

**PENGARUH VAKSINASI HEAT SHOCK PROTEIN(HSP)-65
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP KETEBALAN AORTA
MENCIT MODEL ATHEROSKLEROSIS**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

Dian Amelia Sari

NIM : 115070100111082

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH VAKSINASI HEAT SHOCK PROTEIN(HSP)-65
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP KETEBALAN AORTA
MENCIT MODEL ATHEROSKLEROSIS**

Oleh :

Dian Amelia Sari

NIM: 115070100111082

Telah Diikutsertakan dalam
Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) XXVI
Mataram, 9-13 September 2013

Pembimbing

DR.Dr.Tinny Endang Hernowati, Sp.PK(K)
NIDN. 0025125204

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Prof.Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H.,M.SC.,Sp.Par.K
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yesus Kristus, yang telah menuntun dan menolong sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir berjudul “Pengaruh Vaksinasi Heat Shock Protein(HSP)-65 Mycobacterium tuberculosis terhadapKetebalan Aorta Mencit Model Atherosklerosis”. Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada program pendidikan dokter umum Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari bahwa baik dalam perjalanan studi maupun penyelesaian penelitian ini banyak memperoleh bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa syukur dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem spPA, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr.Tinny Endang Hernowati,Sp.PK (K), sebagai pembimbing yang dengan penuh kesabaran selalu memberi saran, bimbingan, dan semangat dalam proses menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. dr. Bambang Prijadi, MS selaku Pembantu Dekan III FKUB atas bimbingan dan arahan selama proses penelitian, persiapan, karantina, dan presentasi PIMNAS.
4. Yang tercinta Mama Lanny Kristiana dan Papa Dadi Santoso Bagyo, Cece Dian Kartika Sari, Koko Wahyu Budi Dharma serta keluarga besar penulis yang senantiasa memberikan waktu untuk mendengar keluh

kesah, semangat, dan doa yang menguatkan selama penulis menghadapi saat-saat yang berat dalam penulisan Tugas Akhir ini.

5. DIKTI selaku penyelenggara PIMNAS 2013 dan penyedia dana penelitian
6. Untuk rekan-rekan kelompok PKM-P "ATHEROGULATOR" Mas Radhitio Adi Nugroho, Ce Anggela Damayanti, Kak Risa Natalia dan Steven Budihardjo yang telah bersama-sama kompak dan bersemangat, serta banyak membimbing, berbagi ilmu dan pengalaman selama dalam penelitian.
7. Teristimewa William Christian Sindhu dan Cupsi; Githa Putri Puspita, Syekhinna Ayu, Aulia Yasmin, Meiria Jubilanti, Rizky Fachmia, Eriska Ayu Wirindri, dan Ezra Lenny, yang selalu ada untuk mendukung dan menghibur.
8. Seluruh sahabat-sahabat dan teman-teman tercinta yang selalu memberikan dukungan dan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini, yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu.
9. Petugas Laboratorium Parasitologi, Biomedik, Fisiologi, Farmakologi, dan Patalogi Anatomi FKUB yang telah membantu penulis.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, penulis memerlukan saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga penelitian ini dapat menambah wawasan dan memberi manfaat.

Malang, 11 Desember 2014

Penulis

ABSTRAK

Sari, Dian Amelia. 2014. **Pengaruh Vaksinasi Heat Shock Protein(HSP)-65 *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Ketebalan Aorta Mencit Model Atherosklerosis**. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
Pembimbing : Dr. dr Tinny Endang Hernowati, SpPK (K)

Atherosklerosis merupakan proses inflamasi pada pembuluh darah yang disertai aktivitas imun. Gambaran histopatologi berupa peningkatan ketebalan aorta. Manifestasi klinis yang ditimbulkan mulai dari penyakit kardio-vaskuler hingga gangguan organ-organ lain. Terapi dengan statin belum efektif menurunkan progresifitas lesi karena statin hanya bekerja pada salah satu faktor risiko, yaitu menurunkan kadar kolesterol dalam darah. HSP60 merupakan protein protektif di dinding arteri manusia dan tereksresi saat terdapat stress endotel. HSP65 merupakan protein homolog HSP60 yang terdapat pada bakteri, seperti *Mycobacterium tuberculosis*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian vaksinasi HSP65 pada aorta mencit yang telah diinduksi atherosklerosis melalui mekanisme toleransi mukosa. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan *post test control group design* terbagi dalam 5 kelompok dengan masing-masing terdiri dari 6 mencit. Kelompok I mencit diberi diet normokolesterolemia (kontrol negatif), kelompok II mencit diberi diet atherogenik tanpa vaksinasi (kontrol positif), kelompok III mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi 0,5µg, kelompok IV mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi 0,75µg, sedangkan kelompok V mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi 1µg. Hasil pengukuran ketebalan aorta dengan pengecatan hematoxylin eosin, berbeda secara bermakna antara mencit kontrol positif dengan mencit perlakuan vaksinasi (ANOVA, $p < 0,05$) sedangkan ketebalan aorta hampir sama antara mencit kontrol negatif dengan mencit perlakuan vaksinasi dosis II (ANOVA, $p > 0,05$). Melalui analisis korelasi Pearson didapatkan hubungan yang bermakna dengan angka signifikansi 0,024 dan kekuatan korelasi sebesar -0,449. Kesimpulan penelitian ini adalah vaksinasi dengan HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dapat menurunkan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis dan dosis efektifnya adalah 0,75 µg.

Kata kunci: Ketebalan aorta, atherosklerosis, HSP65 *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

Sari, Dian Amelia. 2014. **The Effect of Heat Killed HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* on the Vaccination towards Aortic Thickness of Mice that have been Induced Atherosclerosis**. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Pembimbing : Dr. dr Tinny Endang Hernowati, SpPK (K)

Atherosclerosis is an inflammatory process of the blood vessels accompanied by immune activity. Histopathologic features in the form of an increase in the thickness of the aortic lumen. Clinical manifestations arising from cardio-vascular disease to disease affecting other organs. Treatment with statins have not been effective in lowering the progression of atherosclerotic lesions as statins only work on one risk factor for atherosclerosis, which lowers blood cholesterol levels. HSP60 is a protective protein in the human artery wall and endothelial-expressed when there is stress. HSP65 is homologous protein HSP60 found in bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*. The purpose of this study was to determine the effect of HSP65 on the vaccination through mucosal tolerance of mice that have been induced aortic atherosclerosis. This study was an experimental study using post-test control group design in which subjects were divided into 5 groups. Each group consisted of 5 mice. Group I mice fed a diet normokolesterolemia (negative control), group II mice given atherogenic diet without vaccine (positive control), group III mice given atherogenic diet and 0,5µg vaccination, group IV mice were given atherogenic diet and 0,75µg vaccination, group V mice were given atherogenic diet and 1µg vaccination. The results of the thickness measurement of the aorta with hematoxylin eosin staining, was significantly different between the positive control mice treated mice vaccinated (ANOVA, $p < 0.05$), while the thickness of the aorta is almost the same between the negative control mice treated mice vaccinated with the second dose (ANOVA, $p > 0.05$). Through Pearson correlations analytic there is a significant relation with significance 0,024. The conclusion of this study is vaccination with *Mycobacterium tuberculosis* HSP65 can reduce the thickness of the aorta in mice induced atherosclerosis and the effective dose is 0.75 mg dose.

Keywords: aortic thickness, atherosclerosis, HSP65 *Mycobacterium tuberculosis*

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	v
Abstract.....	vi
Daftar Isi.....	vii
Daftar Gambar.....	x
Daftar Grafik.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.1 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Keilmuan	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	5



BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA	
2.1	Atherosklerosis.....	6
2.1.1	Definisi Aterosklerosis	6
2.1.2	Epidemiologi Aterosklerosis	7
2.1.3	Faktor Resiko Aterosklerosis	9
2.1.4	Patogenesis Aterosklerosis.....	12
2.2	<i>Heat Shock Protein 60 (HSP60)</i>	17
2.3	<i>Heat Shock Protein 65 (HSP65) Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.4	Mekanisme Toleransi Imun	22
BAB 3	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	25
3.2	Hipotesis Penelitian.....	27
BAB 4	METODE PENELITIAN	
4.1	Rancangan Penelitian.....	28
4.2	Populasi dan Sampel.....	29
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
4.4	Variabel Penelitian.....	30
4.5	Definisi Operasional.....	31
4.6	Bahan dan Alat Penelitian.....	33
4.6.1	Perawatan Mencit.....	33
4.6.2	Pembuatan Ransum Makanan Diet Normokolesterolemia.....	33
4.6.3	Pembuatan Vaksin Atherosklerosis.....	34
4.6.4	Pemberian Diet Atherogenik.....	34



4.6.5	Injeksi Vaksin Atherosklerosis	34
4.6.6	Pembedahan dan Pengambilan Organ.....	34
4.6.7	Pembuatan Slide Sampel	35
4.6.8	Pengukuran Ketebalan Aorta.....	35
4.6.9	Analisis Statistik	35
4.7	Prosedur Penelitian.....	35
4.7.1	Persiapan Hewan Coba.....	35
4.7.2	Adaptasi Hewan Coba.....	36
4.7.3	Vaksinasi HSP65.....	36
4.7.4	Pemberian Diet Atherogenik.....	37
4.7.5	Pembedahan Mencit.....	37
4.7.6	Pembuatan Preparat	38
4.7.7	Pengukuran Ketebalan Aorta.....	38
4.8	Analisa Data.....	39
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	41
BAB 6	PEMBAHASAN.....	48
BAB 7	PENUTUP	
7.1	Kesimpulan	53
7.2	Saran	53
	Daftar Pustaka.....	54
	Lampiran	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Respon Imun pada Pathogenesis Atherosklerosis.....	11
Gambar 2.2	Peran Sel T Regulator pada Pathogenesis Atherosklerosis.....	16
Gambar 2.3	Mekanisme Induksi Toleransi Mukosa.....	22
Gambar 4.1	Skema Alur Kerangka Kerja Penelitian	28
Gambar 5.1	Histopatologi Ketebalan Aorta Masing-masing Perlakuan.....	43

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1 Grafik Hubungan Ketebalan Aorta dan Perlakuan.....45



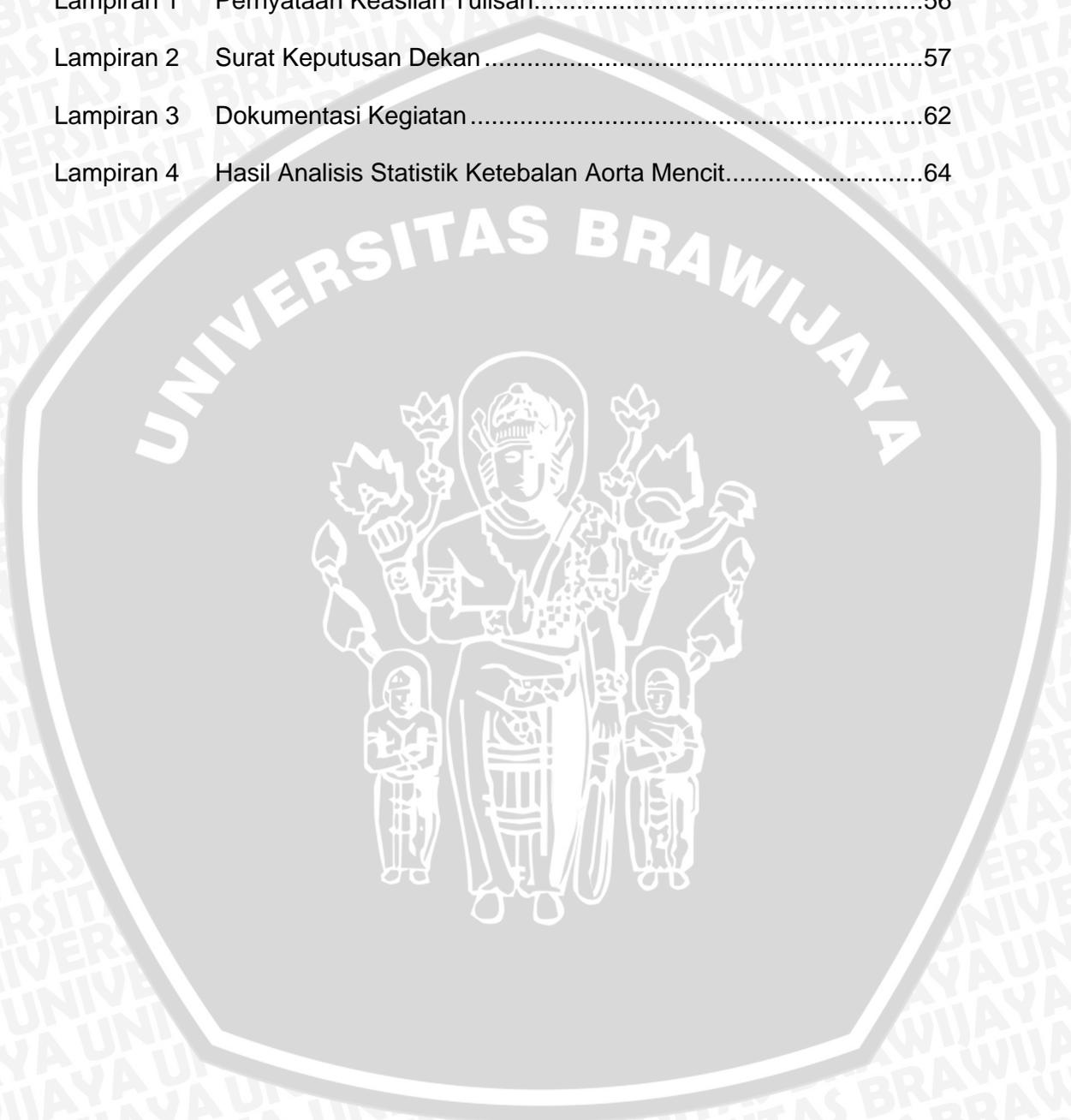
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Tabel Diameter Aorta Normal	16
Tabel 2.2	Tabel Peran HSP60 dalam pathogenesis Atherosklerosis	20
Tabel 2.3	Tabel Hubungan HSP60 dan HSP65 dengan Atherosklerosis	21
Tabel 4.1	Tabel Komposisi Diet Normokolesterolemia	33
Tabel 5.1	Tabel Rerata Ketebalan Aorta Mencit	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pernyataan Keaslian Tulisan.....	56
Lampiran 2	Surat Keputusan Dekan.....	57
Lampiran 3	Dokumentasi Kegiatan.....	62
Lampiran 4	Hasil Analisis Statistik Ketebalan Aorta Mencit.....	64



DAFTAR SINGKATAN

USA	: United States of America
UK	: United Kingdom
AHA	: American Heart Association
CVD	: Cardio Vascular Disease
CLRD	: Chronic Lower Respiratory Disease
CFR	: Case Fatality Rate
NCHS	: National Center for Health Statistics
LDL	: Low Density Lipoprotein
HDL	: High Density Lipoprotein
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
RA	: Rheumatoid Arthritis
V-CAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule-1
MMP	: Metalloproteinase
OxLDL	: oxidized LDL
Th1	: T helper 1
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α
IFN- γ	: Interferon- γ
IL	: interleukin
NK	: Natural Killer
aCL	: Anticardiolipin Antibodies
aPL	: Antiphospholipid Antibodies
PBS	: Phosphate Buffer Saline
HSP	: Heat Shock Protein
TLR-4	: Toll-Like Receptor-4

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardio-vaskuler masih menjadi ancaman dan permasalahan dalam bidang kesehatan di seluruh dunia. Angka kejadian dan angka kematian akibat penyakit kardio-vaskuler masih tinggi meskipun berbagai metode terapi telah diupayakan. Berdasarkan data dari Ditjen Bina Yanmedik, hingga Agustus 2009, penyakit kardio-vaskuler menempati urutan pertama sebagai penyakit utama penyebab kematian di rumah sakit. Laporan terakhir dari WHO (2013), penyakit kardio-vaskuler merupakan penyebab kematian nomor satu di seluruh dunia karena mengakibatkan 17,3 juta penduduk di dunia meninggal, 30% dari keseluruhan angka kematian dengan 7,3 juta kematian disebabkan oleh penyakit jantung koroner dan 6,2 juta disebabkan oleh stroke. Tahun 2030 di prediksi oleh WHO, 23,3 juta penduduk meninggal akibat penyakit jantung koroner dan stroke. Salah satu penyakit kardio-vaskuler yang membahayakan kehidupan adalah atherosklerosis, yang pada perkembangannya dapat menyebabkan penyakit jantung koroner dan stroke.

Atherosklerosis merupakan proses inflamasi kronis yang berkembang akibat akumulasi kolesterol pada *arterial intima* yang dilanjutkan dengan pembentukan plak atherosklerotik, umumnya terjadi pada arteri dengan ukuran sedang hingga besar. Faktor risiko yang berperan dalam atherosklerosis adalah hipertensi, *hyperglycemia*, dan *hypercholesterolemia*. Pembentukan plak pada atherosklerosis, melibatkan

exogenous antigen dan *endogenous* antigen. Antigen yang berperan penting saat pembentukan plak pada pasien dengan *hypercholesterolemia* adalah LDL yang mengalami oksidasi (oxLDL). Namun, studi menunjukkan bahwa antigen HSP60, protein yang berfungsi melindungi protein yang belum matur selama proses maturasi intraseluler, memiliki peran penting dalam patogenesis atherosklerosis. (Hansson, 2001) Protein ini dilepaskan dari sel yang mengalami *injury* saat inflamasi dan protein ini mampu memicu respon autoimun. Pada atherosklerosis, sel endothel yang mengalami kerusakan akan mengekspresikan HSP60 yang memicu respon autoimun yang berkembang menjadi atherosklerosis. Antigen HSP60 manusia ternyata memiliki kemiripan dengan HSP65 yang tereskrepsi dalam jumlah besar pada *Mycobacterium tuberculosis*.

Hingga saat ini, terapi atherosklerosis terus mengalami perkembangan pesat di era kedokteran yang sudah semakin modern. Namun, pada kenyataannya perkembangan terapi baru seperti statin hanya mampu mengurangi risiko kematian tidak lebih dari 40% dan dua per tiga penyakit jantung masih muncul meskipun sudah mendapatkan terapi. Hal ini disebabkan oleh mekanisme kerja statin yang hanya menurunkan kadar kolesterol di dalam darah. Selain terapi yang bekerja secara spesifik pada lesi atherosklerosis, kesadaran masyarakat terhadap risiko terjadinya penyakit jantung dan pembuluh darah juga memegang peran yang besar dalam mengatasi atherosklerosis. Studi menunjukkan, proses terjadinya atherosklerosis juga dipengaruhi oleh respon imun. Hal ini menjadikan respon imun sebagai target potensial dalam pengembangan obat atau vaksin atherosklerosis. Vaksin atherosklerosis diharapkan dapat secara spesifik bekerja pada lesi atherosklerosis dan berpengaruh pada setiap

factor resiko yang memicu munculnya atherosklerosis. Dengan upaya pembentukan respon imun sejak awal melalui metode vaksinasi, diharapkan komplikasi yang lebih berbahaya dapat dicegah. (Sherer and Shoenfeld, 2006).

Vaksinasi adalah tindakan preventif untuk mencegah terjadinya penyakit melalui regulasi sistem imun. Secara umum, sistem imun manusia dapat mengalami dua hal besar dalam menghadapi benda asing yaitu imunitas (kekebalan) dan toleransi (tidak reaktif). Vaksinasi pada penyakit infeksi diperoleh melalui peningkatan respon imun, namun pada penyakit autoimun dimana imunitas menyerang antigen dalam tubuh sendiri, peningkatan imunitas hanya akan memperburuk lesi. Induksi toleransi pada penyakit autoimun seperti atherosklerosis berpotensi mencegah terjadinya penyakit. Toleransi sistem imun dapat dicapai dengan induksi antigen melalui mukosa. Pemberian antigen dalam dosis rendah dan paparan berulang akan membentuk toleransi mukosa yang spesifik terhadap antigen tertentu. (Maron R *et al.*, 2002) Toleransi mukosa ini juga memengaruhi toleransi sistemik melalui peran dari sel T regulator (Treg). Sel Treg berperan dalam mensupresi sistem imun, sehingga toleransi spesifik antigen akan menurunkan respon imun terhadap antigen tersebut. Penurunan respon imun terhadap antigen pembentuk plak atherosklerosis pada akhirnya dapat menurunkan ketebalan aorta. Sel Treg adalah target yang potensial dalam meregulasi autoimun terhadap HSP60 pada atherosklerosis. (Puijvelde *et al.*, 2007). Selanjutnya, antigen HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* yang memiliki kemiripan dengan HSP60 manusia dan mudah didapatkan di duga dapat menjadi target potensial dalam pengembangan terapi atherosklerosis melalui metode vaksinasi. (Hansson and Libby, 2006)

Untuk mengetahui peran HSP65 yang diduga bersifat atheroprotektif melalui metode vaksinasi, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut khususnya tentang peran HSP65 dalam *peptida HSP65 Mycobacterium tuberculosis* dalam menginduksi toleransi mukosa pada atherosklerosis.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan peptida *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* mampu menurunkan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik?
2. Berapakah dosis vaksin atherosklerosis *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam menurunkan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum:

Memperoleh bukti bahwa peptida HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* berperan dalam progresivitas lesi atherosklerosis pada model atherogenik, sehingga dapat menjadi target baru dalam pengembangan vaksin untuk pencegahan atherosklerosis.

1.3.2 Tujuan Khusus:

1. Mengetahui pengaruh *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* dalam progresivitas lesi atherosklerosis, sehingga dapat menjadi target baru dalam pengembangan vaksin untuk pencegahan atherosklerosis.

2. Mengetahui penurunan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik setelah pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis*.

3. Mengetahui dosis vaksin atherosklerosis dari *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam menurunkan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik:

1. Menambah wawasan ilmu pengetahuan mengenai pencegahan atherosklerosis menggunakan vaksinasi.

2. Dasar teori untuk penelitian selanjutnya tentang penggunaan *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* sebagai vaksin pencegah atherosklerosis pada manusia.

1.4.2 Manfaat Praktis:

1. Menambah wawasan masyarakat luas tentang metode pencegahan atherosklerosis dengan vaksin atherosklerosis dari *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis*.

2. Bahan pertimbangan perusahaan industri obat untuk menciptakan metode vaksinasi yang baru dalam menghambat atherosklerosis melalui pemberian *peptida HSP65 Mycobacterium tuberculosis*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Atherosklerosis

2.1.1 Definisi Atherosklerosis

Atherosklerosis merupakan proses inflamasi kronis pada pembuluh darah arteri yang bersifat menyebar, progresif dan multifaktorial, ditandai dengan penebalan dan pengerasan dinding pembuluh darah yang disebabkan oleh pembentukan plak. Atherosklerosis disebut bersifat progresif karena proses yang terjadi secara berkesinambungan dengan peningkatan perburukan dari tahap awal hingga munculnya gejala klinis. (Nikolic *et al.*,2013) Proses pembentukan plak atherosklerosis mulai terjadi pada masa awal kehidupan. Berawal dari terbentuknya lesi berupa bintik lemak yang terlihat secara mikroskopis atau lesi tipe I. Berkembang menjadi garis lemak berwarna kuning yang disebut juga *fatty streak* atau lesi tipe II. Pada anak usia 5 sampai 15 tahun hampir 99% ditemukan lesi tipe II ini. Meskipun terus berkembang, lesi ini tidak selalu menjadi atherosklerosis, ada kalanya tidak menimbulkan gejala apapun hingga akhir hayat. Lesi tipe III terdiri dari kolesterol, makrofag, dan sel foam yang membentuk inti lipid atau *lipid core*, yang dilapisi oleh sel-sel otot polos, matriks ekstraselular yang menebal, disebut *fibrous cap*. Lesi ini mulai terjadi kira-kira umur 23-29 tahun. Selanjutnya plak berkembang menjadi semakin progresif membentuk *atheroma* atau lesi tipe IV yang dapat menyebabkan komplikasi berupa penyumbatan pembuluh darah dan menyebabkan infark jaringan. Manifestasi klinis muncul dalam bentuk penyakit jantung iskemik, jantung



koroner, infark miokardium, stroke, gangren, dan penyakit arteri perifer lainnya. (McGill *et al.*, 2000)

Atherosklerosis juga disebut memiliki sifat menyebar karena umumnya pembentukan lesi atherosklerosis pada tahap awal hanya terjadi di aorta abdominal dan cabang-cabang mayornya, arteri tungkai bawah, arteri koronaria dan arteri serebri. Namun pada perkembangannya, atherosklerosis akan memunculkan gejala klinis berupa penyakit kardiovaskuler seperti angina pectoris, gagal jantung, aneurisma aorta abdominal, serta dapat pula menyerang vaskularisasi serta organ tubuh lain seperti stroke, penyakit ginjal, dan gangrene. Selain itu, atherosklerosis juga bersifat multifaktorial, yang artinya penyebab utama dan spesifik dari atherosklerosis tidak dapat diketahui secara pasti. Atherosklerosis cenderung muncul karena akumulasi beberapa faktor risiko yang secara bersama-sama semakin memperburuk lesi. (Nikolic *et al.*, 2013)

2.1.2 Epidemiologi Atherosklerosis

Penelitian tahun 2004 di USA menunjukkan sebanyak 15,8 juta penduduk mengidap penyakit jantung koroner dan satu dari 5 kematian disebabkan oleh penyakit jantung koroner. Setiap tahun 700.000 orang Amerika mengalami kejadian pertama penyakit jantung koroner dan 500.000 mengalami rekurensi. Lebih dari 148.000 orang Amerika yang meninggal dunia tahun 2004 akibat penyakit kardiovaskuler berusia kurang dari 65 tahun. (P.P.Toth, 2008) Tahun 2005 dilakukan penelitian di UK dan memberikan hasil satu dari 17 kematian di UK disebabkan oleh stroke, 105.000 kematian terjadi akibat penyakit jantung koroner dengan

perbandingan 21% kematian pada pria dan 15% kematian pada wanita. Menurut data *American Heart Association* (AHA) pada Desember 2012, Cardio Vascular Disease (CVD) masih merupakan penyebab kematian terbesar di dunia. Rata-rata 2150 lebih orang di Amerika meninggal akibat CVD tiap harinya. Hal ini hampir sama dengan terjadi 1 kematian setiap 40 detik. Dari data tersebut juga didapatkan, tiap tahunnya jumlah kematian akibat CVD lebih besar daripada jumlah kematian akibat kanker dan *Chronic Lower Respiratory Disease* (CLRD). Angka kematian yang tinggi akibat atherosklerosis juga ditemukan di Indonesia. Berdasarkan data dari Ditjen Bina Yanmedik, hingga Agustus 2009, penyakit sistem sirkulasi darah menempati urutan pertama sebagai penyakit utama penyebab kematian di rumah sakit, terutama yaitu penyakit jantung koroner yang merupakan manifestasi atherosklerosis. Pada tahun 2007, penyakit sistem sirkulasi darah menyebabkan kematian dengan *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 11,02% dan meningkat pada tahun 2008 menjadi 11,06%.

Menurut NCHS (*National Center for Health Statistics*), jika semua jenis penyakit kardiovaskuler dapat dieliminasi, akan meningkatkan *life expectancy* sekitar 7 tahun, sebab probabilitas kematian akibat penyakit kardiovaskuler sebesar 47%. Suatu penelitian di US menyebutkan bahwa dari tahun 1994 hingga 2004, rasio kematian akibat penyakit jantung koroner menurun sekitar 24,7%. Pada periode yang sama, angka kematian yang sesungguhnya menurun sebesar 8%. Studi lain tentang penurunan angka kematian akibat penyakit kardiovaskuler di US periode 1980-2000 menyatakan bahwa 47% penurunan angka kematian karena keberhasilan

terapi dan 44% karena perubahan faktor risiko di populasi. (Wayne Rosamond *et.al*, 2008)

2.1.3 Faktor Risiko Atherosklerosis

Penyebab atherosklerosis sangat beragam oleh sebab itu atherosklerosis disebut bersifat multifaktorial. Faktor risiko atherosklerosis dapat diklasifikasikan sebagai faktor risiko klasik dan faktor risiko non klasik. Selanjutnya, faktor risiko klasik diklasifikasikan faktor risiko yang tidak dapat dikendalikan dan faktor risiko yang dapat dikendalikan. Faktor risiko yang tidak dapat dikendalikan berupa faktor genetik, gender, usia, dan fungsi fisiologis vaskuler bawaan yang kurang baik. Studi Nikolic *et al.* menyatakan bahwa manifestasi atherosklerosis lebih sering terjadi pada pria di banding wanita. Hal ini sebenarnya disebabkan oleh perbedaan waktu munculnya atherosklerosis. Pada wanita, ketika individu berusia kurang dari 55 tahun, tubuh masih di proteksi dari perkembangan atherosklerosis oleh keberadaan hormon esterogen. Sedangkan pada wanita yang berusia lebih dari 55 tahun, peluang munculnya atherosklerosis adalah sama besar dengan peluang kejadian pada pria berusia setara. Dari studi di atas dapat disimpulkan juga bahwa faktor risiko klasik lain yang juga berkontribusi dalam perkembangan atherosklerosis adalah usia. Studi Nikolic *et al.* memberikan hasil kejadian atherosklerosis terbanyak adalah pada pasien dengan usia 61-70 tahun. Selain gender dan usia, ada pula faktor penyebab atherosklerosis yang dapat dikendalikan sehingga dapat mengurangi risiko terjadinya atherosklerosis, seperti hiperkolesterolemia, hipertensi, dan merokok. Peningkatan asupan makanan, terutama yang mengandung

kolesterol, dapat mengurangi kemampuan sel mensintesis kolesterol menjadi HDL. Akibatnya, sintesis kolesterol terjadi di hepar dan menghasilkan LDL (*Low-Density Lipoprotein*) yang selanjutnya di transport ke sel. Kadar LDL disebut tinggi dalam darah apabila lebih dari 3,4 mmol/L, sedangkan kadar HDL (*High-Density Lipoprotein*) disebut rendah apabila kurang dari 1,8 mmol/L dengan total kolesterol lebih dari 5,2mmol/L. Kadar LDL yang tinggi, HDL yang rendah dan total kolesterol yang tinggi merupakan faktor risiko yang dapat memicu munculnya atherosklerosis. Selain itu, hipertensi juga diketahui berperan dalam perjalanan atherosklerosis. Hipertensi dapat memperberat atherosklerosis melalui proses kerusakan endotel, sehingga arteri yang telah kaku akibat atherosklerosis akan semakin mengalami kerusakan dan penurunan fungsi. Tekanan darah normal adalah dibawah angka 130/80mmHg. Angka sistole dan diastole 133/83 mmHg telah dikategorikan sebagai batas kelompok pre-hipertensi. Individu kelompok pre-hipertensi sudah harus memulai upaya perbaikan gaya hidup untuk mencegah munculnya atherosklerosis dan penyakit lain akibat hipertensi. Salah satu gaya hidup masyarakat yang berperan pula dalam perkembangan atherosklerosis adalah merokok. Rokok mengandung zat-zat yang dapat meningkatkan stress oksidatif endotel sehingga berakibat pada percepatan perkembangan lesi atherosklerosis. (Nikolic *et al.*,2013)

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, berbagai studi telah dilakukan untuk meneliti faktor-faktor risiko lain yang turut berperan dalam munculnya atherosklerosis. Sebuah studi menunjukkan adanya peningkatan kejadian atherosklerosis pada penderita penyakit autoimun

seperti *systemic lupus erythematosus* (SLE), *rheumatoid arthritis* (RA), dan *antiphospholipid syndrome*. Dari studi tersebut diketahui bahwa salah satu faktor yang menyebabkan munculnya penyakit SLE juga merupakan salah satu faktor risiko non klasik penyebab munculnya atherosklerosis, yaitu homocystein. Selanjutnya penelitian dilakukan pada penyakit RA dan memberikan hasil adanya induksi produksi mediator pemecah kolagen, salah satunya metalloproteinase. Mediator metalloproteinase ternyata juga diketahui berperan dalam menurunkan stabilitas plak atherosklerotik sehingga muncul manifestasi atherosklerosis. Studi berikutnya dilakukan pada penyakit antiphospholipid syndrome yang ditandai dengan peningkatan kadar antibodi antiphospholipid. Studi ini menunjukkan adanya peningkatan ketebalan arteri intima-media yang juga merupakan salah satu bagian dari perjalanan atherosklerosis. Dari studi tersebut diduga respon autoimun pada penyakit-penyakit autoimun dapat memicu atherosklerosis. Respon autoimun inilah yang kemudian diduga sebagai faktor non klasik penyebab munculnya atherosklerosis. (Nikolic *et al.*,2013)

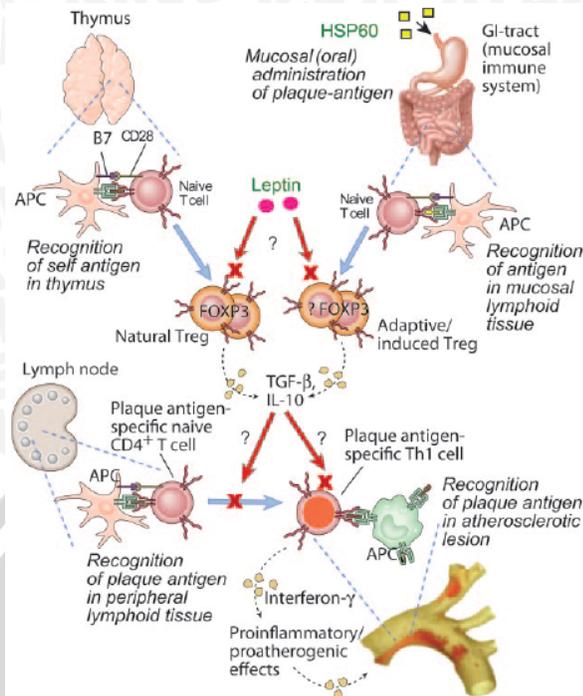


Figure. Treg and atherosclerosis. Natural Treg develop in the thymus and may be induced in peripheral tissues (adaptive/induced Treg). Naive T cells specific for plaque antigens (including HSP60) are activated by antigen presenting cells (APC) and differentiate into Th1 cells, which migrate into atherosclerotic lesions, are reactivated by lesional APCs, secrete INF-γ, and promote disease. Treg may suppress proatherogenic responses by blocking naive T cell or lesional Th1 activation. Treg suppression involves TGF-β, IL-10, and contact with APCs. Studies in this issue of *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* show that atheroprotective Treg may be induced by oral administration of HSP60 and may be inhibited by leptin.

(Israel Gotsman *et al*, 2007)

Gambar 2.1 Peran Sel T regulator pada Pathogenesis Atherosklerosis

2.1.4 Patogenesis Atherosklerosis

Atherosklerosis merupakan abnormalitas yang terjadi pada pembuluh darah akibat deposisi plak pada dinding pembuluh darah arteri. Proses pembentukan plak atherosklerosis ini bermula dari stimuli spesifik oleh kolesterol, lipid, serta tekanan darah yang tinggi pada sel-sel endotel arteri. Stimuli ini menyebabkan perubahan endotel secara cepat. Endotel yang teraktivasi oleh stimuli spesifik mengekspresikan HSP60, serta merekrut sel-sel leukosit mononuklear seperti monosit dan sel T untuk menempel pada endotel dengan diperantarai oleh *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (V-CAM-1) dan *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1). Selanjutnya, sel-sel leukosit mononuklear berdiferensiasi menjadi makrofag dan endositosis ke dalam dinding tunika intima melalui interaksi dengan reseptor *scavenger*. Makrofag ini mengangkut *oxidized* LDL (*oxLDL*), mengaktivasi sel T,

kemudian berubah menjadi sel foam. Sel T, khususnya sel T helper 1 (Th1) dibawa ke subendotel. Th1 memproduksi *Tumor Necrosis Faktor- α* (TNF- α), *interferon- γ* (IFN- γ), dan CD-40 Ligand, kemudian menginduksi produksi *growth factor* dan sitokin-sitokin seperti *interleukin* (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, dan IL-10 oleh makrofag. Sitokin-sitokin ini yang memicu proliferasi otot polos pembuluh darah dan pembentukan plak. Selain sel-sel tersebut, pada lesi atherosklerosis juga terdapat sel mast, sel dendritik dan sel B, namun jumlahnya sedikit. Endotel yang terus teraktivasi, perlahan mengalami disfungsi. Disfungsi endotel, *injury*, dan inflamasi memicu terjadinya ketidakseimbangan sel, serta terjadi perubahan respon endotel normal terhadap faktor-faktor antikoagulan. Endotel normal yang mulanya memiliki potensial antithrombogenik, telah berubah menjadi prothrombotik akibat disfungsi tersebut. Penurunan *nitric oxide* dan peningkatan stress oksidatif akibat disfungsi endotel juga memicu terjadinya proses inflamasi (Altman, 2003; Pastrana *et al.*, 2012; Sherer and Shoefeld, 2006)

Respon imun tubuh terhadap atherosklerosis juga dipengaruhi oleh upaya pertahanan tubuh terhadap sel tubuh individu itu sendiri dan mekanisme pertahanan tubuh terhadap benda asing dari luar tubuh. Mekanisme ini diperankan oleh sel T regulator. Sel T regulator adalah limfosit T yang berperan penting dalam memelihara toleransi tubuh dan mencegah terjadinya respon autoimun tubuh, termasuk dalam proses atherosklerosis. Sel T regulator natural berkembang dalam timus, kemudian berkembang di perifer menjadi sel T regulator adaptif. Sel T regulator diaktivasi oleh peptida antigen yang dipresentasikan oleh APC, kemudian mengekspresikan antigen spesifik sel T efektor. Sel T regulator mensupresi

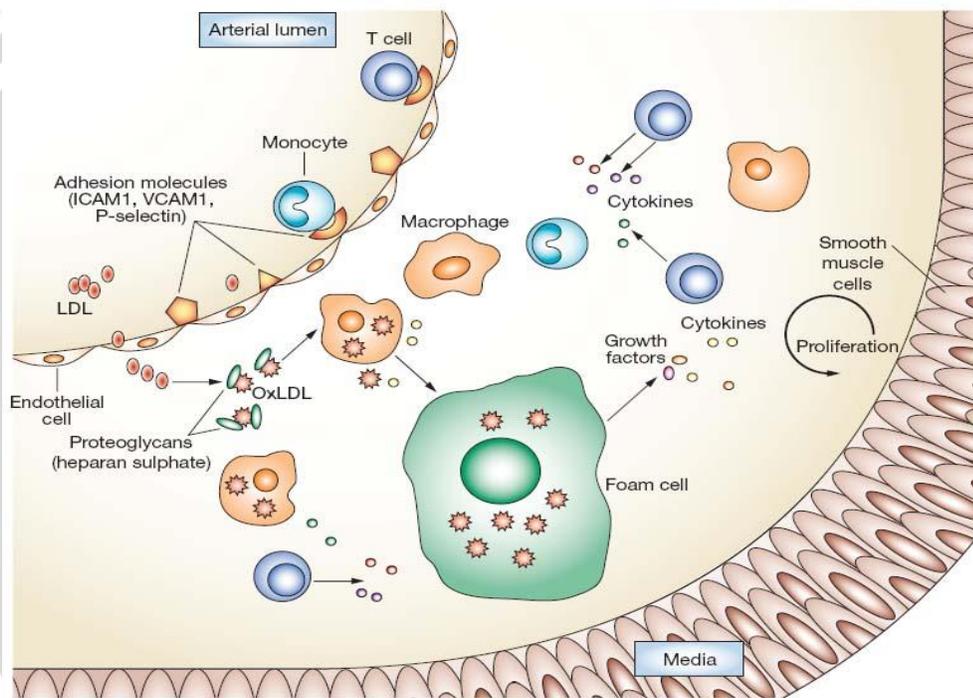
respons proatherogenik dengan mengblok sel T naïf atau menghambat aktivasi dari sel Th1. (Israel Gotsman *et al*, 2007) Sel T regulator juga berperan menghambat aktivasi dan proliferasi sel T efektor pada limfoid, serta menghambat migrasi sel T menuju ke tempat inflamasi. (A. Schiopu *et al.*, 2009) Mekanisme supresi lain oleh sel T regulator dilakukan dengan cara memproduksi CD4⁺ dan CD25⁺ yang menghambat respon imun melalui kontak antar sel. Faktor transkripsi yang menjadi karakter spesifik sel T regulator, FoxP3, juga memiliki peran penting dalam proses supresi respon imun. (Ziad Mallat *et al* 2003) Selain itu, sel T regulator mensekresi TGF- β yang merupakan sel Th3 di Peyer's Patches dan limfonodus mesentrika, serta memproduksi IL-10 untuk melakukan aktivitas supresi. (A. Schiopu *et al*, 2009) IL-10 akan menyebabkan *downregulation* respon imun yang patogenik sehingga dapat menurunkan perkembangan plak atherosklerosis dan proses inflamasi. Studi George J *et al* menyatakan kadar IL-10 dan sel T regulator yang tinggi ditemukan pada individu dengan plak atherosklerosis stabil. (Gotsman *et al.*, 2007; Pastrana *et al.*, 2012) Studi Taleb *et al* menunjukkan mekanisme atheroprotektif sel T regulator akan terhambat apabila produksi leptin meningkat. Leptin merupakan hormon yang diproduksi oleh sel adiposit, utamanya pada individu dengan obesitas. Leptin bersifat proatherogenik dengan efek kekakuan pembuluh darah arteri, meningkatkan stress oksidatif, serta menginduksi kalsifikasi sel pembuluh darah dan proliferasi otot polos. Berdasarkan studi tersebut, leptin diduga dapat menjadi faktor risiko atherosklerosis dan adanya disfungsi sel T regulator menyebabkan proses pembentukan lesi atherosklerosis bertambah

parah tanpa ada yang menghambatnya. (Gotsman *et al.*, 2007; Altman, 2003)

Pada individu dengan penyakit kardio-vaskuler juga ditemukan respon imun humoral yang ditandai dengan peningkatan kadar aCL (*Anticardiolipin Antibodies*), aPL (*Antiphospholipid Antibodies*), anti- β 2GPI, dan antibodi anti-oxLDL. aCL berperan menginduksi perlekatan monosit pada endotel yang di mediasi oleh ICAM-1, VCAM-1, dan E-Selectin. Studi sebelumnya menyatakan bahwa peningkatan kadar aCL ditemukan pada kejadian gagal jantung, stenosis arteri koronaria, kalsifikasi koronaria, angina pectoris, dan nyeri dada. Sedangkan β 2GPI ditemukan pada subendotel arteri dan lapisan intima-media di tepi plak atherosklerosis dengan dikelilingi sel T CD4⁺. Hal ini mendukung dugaan bahwa β 2GPI merupakan target reaksi autoimun yang selanjutnya menginduksi pembentukan lesi atherosklerosis. aPL berperan mempercepat pemasukan oxLDL ke dalam makrofag sehingga menginduksi pembentukan sel foam yang dapat meningkatkan ketebalan arteri intima-media. (Sherer and Shoenfeld, 2006)

Akumulasi partikel lipid dan sel-sel imun di tunika intima dinding arteri yang semakin bertambah banyak jumlahnya dan semakin membesar ukurannya, lama kelamaan akan mendesak keluar ke tunika media. Hal ini akan menyebabkan lumen pembuluh darah makin sempit, terjadinya ruptur plak lalu diikuti proses thrombosis. Permukaan lumen arteri yang terdapat atheroma berubah menjadi ireguler dan kadang juga terjadi proses pengikisan lumen, sehingga sel-sel endotel berkurang dan sisi tersebut menjadi rentan mengalami thrombosis akut. (Altman, 2003) Komponen sistem imun seperti makrofag, sel T, autoantibodi, autoantigen yang

merupakan komponen dinding pembuluh darah dan partikel kolesterol, serta sitokin-sitokin yang terdiri atas interleukin, TNF- α , IFN- γ , dan *platelet-derived growth factor* turut berperan pada proses perjalanan atherosklerosis. Berikutnya, proses ini akan memunculkan gejala yang khas pada penyakit arteri koronaria yaitu nyeri dada di daerah substernal, yang kemudian menjalar sampai ke lengan kiri, dagu, dan epigastrium. (Sherer and Shoenfeld, 2006)



(Sherer and Shoenfeld, 2006)

Gambar 2.2 Respon Imun pada Pathogenesis Atherosklerosis

Dari patogenesisnya, dapat disimpulkan bahwa respon imun yang terjadi pada atherosklerosis dapat dinilai melalui kadar sitokin dalam serum, serta melalui pengamatan kondisi dinding arteri terutama aorta. Peningkatan jumlah sel foam di dinding aorta akan meningkatkan ketebalan aorta hingga mengakibatkan penurunan diameter aorta. Berikut ini data Litmanovich *et al.* mengenai ukuran diameter aorta normal. (Litmanovich *et al.*, 2009)

TABLE 1: Maximal Normal Aortic Diameter

Segment	Size (cm)
Ascending	4
Descending thoracic	3
Abdominal	2

(Litmanovich *et al.*, 2009)**Tabel 2.1** Diameter Aorta Normal

2.2 Heat shock protein-60 (HSP60)

HSP60 merupakan protein dengan berat molekul 61,055kDa, tereksprei pada sel-sel endotel dan makrofag. Fungsi dasar HSP60 adalah di dinding arteri manusia. Molekul HSP60 secara umum memiliki fungsi pada kondisi normal atau kondisi *stressful*. Kondisi *stressful* adalah kondisi dimana terdapat paparan-paparan yang merusak endotel dan sel-sel lain di dinding arteri, misalnya *oxLDL*, stress biomekanik, infeksi, oksidan, dan sitokin-sitokin pada proses inflamasi. (Xu *et al.*, 2011) Pada kondisi *stressful*, HSP60 berperan memperbaiki atau mencegah degradasi protein yang terdenaturasi dan meningkatkan kemampuan sel-sel untuk bertahan terhadap stimuli yang mengancam. (Puijvelde *et al.*, 2007) Pada keadaan normal, HSP60 berada pada level intraseluler atau berada di dalam sel dan tereksprei pada sitoplasma, mitokondria, reticulum endoplasma, dan nukleus. Saat itu, HSP60 berperan sebagai molekul chaperon dan menyelubungi protein-protein, sehingga mencegah agregasi antar sel-sel tersebut. Apabila HSP60 berada pada level ekstraseluler atau berada diluar sel, hal ini menandakan terdapat proses kematian sel dan merupakan sinyal yang penting bagi respon imun untuk mengaktifkan makrofag dan sel-sel

imun lain untuk membersihkan sel yang mati tersebut. Disini HSP60 memicu terjadinya respon imunogenik. (Xu *et al.*, 2011) Oleh sebab itu, HSP60 dapat menjadi mediator yang penting dalam jalur proteksi, namun HSP60 dapat pula menjadi target autoimun yang mengarah pada proses atherosklerosis. (Kilic and Mandal, 2012)

Studi Khauzik Mandal, 2005, menunjukkan bahwa HSP60 berperan penting dalam pembentukan plak atherosklerosis. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan HSP60 memengaruhi pengeluaran mediator proinflamatori pada adiposit tikus. Mediator proinflamatori tersebut selanjutnya menyebabkan pengeluaran sinyal-sinyal yang memicu pengeluaran sitokin-sitokin. Kadar HSP60 yang tinggi pada adiposit memicu preadiposit dan sel otot lurik yang dapat diaktivasi *via Toll-Like Receptor-4* (TLR-4). TLR-4 ini terekspresi dengan kadar rendah pada endotel normal, namun meningkat pada makrofag dan endotel yang mengandung lesi atherosklerosis. Ekspresi TLR-4 berhubungan dengan keberadaan HSP60. (Altman, 2003; Wellen KE, 2005).

Studi lain menyatakan bahwa kadar HSP60 yang sangat meningkat dapat ditemukan pada penderita obesitas. Keadaan ini mampu memicu respon imun bawaan dan adaptif yang mengawali tahap inflamasi atherosklerosis yang *reversible*. Secara struktural, HSP60 diekspresikan dengan sangat tinggi oleh sel prokariotik dan sel eukariotik pada kondisi stress yang tinggi. Studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa pada atherosklerosis, faktor risiko dapat bertindak sebagai *stress endothel* yang menginduksi ekspresi molekul adhesi pada permukaan sel seperti VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 dan ekspresi HSP60 di mitokondria, di sitoplasma dan

pada permukaan sel. Molekul HSP60 mampu berekspresi secara ekstraseluler hingga menginduksi TNF- α dan *matriks metalloproteinase* (MMP)-9 yang diproduksi oleh makrofag. HSP60 mampu mengaktifkan sel endotel, sel otot polos dan monosit. Selain itu, HSP60 mampu menginduksi E-selectin, ICAM-1, dan VCAM-1 yang diekspresikan pada sel endotel, serta menginduksi IL-6 oleh sel endotel, sel otot polos, dan makrofag. Molekul HSP60 memberikan sinyal berbahaya pada imunitas tubuh sehingga terjadi respon proinflamasi meliputi produksi TNF- α , IL-12, dan IL-15 yang selanjutnya menginduksi inflamasi. Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel untuk menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam menginduksi inflamasi sistemik. IL-12 merangsang produksi IFN- γ oleh sel *natural killer* (NK) dan sel T. IL-12 juga memicu diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi sel Th1 yang memproduksi IFN- γ . IFN- γ sendiri berperan sebagai pengaktivasi makrofag. Ekspresi HSP60 berfungsi sebagai sinyal untuk reaksi imun seluler dan humoral yang bersifat atherogenik. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa HSP60 adalah antigen yang bersifat atherogenik dan mampu mengaktifkan fungsi sel imun hingga memicu atherogenesis. (Cecilia Grudmant, 2011; Kilic and Mandal 2012).

Pada pasien dengan atherosklerosis, antibodi spesifik HSP60 dapat dideteksi di serum, selain itu koloni sel T yang spesifik HSP60 dapat ditemukan di plak. Studi yang dilakukan oleh Mallat et al menyatakan bahwa pada perjalanan atherosklerosis diduga terdapat ketidakseimbangan sel T patogenik dan sel T regulator spesifik yang berperan mencegah proses autoimun. Hal ini menunjukkan bahwa HSP60 memiliki kemampuan

menginduksi inflamasi dan berperan dalam proses autoimun pada atherosklerosis, namun berpotensi untuk dikendalikan melalui sel T regulator. (Puijvelde *et al.*, 2007)

TABLE 1: Functions of heat shock proteins.

Heat shock protein molecular weight (kilodaltons)	Function	Pathologic associations
60	Protein folding	Atherosclerosis
	Protein unfolding	Rheumatoid arthritis
	Polypeptide assembly	Systemic sclerosis
	Protein translocation across membranes	Schizophrenia
		Diabetes mellitus

(Kilic and Mandal, 2012)

Tabel 2.2 Peran HSP60 dalam pathogenesis Atherosklerosis

2.3 Heat shock protein-65 (HSP65) *Mycobacterium tuberculosis*

HSP65 adalah kelompok protein yang bersifat homolog pada spesies yang berbeda, misalnya bakteri dan manusia. Terdapat lebih dari 95% sekuen homolog antara berbagai macam bakteri, termasuk HSP65. *Mycobacterium tuberculosis*. Sekitar 50-55% sekuen homolog juga terdapat pada HSP60 manusia dan HSP65 mycobacterial. (Kilic and Mandal, 2012)

Molekul HSP60 pada manusia memiliki kemiripan dengan HSP65 *Mycobacterium tuberculosis*. Bahkan antibodi spesifik HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* mampu berikatan dengan HSP60 manusia. HSP 60/65 adalah 97% homolog dan memiliki rantai asam amino 70%. Dengan menekan ekspresi HSP 60 oleh arteri yang terbentuk plak maka anti HSP 65 berkontribusi pada atherosklerosis melalui mimikri antigen. (Harats *et al.*, 2002)

Studi Xu *et al* pada awal tahun 1990 merupakan yang pertama kali mengungkapkan adanya hubungan antara antibodi anti-HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dengan atherosklerosis. Survei dilakukan pada pasien usia 40-79 tahun dengan lesi atherosklerosis karotis dibandingkan

dengan pasien tanpa lesi atherosklerosis karotis dan ditemukan kadar serum antibodi melawan HSP65 (anti-HSP65) meningkat signifikan pada pasien dengan lesi atherosklerosis karotis. (Xu *et al.*, 2011) Studi lain melakukan transfer pasif sel T mencit yang telah di injeksi rekombinan HSP65 mycobacterial kepada mencit yang tidak diinjeksi HSP65 mycobacterial. Hasil yang diperoleh adalah terjadi perkembangan lesi atherosklerosis pada mencit yang tidak diinjeksi HSP65 mycobacterial namun diberi transfer pasif sel T. Hal ini juga diujikan pada kelinci dan memberikan hasil yang serupa. Pada kelinci yang diberi diet tinggi kolesterol bersamaan dengan induksi HSP65 mycobacterial menunjukkan perkembangan lesi atherosklerosis yang lebih parah. (Kilic and Mandal, 2012) Hal ini menjadi dasar dilakukan penelitian pada mencit C57BL/6 yang diberi diet tinggi kolesterol dengan diinduksi HSP65 *M.tuberculosis*, *M.tuberculosis* atau *phosphate buffer saline* (PBS). Hasil penelitian tersebut adalah mencit yang di induksi HSP65 *M.tuberculosis* atau *M.tuberculosis* lebih cepat mengalami atherosklerosis dibanding mencit yang di induksi PBS. (Sherer and Shoenfeld, 2006)

Table 1. *Heat shock protein families*

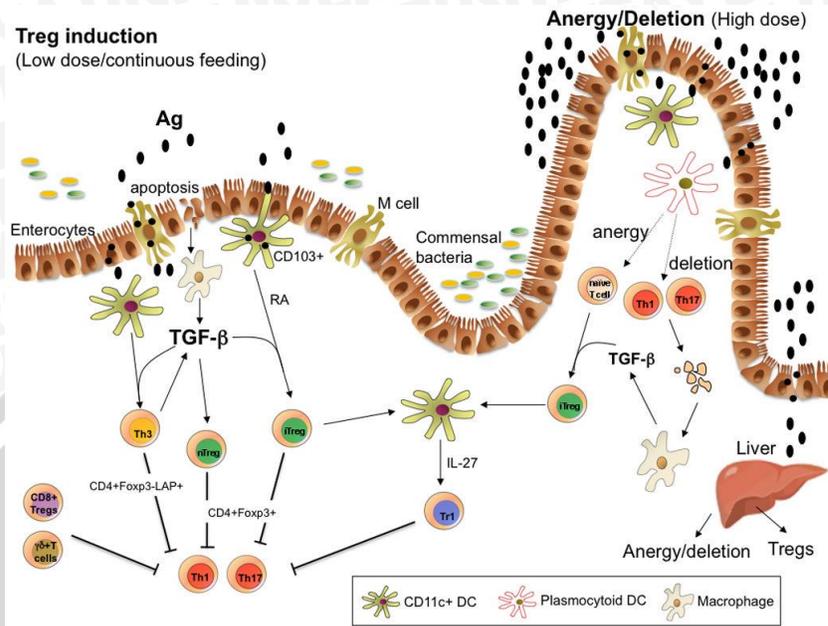
Family	Members/Other Names	Physiological Function	Pathological Involvement
HSP10	HSP10, HSP17	Promotes substrate release with HSP60; cofactor for HSP60	Heart disease
HSP27	HSP27, HSP28 HSP22, α A-crystallin HSP23, α B-crystallin	ER β -associated protein; F-actin assembly; molecular chaperones	Atherosclerosis
HSP40	HSP32, HO-1 HSP40, Hdj-1 HSP47	Guide protein folding; binding and transport of collagen	?
HSP60	HSP58, GroEL HSP60, HSP65 Grp58	Assemble polypeptides; translocate proteins across membranes; accelerate protein folding and unfolding.	Adjuvant arthritis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, diabetes mellitus, systemic sclerosis, schizophrenia

(Xu *et al.*, 2011)**Tabel 2.3** Hubungan HSP60 dan HSP65 dengan Atherosklerosis

2.4 Mekanisme Toleransi Imun

Toleransi imun adalah keadaan sistem imun adaptif yang tidak responsif secara spesifik terhadap suatu antigen. Toleransi imun diperoleh karena adanya paparan antigen yang sama pada waktu sebelumnya. Keseimbangan populasi sel T dan sel B efektor dengan populasi sel T regulator akan mempengaruhi kualitas respon imun adaptif untuk menghasilkan toleransi imun, baik terhadap antigen *non-self* atau antigen *self*. (Sakaguchi *et al.*, 2008) Mekanisme toleransi imun pada atherosclerosis terjadi melalui penghapusan sel T autoreaktif di timus atau melalui perubahan reseptor kompleks. (Pastrana *et al.*, 2012)

Studi Miller SD *et al* menyebutkan suatu peluang terapi bagi penyakit alergi, inflamasi dan autoimun melalui mekanisme induksi toleransi imun perifer. Kemampuan sel T regulator dalam mensupresi respon imun pada penyakit autoimun dan atherosclerosis telah dibuktikan dalam beberapa studi. Induksi toleransi imun dengan pemberian autoantigen melalui rute mukosa, baik nasal maupun oral, telah terbukti dapat menurunkan perkembangan atherosclerosis pada model hewan coba. (Pastrana *et al.*, 2012)



(Pastrana *et al.*, 2012)

Gambar 2.3 Mekanisme Induksi Toleransi Mukosa

Mekanisme toleransi mukosa ditunjukkan pada gambar diatas, dimana antigen melewati mukosa *Nasal Associated Lymphoid Tissue* (NALT), dapat melewati sel M kemudian ditangkap oleh *Dendritic Cells* (DC). DC mampu menginduksi perubahan Foxp3 menjadi sel T regulator yang juga dipengaruhi oleh TGF- β dan IL-10. Makrofag juga mengalami stimulasi untuk memproduksi TGF- β setelah mengambil sel epitel dan sel T yang mengalami apoptosis. Induksi toleransi mukosa dapat mengarahkan pada sel Th1 dan sel Th2 atau aktivasi sel T regulator tergantung pada dosis administrasi dari antigen. (Gotsman *et al*, 2007) Antigen pada dosis rendah akan menginduksi toleransi melalui sel T regulator, sedangkan pada dosis tinggi akan menginduksi terjadinya *anergy*. (Weiner LH *et al*, 2005)

Studi Van Puijvelde *et al* memberikan hasil bahwa induksi toleransi melalui mukosa oral dengan HSP60 dan peptida kecil HSP60 dapat menurunkan ukuran plak atherosklerosis pada mencit *Ldlr*^{-/-} secara

signifikan. Penelitian sebelumnya menunjukkan efek tolerogenik dan atheroprotektif berhubungan dengan peningkatan aktivitas sel T regulator. Toleransi mukosa melalui oral dengan HSP60 pada mencit atherosklerosis berhubungan dengan peningkatan kadar sel T regulator di jaringan lymphoid, serta menunjukkan peningkatan produksi IL-10 dan TGF- β ex-vivo oleh sel T mencit. Marker sel T regulator (FoxP3, CTLA-4, dan CD25) juga mengalami peningkatan pada lesi atherosklerosis setelah induksi HSP60 melalui oral.(Gotsman *et al.*, 2007)) Studi Marker *et.al* menunjukkan paparan HSP60 pada adiposit manusia dengan konsentrasi $\leq 0,05 \mu\text{g}$ tidak berhasil memicu produksi sitokin proinflamatori. Sedangkan paparan HSP60 dengan konsentrasi $\geq 0,05 \mu\text{g}$ menunjukkan produksi sitokin proinflamasi secara signifikan. Selain itu, studi Maron *et.al* menunjukkan induksi HSP65 Mycobacterium melalui mukosa nasal mencit dengan dosis $1 \mu\text{g}$ mulai menunjukkan efek proliferasi dan sekresi sitokin proinflamasi. (Maron *et al.*, 2002)

mencit Balb/c akan menginduksi peningkatan kadar oxLDL dalam darah mencit. Peningkatan kadar oxLDL merupakan salah satu stimuli spesifik yang dapat mengaktivasi endotel. Endotel yang teraktivasi akan menyebabkan peningkatan ekspresi HSP60 di endotel.

HSP60 merupakan protein yang berperan menyelubungi dan melindungi sel-sel dalam keadaan yang normal. Pada keadaan dengan stress endotel, HSP60 akan terekspresi dalam jumlah yang besar sebagai penanda adanya kerusakan serta sebagai sinyal bagi sel-sel imun untuk memproduksi sitokoin-sitokin yang berperan dalam regulasi imunitas tubuh. Peningkatan ekspresi HSP60 ini akan memicu respon autoimun melalui peningkatan aktivitas sel T efektor. Selanjutnya sel T efektor akan menstimulasi makrofag untuk berdiferensiasi menjadi sel foam melalui proses endositosis lipid. Peningkatan aktivitas T efektor juga tampak pada aktivitas Th1 yaitu sekresi TNF- α , CD 40 dan IFN γ . Peningkatan sekresi produk Th1 akan menginduksi sekresi sitokin-sitokin proinflamasi IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 dan IL-10 oleh makrofag. Hal ini yang menyebabkan terjadinya proliferasi otot polos pembuluh darah masuk ke dalam lesi sehingga bersama dengan akumulasi sel foam membentuk plak atherosklerosis.

HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* memiliki sifat homolog HSP60. Melalui kemiripan sifat dan struktur kedua HSP ini, maka diharapkan paparan HSP65 akan merangsang imunitas terbentuk lebih dini dengan cara menekan ekspresi HSP60 dari endotel. Dengan menekan ekspresi HSP 60 oleh arteri yang terbentuk plak maka anti HSP 65 berkontribusi pada atherosklerosis melalui mimikri antigen.. Hal ini diharapkan dapat

menghambat progresifitas lesi atherosklerosis. HSP65 diinduksikan melalui mukosa untuk menciptakan respon imun toleransi. Induksi HSP65 melalui mukosa dapat mensupresi populasi sel T efektor sehingga jumlah sel T regulator akan meningkat. Peningkatan sel T regulator kemudian akan menyebabkan peningkatan produksi sitokin supresif seperti IL-10, IL-35 dan TGF- β . Pada akhirnya sitokin supresif ini yang akan mensupresi sel T efektor dan menghambat proses autoimun pada atherosklerosis.

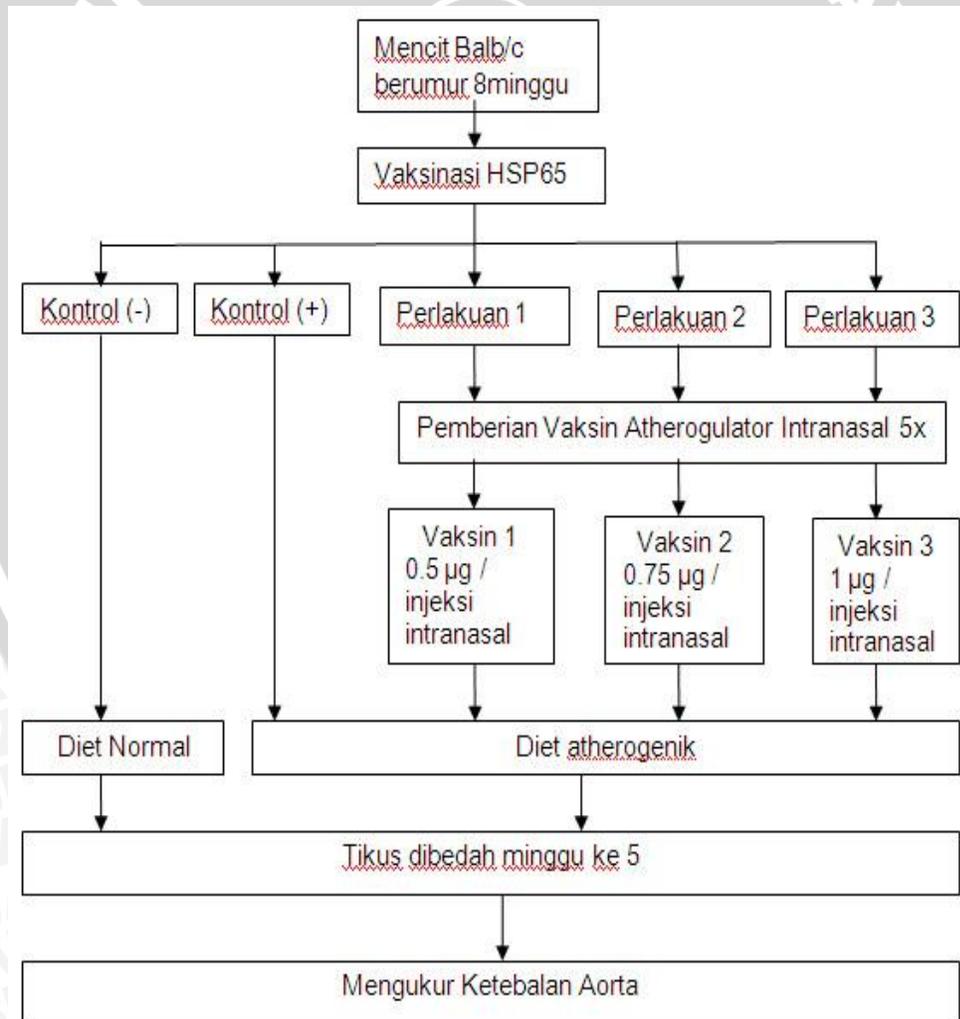
3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan peptida *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* mampu menurunkan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik
2. Dosis vaksin atherosklerosis *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam menurunkan ketebalan aorta pada model *Mencit balb/c* yang diberikan diet atherogenik adalah 1 μ g

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan Randomized Post Test Only Controlled Group Design. Desain penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Alur Kerangka Kerja Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi hewan coba diperoleh dari Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dan dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba yang dipakai adalah 30 ekor mencit. Pemeliharaan dilakukan di dalam kandang yang dijaga kebersihannya dan diberi makan setiap hari. Berikut kriteria inklusi hewan coba :

1. Mencit galur BALB/c
2. Umur 6-8 minggu
3. Berat badan \pm 20-40 gram
4. Jenis kelamin jantan
5. Dalam keadaan sehat selama penelitian

Sedangkan kriteria eksklusi hewan coba adalah mencit yang selama penelitian tidak mau makan, mencit yang kondisinya menurun atau sakit dalam masa persiapan atau adaptasi.

Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode rancangan acak lengkap atau *randomized completely design* mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini memungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Supranto, 2000):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(5-1) (r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah 5. Sedangkan satu ekor sisanya untuk cadangan. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 30 ekor mencit.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Farmakologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari hingga Agustus 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin aterosklerosis menggunakan Peptida HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dengan adjuvant Phosphate Buffered Saline (PBS) yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan diet atherogenik dan tanpa diberikan vaksinasi)
2. Kelompok II: kelompok kontrol positif (mencit yang diberi diet atherogenik tanpa diberikan vaksinasi)
3. Kelompok III: mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 0,5 µg/ oral
4. Kelompok IV: mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 0,75 µg/ oral

5. Kelompok V: mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 1 µg/ oral

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: ketebalan aorta.

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi : jenis mencit, umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan awal, kondisi lingkungan kandang, pemberian vaksin HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* intranasal, komposisi dan ukuran diet atherogenik serta diet normokolesterolemia.

4.5 Definisi Operasional

1. Vaksinasi : metode pencegahan penyakit pada individu dengan cara menginjeksikan bagian dari agen penginfeksi (telah dilemahkan). Hal ini bertujuan agar agen penginfeksi dikenali oleh tubuh sebagai benda asing, lalu tubuh akan membentuk imunitas spesifik terhadap agen tersebut, sehingga pada saat terjadi paparan yang sesungguhnya oleh agen penginfeksi, tubuh telah siap dengan imunitas yang terbentuk pada paparan awal (vaksinasi). (Jenner, 2002)
2. *Heat Shock Protein (HSP)-65* : Heat Shock Protein adalah protein dengan kemampuan hidup yang lama dan bersifat immunogenic (memicu respon imun). Utamanya, HSP berperan untuk melindungi sel-sel yang ada dalam kondisi "stressful". Namun pada suatu kondisi, HSP bisa menjadi target sistem imun sehingga menimbulkan efek autoimun. (Moudgil, 2013) Sedangkan HSP65 adalah HSP yang terekspresi dalam jumlah yang besar pada *Mycobacterium tuberculosis*. (Kilic and Mandal, 2012)

3. *Mycobacterium tuberculosis* : bakteri tahan asam yang merupakan bagian dari strain bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC). (MikrobeWiki)
4. Aorta : trunkus utama pembuluh darah yang mengoksigenasi darah ke jaringan tubuh untuk memberi nutrisi. Diklasifikasikan berdasarkan posisinya yaitu aorta asenden, arkus aorta, aorta desenden, aorta thoracica dan aorta abdominal. Aorta asenden terletak di atas ventrikel kiri dengan diameter sekitar 3 cm dan panjang sekitar 5 cm. Aorta asenden memiliki pembuluh darah cabang yaitu arteri koronari kanan dan arteri koronari kiri yang menutrisi jantung. Arkus aorta menghubungkan aorta asenden dan aorta desenden dengan membentuk 2 kurvatura, yaitu menuju ke atas kanan dan menuju ke bawah kiri. Arkus aorta memiliki 3 cabang utama yaitu arteri inominata atau brachiocephalica, arteri karotis kiri, dan arteri subclavia kiri. Aorta desenden terletak di sebelah kiri kolumna vertebra dengan diameter sekitar 1,75 cm. (Gray, 1918)
5. Mencit model atherosklerosis : mencit di induksi dengan diet tinggi kolesterol untuk memicu atherosklerosis. Atherosklerosis berasal dari bahasa Yunani "athera" yang artinya bubur dan sklerosis yang artinya pengerasan. Atherosklerosis merupakan salah satu jenis arteriosklerosis yang menyerang arteri ukuran sedang dan besar. Bercak seperti bubur berasal dari penumpukan lemak kolesterol pada lapisan intima lumen pembuluh darah yang berakibat pada penebalan dinding pembuluh darah dan hilangnya elastisitas arteri, disertai perubahan degenerasi lapisan media dan intima. Pada bagian tengah bercak terdapat gumpalan lemak, yang disebut atheroma, menonjol ke dalam lumen pembuluh darah dan dapat menyumbat aliran darah, hingga akhirnya menimbulkan komplikasi yang serius. Terdapat

mekanisme inflamasi yang memicu respon autoimun pada perjalanan penyakit atherosklerosis. (Lumongga, 2007)

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Perawatan mencit

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 5 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 5 buah, botol air 10 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius

4.6.2 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normokolesterolemia

Alat yang digunakan mimbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling, nampan. Bahan yang digunakan untuk komposisi diet normokolesterolemia pada makanan mencit dapat dilihat di tabel berikut.

Bahan	Komposisi (100gg ⁻¹)
Tepung terigu	50.00
Tepung beras	11.25
Dedak gandum	19.00
Kasein	08.00
Putih telur	10.00
Minyak kedelai	01.00
Garam dapur	00.50
Vitamin*	0.125
Mineral*	0.125

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normokolesterolemia

(Pellizon, 2008)

4.6.3 Pembuatan Vaksin Atherosklerosis

Pembuatan vaksin atherosklerosis dilakukan dengan mencampurkan antigen peptide HSP65 Mycobacterium tuberculosis dengan phosphate buffered saline (PBS).

4.6.4 Pemberian Diet Atherogenik

Pembuatan diet atherogenik dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan mencit umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 15gr/100 gBB sehingga komposisi untuk tiap mencit perlakuan adalah 5gr yang terdiri dari campuran chow, 15% lemak dari minyak kelapa, 1.25% kolesterol, dan 0.5% cholic acid. Diet atherogenik diberikan selama 6 minggu pada kelompok perlakuan 2, 3, 4, dan 5. (Pellizon, 2008)

4.6.5 Injeksi Vaksin Atherosklerosis

Injeksi intranasal dilakukan dengan menggunakan mikropipet 10 μ L. Injeksi diawali dengan pembiusan hewan coba menggunakan kloroform. (Maron et al., 2002; Marker et al., 2012)

4.6.6 Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pembedahan mencit dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh mencit yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut dengan gunting bedah. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil aortanya dan fiksasi ke dalam wadah berlabel berisi formalin 10%.

4.6.7 Pembuatan Slide Sampel

Aorta yang telah diperoleh melalui pembedahan selanjutnya dipotong secara melintang dan dilakukan pengecatan menggunakan hematoxillin eosin (HE). Pengecatan HE bertujuan untuk mengukur ketebalan aorta.

4.6.8 Pengukuran Ketebalan Aorta

Slide yang telah dicat dengan HE kemudian di-scan dengan mikroskop dengan scanner pada laboratorium patologi anatomi. Kemudian gambar yang diperoleh, dianalisa ketebalan aorta pada software Olympus.

4.6.9 Analisis Statistik

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian untuk menentukan varian data sama atau tidak. Jika sebaran data normal dan varian data sama, digunakan uji hipotesis *one way anova*. Untuk melihat perbedaan tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc*. Penelitian bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 16.

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

4.7.1 Persiapan hewan coba

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c jenis kelamin jantan berusia 6-8 minggu. Mencit dipelihara di laboratorium

Parasitologi FKUB di dalam kandang berupa bak plastik yang ditutup kawat kasa. Tiap kandang mencit berisi 6 ekor mencit dan diberi label pada masing-masing kandang sesuai kelompok perlakuan (kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3)

4.7.2 Adaptasi hewan coba

Proses adaptasi mencit dilakukan selama 14 hari. Setiap hari mencit diberi makan diet normokolesterolemia dan minum air matang sekali dalam sehari dengan komposisi yang sesuai. Botol minum di cuci setiap hari sebelum di ganti dengan air minum yang baru. Kandang mencit dibersihkan dan di ganti sekam setiap tiga hari sekali. Saat membersihkan kandang, mencit dipindahkan ke bak plastik lain untuk sementara. Pemandahan mencit dilakukan dengan hati-hati agar tidak menyakiti mencit.

4.7.3 Vaksinasi HSP65

Preparasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* (bioWorld) merupakan 100 µg HSP65 dalam volume sebesar 50 µL. Sehingga dilakukan penghitungan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$. Karena jumlah antigen yang masuk dalam satu kali injeksi intranasal pada perlakuan 1, 2, dan 3 berturut-turut adalah 0,5 µg, 0,75 µg, dan 1 µg, maka pemberian PBS sebagai pelarut disesuaikan dengan volume yang dibutuhkan. Vaksinasi dilakukan dengan cara subyek penelitian difiksasi pada bagian leher menggunakan tangan agar lubang hidung mencit dapat diinjeksikan vaksin atherosclerosis. Injeksi vaksin terbagi menjadi tiga dosis 0,5µg/0,5µL, 0,75µg/0,5µL, dan 1 µg/0,5 µL. Vaksinasi dilakukan sebanyak 3 kali seminggu dengan selang 2 hari, yaitu

pada hari ke 1, 3, dan 5, dan dilanjutkan pada minggu kedua sebanyak 2 kali yaitu pada hari ke 7 dan 9. Vaksinasi tidak diberikan pada mencit kontrol positif dan kontrol negatif. (Maron et al., 2002; Xu et al., 2011; Marker et al., 2012).

4.7.4 Pemberian diet atherogenik

Kelompok kontrol negatif diberi diet normokolesterolemia sejak adaptasi sampai saat pembedahan. Sedangkan kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 setelah diberi vaksin HSP65 mulai diberi diet atherogenik setiap hari selama 5 minggu. Kebutuhan makan mencit umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 15g/100 gBB sehingga komposisi untuk tiap mencit perlakuan adalah 5 gram yang terdiri dari campuran chow, 15% lemak dari minyak kelapa, 1.25% kolesterol, dan 0.5% asam kolat. (Pellizzon, 2008)

4.7.5 Pembedahan mencit

Mencit dibedah pada minggu ke 12 di laboratorium Parasitologi FKUB. Semua anggota kelompok wajib menggunakan sarung tangan dan masker selama proses pembedahan. Sebelum di bedah, mencit di anastesi dengan dimasukkan ke dalam toples berisi kloroform. Mencit yang telah di anastesi diletakkan diatas alas dari sterofoam dalam posisi telentang. Keempat kaki mencit difiksasi dengan jarum pentul di alas sterofoam. Pembedahan diawali dengan menggunting kulit di bagian perut mencit. Lalu darah dari jantung diambil dengan spuit 1ml secara cepat sebelum mencit mati. Aorta mencit dipotong dan diletakkan ke dalam wadah plastik berisi formalin 10%, di tutup,

dan disimpan dalam freezer -20°C . Tiap wadah plastik yang berisi aorta diberi label sesuai kelompok mencit. Setelah pembedahan selesai, bangkai mencit dikubur dan ruangan bedah laboratorium parasitologi dibersihkan.

4.7.6 Pembuatan preparat

Jaringan aorta dipotong setebal $3\text{-}5\mu\text{m}$, ditempelkan pada slide glass dan difiksasi dengan aseton 2-3 menit. Lalu masukkan dalam icebox 4°C . Fiksasi slide glass dengan formalin 10% dan didiamkan 7 menit. Cuci dengan aquades selama 3 menit dengan 2 kali pengulangan. Ditambahkan propylene glycol 100% selama 5 menit dengan 2 kali pengulangan, setiap selesai masing-masing pengulangan slide glass dibersihkan (seka) dengan tisu. Tambahkan oil red O dan didiamkan 7 menit dengan 2 kali pengulangan. Kemudian cuci dengan propylene glycol 85% selama 3 menit. Cuci dengan aquades selama 3 menit dengan 2 kali pengulangan, setiap selesai masing-masing pengulangan dibersihkan (tanpa mengenai preparat) dengan tisu. Dilakukan counterstaining dengan Meyer's Hematoxilen dan didiamkan selama 10 menit. Cuci dengan aquades selama 3 menit, diangin-anginkan \pm 5-10 menit. Mounting dengan gelatin dan hitung dengan mikroskop atau software apabila menggunakan foto scan preparat. (Karlina, R., 2008)

4.7.7 Pengukuran ketebalan aorta

Foto scan preparat dibuka dengan software khusus untuk mengukur ketebalan aorta. Data ketebalan aorta diperoleh dari hasil pengukuran masing-masing sampel mencit pada 5 kali lapangan pandang, lalu diambil

reratanya. Hasil masing-masing sampel kembali dikelompokkan sesuai kelompok perlakuan mencit. (Karlina, R., 2008)

4.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data : menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p>0,05$). Karena itu untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis digunakan uji parametrik
2. Uji homogenitas varian : menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen. Bila homogenitas normal maka dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA
3. Uji *One Way ANOVA* : digunakan jika sebaran data normal dan varian data sama
4. Post Hoc test (uji Tuckey HSD) : uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p<0,05$). Uji ini digunakan untuk melihat perbedaan setiap kelompok sebagai lanjutan dari uji *One Way ANOVA*
5. Uji homogenous subsets : menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji Tuckey.
6. Uji korelasi Pearson : menunjukkan hubungan antara dua atau lebih variabel berskala ordinal jika data berdistribusi normal.

Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 16 (Andika, 2009)



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

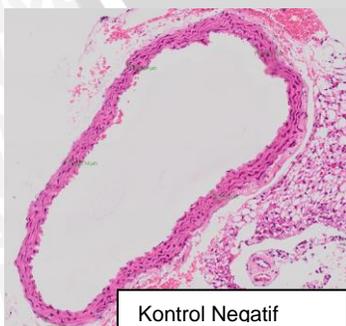
Pada penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit Balb/C jantan berusia 8 minggu dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan I adalah 6 ekor mencit kontrol negatif yang diberi diet normal. Kelompok perlakuan II adalah 6 ekor mencit kontrol positif yang diberi diet atherogenik tanpa di terapi. Kelompok perlakuan III adalah 6 ekor mencit yang diberi diet atherogenik dan di terapi dengan HSP65 dosis 0,5 μ g. Kelompok perlakuan IV adalah 6 ekor mencit yang diberi diet atherogenik dan di terapi dengan HSP65 dosis 0,75 μ g. Kelompok perlakuan V adalah 6 ekor mencit yang diberi diet atherogenik dan di terapi dengan HSP65 dosis 1 μ g. Berikut ini adalah data ketebalan aorta masing-masing kelompok perlakuan mencit yang di ukur setelah perlakuan selama 5 minggu.

Perlakuan	Rata-rata Ketebalan Aorta (μ m)
I (Kontrol Negatif)	35,67
II (Kontrol Positif)	45,02
III (Dosis 0,5 μ g)	39,87
IV (Dosis 0,75 μ g)	37,36
V (Dosis 1 μ g)	32,59

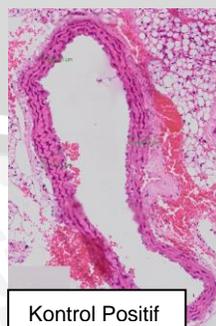
Tabel 5.1 Rerata Ketebalan Aorta Mencit

Dari hasil pengukuran ketebalan aorta pada 5 kelompok perlakuan, ditemukan bahwa rata-rata ketebalan aorta masing-masing perlakuan memiliki perbedaan. Aorta mencit perlakuan I atau kontrol negatif memiliki rerata 35,67

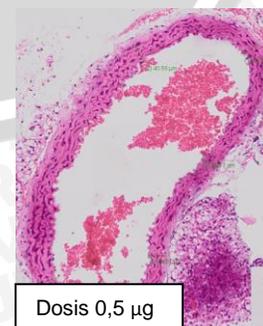
μm . Pada mencit perlakuan II atau kontrol positif didapatkan ukuran rerata ketebalan aorta $45,02 \mu\text{m}$. Mencit kontrol positif diberi makan diet atherogenik yang dapat berpengaruh pada ketebalan aorta mencit dibandingkan diet normokolesterolemia yang diterima oleh mencit kontrol negatif. Aorta mencit perlakuan III menunjukkan ukuran rerata $39,87 \mu\text{m}$. Mencit perlakuan III ini diberi perlakuan berupa diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis $0,5 \mu\text{g}$ sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5. Mencit perlakuan IV yang diberi diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis $0,75 \mu\text{g}$ sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5 menunjukkan angka rerata ketebalan aorta $37,36 \mu\text{m}$. Rerata ketebalan aorta kelompok perlakuan IV ternyata lebih rendah dibandingkan rerata ketebalan aorta kelompok perlakuan III. Sedangkan pada kelompok perlakuan V yang diberi diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis $1 \mu\text{g}$ sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5 didapatkan rerata ketebalan aorta sebesar $32,59 \mu\text{m}$. Rerata kelompok perlakuan V ini paling rendah dibandingkan kedua kelompok perlakuan vaksinasi yang lain. Angka ketebalan aorta pada kelompok perlakuan V ini bahkan lebih rendah jika dibandingkan ketebalan aorta pada mencit kontrol negatif. Hasil pengukuran ketebalan aorta juga dapat dilihat dari gambaran histopatologis aorta berikut ini.

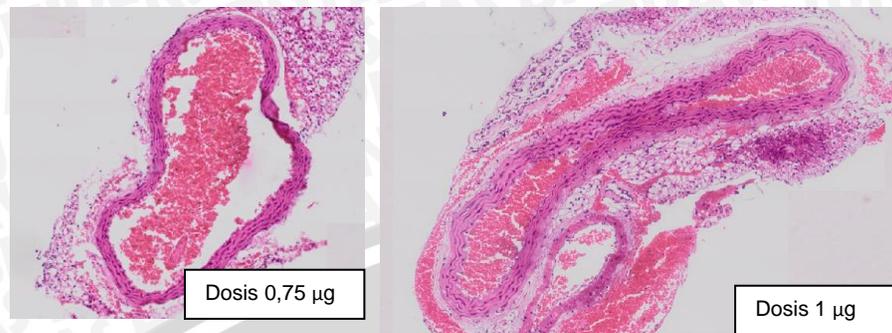


Kontrol Negatif



Kontrol Positif

Dosis $0,5 \mu\text{g}$



Gambar 5.1 Histopatologi Ketebalan Aorta Masing-masing Perlakuan

Foto scan preparat ini diamati dengan software Olympus dengan perbesaran 40X dan diukur pada 5 lapangan pandang yang berbeda. Dari gambaran histopatologi didapatkan perbedaan gambaran ketebalan aorta dari masing-masing kelompok perlakuan mencit. Tampak gambaran aorta kontrol negatif tipis, sedangkan pada kontrol positif tampak tebal. Perlakuan III ketebalan aorta pada gambaran histopatologi tampak tebal hampir menyerupai perlakuan II. Sedangkan perlakuan IV atau dosis 0,75 µg menunjukkan gambaran aorta dengan ketebalan yang hampir menyerupai kontrol negatif. Pada perlakuan V ketebalan aorta di lapangan pandang tertentu bahkan lebih tipis dibandingkan kontrol negatif.

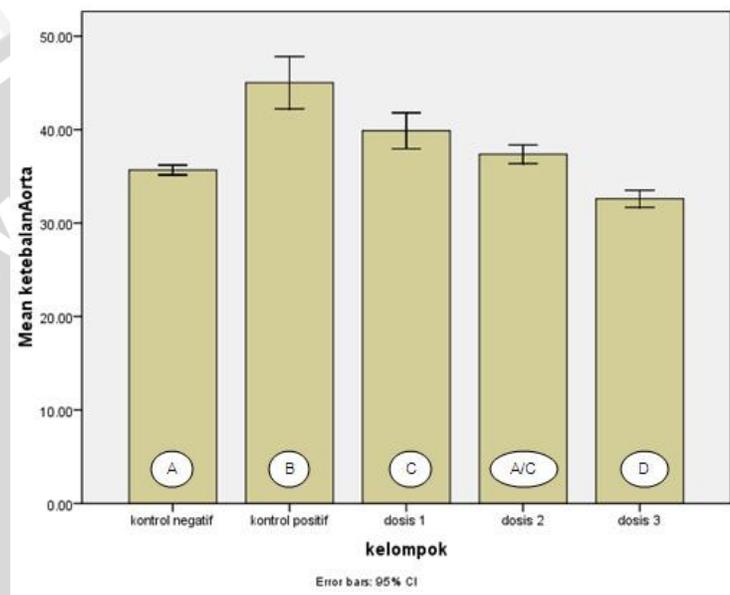
Hasil penelitian ini diuji normalitas distribusi data dengan menggunakan Shapiro Wilk dan Kolmogorov Smirnov. Didapatkan bahwa data hasil penelitian ini adalah normal ($p > 0,05$). Setelah hasilnya diketahui normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian dengan menggunakan *Levene test* untuk menguji homogenitas dari varian data hasil penelitian. Berdasarkan hasil pengujian *Levene test*, data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian yang sama ($p = 0,067$). Oleh karena data hasil penelitian ini memiliki distribusi yang normal dan varian yang homogen, maka pengujian hasil penelitian ini dapat dilanjutkan dengan pengujian *One Way ANOVA*.

Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) yang terlampir pada lampiran digunakan untuk menguji signifikansi dan mengambil kesimpulan setelah data terbukti homogen. Uji ini tergolong analisis komparatif lebih dari dua variabel atau lebih dari dua rata-rata. Tujuannya ialah untuk membandingkan lebih dari dua rata-rata. Dari hasil uji ANOVA didapatkan angka ketebalan aorta pada kelima kelompok mencit memang berbeda ($p=0.000$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test (Least Significant Difference)* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Pada analisis ini digunakan *Tukey HSD test* yang hasilnya terdapat pada lampiran. Hasil signifikansi uji *Tukey HSD* dapat dilihat pada tabel 5.3. Pada tabel tersebut menunjukkan ketebalan aorta mencit kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif berbeda dengan signifikansi 0,000. Begitu juga perbandingan ketebalan aorta mencit kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dosis 0,5 μ g, 0,75 μ g dan 1 μ g, masing-masing menunjukkan perbedaan dengan signifikansi 0,000. Terdapat lebih dari dua data yang berbeda dengan signifikansi 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh dari percobaan ini adalah berbeda secara signifikan.

Pada data homogenous subsets dari uji Tukey HSD didapatkan angka 32,5940 untuk dosis 3 yaitu dosis 1 μ g dan diwakili dengan D. Kontrol negatif yaitu perlakuan normal menunjukkan angka 35,6720, bersama dengan dosis 2 yaitu dosis 0,75 μ g menunjukkan angka 37,3600 dan diwakili dengan A. Dosis 2 yaitu dosis 0,75 μ g menunjukkan angka 37,3600 bersama dengan dosis 1 yaitu

dosis 0,5 μg menunjukkan angka 39,8720 dan diwakili dengan C. Sedangkan kontrol positif yaitu perlakuan diet atherogenik menunjukkan angka 45,0160 dan diwakili dengan B. Data homogenous subsets kemudian diaplikasikan pada grafik rerata ketebalan aorta terhadap perlakuan dan tampak data sebagai berikut.



SGrafik 5.1 Grafik Hubungan Ketebalan Aorta dan Perlakuan

Dari grafik diatas tampak bahwa skala rerata ketebalan aorta antara kontrol negatif dengan kontrol positif berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian diet atherogenik kepada kelompok kontrol positif dapat menyebabkan peningkatan ukuran ketebalan aorta secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang merupakan perlakuan normal. Data grafik kontrol positif dengan dosis 1 tampak perbedaan yang cukup signifikan, namun grafik dosis 1 belum dapat mendekati grafik kontrol negatif. Hal ini berarti terapi dengan dosis 1 yaitu dosis 0,5 μg dapat menurunkan ketebalan aorta dari kelompok positif, namun belum dapat mencapai ukuran ketebalan aorta yang normal seperti pada kontrol negatif.

Perbandingan grafik kontrol positif dengan dosis 2 yaitu 0,75 μg menunjukkan perbedaan yang lebih signifikan dibandingkan kontrol positif dengan dosis 1 dan grafik dosis 2 lebih mendekati skala grafik kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa pemberian vaksin dengan dosis 0,75 μg dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta dengan lebih baik hingga hampir mendekati ukuran ketebalan aorta normal seperti kontrol negatif, namun masih belum bisa setara dengan ukuran ketebalan aorta kontrol negatif. Sedangkan pada grafik dosis 3 yaitu dosis 1 μg menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan bila dibandingkan dengan kontrol positif, namun apabila dibandingkan dengan kontrol negatif, ukuran ketebalan aorta kelompok dosis 3 justru lebih rendah. Hal ini berarti bahwa penggunaan dosis 1 μg dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta secara signifikan, namun penurunan ukuran ketebalan aorta dosis 3 dibanding kontrol negatif bukan merupakan dosis yang baik dan aman untuk melakukan terapi pada kontrol positif karena kinerja vaksin dosis 1 μg terlalu berlebihan sehingga dapat melampaui ukuran normal ketebalan aorta pada perlakuan kontrol negatif. Dari grafik diatas didapatkan bahwa pemberian vaksin HSP65 pada mencit model atherosklerosis berhasil menurunkan ukuran ketebalan aorta. Dosis efektif yang dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta secara signifikan pada penelitian ini adalah 0,75 μg . Dari uji korelasi Pearson didapatkan angka 0,024 ($p < 0,05$) yang bermakna bahwa terdapat korelasi yang kuat antara data-data dari masing-masing dosis perlakuan vaksinasi. Menurut Sugiyono (2007) pedoman untuk memberikan interpretasi koefisien korelasi sebagai berikut :

0,00-0,199 = sangat rendah

0,20-0,399 = rendah

- 0,40-0,599 = sedang
0,60-0,799 = kuat
0,80-1,000 = sangat kuat

Dari analisis korelasi Pearson didapatkan angka kekuatan korelasi sebesar -0,449. Hal ini berarti terdapat korelasi bersifat negatif dengan kekuatan korelasi sedang.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





BAB 6

PEMBAHASAN

Atherosklerosis merupakan proses inflamasi kronis yang dipicu oleh akumulasi kolesterol di arterial intima. Sel yang berperan dalam proses inflamasi ini terutama adalah sel limfosit T yang terdiri atas sel T efektor dan sel T reg. Sel T efektor akan memicu proses inflamasi sedangkan sel T reg akan mensupresi proses inflamasi. Proses inflamasi menyebabkan *injury* pada endotel yang berujung pada pembentukan plak atherosklerosis di dinding arteri intima. Plak atherosklerosis yang bertambah besar dan banyak akan mendesak keluar ke arteri media sehingga lumen pembuluh darah menyempit, kemudian memicu terjadinya penyakit-penyakit kardio-vaskuler, seperti penyakit jantung koroner dan stroke. Prevalensi penyakit-penyakit ini terus meningkat dan menjadi penyebab kematian utama dengan angka yang cukup tinggi, baik di Indonesia maupun di seluruh dunia. Pada saat ini telah banyak upaya mengobati atherosklerosis, namun belum dapat mengurangi angka kematian akibat atherosklerosis secara signifikan. Penelitian ini menguji efektivitas antigen HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* untuk menghambat progresivitas lesi atherosklerosis. (Altman, 2003)

HSP60 manusia merupakan protein yang terekspresi pada sel-sel endotel dan makrofag terutama pada keadaan *stressful* oleh oxLDL, stress biomekanik, infeksi, oksidan, dan sitokin-sitokin pada proses inflamasi. Pada keadaan normal, HSP60 pada level intrasel berperan sebagai chaperon yang mencegah agregasi antar sel-sel yang mengekspresikannya. Sedangkan pada level ekstrasel HSP60 berperan sebagai penanda kematian sel yang menjadi

sinyal bagi makrofag dan sel-sel imun lain untuk membersihkan sel yang mati tersebut. (Xu *et al.*, 2011) Ekspresi HSP60 akan menginduksi inflamasi melalui mekanisme regulasi dari HSP60 pada adiposit untuk mengeluarkan sinyal-sinyal yang mngeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi, sehingga sekaligus berperan pada proses autoimun pada atherosklerosis. Namun, ekspresi HSP60 yang bersifat atherogenik ini berpotensi untuk dikendalikan melalui sel T regulator. (Puijvelde *et al.*, 2007) Sel T mengenal antigen pada hiperkolesterolemia atau pada plak yang mengandung ox-LDL dan HSP 60/65 serta ketika adanya makrofag atau sel dendritik pada plak sehingga terjadilah proses atherosklerosis selanjutnya. Untuk mencegah proses terjadinya atherosklerosis, tubuh mensupresinya melalui sel T regulator. (Israel Gotsman, 2007)

Aktivitas sel T regulator dalam mensupresi respon imun pada atherosklerosis dapat dicapai melalui induksi toleransi imun. Pemberian autoantigen melalui rute mukosa, baik nasal maupun oral, telah terbukti dapat menurunkan perkembangan atherosklerosis pada model hewan coba. Sehingga penurunan progresivitas lesi atherokslerosis ini dicapai melalui mekanisme pengarahan pada sel Th1 dan sel Th2 atau aktivasi sel T regulator tergantung pada dosis aministrasi dari antigen. Penelitian ini menggunakan antigen HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* karena HSP 60/65 adalah 97% homolog dan memiliki rantai asam amino 70%. Dengan menekan ekspresi HSP 60 oleh arteri yang terbentuk plak maka anti HSP 65 berkontribusi pada atherosklerosis melalui mimikri antigen. (Pastrana *et al.*, 2012)

HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* merupakan kelompok protein yang bersifat homolog dengan HSP60 manusia. Bahkan antibodi spesifik HSP65

Mycobacterium tuberculosis mampu berikatan dengan HSP60 manusia. HSP60 terseksresi dalam jumlah besar pada pasien dengan lesi atherosklerosis serta menginduksi pembentukan lesi atherosklerosis pada hewan coba. *Mycobacterium tuberculosis* adalah pathogen intraseluler yang bertahan dalam kompartemen fagosomal makrofag. *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan 2 pertahanan yaitu menghambat ekspresi MHC II dan proses serta presentasi dari antigen. Selain itu *Mycobacterium tuberculosis* juga menghambat pengeluaran sitokin IL-10 dan TGF- β . Respons CD4⁺ sel T untuk mengontrol infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada manusia dan hewan serta mengontrol kompleks MHC-II. Kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk menghambat ekspresi dari MHC-II serta presentasi antigen supaya tidak terjadi respons imun. (Sherer and Shoenfeld, 2006)

Studi Marker et.al menunjukkan paparan HSP60 pada adiposit manusia dengan konsentrasi $\leq 0,5 \mu\text{g}$ tidak berhasil memicu produksi sitokin proinflamatori. Sedangkan paparan HSP60 dengan konsentrasi $\geq 0,5\mu\text{g}$ menunjukkan produksi sitokin proinflamasi secara signifikan. Selain itu, studi Maron et.al menunjukkan induksi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* melalui mukosa nasal mencit dengan dosis $1\mu\text{g}$ mulai menunjukkan efek proliferasi dan sekresi sitokin proinflamasi. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dosis $0,5\mu\text{g}$, $0,75\mu\text{g}$ dan $1\mu\text{g}$ diinduksikan kepada kelompok perlakuan. (Marker et.al, 2012)

Penelitian pengaruh HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* terhadap ketebalan aorta mencit model atherosklerosis telah dilakukan. Dari penelitian ini didapatkan bahwa pemberian diet atherogenik berhasil menciptakan kondisi atherosklerotik pada mencit. Hal ini dibuktikan dengan rerata ketebalan aorta mencit perlakuan II atau kontrol positif ($45,02 \mu\text{m}$) yang meningkat tinggi yaitu

sebesar 9,35 μm dibandingkan mencit perlakuan I atau kontrol negatif (35,67 μm), serta didukung dengan gambaran histopatologi aorta dengan pewarnaan HE yang menunjukkan gambaran peningkatan ketebalan aorta pada aorta mencit kontrol positif. Sedangkan ketebalan aorta mencit perlakuan II (45,02 μm) bila dibandingkan dengan mencit perlakuan III (39,87 μm) menunjukkan penurunan angka ketebalan aorta. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian vaksin HSP65 dengan dosis 0,5 μg dapat menurunkan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis sebesar 5,15 μm , namun ukuran aorta ini belum mencapai ukuran aorta normal seperti pada mencit kelompok kontrol negatif. Perbandingan ketebalan aorta pada kelompok perlakuan II (45,02 μm) dan IV (37,36 μm) menunjukkan penurunan angka ketebalan aorta yang lebih besar yaitu 7,66 μm melalui pemberian vaksinasi HSP65 dengan dosis 0,75 μg . Ukuran ini masih belum dapat mencapai angka ketebalan aorta pada mencit yang sehat, namun sudah lebih mendekati angka ketebalan aorta pada mencit kontrol negatif. Perbandingan pada mencit kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan V yang diberi vaksinasi HSP65 dengan dosis 1 μg menunjukkan penurunan angka ketebalan aorta yang lebih besar yaitu 12,43 μm . Angka ketebalan aorta pada kelompok perlakuan III ini bahkan lebih rendah jika dibandingkan ketebalan aorta pada mencit kontrol negatif. Ketiga data ini menunjukkan bahwa pemberian vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* memberikan efek penurunan ukuran ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis dengan dosis yang paling mendekati normal adalah dosis 0,75 μg . Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis vaksinasi HSP65 optimal yang dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta secara lebih signifikan hingga setara dengan ukuran ketebalan aorta pada

mencit yang sehat. Berdasarkan data dan grafik homogenous subsets, dosis optimal ini dapat dicari di antara dosis 0,75 µg dan 1 µg.

Hasil analisis hubungan antara pengaruh vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dengan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis dengan korelasi Pearson menunjukkan hubungan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0,024 ($p < 0,05$). Hal ini berarti terdapat pengaruh yang kuat antara perlakuan vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* terhadap penurunan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis. Sedangkan nilai kekuatan korelasi -0,449 menunjukkan adanya hubungan bersifat negatif dengan kekuatan sedang dimana peningkatan dosis vaksin mampu menurunkan ketebalan aorta.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Vaksinasi dengan HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* pada mencit model atherosklerosis dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta.
2. Dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam penelitian ini untuk menurunkan ketebalan aorta adalah 0,75 μ g.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* optimal yang dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta secara lebih signifikan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* supaya mengetahui jumlah dosis toksik dari kombinasi tersebut.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan sampel yang lebih banyak untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dengan menghindari terjadinya variasi normal yang mengganggu.

DAFTAR PUSTAKA

- Altman, Raul. 2003. Risk Factors in Coronary Atherosclerosis Athero-inflammation : the Meeting Point. *Thrombosis Journal* 2003 1:4.
- Beverley, P.C.L. 2002. Immunology of Vaccination. *British Medical Bulletin* 62:15-28.
- Fonseca D.M., Bonato V.L.D., Silva C.L., and Sartori A. 2007. Th1 Polarized Response Induced by Intramuscular DNA-HSP65 Immunization is Preserved in Experimental Atherosclerosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40:1495-1504.
- Frostedgard, Johan. 2013. Immunity, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *BMC Medicine* 11:117.
- Gotsman I., Gupta R., and Lichtman Andrew H. 2007. The Influence of the Regulatory T Lymphocytes on Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2493-2495.
- Hansson, G. K. 2001. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Journal of American Heart Association, Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1876-1890 doi: 10.1161/hq1201.100220.
- Hansson, G.K. and Libby, P. 2006. The Immune Response in Atherosclerosis: A Double-edged Sword. *Nature Reviews Immunology* Vol.6:508-519.
- Harats D., Yacov N., Gilburd B., Shoenfeld Y., and George J. 2002. Oral Tolerance with Heat Shock Protein 65 Attenuates *Mycobacterium Tuberculosis*-Induced and High-Fat-Diet-Driven Atherosclerotic Lesions. *Journal of the American College of Cardiology (JACC)* Vol.40 No.7.
- Kilic, A and Mandal, K. 2012. Heat Shock Proteins: Pathogenic Role in Atherosclerosis and Potential Therapeutic Implications. *Autoimmune Diseases* Vol.2012.
- Litmanovich D., Bankier Alexander A., Cantin L., Raptopoulos V., and Boiselle Phillip M. 2009. CT and MRI in Disease of the Aorta. *AJR* 193:928-940.
- Lumongga, Fitriani. 2007. Atherosclerosis. USU Repository.
- Maron R., Sukhova G., Faria A.M., Hoffman E., Mach F., Libby P., and Weiner Howard L. 2002. Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation* 106:1708-1715.



- Marker T., Sell H., Zilleßen P., Glode A., Kriebel J., Ouwens D.M., *et al.* 2012. Heat Shock Protein 60 as a Mediator of Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes*, Vol. 61.
- Nikolic G., Ljaljevic A., Music L., Boskovic a., Cadjenovic T. 2013. Atherosclerosis Risk Factors Among Cardiovascular in Hospital Patients Treated in Montenegro. *Medical Journal of Montenegro*.
- Pastrana J.L., Sha X., Virtue A., Mai J., Cueto R., Lee I.A., *et al.* 2012. Regulatory T Cells and Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiology* S12:002.
- Pellizon M.A. 2008. Diet Induced Atherosclerosis/Hypercholesterolemia in Rodent Models. *Research Diets, Inc, Athero-3000-2-09*.
- Puijvelde G.H.M.van, Es T. van, Wanrooij E.J.A. van, Habets K.L.L., Vos P. de, Zee van der, *et al.* 2007. Induction of Oral Tolerance to HSP60 or an HSP-60 Peptide Activates T Cell Regulation and Reduces Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2677-2683.
- Rosamond W., Flegal K., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., *et al.* 2008. Heart Disease and Stroke Statistics-2008 Update:A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117:E25-E146.
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., and Ono M. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133.
- Sherer Y and Shoenfeld Y. 2006. Mechanisms of Disease:Atherosclerosis in Autoimmune Disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology* Vol.2 No.2.
- Shi Z., Rifa'i M., Lee Young H., Shiku H., Isobe Ken-ichi, and Suzuki H. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 Interactions in the Recognition of Target Cells by CD8⁺ CD122⁺ Regulatory T Cells. *Immunology* 124:121-128.
- Toth, P.P. Subclinical Atherosclerosis : What It Is, What It Means, and What We Can Do About It. *Int J Clin Pract* 62(8):1246-1254.
- Xu Q., Metzler B., Jahangiri M., and Mandal K. 2011. Molecular Chaperones and Heat Shock Proteins in Atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H506-H514.

Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Amelia Sari
NIM : 115070100111082
Program Studi : Program Studi Kedokteran Umum
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya bersama dengan teman-teman satu tim dalam Pekan Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKM-P) Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) XXVI UNRAN (Universitas Mataram) 2013, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Desember 2014

Yang membuat pernyataan,

(Dian Amelia Sari)

NIM. 115070100111082

Lampiran 2. Surat Keputusan Dekan



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KEPUTUSAN DEKAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Nomor: 274 /SK/UN10.7/KP/2013

TENTANG

PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PESERTA PIMNAS XXVI DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL
TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI TAHUN AKADEMIK 2012/2013

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,

- Menimbang :
- a. bahwa untuk peningkatan atmosfer akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya perlu di tingkatkan kegiatan-kegiatan kemahasiswaan yang bernuansa akademis
 - b. bahwa dalam meningkatkan motivasi dan mendorong partisipasi para mahasiswa dalam kegiatan yang bernuansa tersebut perlu adanya penghargaan
 - c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan b, perlu diterbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya tentang Pemberian Penghargaan Kepada Mahasiswa Berprestasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Peserta Pimnas XXVI dan atau Kompetisi Nasional Tahun Akademik 2012/2013
- Mengingat :
1. Undang-undang Nomor : 20 Tahun 2003 Tentang Sistem Pendidikan Nasional;
 2. Undang-undang No. 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi;
 3. Peraturan Pemerintah Nomor : 17 Tahun 2010 jo Nomor : 66 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan;
 4. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia No. 232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;
 5. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia No. 080/O/2002 tentang Statuta Universitas Brawijaya;
 6. Keputusan Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 074/SK/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Brawijaya;
 7. Surat Keputusan Rektor Universitas Brawijaya No. 049/SK/2011 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Periode 2011 – 2015;
- Memperhatikan :
- Hasil pada PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat yang diselenggarakan pada tanggal 09 – 13 September 2013 dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI yang diikuti para mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama Tahun Akademik 2012/2013



MEMUTUSKAN

- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA TENTANG PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYAPESERTA PIMNAS XXVI DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI TAHUN AKADEMIK 2012/2013;
- KESATU : Memberikan Penghargaan kepada Mahasiswa anggota Tim PIMNAS dan atau peserta Kompetisi-kompetisi Tingkat Nasional Tahun 2013 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Tahun Akademik 2012/2013 yang susunan anggotanya seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini;
- KEDUA : Bentuk penghargaan berupa pembebasan para anggota Tim Mahasiswa dari kewajiban akademis pembuatan Karya Ilmiah Tugas Akhir regular, dengan tetap berkewajiban menyerahkan naskah karya ilmiah yang diikutinya oleh masing-masing mahasiswa;
- KETIGA : Memberikan nilai prestasi Akademis A pada Karya Ilmiah Tugas Akhir bagi setiap mahasiswa anggota TIM oleh karena capaian prestasi berskala nasional yang diperoleh pada PIMNAS XXVI dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI pada Tahun Akademik 2012/2013,
- KEEMPAT : Memberikan dana pembinaan kepada setiap kelompok dari Tim Mahasiswa sesuai dengan capaian prestasi pada PIMNAS XXVI dan Kompetisi-kompetisi Nasional;
- KELIMA : Menugaskan kepada lembaga-lembaga di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang terkait dengan ini untuk menindaklanjuti keputusan ini;
- KEENAM : Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan;
- KETUJUH : Apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam keputusan ini akan diperbaiki sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Malang
 Pada tanggal :



Dekan,
 Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA
 NIP. 195011161980021001

Tembusan :

1. Rektor Universitas Brawijaya;
2. Para Pembantu Dekan di Lingkungan FKUB;
3. Para Ka. Jur. dan KPS di Lingkungan FKUB;
4. Para Ka. Lab. di Lingkungan FKUB;
5. Presiden BEM FKUB;

Lampiran Keputusan Dekan FKUB

Nomor : /SK/JUN10.7/KP/2013

Tanggal :

**PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PESERTA PIMNAS XXVI DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL
TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI TAHUN AKADEMIK 2012/2013**

NO	NAMA MAHASISWA	NIM	KEGIATAN	TINGKAT KEGIATAN	CAPAIAN PRESTASI
1	Zanella Yolanda L. Meliantha Tandiono Lucy Pricillia Astrid Nandikasari Lukito Cakra Parindra Gasmara	105070100111106 105070100111084 105070104111010 105070100111096 115070107151010	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Perak
2	Pervita Venny Maharsi Abdur Razaq K Alber Dian Megan Alfian Khoiril Bahroin Layyin Halimah	115070401111009 0810740001 115070400111020 115070400111046 115070401111019	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Emas
3	Anggela Damayanti Radhitio Adi Nugroho Risa Natalia Siburian Steven Budiharjo Dian Amelia Sari	105070107111029 0910710106 105070101111001 115070100111076 115070100111082	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Emas
4	Furqan Hidayatullah Andreas Budi Wijaya Faizal Reza Pahlevi Camoya Gersom Verina Setyabudi	105070100111090 0910710002 0910710070 115070107121008 125070100111025	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Perak
5	Ayu Pramitha Wulandari Defri Andrian Dwi Ardika Shanti Andri Sakaris Imam Faiq Habiburman Krisna Rangga Permana	0910714063 115070207131019 105070104111013 105070100111042 105070106111004	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Perunggu
6	Fania Dora Aslamy Dewangga Primananda S Intan Kautsarani Afiyf Kaysa Waafi M. Vardian Mahardika	115070100111010 105070103121008 125070107121008 105070100111070 105070104121002	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Medali Perunggu
7	Firman Mulyo Wicaksono Beta Herilla Sekti Desie suci ps Ellen Natalia Yitania Sari	105070500111007 105070507111007 105070501111003 115070300111030 105070500111014	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Finalis

NO	NAMA MAHASISWA	NIM	KEGIATAN	TINGKAT KEGIATAN	CAPAIAN PRESTASI
8	Aditya Indra M Annisa Maulidia Mahdi Alan Vahlevi Tarbiyah Catur Sugiarti Wahyu Triadmajani	0910710025 0910713061 115070101111014 105070106111011 105070101111014	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Finalis
9	Yuri Afifah Aditya Indra M Afiyf Kaysa Waafi Annisa Maulidia Mahdi Puspita Abidatul Qodariyah	105070101111009 0910710025 105070100111070 0910713061 105070100111009	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Finalis
10	Fetreo Negeo Putra Ni Putu Jeny M. Arinda Nur Yunitasari Dwi Astika Sari I Wayan Gede Saraswasta	105070200111004 105070201111013 105070200111010 105070201111021 115070200111021	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Finalis
11	Ivan Bintang Pratama Dewangga Primananda Susanto Mohd Shafiq Bin Mohd Zamhuri Dwi Fitria Rahayuningwati Fitria Sari Wulandari	115070107121003 105070103121008 115070108111006 115070501111006 115070100111013	PIMNAS XXVI Tahun 2013 Universitas Mataram, Lombok-NTB	Nasional	Finalis



Dekan,
Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA
NIP. 195011161980021001





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
DIAGRAM PENGHARGAAN

Nomor: 29/E.E5/LL/2013

Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia memberikan penghargaan kepada:

Nama : **DIAN AMELIA SARI**
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Bidang Kegiatan : Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKM-P)
Judul : **ATHEROGULATOR : PENDEKATAN VAKSINASI ATHEROSKLEROSIS BERBASIS STIMULASI SEL T REGULATOR MENGGUNAKAN BAKTERI Mycobacterium Tuberculosis**

Atas peran sertanya dalam rangka mengikuti "PEKAN ILMIAH MAHASISWA NASIONAL" (PIMNAS) XXVI pada tanggal 09 s.d 12 September 2013 yang diselenggarakan oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan bekerjasama dengan Universitas Mataram sebagai:

PENYAJI TINGKAT NASIONAL

Jakarta, 13 September 2013

Direktur Jenderal

Prof. DR. Ir. Djoko Santoso, M.Sc.
NIP. 195309094197803 1 003

Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan



Kandang Pemeliharaan Mencit



Pemberian Makan dan Minum Mencit



Membersihkan Kandang Mencit



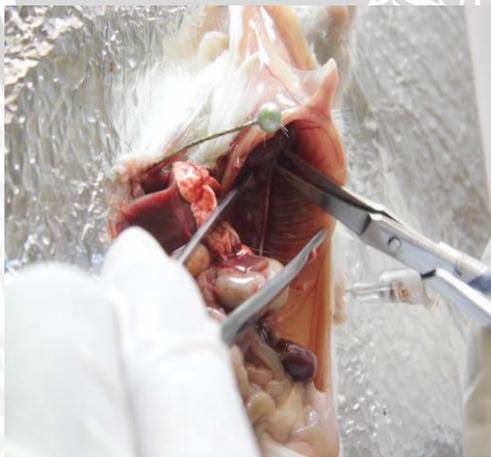
Vaksinasi Intranasal pada Mencit



Pembiusan Mencit



Pembedahan Mencit



Pengambilan Aorta Mencit



Sampel Pemeriksaan Histopatologi



Lampiran 4 . Hasil Analisis

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ketebalanAorta	.136	25	.200*	.949	25	.244

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

ketebalanAorta

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.596	4	20	.067

ANOVA

ketebalanAorta	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	438.649	4	109.662	62.082	.000
Within Groups	35.328	20	1.766		
Total	473.978	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent

Variable: ketebalanAorta

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	kontrol negatif	kontrol positif	-9.34400*	.84058	.000	-11.8593	-6.8287
		dosis 1	-4.20000*	.84058	.001	-6.7153	-1.6847
		dosis 2	-1.68800	.84058	.298	-4.2033	.8273
		dosis 3	3.07800*	.84058	.012	.5627	5.5933
	kontrol positif	kontrol negatif	9.34400*	.84058	.000	6.8287	11.8593
		dosis 1	5.14400*	.84058	.000	2.6287	7.6593
		dosis 2	7.65600*	.84058	.000	5.1407	10.1713
		dosis 3	12.42200*	.84058	.000	9.9067	14.9373
	dosis 1	kontrol negatif	4.20000*	.84058	.001	1.6847	6.7153
		kontrol positif	-5.14400*	.84058	.000	-7.6593	-2.6287
		dosis 2	2.51200	.84058	.050	-.0033	5.0273
		dosis 3	7.27800*	.84058	.000	4.7627	9.7933
dosis 2	kontrol negatif	1.68800	.84058	.298	-.8273	4.2033	
	kontrol positif	-7.65600*	.84058	.000	-10.1713	-5.1407	
	dosis 1	-2.51200	.84058	.050	-5.0273	.0033	
	dosis 3	4.76600*	.84058	.000	2.2507	7.2813	
dosis 3	kontrol negatif	-3.07800*	.84058	.012	-5.5933	-.5627	
	kontrol positif	-12.42200*	.84058	.000	-14.9373	-9.9067	
	dosis 1	-7.27800*	.84058	.000	-9.7933	-4.7627	
	dosis 2	-4.76600*	.84058	.000	-7.2813	-2.2507	



LSD	kontrol negatif	kontrol positif	-9.34400*	.84058	.000	-11.0974	-7.5906
		dosis 1	-4.20000*	.84058	.000	-5.9534	-2.4466
		dosis 2	-1.68800	.84058	.058	-3.4414	.0654
		dosis 3	3.07800*	.84058	.002	1.3246	4.8314
kontrol positif	kontrol negatif		9.34400*	.84058	.000	7.5906	11.0974
		dosis 1	5.14400*	.84058	.000	3.3906	6.8974
		dosis 2	7.65600*	.84058	.000	5.9026	9.4094
		dosis 3	12.42200*	.84058	.000	10.6686	14.1754
dosis 1	kontrol negatif		4.20000*	.84058	.000	2.4466	5.9534
		kontrol positif	-5.14400*	.84058	.000	-6.8974	-3.3906
		dosis 2	2.51200*	.84058	.007	.7586	4.2654
		dosis 3	7.27800*	.84058	.000	5.5246	9.0314
dosis 2	kontrol negatif		1.68800	.84058	.058	-.0654	3.4414
		kontrol positif	-7.65600*	.84058	.000	-9.4094	-5.9026
		dosis 1	-2.51200*	.84058	.007	-4.2654	-.7586
		dosis 3	4.76600*	.84058	.000	3.0126	6.5194
dosis 3	kontrol negatif		-3.07800*	.84058	.002	-4.8314	-1.3246
		kontrol positif	-12.42200*	.84058	.000	-14.1754	-10.6686
		dosis 1	-7.27800*	.84058	.000	-9.0314	-5.5246
		dosis 2	-4.76600*	.84058	.000	-6.5194	-3.0126

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

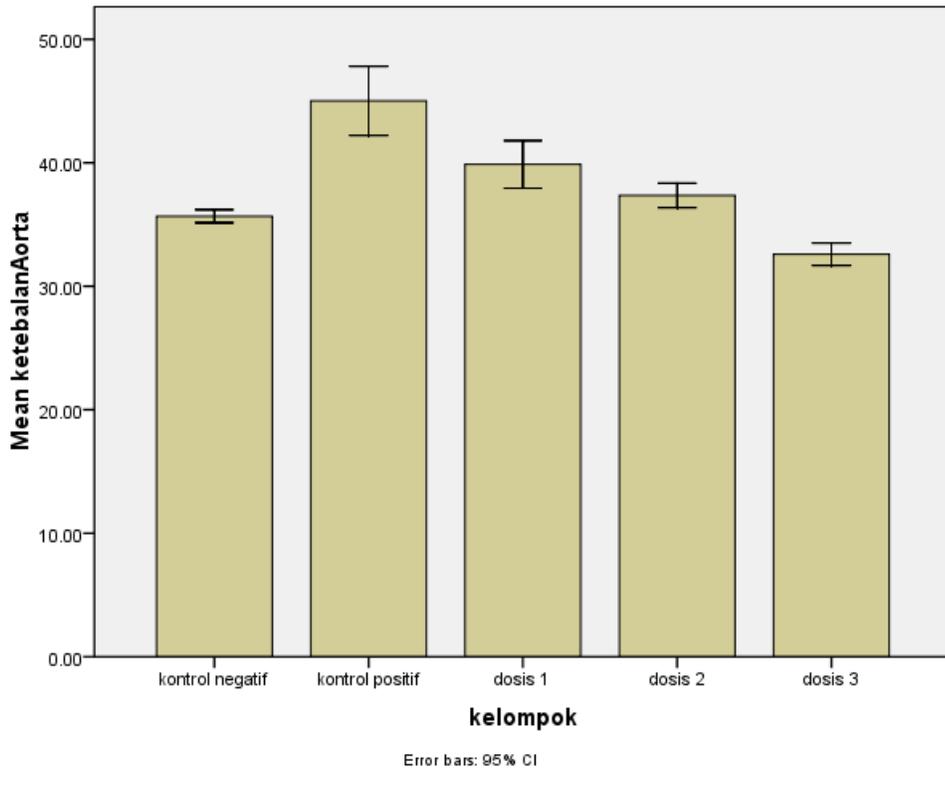
ketebalanAorta

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD ^a dosis 3	5	32.5940			
kontrol negatif	5		35.6720		
dosis 2	5		37.3600	37.3600	
dosis 1	5			39.8720	
kontrol positif	5				45.0160
Sig.		1.000	.298	.050	1.000
Duncan ^a dosis 3	5	32.5940			
kontrol negatif	5		35.6720		
dosis 2	5		37.3600		
dosis 1	5			39.8720	
kontrol positif	5				45.0160
Sig.		1.000	.058	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.





Correlations

Correlations

		kelompok	ketebalanAorta
kelompok	Pearson Correlation	1	-.449*
	Sig. (2-tailed)		.024
	N	25	25
ketebalanAorta	Pearson Correlation	-.449*	1
	Sig. (2-tailed)	.024	
	N	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

