

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Vaksin Berbasis *Outer Membrane Protein* (OMP) *Porphyromonas gingivalis* terhadap Proliferasi VSMC

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan perbandingan proliferasi VSMC terhadap pemberian *outer membrane protein* (OMP) *P. gingivalis* dan OMP *P.gingivalis* + CFA/IFA pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan garam DOCA. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa proliferasi VSMC pada kelompok kontrol negatif adalah 40.53 μ m dengan rerata tekanan darah adalah 111/71 mmHg. Sedangkan proliferasi VSMC kelompok kontrol positif adalah 60.99 μ m dengan rerata tekanan darah adalah 176/131 mmHg. Berdasarkan uji *post hoc* Mann Whitney didapatkan $p=0.008$ yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol tersebut.

Pada kelompok kontrol negatif tidak terjadi peningkatan tekanan darah maupun proliferasi VSMC karena tikus tidak diberikan perlakuan sehingga diasumsikan tikus normal/sehat. Pada kelompok kontrol positif terjadi peningkatan tekanan darah dan proliferasi VSMC karena tikus diberikan injeksi garam DOCA serta diberi air minum garam NaCl 1%. Injeksi garam DOCA diketahui memicu peningkatan kadar aldosterone sehingga terjadi upregulasi dari NADPH oksidase yang akan mengaktifkan ROS sehingga menyebabkan terjadi peroksidasi lipid yang menghasilkan MDA-LDL. *Malondialdehyde-modified low density lipoprotein* (MDA-LDL) kemudian akan berikatan dengan reseptor CD 36 yang mengaktifkan sitokin-sitokin inflamasi seperti TNF- α dan IL-6 yang mendestabilisasi

mRNA *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sehingga mengalami deregulasi atau *uncoupling* eNOS. Pada kondisi tersebut, eNOS tidak lagi berpasangan dengan oksidasi L- Arginin bahkan merangsang pembentukan superoksida anion (O_2^-) serta menurunkan pelepasan *Nitric oxide* (NO) yang berfungsi sebagai vasodilator. Hal tersebut akan menyebabkan disfungsi endotel karena terdapat ketidakseimbangan antara vasodilator dan vasokonstriktor. (Bautista *et al.*, 2005; Susanti, 2012; Iyer *et al.*, 2010). Disfungsi endotel akibat vasokonstriksi yang berkelanjutan dapat meningkatkan tekanan darah. Stress yang ditimbulkan akibat peningkatan tekanan darah pada pembuluh darah lama kelamaan akan membuat pembuluh darah beradaptasi dengan berproliferasi.

Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) adalah sel stroma dari dinding pembuluh darah yang memproduksi *Extracellular Matrix Cell* (ECM) selama pembentukannya (Lacolley *et al.*, 2012). *Vascular Smooth Muscle Cell* (VSMC) tidak hanya untuk regulasi *short term* dari diameter pembuluh darah tapi juga *long term* melalui *structural remodeling* dengan mengubah jumlah sel dan komposisi dari *connective tissue*nya (Rensen *et al.*, 2007). *Vascular Smooth Muscle Cell* (VSMC) dari pembuluh darah arteri mempertahankan *contractile tone* (*peripheral resistance to flow*) yang bertanggung jawab dalam regulasi tekanan darah dan redistribusi aliran darah yang dipompa oleh jantung (Lacolley *et al.*, 2012). *Remodelling* pada pembuluh darah bisa dipicu oleh produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan. Pada kondisi fisiologis ROS diproduksi oleh seluruh lapisan dinding pembuluh darah dalam konsentrasi rendah untuk meregulasi kontraksi dan relaksasi VSMC (Schiffrin dan Touyz, 2006).

Pada penelitian sebelumnya, peningkatan aldosterone diketahui mengaktifkan jalur MAP kinase yang berperan dalam proliferasi VSMC dan hipertrofi yang terkait dengan *remodeling* pembuluh darah serta mengganggu tonus pembuluh darah pada hipertensi (Ishizawa *et al*, 2005). Peningkatan tekanan darah diketahui dapat menyebabkan proliferasi VSMC akibat *shear stress*. Selain itu, disfungsi endotel sendiri diketahui dapat menyebabkan proliferasi VSMC dengan meningkatkan sekresi Endothelin-1. Endothelin-1 merupakan vasokonstriktor poten dan memiliki aktivitas mitogenik pada sel-sel otot polos pembuluh darah.

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri Gram negative oral anaerob yang diketahui memproduksi arginine dan lisin spesifik proteinase dalam sel yang diproduksi dengan jumlah yang besar sebagai bentuk sekresi. Enzim ini merujuk pada arginine (gingipain R) dan residu lisin (gingipain K) yang terdapat pada permukaan sel bakteri (*outer membrane*). Gingipain diketahui dapat memodulasi respon imun dengan menghambat produksi ROS karena memiliki kemiripan dengan MDA-LDL yang merupakan salah satu produk dari peroksidasi lipid (Chen *et al*, 2001; Henry *et al*, 2012; Kearney, 2000; Mysak *et al*, 2014; Su, 2009). Pada penelitian ini didapatkan berat molekul *Porphyromonas gingivalis* yaitu 110-kDa, 95-kDa, dan 70-90 kDa serta 50-kDa sesuai dengan penelitian Mysak *et al* pada tahun 2014 yang mana berat molekul tersebut merupakan berat dari gingipain khususnya Rgp.

Pada penelitian ini didapatkan rerata tekanan kelompok yang diberi OMP *P.gingivalis* (kelompok perlakuan 1) adalah 123/85 mmHg dengan proliferasi VSMC adalah 45.25 μ m serta rerata tekanan darah kelompok yang diberi OMP *P.gingivalis* dengan CFA/IFA (kelompok perlakuan 2) adalah 143/107 mmHg dengan

proliferasi VSMC adalah 40.75 μm . Pemberian vaksin *outer membrane protein P. gingivalis* dan *P.gingivalis* dengan ajuvan CFA/IFA dapat menurunkan proliferasi VSMC pada tikus model hipertensi. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Vahlevi dkk. (2014) bahwa pemberian gingipain dapat menurunkan ketebalan dinding aorta pada tikus model aterosklerosis.

Penurunan ketebalan dinding aorta pada tikus model aterosklerosis dapat terjadi karena adanya Rgp pada OMP *P.gingivalis* yang memiliki kemiripan dengan MDA-LDL sehingga menginduksi antibodi terhadap MDA-LDL. Antibodi tersebut akan mengikat MDA-LDL yang terbentuk dari peroksidasi lipid sehingga disfungsi endotel dapat dihambat dan manifestasi seperti hipertensi maupun proliferasi VSMC dapat ditekan. Namun untuk mekanisme secara pastinya masih perlu diteliti lebih lanjut karena OMP yang diinjeksikan pada penelitian ini masih dalam bentuk *crude*, bukan OMP murni yang berisi Rgp dengan berat molekul tertentu.

Pada perlakuan tekanan darah didapatkan hasil yang lebih rendah pada kelompok yang diberi OMP *P.gingivalis* daripada yang diberi OMP *P.gingivalis* + CFA/IFA sedangkan pada proliferasi didapatkan hasil yang lebih rendah pada kelompok yang diberi OMP *P.gingivalis* + CFA/IFA daripada kelompok yang diberi OMP *P.gingivalis*. Walaupun terdapat perbedaan hasil pada tekanan darah dan proliferasi VSMC, namun secara statistik hal tersebut terbukti tidak bermakna.

Selain itu perlu diteliti lebih lanjut pula terkait dosis dan efek samping yang ditimbulkan, karena pada penelitian ini tidak ada perbedaan dosis pada kelompok perlakuan, sehingga masih belum bisa memastikan dosis yang efektif terhadap penurunan proliferasi VSMC.

Pada tikus yang diberi CFA/IFA (kelompok perlakuan 3) didapatkan rerata tekanan darah 158/130 mmHg dan proliferasi VSMC yaitu 58.46 μm . Walaupun

pada hasil pengukuran VSMC kelompok perlakuan 3 menunjukkan hasil lebih rendah dari kontrol positif, namun pada uji *post hoc Mann Whitney* didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,222$). Pemberian CFA/IFA tanpa disertai OMP *P. gingivalis* ternyata tidak memberikan pengaruh yang lebih baik terhadap proliferasi VSMC. Berdasarkan penelitian Binder *et al* pada tahun 2003, CFA/IFA berbahan dasar lemak sehingga mampu untuk menginduksi terjadinya respon inflamasi. Respon inflamasi tersebut dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang menghasilkan MDA-LDL sehingga berakibat pada disfungsi endotel.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan antara lain peneliti tidak menggunakan gingipain murni, tidak adanya perbedaan dosis pada perlakuan, serta tidak dapat melakukan pengukuran ROS secara langsung dan pengukuran proliferasi VSMC sebelum tikus diberikan perlakuan.