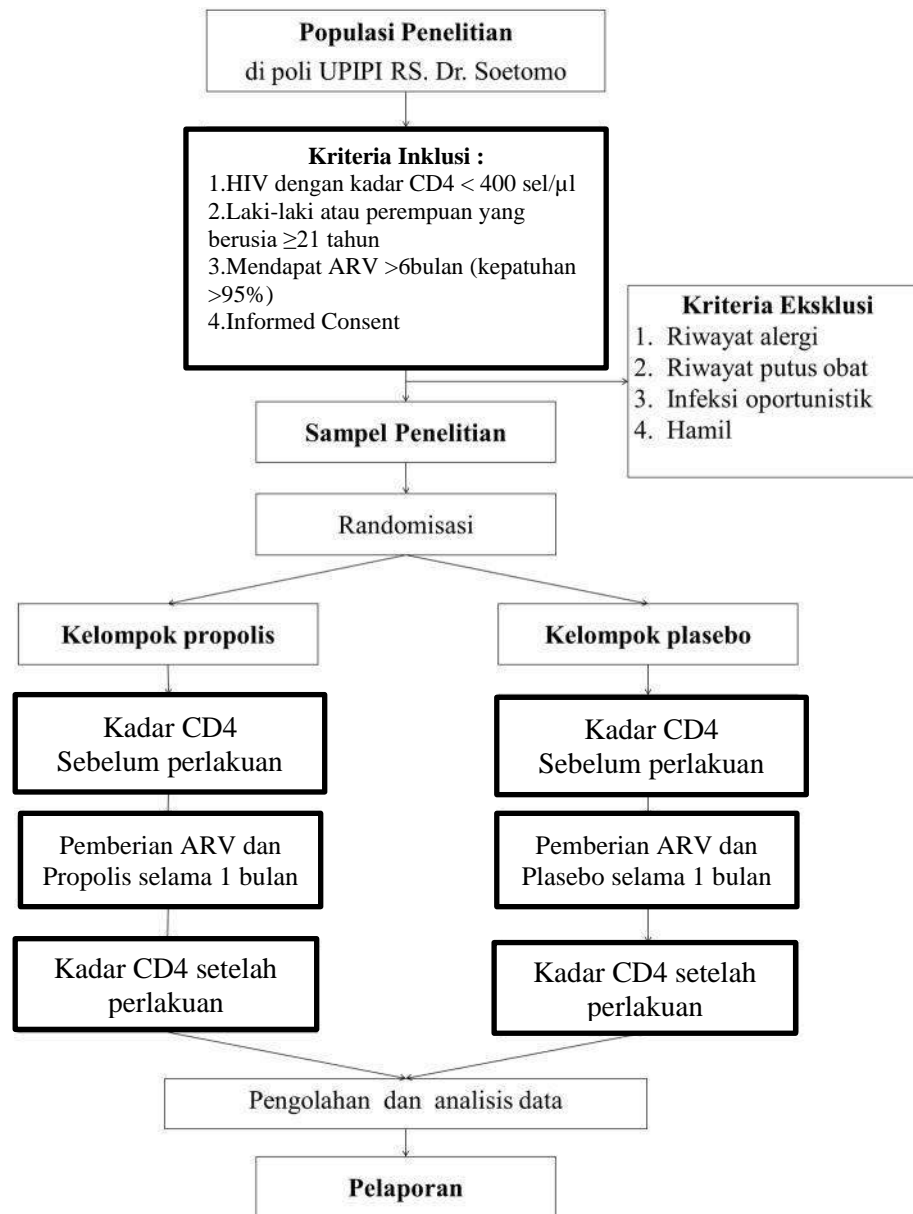
Produk penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah propolis. Propolis merupakan produk PT High Desert Indonesia (HDI) yang dengan merk dagang Propoelix[®] yang berisi 200 mg ekstrak propolis dalam 1 sediaannya. Sediaan propolis dikemas dalam bentuk kapsul berwarna coklat, ukuran dan bentuk yang sama dengan plasebo. Bahan aktif yang terdapat dalam Propoelix[®] antara lain flavonoid, flavones, polifenol dan asam ester fenolat.

Propoelix[®] telah terdaftar dalam kategori produk obat tradisional dan diizinkan peredarannya di Indonesia sejak Agustus 2015 dengan nomor registrasi TR102318611 oleh Direktorat Penilaian Obat Tradisional, Suplemen Makanan dan Kosmetika; Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM, 2016).

3. Dispensing

Proses *dispensing* propolis dan plasebo (menerima dan memvalidasi resep, menyediakan, memberi wadah dan etiket yang sesuai, mendistribusikan obat dan memberikan informasi kepada subjek penelitian) dipersiapkan oleh Bagian Farmasi RSUD Dr Soetomo, Surabaya.

4.10 Protokol Penelitian



Gambar 4.1 Alur Protokol Penelitian

4.11 Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan melalui lembar pengumpul data. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tulisan, tabulasi, grafik, dan diagram. Pada penelitian ini, data dianalisis dengan menggunakan program statistik IBM SPSS Statistik 23. Data ditampilkan sebagai mean \pm SD pada masing-masing kelompok

(bila data berdistribusi normal) dan sebagai median bila data berdistribusi tidak normal. Nilai p kurang dari 0,05 dianggap signifikan.

Analisis nilai kadar CD4 sebelum dan sesudah perlakuan menggunakan uji '*studentpaired-t- test*' bila data berdistribusi normal dan uji '*Wilcoxon Sign Rank test*' bila data tidak berdistribusi normal.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subjek dan Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan sejak Agustus hingga September 2021. Total sampel penelitian ini adalah 40 pasien dengan pembagian 20 pasien untuk kelompok propolis dan 20 pasien untuk kelompok plasebo. Populasi penelitian ini merupakan pasien HIV/AIDS yang berobat ke poli UPIPI RS. Dr. Soetomo. Pasien yang dijadikan sampel adalah pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ l yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kelompok propolis adalah kelompok yang mendapatkan kapsul berisi ekstrak propolis, sedangkan kelompok plasebo mendapatkan kapsul plasebo yang berisi *saccharin*. Seluruh pasien mendapat perlakuan selama 1 bulan dan dilakukan pemeriksaan kadar CD4 pada akhir penelitian (setelah 1 bulan perlakuan), sedangkan kadar CD4 awal didapatkan dari data yang ada di rekam medis Poli UPIPI dengan rentang 1bulan dari saat dimulainya penelitian. Yang dimaksud dengan perlakuan pada penelitian ini adalah suplementasi nutrien propolis pada kelompok propolis dan pemberian plasebo pada kelompok plasebo.

Selama periode perlakuan tidak didapatkan *adverse event* ataupun *drop out* yang diamati dan dilaporkan oleh responden.

Karakteristik responden pada penelitian ini tampak pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik	Placebo	Propolis
Laki-laki	16 (80%)	15 (75%)
Perempuan	4 (20%)	5 (25%)
	20 (100%)	20 (100%)

Tabel 5.1 menyebutkan bahwa karakter responden berdasarkan jenis kelamin menunjukkan angka yang homogen antara kelompok control dan perlakuan. Responden dengan

jenis kelamin laki-laki tampak lebih dominan pada kedua kelompok dibandingkan jenis kelamin perempuan. Untuk mengetahui normalitas dan homogenitas data maka dilakukan uji yang hasilnya tampak pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Macam Perlakuan	Placebo (n=20)		Propolis (n=20)		Normalitas	Homogenitas
	Median (Range)	Mean \pm SD	Median (Range)	Mean \pm SD		
Sebelum perlakuan	13 – 397	210.50	21 – 381	207.70	0.058	0.096
Setelah perlakuan	7 - 410	206.50	142 – 482	294.85	0.570	0.247

P-value>0.05

Uji Normalitas dan Homogenitas data pada penelitian ini menggunakan menggunakan uji paired sample dengan p-value 0.05. Data pada Tabel 5.2 dapat disimpulkan bahwa p-value yang didapatkan adalah lebih dari 0,05 sehingga data tersebut normal dan homogen.

Hubungan antar jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan secara keseluruhan ditunjukkan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hubungan Kadar CD4 Sebelum dan Sesudah Perlakuan

	N	Korelasi	Mean	P-value
Jumlah CD4 awal perlakuan	40	0.814	41.575	0.001
Jumlah CD4 akhir perlakuan				0.002

P-value<0.05

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa antara data jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan menunjukkan p-value yang signifikan (<0.005), yaitu 0.001 (menggunakan uji paired sample test) dan 0.002 (menggunakan Uji Wilcoxon), sehingga dapat diartikan bahwa terdapat hubungan antara jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan.

Untuk melihat hubungan efek pemberian perlakuan (Propolis) ditunjukkan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hubungan Kadar CD4 Berdasarkan Kelompok Perlakuan

	Placebo (n=20)			Propolis (n=20)		
	Mean \pm SD	Std. Deviasi	P-value	Mean \pm SD	Std. Deviasi	P-value
Sebelum	210.50	123.43	0.730	207.70	108.28	0.000
Sesudah	206.50	135.23		294.85	103.37	

P-value <0.05

Pada Tabel 5.4 dapat dilihat bahwa pada masing-masing kelompok menunjukkan signifikansi yang berbeda. Kelompok Kontrol memiliki p-value 0,730 (>0.005) sehingga dapat diartikan bahwa tidak ada peningkatan yang signifikan. Berbeda dengan Kelompok Kontrol, Kelompok Propolis Menunjukkan peningkatan signifikan peningkatan jumlah CD4 dengan nilai signifikansi 0.000.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 40 subjek penelitian pada populasi pasien HIV stadium 1 dan 2. *End point* penelitian ini adalah keikutsertaan subjek penelitian selama 1 bulan perlakuan. Subjek yang berhasil mencapai *end point* penelitian sebanyak 40 orang, tidak didapatkan subjek yang mengalami *drop out*, *lost to follow up*, mengalami infeksi oportunistik, ataupun *adverse event*.

Persentase jumlah subjek laki-laki dan perempuan pada penelitian ini adalah 77,5% dan 22,5%. Laporan persentase laki-laki dan perempuan yang menderita HIV di Indonesia tahun 2016 masing-masing adalah 60% dan 40%. Perbandingan jenis kelamin pada penelitian ini selaras dengan data persentase HIV di Indonesia, dimana persentase subjek laki – laki lebih tinggi dari perempuan. (Kemenekes, 2016).

Penelitian ini melibatkan pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ l didasarkan pada penelitian sebelumnya di center RS Dr Sutomo pada tahun 2017 yang mendapatkan kesimpulan pada akhir studi, jumlah CD4 terus meningkat, namun peningkatannya tidak signifikan secara statistik dan pada subyek penelitian dengan jumlah CD4 <400 sel/ μ L, analisis selisih/perubahan rerata jumlah CD4 didapatkan perbedaan bermakna ($p=0,04$) pada 0- 3 bulan (Triyono et al, 2021). Penggunaan kriteria ini berdasarkan beberapa pertimbangan, antara lain sudah ada indikasi yang ditunjukkan dari penelitian sebelumnya, sehingga di dalam penelitian lanjutan ini menggunakan subjek yang lebih homogen, dengan harapan akan didapatkan kesimpulan yang lebih representative.

Pengobatan infeksi HIV dengan terapi ARV akan menurunkan replikasi virus dan meningkatkan jumlah sel CD4. Inisiasi ARV akan diikuti dengan respon bifasik yaitu peningkatan sel CD4 yang tinggi pada awal penggunaan ARV akibat berkurangnya apoptosis sel CD4 dan redistribusi sel CD4 memori dari jaringan limfoid, diikuti dengan peningkatan sel CD4 yang berlangsung lambat (Gaardbo et al., 2012). Suatu studi kohort menyebutkan pemulihan sel CD4 membutuhkan waktu setidaknya 5 tahun ARV bila kadar CD4 nadir <500 sel / μ L (Mocroft et al., 2007).

6.2 Tingkat Kemaknaan Kadar CD4 Sebelum dan Sesudah Perlakuan pada Kelompok Propolis dan Plasebo

Kadar normal CD4 pada individu normal berkisar antara 500-1200 sel/ μ L (Wilson, 2007). Jumlah ini dapat menurun jauh dibawah rentang normal pada pasien HIV hingga mencapai kadar terendah yang disebut CD4 nadir (Deeks et al., 2013). Penelitian ini menggunakan cut of point nilai normal kadar CD4 410-1590 sel/ μ L dan kadar CD8 190-1140 sel/ μ L berdasarkan referensi nilai normal dari flowcytometry FACS Calibur (Becton Dickinson Bioscience) di laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. Soetomo.

Pada penelitian ini, rerata kadar CD4 nadir adalah 207,70 sel/ μ L pada kelompok propolis dan 210,50 sel/ μ L pada kelompok plasebo. Rerata kadar CD4 nadir ini tidak berbeda bermakna antara kelompok propolis dan kelompok plasebo. Penelitian Petoumenos et al., (2017) yang melibatkan 2.620 subjek HIV di Asia mendapatkan rerata kadar CD4 nadir yaitu 176,87 sel/ μ L. Senada dengan penelitian ini, Leung (2013) melaporkan rerata CD4 nadir pada 4.206 subjek HIV di Kanada, yaitu 190 sel/ μ L. Rerata CD4 nadir pada penelitian ini lebih tinggi dari penelitian pembandingan, hal ini dapat disebabkan karena ada kemungkinan

bahwa subjek yang termasuk dalam penelitian ini memiliki compliance

pengobatan ARV yang cukup baik sehingga kadar CD4 lebih tinggi dari subjek penelitian yang lain (Ainun et al., 2017) dan atau tidak mengalami infeksi atau ko-infeksi (Ray et al., 2006).

Profil CD4 sebelum perlakuan pada penelitian ini pada kedua kelompok adalah sebagai berikut: rerata kadar CD4 207,50 sel/ μ L pada kelompok propolis dan 210,50 sel/ μ L pada kelompok plasebo. Setelah dilakukan perlakuan, rerata kadar CD4 294,85 sel/ μ L pada kelompok propolis dan 206,80 sel/ μ L pada kelompok placebo. Uji beda parametrik independent sample-t-test digunakan untuk mengetahui perbedaan rerata kadar CD4 antar kelompok propolis dan kelompok plasebo.

Jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan menunjukkan p-value yang signifikan (<0.005), yaitu 0.001 (menggunakan uji paired sample test) dan 0.002 (menggunakan Uji Wilcoxon), sehingga dapat diartikan bahwa terdapat hubungan antara jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan. Kelompok kontrol memiliki p-value 0,730 (>0.005) sehingga dapat diartikan bahwa tidak ada peningkatan yang signifikan. Berbeda dengan kelompok kontrol, kelompok propolis menunjukkan peningkatan signifikan peningkatan jumlah CD4 dengan nilai signifikansi 0.000.

Hal tersebut mungkin dipengaruhi oleh efek suplementasi nutrisi propolis yang secara *in vitro* dapat menghambat enzim replikasi HIV. Penelitian *in vitro* menggunakan kultur sel limfosit CD4 dan sel mikroglia membuktikan bahwa propolis bersifat antiviral terhadap virus HIV-1 varian X4 dan R5 dengan dosis di atas 66. μ g/ml, propolis menghambat masuknya virus HIV-1 ke dalam sel limfosit CD4 (Gekker, 2005) yang mungkin berpengaruh menekan proses replikasi virus yang secara tidak langsung menunjang pemulihan kadar CD4.

Propolis menyebabkan makrofag melepaskan sitokin yang berikutnya mengaktifkan proliferasi sel limfosit helper, dan merangsang proliferasi sel T sitotoksik dan sel T supresor, mengindikasikan bahwa propolis mempunyai

kemampuan untuk mengaktifkan respon imun seluler (Yasuyuki Takagi et. al., 2005).

Selain hal tersebut di atas, terdapat beberapa faktor lain yang mempengaruhi normalisasi kadar CD4 pada pasien HIV antara lain terapi ARV yang efektif, durasi ARV, waktu inisiasi ARV, kadar viral load saat mulai ARV, tingkat aktivasi imun dan ko-infeksi ko-infeksi serta immunosenesens (Serrano Villar, 2014; Lu, 2015; Tinago, 2014; Caby, 2016; Leung, 2013; Mogensen, 2010).

6.3 Adverse Event dan Serious Adverse Event

Pada penelitian ini tidak didapatkan *adverse event*. Semua subjek di atas dalam keadaan baik sampai dengan masa penelitian ini selesai.

Propolis adalah produk alami yang kompleks dengan keberagaman struktur kimia dan aktivitas biologis, ia dilaporkan tidak berbahaya namun kewaspadaan perlu diperhatikan, mengingat produk tersebut memiliki variasi asal dan aktivitas yang besar. Tidak adanya kontrol kualitas mungkin dapat merugikan kesehatan manusia (Miguel & Antunes, 2011).

Propolis terbukti tidak non toxic pada pemberian peroral dosis tunggal uji toksisitas akut pada mencit. Tidak menunjukkan efek merusak sistim saraf pusat, sistim saraf autonom atau aktifitas motorik. Nilai LD50 diatas 5000/kg bb, sesuai dengan laporan dietric 1983, bahwa zat atau bahan kimia dengan LD 50 diatas 5000mg/kg bb dianggap sebagai zat atau bahan kimia yang memiliki toksisitas rendah(Dulcetti et al., 2004).

6.4 Kelemahan dan Keterbatasan Penelitian

Beberapa keterbatasan pada penelitian ini yang dapat mempengaruhi hasil penelitian antara lain:

1. Penelitian ini dilakukan dalam rentang waktu yang cukup singkat, sehingga profil kenaikan CD4 belum dapat digambarkan dengan lebih baik.
2. Penelitian ini tidak ikut mengukur albumin, kalsium, fosfat dan parameter nutrisi yang lain sehingga tidak cukup data untuk menganalisis status nutrisi subjek penelitian.
3. Terdapat variabel perancu yang tidak diperiksa, seperti infeksi Hepatitis B, Hepatitis C, citomegalovirus, toksoplasma.
4. Parameter fungsi organ yang terkait metabolisme propolis dan kadar propolis dalam plasma tidak turut diperhitungkan karena keterbatasan sumber daya dan fasilitas laboratorium, sehingga efek propolis pada berbagai organ terkait dan interaksi obat antara propolis dan ARV tidak dapat dipantau secara detail.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Karakteristik umum subyek penelitian ini adalah pasien HIV berusia 37 tahun dengan rasio laki-laki dibanding perempuan 77,5% : 22,5%. Total subjek yang mencapai *end point* penelitian sebesar 100% dari total sampel.
2. Setelah perlakuan suplementasi nutrisi propolis terhadap ARV, terdapat peningkatan kadar CD4 pada kelompok propolis. Jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan menunjukkan p-value yang signifikan (<0.005), yaitu 0.001 (menggunakan uji paired sample test) dan 0.002 (menggunakan Uji Wilcoxon), sehingga dapat diartikan bahwa terdapat hubungan antara jumlah CD4 sebelum dan sesudah perlakuan.
3. Kelompok kontrol memiliki p-value 0,730 (>0.005) sehingga dapat diartikan bahwa tidak ada peningkatan yang signifikan. Kelompok propolis menunjukkan peningkatan signifikan peningkatan jumlah CD4 dengan nilai signifikansi 0.000.
4. Tidak didapatkan efek samping yang teramati setelah suplementasi nutrisi propolis.
5. Pemberian suplementasi nutrisi propolis selama 1 bulan pada pasien HIV dengan kadar CD4 <400 sel/ μ L yang mendapat ARV berpengaruh pada peningkatan kadar CD4 secara bermakna.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian pendahuluan pada hewan coba sebelum penelitian klinis pada manusia dilakukan.
2. Beberapa faktor yang ikut mempengaruhi status nutrien dan kadar CD4 tidak diteliti pada penelitian ini, sehingga disarankan untuk melakukan studi yang lebih spesifik dengan memasukkan faktor-faktor tersebut dalam kriteria inklusi maupun eksklusi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S, 2012. Congenital and Acquired Immunodeficiencies. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed, Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 445-470.
- Adamson CS, 2012. Protease-mediated maturation of HIV: inhibitors of protease and the maturation process. Molecular Biology International. 2012: 1-13.
- Afroz R, Tanvir E, Zheng W and Little P, 2016. Molecular Pharmacology of Honey. Journal of Clinical & Experimental Pharmacology. 6: 1-13.
- Ahn M-R, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang K-S and Nakayama T, 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 7286-7292.
- AIDSinfo A. 2016. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents* [Online]. Available: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines> [Accessed 2 April 2017].
- Ainun N, Yuniastuti E and Roosheroe AG, 2017. HIV pada Geriatri HIV in Geriatrics. Jurnal Penyakit Dalam Indonesia. 3.
- Alhethel A, Aly M and Kryworuchko M, 2013. Immune responses and cell signaling during chronic HIV infection. Intech Open Access Publisher. 40-65.
- Almaraz-Abarca N, da Graca Campos M, Avila-Reyes JA, Naranjo-Jimenez N, Corral JH and Gonzalez-Valdez LS, 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). Journal of Food Composition and Analysis. 20: 119-124.
- Amoros M, Sauvager F, Girre L and Cormier M, 1992. In vitro antiviral activity of propolis. Apidologie. 23: 231-240.
- Appay V and Sauce D, 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. The Journal of Pathology. 214: 231-241.
- Araujo M, Mattar N, Reis A, Serra I, Fialho E, Assuncao A, Dutra R, Nogueira A, Liberio S and Guerra R, 2011. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. Natural Product Research. 25: 1037-1046.
- Armutcu F, Akyol S, Ustunsoy S and Turan FF, 2015. Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Experimental and Therapeutic Medicine. 9: 1582-1588.
- Bankova V, 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of Ethnopharmacology. 100: 114-117.
- Bankova V, De Castro S and Marcucci M, 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 31: 3-15.

- Bartlett J, 2009. Techniques and Interpretation of Measurement of the CD4 Cell Count in HIV Infected Patients. UpToDate Patient Preview. 1-5.
- BPOM, 2001. Pedoman Cara Uji Klinik yang Baik di Indonesia. Jakarta: Kementrian Kesehatan, 5-10.
- BPOM. 2016. *Cek Produk BPOM: Propoelix* [Online]. Available: <http://cekbpom.pom.go.id/index.php/home/produk/61566d637b7cb19a101444d38892947b/all/row/10/page/0/order/4/DESC/search/1/propoelix> [Accessed 1 December 2016].
- Brenchley JM and Douek DC, 2008. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 3: 356.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O and Altmann D, 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 12: 1365-1371.
- Buggert M, Frederiksen J, Noyan K, Svard J, Barqasho B, Sonnerborg A, Lund O, Nowak P and Karlsson AC, 2014. Multiparametric bioinformatics distinguish the CD4/CD8 ratio as a suitable laboratory predictor of combined T cell pathogenesis in HIV infection. *The Journal of Immunology*. 192: 2099-2108.
- Burdock G, 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363.
- Burke TRJ, Fesen M, Mazumder A, Yung J, Wang J, Carothers AM, Grunberger D, Driscoll J, Pommier Y and Kohn K, 1995. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38: 4171-4178.
- Caby F, Guihot A, Lambert Niclot S, Guiguet M, Boutolleau D, Agher R, Valantin MA, Tubiana R, Calvez V and Marcelin AG, 2016. Determinants of a low CD4/CD8 ratio in HIV-1-infected individuals despite long-term viral suppression. *Clinical Infectious Diseases*. 76-99.
- Callejo A, Armentia A, Lombardero M and Asensio T, 2001. Propolis, a new bee-related allergen. *Allergy*. 56: 579-579.
- Cao W, Mehraj V, Kaufmann DE, Li T and Routy J-P, 2016. Elevation and persistence of CD8 T-cells in HIV infection: the Achilles heel in the ART era. *Journal of the International AIDS Society*. 19: 20967-20976.
- Cao W, Mehraj V, Trottier B, Baril J-G, Leblanc R, Lebouche B, Cox J, Tremblay C, Lu W and Singer J, 2015. Early initiation rather than prolonged duration of antiretroviral therapy in HIV infection contributes to the normalization of CD8+ T-cell counts. *Clinical Infectious Diseases*. 809-814.
- Chun T-W, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA and Fauci AS, 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 13193-13197.

- Cichello S, Tegegne SM and Yun H, 2014. Herbal medicine in the management and treatment of HIV-AIDS-A review of clinical trials. *Australian Journal of Herbal Medicine*. 26: 100-116.
- Clifford GM, Rickenbach M, Lise M, Dal Maso L, Battegay M, Bohlius J, El Amari EB, Karrer U, Jundt G and Bordoni A, 2009. Hodgkin lymphoma in the Swiss HIV cohort study. *Blood*. 113: 5737-5742.
- Coneac G, Gafitanu E, Hadaruga D, Hadaruga N, Pînzaru I, Bandur G, Ursica L, Paunescu V and Gruia A, 2008. Flavonoid contents of propolis from the West Side of Romania and correlation with the antioxidant activity. *Chemical Bulletin of Politehnica*. 53: 56-60.
- Critchfield JW, Butera ST and Folks TM, 1996. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 12: 39-46.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ and DePierres C, 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 443: 350-354.
- De Haes W, Pollard C, Vanham G and Rejman J, 2012. Wrapped up vaccines in the context of HIV-1 immunotherapy. In: Metodiev K. (ed.) *Immunodeficiency*. Croatia: InTech, 27-76.
- De Salvador-Guillouet F, Sakarovitch C, Durant J, Risso K, Demonchy E, Roger P and Fontas E, 2015. Antiretroviral regimens and CD4/CD8 ratio normalization in HIV-infected patients during the initial year of treatment: A cohort study. *PloS One*. 10: e0140519.
- Deeks SG, Lewin SR and Havlir DV, 2013. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*. 382: 1525-1533.
- Depkes R, 2012. *Tata Laksana Pemberian ARV Pedoman Tatalaksana Infeksi HIV dan Terapi Antiretroviral Pada Orang Dewasa di Indonesia*. Jakarta: Direktorat Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Depkes RI, 21-88.
- Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N and Popov S, 1991. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*. 22: 155-162.
- Dulcetti, O., Andreucci, V. C., Cunha, I. B. D. S., Araujo, C. E. P., De Oliveira, F., & Marcucci, M. C. (2004). Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of a sample of Brazilian propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(3), 285–291
- Engelman A and Cherepanov P, 2013. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 279-290.
- Erdemli HK, Akyol S, Armutcu F and Akyol O, 2015. Antiviral properties of caffeic acid phenethyl ester and its potential application. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 4: 344-348.
- Farooqui T and A Farooqui A, 2010. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition & Food Science*. 6: 186-199.

- Fauci AS and Lane HC, 2015. Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorder. In: Kasper D., Fauci A., Longo D., Hauser S., Jameson L. & Loscalzo J. (eds.) Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill Professional, 1215-1285.
- Fesen MR, Kohn KW, Leteurtre F and Pommier Y, 1993. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90: 2399-2403.
- Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J and Kohn KW, 1994. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. Biochemical Pharmacology. 48: 595-608.
- Fida M, Kellici S, Hoxha M and Qirko E, 2013. A Case of Allergic Dermatitis after Self-Treatment with Propolis: Case Report. Macedonian Journal of Medical Sciences. 6: 425-427.
- French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA and Landay AL, 2009. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. Journal of Infectious Diseases. 200: 1212-1215.
- Fuster F, Vargas JI, Jensen D, Sarmiento V, Acuna P, Peirano F, Fuster F, Arab JP, Martínez F and Group C-HS, 2016. CD4/CD8 ratio as a predictor of the response to HBV vaccination in HIV-positive patients: A prospective cohort study. Vaccine. 34: 1889-1895.
- Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J and Nielsen SD, 2012. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. Clinical and Developmental Immunology. 2012.
- Gardana C, Simonetti P, Berti C and Pietta P, 2007. Evaluation of propolis polyphenols absorption in humans by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 21: 3849-3854.
- Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR and Peterson PK, 2005. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. Journal of Ethnopharmacology. 102: 158-163.
- Giusti F, Miglietta R, Pepe P and Seidenari S, 2004. Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. Contact dermatitis. 51: 255-258.
- Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliah M and Mizrachi Y, 1996. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. Drugs under Experimental and Clinical Research. 23: 89-96.
- Hasan SS, See CK, Choong CLK, Ahmed SI, Ahmadi K and Anwar M, 2010. Reasons, perceived efficacy, and factors associated with complementary and alternative medicine use among Malaysian patients with HIV/AIDS. The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 16: 1171-1176.
- HDI. 2015. *What is Propoelix?* [Online]. Singapore. Available: http://propoelix.com/en_US/what-is-propoelix/ [Accessed 3 January 2017].

- Helleberg M, Kronborg G, Ullum H, Ryder LP, Obel N and Gerstoft J, 2015. Course and clinical significance of CD8+ T-cell counts in a large cohort of HIV-infected individuals. *Journal of Infectious Diseases*. 211: 1726-1734.
- Hill JW, 2008. Propolis. Natural treatments for genital herpes, cold sores and shingles. A review of the scientific and medical literature. 2 ed, Washington: Clear Springs Press, 66-69.
- HIV/AIDS-Bureau, 2014. Guide for HIV/AIDS clinical care. Department of Health Human Services. 1-50.
- Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ and Hu F-L, 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 19: 19610-19632.
- Hyle EP and Sax PE, 2013. The impact of antiretroviral therapy on morbidity and mortality of HIV infection in resource-rich countries. *UpToDate Patient Preview*. 2-12.
- Ito J, Chang F-R, Wang H-K, Park YK, Ikegaki M, Kilgore N and Lee K-H, 2001. Anti-AIDS agents. 48. 1 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*. 64: 1278-1281.
- Ivanovska N, Neychev H, Stefanova Z, Bankova V and Popov S, 1995. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. *Apidologie*. 26: 73-81.
- Jernewall N, Zea M, Reisen C and Poppen P, 2005. Complementary and alternative medicine and adherence to care among HIV-positive Latino gay and bisexual men. *AIDS Care*. 17: 601-609.
- Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E and Asher AI, 2009. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*. 199: 1177-1185.
- Jiménez E, Vicente A, Sacedón R, Muñoz JJ, Weinmaster G, Zapata AG and Varas A, 2001. Distinct mechanisms contribute to generate and change the CD4: CD8 cell ratio during thymus development: a role for the Notch ligand, Jagged1. *The Journal of Immunology*. 166: 5898-5908.
- Kemenkes, 2016. Laporan Perkembangan HIV/AIDS Triwulan I Tahun 2016. Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. 1-141.
- Kemenkes R, 2015. Tata Laksana Terapi ARV. Pedoman Pengobatan Antiretroviral di Indonesia. Jakarta: Kementrian Kesehatan, 17-45.
- Khayyal M, El-Ghazaly M, El-Khatib A, Hatem A, De Vries P, El-Shafei S and Khattab M, 2003. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 17: 93-102.
- Lehmann C, Harper JM, Taubert D, Hartmann P, Fätkenheuer G, Jung N, van Lunzen J, Stellbrink H-J, Gallo RC and Romerio F, 2008. Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of

- HIV-1-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 48: 522-530.
- Leung V, Gillis J, Raboud J, Cooper C, Hogg RS, Loutfy MR, Machouf N, Montaner JS, Rourke SB and Tsoukas C, 2013. Predictors of CD4: CD8 ratio normalization and its effect on health outcomes in the era of combination antiretroviral therapy. *PLoS One*. 8: 77665-77675.
- Lieberman HD, Fogelman JP, Ramsay DL and Cohen DE, 2002. Allergic contact dermatitis to propolis in a violin maker. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 46: S30-S31.
- Lu W, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Li T and Routy J-P, 2015. CD4: CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*. 18: 52-61.
- Maartens G, Celum C and Lewin SR, 2014. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*. 384: 258-271.
- Margolick JB, Gange SJ, Detels R, O'gorman MR, Rinaldo Jr CR and Lai S, 2006. Impact of inversion of the CD4/CD8 ratio on the natural history of HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 42: 620-626.
- McMichael AJ and Rowland-Jones SL, 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature*. 410: 980-987.
- Mesbah L and Samia A, 2011. Bioavailability and pharmacokinetic of the Algerian propolis constituent naringenin in rats after oral administration. *Planta Medica*. 77: 11-14.
- Miguel MG and Antunes MD, 2011. Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3: 479.
- Mocroft A, Phillips AN, Gatell J, Ledergerber B, Fisher M, Clumeck N, Losso M, Lazzarin A, Fatkenheuer G and Lundgren JD, 2007. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The Lancet*. 370: 407-413.
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS and Paludan SR, 2010. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 7: 54.
- Moore PS and Pizza C, 1992. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochemical Journal*. 288: 717-719.
- Mudd JC and Lederman MM, 2014. CD8 T cell persistence in treated HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 9: 500-505.
- Mussini C, Lorenzini P, Cozzi-Lepri A, Lapadula G, Marchetti G, Nicastri E, Cingolani A, Lichtner M, Antinori A and Gori A, 2015. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The Lancet HIV*. 2: e98-e106.



- Nasronuddin, 2014. Aspek Medik-Religi Produk Lebah dan Buah Kurma pada Terapi Infeksi HIV. In: Barakbah J., Soewandjojo E., Hadi U., Astuti W. D., Bramantono, Arfijanto M. V., Triyono E. A., Purwati & Rusli M. (eds.) HIV & AIDS - Pendekatan Biologi Molekuler, Klinis dan Sosial. 2 ed, Surabaya: Airlangga University Press, 783-791.
- Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D and Aggarwal BB, 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 9090-9095.
- Neuhaus J, Jacobs DR, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, Kuller LH, Pett SL, Ristola M and Ross MJ, 2010. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*. 201: 1788-1795.
- Orban Z, Mitsiades N, Burke Jr TR, Tsokos M and Chrousos GP, 2000. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 7: 99-105.
- Orisatoki R and Oguntibeju O, 2010. The role of herbal medicine use in HIV/AIDS treatment. *Archives of Clinical Microbiology*. 1: 1-4.
- Orsatti C, Missima F, Pagliarone A, Bachiega TF, Búfalo M, Araújo J and Sforcin J, 2010. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*. 24: 1141-1146.
- Orsi R, Funari S, Soares A, Calvi S, Oliveira S, Sforcin J and Bankova V, 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 6: 205-219.
- Oses S, Pascual Mate A, Fernandez Muino M, Lopez Diaz T and Sancho M, 2016. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*. 196: 1215-1223.
- Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, Chung SJ, Paik SY and Oh HY, 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*. 4: 429-436.
- Peltzer K, Friend-du Preez N, Ramlagan S and Anderson J, 2010. Antiretroviral treatment adherence among HIV patients in KwaZulu-Natal, South Africa. *BMC Public Health*. 10: 111-121.
- Petoumenos K, Choi JY, Hoy J, Kiertiburanakul S, Ng OT, Boyd M, Rajasuriar R and Law M, 2017. CD4:CD8 ratio comparison between cohorts of HIV-positive Asians and Caucasians upon commencement of antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy*. 1-19.
- Pomerantz RJ and Horn DL, 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine*. 9: 867-873.

- Power R, Gore-Felton C, Vosvick M, Israelski DM and Spiegel D, 2002. HIV: effectiveness of complementary and alternative medicine. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 29: 361-378.
- Qian K, Kuo R-Y, Chen C-H, Huang L, Morris-Natschke SL and Lee K-H, 2010. Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis, and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53: 3133-3141.
- Ray K, Gupta S, Bala M, Muralidhar S and Kumar J, 2006. CD4/CD8 lymphocyte counts in healthy, HIV-positive individuals & AIDS patients. *Indian Journal of Medical Research*. 124: 319.
- Reda AA and Biadgilign S, 2012. Determinants of adherence to antiretroviral therapy among HIV-infected patients in Africa. *AIDS Research and Treatment*. 2012: 1-8.
- Sá-Nunes A, Faccioli L and Sforcin J, 2003. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 93-97.
- Sainz T, Serrano Villar S, Diaz L, Tome MIG, Gurbindo MD, de Jose MI, Mellado MJ, Ramos JT, Zamora J and Moreno S, 2013. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS*. 27: 1513-1516.
- Sajadi MM, Pulijala R, Redfield RR and Talwani R, 2012. Chronic immune activation and decreased CD4 counts associated with Hepatitis C Infection in HIV-1 Natural Viral Suppressors. *AIDS*. 26: 1879.
- Saracino A, Bruno G, Scudeller L, Volpe A, Caricato P, Ladisa N, Monno L and Angarano G, 2014. Chronic inflammation in a long-term cohort of HIV-infected patients according to the normalization of the CD4: CD8 ratio. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 30: 1178-1184.
- Serrano Villar S, Gutierrez C, Vallejo A, Hernandez Novoa B, Diaz L, Fernandez MA, Madrid N, Dronda F, Zamora J and Munoz-Fernandez MA, 2013. The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T-cell activation despite long-term viral suppression. *Journal of Infection*. 66: 57-66.
- Serrano Villar S, Moreno S, Fuentes Ferrer M, Sanchez Marcos C, Avila M, Sainz T, Villar N, Fernandez Cruz A and Estrada V, 2014a. The CD4: CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery. *HIV Medicine*. 15: 40-49.
- Serrano Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, Ferre AL, Hayes TL, Somsouk M and Hsue PY, 2014b. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathogens*. 10: e1004078.
- Sforcin J, 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 1-14.

- Silva Carvalho R, Baltazar F and Almeida Aguiar C, 2015. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 1-29.
- Simanjuntak E, 2010. Analisis faktor resiko penularan HIV/AIDS di kota Medan. *Jurnal Pembangunan Manusia*. 4: 4.
- Smith RL, de Boer R, Brul S, Budovskaya Y and van der Spek H, 2013. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Frontier in Genetic*. 3: 1-13.
- Streeck H, Lu R, Beckwith N, Milazzo M, Liu M, Routy J-P, Little S, Jessen H, Kelleher AD and Hecht F, 2014. Emergence of individual HIV-specific CD8 T cell responses during primary HIV-1 infection can determine long-term disease outcome. *Journal of Virology*. 88: 12793-12801.
- Su D and Li L, 2011. Trends in the use of complementary and alternative medicine in the United States: 2002–2007. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*. 22: 296-310.
- Suarez-Garcia I, Sobrino-Vegas P, Tejada A, Viciano P, Ribas M, Iribarren J, Diaz Menendez M, Rivero M, Arazo P and Amo J, 2014. Compliance with national guidelines for HIV treatment and its association with mortality and treatment outcome: a study in a Spanish cohort. *HIV Medicine*. 15: 86-97.
- Syrjala H, Surcel HM and Ilonen J, 1991. Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction. *Clinical & Experimental Immunology*. 83: 326-328.
- Takagi Y, Choi I-S, Yamashita T, Nakamura T, Suzuki I, Hasegawa T, Oshima M, Gu Y-H, 2005. Immune Activation and Radioprotection by Propolis. *The American Journal of Chinese Medicine*. 33(2): 231-240
- Tamuno I, 2011. Traditional medicine for HIV infected patients in antiretroviral therapy in a tertiary hospital in Kano, Northwest Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4: 152-155.
- Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD and Hughes SH, 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*. 54: 143-154.
- Tao Y, Wang D, Hu Y, Huang Y, Yu Y and Wang D, 2014. The immunological enhancement activity of propolis flavonoids liposome in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014.
- Thornhill J, Inshaw J, Oomeer S, Kaleebu P, Cooper D, Ramjee G, Schechter M, Tambussi G, Fox J and Maria Miro J, 2014. Enhanced normalisation of CD4/CD8 ratio with early antiretroviral therapy in primary HIV infection. *Journal of the International AIDS Society*. 17: 1.
- Tilton JC and Doms RW, 2010. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research*. 85: 91-100.
- Tinago W, Coghlan E, Macken A, McAndrews J, Doak B, Prior-Fuller C, Lambert JS, Sheehan GJ, Mallon PW and Group MIS, 2014. Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4+/CD8+ T-cell ratio: effect of naive and memory T-cell subsets. *PloS one*. 9: 1-9.

- Toreti VC, Sato HH, Pastore GM and Park YK, 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-13.
- Torti C, Prosperi M, Motta D, Digiambenedetto S, Maggiolo F, Paraninfo G, Ripamonti D, Cologni G, Fabbiani M and Caputo S, 2012. Factors influencing the normalization of CD4+ T-cell count, percentage and CD4+/CD8+ T-cell ratio in HIV-infected patients on long-term suppressive antiretroviral therapy. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 449-458.
- Triyono, EA, Firdausa S, Prasetyo H, Hutagalung J, Masyufah L, Budiono, Hoesada I, 2021. The Effect of Propolis Extract Administration on HIV Patients Receiving ARV. *Indonesian Bio Med Journal*. 13 : 75-83
- Viuda Martos M, Ruiz Navajas Y, Fernandez Lopez J and Perez Alvarez J, 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*. 73: 117-124.
- WHO, 2007. *Who Case Definitions of HIV for Surveillance and Revised Clinical Staging and Immunological Classification of HIV-Related Disease in Adults and Children*. WHO Press. 1-45.
- WHO, 2014. *Guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach*. WHO Press. 1-130.
- Williams A, Steffens F, Reinecke C and Meyer D, 2013. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: a multivariate cytokinomics approach. *Cytokine*. 61: 521-526.
- Wilson DD, 2007. *Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Illionis: McGraw Hill Medical, 395-399.
- Xu H-X, Wan M, Dong H, BuT PP-H and Foo LY, 2000. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 23: 1072-1076.
- Yildirim A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraloglu M and Muz M, 2016. Antiviral Activity of Hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 22: 422-430.
- Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W and Xiaojun G, 2011. Quality control method for herbal medicine-chemical fingerprint analysis. In: Uto, Takuhiro & Morinaga O. (eds.) *Quality Control of Herbal Medicines and Related Area*. InTech Open, 171-194.
- Yu D, Sakurai Y, Chen C-H, Chang F-R, Huang L, Kashiwada Y and Lee K-H, 2006. Anti-AIDS agents 69. Moronic acid and other triterpene derivatives as novel potent anti-HIV agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 5462-5469.
- Yuniar Y, Handayani RS and Aryastami NK, 2013. Faktor–faktor pendukung kepatuhan orang dengan HIV/AIDS dalam minum obat antiretroviral di Bandung dan Cimahi. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 41: 72-83.

- Zhang P, Tang Y, Li N-G, Zhu Y and Duan J-A, 2014. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules*. 19: 16458-16476.
- Zhang X, Neamati N, Lee YK, Orr A, Brown RD, Whitaker N, Pommier Y and Burke TR, 2001. Arylthiocyanate-containing esters of caffeic acid designed as affinity ligands for HIV-1 integrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9: 1649-1657.

**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(“ ETHICAL CLEARANCE ”)**

0210/KEPK/VI/2021

KOMITE ETIK RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN JUDUL :


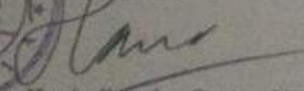
“ Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya ”

PENELITI UTAMA : Dr. Erwin Astha Triyono, , dr., Sp.PD., KPTL, FINASIM

PENELITI LAIN : 1. Joni Susanto, dr., M.Kes
2. Dra. James S. Hutagalung, M.Kes
3. Liliy Masyfubah A.S, S.KM., M.Kes
4. Dimas Aji Perdana, dr

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo

DINYATAKAN LAIK ETIK


 Berlaku dari : 15/06/2021 s.d 15/06/2022
 Surabaya, 15 Juni 2021
 KETUA

 (Dr. Eliseus Hanindito, dr., Sp.An, KIC, KAP)
 NIP. 19511007 197903 1 002

**) Sertifikat ini dinyatakan sah apabila telah mendapatkan stempel asli dari Komite Etik Penelitian Kesehatan*



PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8, Telp. 5501111
SURABAYA 60286



Judul Penelitian:

Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/µL Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Bapak/Ibu/Saudara yang kami hormati, kami dokter di SMF Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo berencana untuk melakukan penelitian dengan judul tersebut di atas.

Tim Peneliti Terdiri Dari:

1. Dr. Erwin Astha Triyono, dr., Sp. PD, K-PTI, FINASIM
2. Joni Susanto, dr., M. Kes, PA
3. Drs. James S. Hutagalung, M. Kes
4. Lilis Masyfufah A.S., S.KM, M. Kes
5. Dimas Aji Perdana, dr.

Latar Belakang Penelitian:

Human Immunodeficiency Virus (HIV) merupakan infeksi yang disebabkan oleh virus yang menyerang kekebalan tubuh manusia. Orang yang terinfeksi HIV akan memunculkan kumpulan tanda bahwa seseorang terinfeksi HIV yang dikenal dengan *Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*. HIV menyerang sel yang mengekspresikan antigen CD4, yang merupakan reseptor seluler dari HIV. Antigen CD4 terdapat pada semua limfosit T helper, 20% makrofag, 10 % monosit dan sekitar 5 % limfosit B. Secara klinis jumlah T-CD4 dipakai sebagai petanda keparahan dari infeksi HIV. Individu terinfeksi HIV dengan jumlah T-CD4 kurang dari 200/mm³ harus diwaspadai akan mengalami kejadian infeksi oleh organisme patogen lain (infeksi oportunistik) yang dapat menyebabkan kematian penderita.

Bahan alam merupakan sumber obat baru antivirus yang potensial untuk terus digali dan dikembangkan. Diantara sekian banyak bahan alam yang digunakan oleh masyarakat untuk mengobati virus adalah propolis.

Penelitian didalam laboratorium (invitro) menggunakan kultur sel limfosit CD4 dan sel mikreglia membuktikan bahwa propolis bersifat antiviral terhadap HIV-1 varian X4 dan RS dengan dosis

Keuntungan Penelitian:

Anda dapat mengetahui penelitian ini dengan sempurna pra penelitian Anda, dengan berbagai pertimbangan. Dokter Anda dapat memanduk Anda, menggunakan teknik tertentu Anda dalam penelitian ini jika bereslah pertimbangannya penelitian ini dapat membahayakan Anda, atau jika Anda mengalami perubahan kondisi, atau terburuknya efek samping yang dianggap lebih besar daripada manfaat dari penelitian yang diberikan dalam penelitian ini.

Ganti Rugi/Kompensasi Untuk Kelembutan Anda Dalam Penelitian ini:

Walaupun sudah dibayar secara resmi untuk partisipasi Anda dalam penelitian ini, sebagai bentuk ada kemungkinan terjadi hal-hal yang tidak diinginkan. Jika memang hal itu terjadi, maka tim peneliti akan mengganti semua kejadian yang terkait dengan penelitian ini sesuai prosedur dan standar yang berlaku di RSUD Dr. Soetomo sampai Anda dinyatakan pulih. Anda juga akan mendapat kompensasi biaya sebesar Rp 200.000,00.

Kontak Yang Bisa Dibantu Setiap Saat:

Sebagai subjek penelitian, Anda dapat sewaktu-waktu mengajukan pertanyaan dan mendapatkan informasi dengan menghubungi tim peneliti. Nomor kontak yang dapat dihubungi sewaktu-waktu adalah:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------|
| 1. Dimas Aji Perdana, dr. | HP: 0818 5298 8372 |
| 2. Lilis Masyfufah A.S., S.KM, M. Kes | HP: 0857 3012 6803 |

Surabaya, 12 Agustus 2021

Yang menerima penjelasan

.....
Dimas Aji Perdana, dr.

Saksi I

Yang memberi penjelasan

.....
Lilis Masyfufah A.S., S.KM, M. Kes

Saksi II

FORM INFORMED CONSENT

LEMBAR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN (Informed consent)

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : HAFIZH HANIKH ARDIH
Umur : 27 TAHUN
Alamat : DSH KEPURBAN No. 63 Ds. DINDORO DEKET. LANANGAN
Tlp / Email : 08593139004C

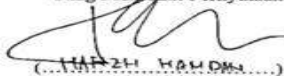
Sesudah mendengarkan penjelasan yang diberikan dan diberikan kesempatan untuk menanyakan yang belum dimengerti, dengan ini memberikan :

PERSETUJUAN

Mengikuti penelitian sebagai subyek penelitian dengan judul penelitian
"Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV
Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L. Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya"
dan sewaktu-waktu saya berhak mengundurkan diri.
Demikian persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya, 02 AGUSTUS 2021

Yang Membuat Pernyataan


(HAFIZH HANIKH ARDIH)

Saksi 1

(.....)

Saksi 2

(.....)

FORM PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

LEMBAR PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : HARIH HAMDANI ARIDH.
 Umur : 27. TAHUN.
 Alamat : Dsn. Keputean, No. 63. Ds. Dimeyo Dede - Lamongan
 Tlp / Email : 085931390945.

Sesudah mendengarkan penjelasan yang diberikan dan diberikan kesempatan untuk menanyakan yang belum dimengerti, dengan ini memberikan :

PERSETUJUAN

Untuk dilakukan tindakan medis berupa:

1. Pemberian suplemen Propolis tablet 2 x 200 mg (Pagi dan Sore) selama 1 bulan berturut turut.
2. Pengambilan sample darah pada saat awal penelitian sebelum pemberian suplemen dan di akhir penelitian sesudah pemberian suplemen selama 1 bulan.

Pada penelitian dengan judul : "Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya"

Sewaktu-waktu saya berhak mengundurkan diri.

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

Surabaya, 02. Agustus. 2021.

Yang Membuat Pernyataan


 (... HARIH HAMDANI ARIDH)

Saksi 1

(.....)

Saksi 2

(.....)

Lampiran 3 : Lembar Pengumpul Data

Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

PIC: A. Enjin

Protokol: 0210 / 01 / 01 / 2021

Inisial Subjek

H	F	Z
---	---	---

 Subjek ID:

			4	0
--	--	--	---	---

 Tanggal (hari/bulan/thn)

02	08	21
----	----	----

Data Demografi

Nomor Catatan Medis Subjek :

1	2	7	0	6	8	5	1
---	---	---	---	---	---	---	---

Tanggal lahir: (hari/bulan/tahun)

03	02	1994
----	----	------

Jenis kelamin :

 laki laki Perempuan

SUKU: Jawa

Informasi Kontak:

Alamat: Kepuren, Duren - Duren, Lamongan		
Kota: Lamongan	Negara: Indonesia	Kode Pos: -
Nomor Telepon: 08593190954	Alternatif Nomor Telepon: -	Alamat email: -

Kontak Darurat / Keluarga yang bisa dihubungi :

Nama:		
Alamat:		
Kota:	Negara:	Kode Pos :
Nomor Telepon: <input type="text"/>	Alternatif Nomor Telepon: <input type="text"/>	Alamat email:
Metode kontak yang disukai:		

Tanda tangan dan nama: A. Dimas Tanggal: 01-08-21

Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

PIC: *dr. Dimes A. Erwin*

Protokol: G110/KEPH/SA/12021

Lokasi: Poli UPIPI

Inisial Subjek

H P Z

Subjek ID:

40

Tanggal

02

08

21

Pemeriksaan Fisik

Jam :

08 : 00

Pemeriksaan Fisik Tidak Dilakukan

Visite ke :

Pemeriksaan	Temuan	Keterangan *(bila Abnormal)	Signifikasi Klinis (Ya atau Tidak)
Kepala / Leher	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Thorax : Jantung	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Thorax : Paru	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Abdomen	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Extremitas Atas	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Extremitas Bawah	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Status Lokalis (bila ada)	<input checked="" type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abnormal* <input type="checkbox"/> Not examined		
Catatan Tambahan			
PEMERIKSA	<i>dr. Dimes</i>	Tanggal : 02 08 21	

**Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4
Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di
RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

PIC: dr. Dimes / dr. Erwin

Protokol: OL10 / KEPK / VI / 2021 Lokasi: Poli UPIPI

Inisial Subjek H F Z

Subjek ID: 40

Tanggal 02 08 21

Riwayat Kesehatan (UMUM)

Anamnesa		Keterangan	Onset dari keluhan	Apakah jadi masalah saat ini
Riwayat alergi	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Riwayat putus obat ARV	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Riwayat dirawat di RS dalam 6 bulan terakhir	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Batuk, Pilek, Demam	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Mual, Muntah	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Diare	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Tidak bisa tidur	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Badan kekuningan, BAK seperti teh	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T			<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T
Keluhan lain	<input type="checkbox"/> Y <input checked="" type="checkbox"/> T	<u>tidak ada</u>		<input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> T

Catatan tambahan: _____

Pemeriksa: dr. Dimes

Lampiran 4 : Data penelitian

Kelompok Kontrol (A) dan Propolis (B)

No	Nama	Jenis kelamin	Usia	Jenis	CD4 Awal	CD4 Akhir
1	HC	L	72	A	116	157
2	BKY	L	43	A	13	7
3	YS	L	34	A	142	128
4	AR	P	31	A	371	327
5	RTO	L	45	A	34	28
6	INK	L	40	A	155	170
7	AZL	L	29	A	306	377
8	SS	P	36	A	159	89
9	MI	L	61	A	301	287
10	SUC	P	60	A	74	38
11	EPS	L	58	A	221	177
12	AMR	L	27	A	33	33
13	ZUM	P	51	A	325	402
14	APU	L	38	A	397	289
15	SET	L	46	A	312	307
16	NS	L	28	A	362	410
17	APN	L	46	A	300	242
18	DS	L	48	A	151	178
19	VT	L	41	A	302	386
20	HH	L	27	A	136	98

No	Nama	Jenis Kelamin	Usia	Jenis	CD4 Awal	CD4 Akhir
1	AP	L	48	B	218	239
2	SB	L	45	B	280	366
3	ASF	P	37	B	222	224
4	EP	P	36	B	363	478
5	MS	L	27	B	139	147
6	MR	L	37	B	192	243
7	PAU	L	59	B	102	142
8	EL	L	36	B	282	294
9	DA	L	30	B	177	260
10	EA	P	29	B	309	358
11	YR	L	27	B	21	220
12	OA	L	40	B	58	200
13	SHB	L	56	B	131	239
14	AA	L	39	B	167	288
15	HDM	L	39	B	296	482
16	MAS	L	30	B	35	270
17	KA	P	41	B	381	464
18	ER	P	30	B	247	372
19	AZ	L	55	B	169	219
20	AN	L	30	B	365	392

Lampiran 5 : Rincian Anggaran Biaya Penelitian

RINCIAN ANGGARAN BIAYA PENELITIAN

Biaya Belanja Penelitian Unggulan 2021 an. Dr. Erwin Astha.T., dr., SpPD.,KPTL.,FINASIM

Uraian	Biaya	Pajak	Hasil
Belanja Uji Lab	Rp 6.000.000	Rp 120.000	Rp 5.880.000
Belanja Bahan Komputer	Rp 400.000	Rp 0	Rp 400.000
Belanja Cetak	Rp 1.000.000	Rp 0	Rp 1.000.000
Belanja Bahan Kimia	Rp 3.920.000	Rp 409.819	Rp 3.510.181
Belanja ATK	Rp 600.000	Rp 0	Rp 600.000
Honor Statistik	Rp 2.000.000	Rp 100.000	Rp 1.900.000
Belanja Konsumsi Rapat	Rp 1.050.000	Rp 0	Rp 1.050.000
Total	Rp 14.970.000	Rp 629.819	Rp 14.340.181

Empat Belas Juta Tiga Ratus Empat Puluh Ribu Seratus Delapan Puluh Satu Rupiah

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00202239388, 24 Juni 2022

Pencipta

Nama : **Dr. Erwin Astha Triyono, dr, SpPD, K-PTI, FINASIM dan Dimas Aji Perdana, dr**

Alamat : Taman Wisma Menanggal No 17, RT 6 RW 4 Menanggal Gayungan, Surabaya, JAWA TIMUR, 60234

Kewarganegaraan : Indonesia

Pemegang Hak Cipta

Nama : **Dr. Erwin Astha Triyono, dr, SpPD, K-PTI, FINASIM, Dimas Aji Perdana dkk**

Alamat : Taman Wisma Menanggal No 17, RT 6 RW 4 Menanggal Gayungan, Surabaya, JAWA TIMUR, 60234

Kewarganegaraan : Indonesia

Jenis Ciptaan : **Laporan Penelitian**

Judul Ciptaan : **Penggunaan Propolis Terhadap Peningkatan Kadar T Limfosit CD4 Pada Pasien HIV Dewasa Dengan Kadar CD4 Dibawah 400 Sel/ μ L Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 10 Januari 2022, di Surabaya

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.

Nomor pencatatan : 000355014

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia
Direktur Jenderal Kekayaan Intelektual
u.b.
Direktur Hak Cipta dan Desain Industri

Anggoro Dasananto
NIP.196412081991031002

Disclaimer:

Dalam hal pemohon memberikan keterangan tidak sesuai dengan surat pernyataan, Menteri berwenang untuk mencabut surat pencatatan permohonan.

LAMPIRAN PEMEGANG

No	Nama	Alamat
1	Dr. Erwin Astha Triyono, dr,SpPD,K-PTI,FINASIM	Taman Wisma Menanggal No 17, RT 6 RW 4 Menanggal Gayungan
2	Dimas Aji Perdana	Citra Garden Blok D-8 No 22 RT 20 RW 5 Entalsewu Buduran
3	Joni Susanto	Grand Masangan Wetan B2 No 12 RT 31 RW 10 Masanganwetan Sukodono
4	Drs. James Hutagalung	Perum Puri Erlangga O / 17 RT 55 RW 1 Sidokare Sidoarjo
5	Lilis Masyfufah A.S , S.KM.,M.Kes	Semampir Tengah 3-A/26 RT 2 RW 7 Medokan Semampir Sukolilo

