

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pengaruh Pemberian Vaksin *Heat Killed S. Typhimurium* terhadap Berat Badan dan Asupan Pakan per hari

Obesitas merupakan suatu kondisi yang erat kaitannya dengan peningkatan dari sitokin proinflamasi, khususnya dalam penelitian ini adalah kadar TNF- $\alpha$ . Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian vaksin menggunakan *heat killed S. Typhimurium* mampu menurunkan kadar TNF- $\alpha$  yang diberikan diet tinggi lemak sehingga dapat mencegah terjadinya sindroma metabolik. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu terdiri kelompok kontrol negatif (tanpa diet tinggi lemak dan tanpa vaksinasi), kelompok kontrol positif (diet tinggi lemak dan tanpa vaksinasi), kelompok A (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l + CFA-IFA 100  $\mu$ l/injeksi), kelompok B (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l/injeksi), dan kelompok C (diet tinggi lemak ditambah CFA-IFA 100 $\mu$ l/injeksi).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pengukuran berat badan tikus setelah diberikan diet tinggi lemak selama 50 hari menunjukkan penurunan berat badan pada kelompok tikus yang diberi diet tinggi lemak dan pemberian vaksinasi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (diet tinggi lemak dan tanpa vaksinasi). Perbandingan berat badan pada kelompok perlakuan yang diberi vaksinasi terutama kelompok A (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l + CFA-IFA 100  $\mu$ l/injeksi) dan kelompok B (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l/injeksi) dengan kelompok C (diet tinggi lemak ditambah CFA-IFA 100  $\mu$ l/injeksi). Hal ini disebabkan vaksin yang terdiri dari kombinasi *heat killed* bakteri

*S. Typhimurium* dan ajuvan CFA-IFA yang diinjeksikan ke dalam tubuh tikus dapat direspon sehingga dapat menghambat *uptake* Ox-LDL oleh makrofag dan sel adiposit melalui reseptor CD36 atau SR. Hal tersebut nantinya dapat menghambat proses biologis sindroma metabolik yang disebabkan oleh Ox-LDL dapat dihambat.

Asupan pakan per hari yang diberikan berupa diet normal yang merupakan pakan standar yang tidak diberikan diet tinggi lemak, dan diet tinggi lemak yang merupakan pakan yang diberikan bahan tinggi lemak yang bertujuan untuk menginduksi terbentuknya plak atherosclerosis dan obesitas pada hewan coba yang erat kaitannya dengan patogenesis dari sindroma metabolik. Diet diberikan dengan komposisi yang telah ditentukan (merupakan komposisi standar yang sudah teruji keberhasilannya) diberikan sebanyak 40 gram setiap harinya hanya dalam bentuk bulatan agar tekstur pakan tidak rusak (Mutiyani, 2005). Intake pakan tikus diperoleh dari pengurangan total pakan yang diberikan dan sisa pakan yang diukur setiap harinya (Zaka, 2011).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan rerata asupan pakan per hari setelah diberikan perlakuan selama 50 hari yaitu kelompok kontrol negatif memiliki rerata tertinggi dikarenakan tidak diberikan perlakuan diet tinggi lemak. Sedangkan pada kelompok A (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l + CFA-IFA 100  $\mu$ l/injeksi), kelompok B (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l/injeksi), dan kelompok C (diet tinggi lemak ditambah CFA-IFA 100  $\mu$ l/injeksi) memiliki rerata asupan pakan harian lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (diet tinggi lemak dan tanpa vaksinasi). Hal ini disebabkan oleh vaksin *heat killed S. Typhimurium* dan ajuvan CFA-IFA yang diinjeksikan dalam tubuh tikus dapat direspon oleh sel T CD4+ yang kemudian menginduksi terbentuknya

antibodi spesifik terhadap Ox-LDL sehingga bersifat protektif. Rerata tertinggi asupan pakan per hari dengan diet tinggi lemak ditunjukkan oleh kelompok kontrol positif, kemudian disusul oleh kelompok C, kelompok A, lalu terakhir oleh kelompok B. Meskipun demikian, hasil dari rerata asupan pakan per hari dengan diet tinggi lemak tidak terdapat perbedaan yang bermakna dikarenakan simpangan deviasi (SD) yang besar antar kelompok perlakuan. Rerata asupan pakan per hari tersebut menunjukkan sisa sebesar 20 gram/hari, sehingga dapat diindikasikan asupan pakan diet tinggi lemak belum optimal untuk menginduksi kadar TNF- $\alpha$  serum yang tinggi terhadap proses patogenesis sindroma metabolik.

## **6.2 Pengaruh Pemberian Vaksin *Heat Killed S. Thypimurium* terhadap Kadar TNF- $\alpha$ Serum**

Hewan coba yakni tikus setelah diberi diet tinggi lemak diharapkan mengarah ke kondisi dislipidemia seperti halnya yang terjadi pada manusia selain dipicu oleh faktor genetik (Golberg, 2008). Diet tinggi lemak dapat menyebabkan meningkatnya sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pada kondisi obesitas terjadi infiltrasi makrofag pada jaringan adiposa putih, yang mana merupakan sumber utama produksi sitokin mediator proinflamasi (Bastard *et al.*, 2006).

Dari hasil pengukuran kadar serum TNF- $\alpha$  dengan metode ELISA dapat diketahui bahwa rerata kadar TNF- $\alpha$  serum tertinggi terdapat pada kelompok B (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l/ injeksi) dan terendah pada kelompok A (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l + CFA – IFA 100  $\mu$ l/ injeksi) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hasil analisis dengan menggunakan *Post Hoc Tukey's Test*, terdapat perbedaan kadar TNF- $\alpha$  serum

yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Ini berarti bahwa pemberian diet tinggi lemak sebesar 40 gram setiap harinya mampu menimbulkan kenaikan yang bermakna pada kadar TNF- $\alpha$  serum. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dubey dan Hesong (2006) bahwa dengan paparan diet tinggi lemak yang kronis akan menyebabkan kenaikan kadar TNF- $\alpha$  yang merupakan salah satu sitokin mediator proinflamasi yang nantinya akan menyebabkan inflamasi vaskuler sebagai bagian dari penyakit sindroma metabolik.

Hasil dari kelompok A (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l + CFA – IFA 100  $\mu$ l/ injeksi) secara deskriptif menunjukkan rerata kadar TNF- $\alpha$  serum yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, hal ini menunjukkan efek protektif terhadap penumpukan jaringan adiposa setelah diberikannya vaksin. Seperti yang diketahui adanya infiltrasi makrofag ke jaringan adiposa akan mengakibatkan meningkatnya produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Kondisi proinflamasi tersebut mengakibatkan penurunan ekspresi HSL dan ATGL sehingga progresivitas sindroma metabolik meningkat (Antunes, *et al.*, 2008; Chen, 2006). Maka dari itu efek protektif yakni dengan menurunnya kadar TNF- $\alpha$  sebagai sitokin inflamasi dalam reaksi inflamasi vaskular dapat dihambat. Fungsi adjuvan pada vaksinasi sendiri yaitu untuk meningkatkan reaksi imun terhadap antigen. Namun secara statistik, perbedaan menjadi tidak bermakna dikarenakan simpangan deviasi (SD) yang besar pada setiap kelompok perlakuan. Hal ini kemungkinan disebabkan rerata asupan pakan per hari tiap kelompok perlakuan belum optimal (belum mencapai 40 gram/hari), sehingga untuk menginduksi terjadinya reaksi inflamasi vaskular pada kelompok kontrol positif belum optimal. Meskipun demikian kadar TNF- $\alpha$  serum pada

kelompok kontrol (+) lebih tinggi daripada kontrol (-) yang mengindikasikan adanya kejadian inflamasi vaskular. Selain itu, pada kelompok perlakuan dengan penambahan ajuvan CFA-IFA ditemukan hasil bahwa kadar TNF- $\alpha$  lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, CFA-IFA memiliki bahan dasar lemak sehingga kemungkinan mampu mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid yang menyebabkan penumpukan TG pada jaringan adiposa (Mattson, 2009) sehingga asupan pakan diet tinggi lemak kelompok perlakuan dengan penambahan ajuvan CFA-IFA masih tinggi dan berdampak pada hasil rerata kadar TNF- $\alpha$  serum yang tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan terdapat pemberian vaksin *heat killed S. Typhimurium*.

Sedangkan pada kelompok B (diet tinggi lemak ditambah vaksin 100  $\mu$ l tanpa ajuvan CFA-IFA) kadar TNF- $\alpha$  serum lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (+), hal ini dimungkinkan oleh adanya variasi biologis dari hewan coba pada kelompok B (mungkin dari usia tikus yang berbeda, beberapa ada yang asupan makanannya lebih baik dibandingkan dengan tikus lainnya, dll). Selain itu, dimungkinkan juga adanya pengaruh dari jadwal pemberian vaksinasi yang kurang merata pada tikus kelompok B dikarenakan terbatasnya waktu untuk pemberian vaksinasi.

### 6.3 Analisis Peran TNF- $\alpha$ dalam Sindroma Metabolik

TNF- $\alpha$  pada awalnya ditemukan pada tumor tertentu yang mengalami pendarahan. Ternyata pendarahan ini disebabkan adanya nekrosis jaringan. Pada penderita infeksi oleh parasit ditemukan bahan yang dinamakan *cahectin* sebagai penyebab kekurusan yang berlebihan (kakeksi). Dua jenis mediator tersebut ternyata termasuk golongan sitokin yang kemudian dinamakan tumor nekrosis atau TNF (Subowo, 2009).

TNF terutama dihasilkan oleh sel makrofag dan sel-sel jenis lainnya dengan berbagai aktivitas biologi pada sel-sel sasaran yang termasuk sistem imun maupun bukan. Ada 2 bentuk TNF, yaitu TNF- $\alpha$  dan TNF- $\beta$ . TNF- $\alpha$  diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, B, NK, astrosit dan kupfer.

TNF- $\alpha$  dapat dihasilkan oleh beberapa sel, terutama makrofag akibat adanya suatu stresor ataupun infeksi. Pada saat ini beberapa studi melaporkan bahwa akan terjadi peningkatan terhadap produksi TNF- $\alpha$  pada beberapa penyakit atau stresor, namun belum ditemukan nilai *cut off point* (Durum *et al.*, 2003). TNF terutama TNF- $\alpha$  merupakan salah satu mediator penting pada proses hiperkolesterolemia pemicu atherosklerosis (Abbas *et al.*, 2000).

Pada kondisi penyakit sindroma metabolik sendiri kadar TNF- $\alpha$  sebagai sitokin proinflamasi kuat dalam keadaan tinggi. Hal ini dikarenakan TNF- $\alpha$  menurunkan supresi insulin terinduksi dari produksi glukosa hepatic, meningkatkan asam lemak dan sintesis kolesterol, meningkatkan produksi *very low density lipoprotein* (VLDL) hepatic, dan meningkatkan lipolisis adiposa yang menyebabkan adiponektin sebagai *heart protector* menurun. Dikarenakan kadar TNF- $\alpha$  dalam keadaan tinggi sehingga menyebabkan keadaan inflamasi vaskular yaitu hipersensitivitas yang berlebihan. Meskipun inflamasi merupakan respon yang bersifat protektif dengan mempunyai beberapa tujuan, tetapi dapat berbahaya apabila hipersensitivitasnya berlebihan; yang dapat menimbulkan kematian atau kerusakan organ yang persisten dan progresif akibat inflamasi kronis dan fibrosis yang terjadi kemudian (atherosklerosis). Dan dapat diketahui atherosklerosis merupakan salah satu manifestasi klinis penting dari sindroma metabolik.

#### 6.4 Mekanisme Vaksin *Heat Killed S. Typhimurium* dalam Pembentukan Antibodi Protektif

Mekanisme vaksin *heat killed* dalam pembentukan antibodi protektif sendiri dapat dijelaskan melalui pemberian isolat bakteri *S. Typhimurium* dapat menginduksi terbentuknya antibodi yang spesifik terhadap PC seperti yang telah dibuktikan oleh penelitian sebelumnya. Mekanisme terbentuknya antibodi anti-PC karena pemberian *S. Typhimurium* dapat melalui dua mekanisme, yaitu pembentukan antibodi independen sel T dan dependen sel T. Melalui mekanisme pembentukan antibodi independen sel T, PC pada bakteri *S. Typhimurium* akan langsung dikenali oleh sel B yang merupakan sel pembentuk antibodi melalui reseptor sel B atau B cell receptor (BCR).

Ikatan antara PC dan BCR akan menstimulasi proliferasi atau pembelahan sel B yang kemudian akan aktif dalam mensintesa antibodi immunoglobulin M (IgM) yang spesifik terhadap PC. Meskipun demikian, pembentukan antibodi melalui jalur ini tidak dapat menginduksi terbentuknya antibodi jangka panjang yang protektif terhadap atherosclerosis yang nantinya akan dapat berkembang secara kompleks menjadi sindroma metabolik.

Ox-LDL akan mengekspresikan PC pada membran luarnya yang mengakibatkan proses eliminasi Ox-LDL oleh makrofag yang ditangkap melalui scavenger receptor (SR). Proses eliminasi Ox-LDL oleh makrofag akan mengakibatkan terbentuknya *foam cell* yang akan mengeluarkan berbagai macam sitokin inflamasi, molekul adhesi, faktor pertumbuhan, dan apoptosis atau kematian sel.

Teori tersebut juga didukung kuat dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara peningkatan jumlah

kadar sitokin proinflamasi terutama dalam penelitian ini adalah TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Hal tersebut membuktikan bahwa semakin meningkatnya sitokin proinflamasi (dalam penelitian ini adalah TNF- $\alpha$ ) maka angka terjadinya sindroma metabolik akan semakin meningkat juga.

Antibodi anti-PC yang terbentuk akan berikatan dengan PC pada Ox-LDL. Karena PC diikat oleh antibodi, PC tidak akan berikatan dengan SR pada makrofag sehingga pembentukan *foam cell*, penebalan dinding pembuluh darah atau sindroma metabolik tentunya dapat dicegah. Hal tersebut telah dibuktikan bahwa pemberian bakteri *S. Typhimurium* ternyata mampu mencegah salah satu komponen munculnya prekursor sindroma metabolik yakni jumlah kadar TNF- $\alpha$  secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $p < 0,05$ ).

Selain antigen utama, penambahan adjuvan merupakan hal yang penting dalam protokol pemberian vaksin. Ajuvan adalah suatu bahan vaksin yang digunakan untuk menjaga integritas antigen, meningkatkan respon imun terhadap antigen, dan mencegah terjadinya toleransi terhadap suatu antigen vaksin. Dengan kata lain, adjuvan dibutuhkan untuk membantu pembentukan respon imun yang adekuat dalam mencegah suatu penyakit. Ajuvan yang dipilih dalam penelitian ini merupakan CFA-IFA.

Obesitas merupakan suatu kondisi yang saling berhubungan yakni berproses dari inflamasi vaskuler yang nantinya memiliki peranan dalam proses pembentukan sindroma metabolik. Hubungan kondisi tersebut diperantarai oleh berbagai macam substansi, salah satunya adalah Ox-LDL.

Mengingat peran Ox-LDL yang sangat penting dalam menginduksi terjadinya obesitas maka adanya antibodi anti-PC yang dapat mengikat Ox-LDL

tentu saja dapat mencegah progresivitas dari obesitas yang menjadi bagian penting dari pembentukan sindroma metabolik nantinya.

### 6.5 Potensi Vaksin Sindroma Metabolik dan Keterbatasan Penelitian

Metode pemberian vaksin *heat killed Salmonella Typhimurium* pada manusia sama dengan metode pemberian vaksin pada hewan coba. Diharapkan setelah pemberian vaksin selesai, vaksin dapat melaksanakan peranannya dengan baik. Vaksin berperan dalam memproduksi sel memori yang nantinya dapat memproduksi antibodi protektif yakni antibodi yang dapat menginduksi Ox-LDL terhadap penyakit sindroma metabolik sendiri.

Agar vaksin dapat bekerja dengan baik pada manusia, maka penting untuk mengetahui faktor-faktor resiko dari penyakit sindroma metabolik. Vaksin akan lebih poten pada manusia dengan faktor resiko penyakit sindroma metabolik. Sindroma metabolik sendiri adalah suatu penyakit yang gejalanya belum jelas dan tidak jarang penderitanya telah mengalami komplikasi dari penyakit sindroma metabolik.

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui dosis efektif vaksin *heat killed* berbahan bakteri *S. Typhimurium* yang bertujuan dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$  serum baik pada hewan coba maupun pada manusia.

Pada penelitian ini dapat diketahui bahwa secara deskriptif, kadar TNF- $\alpha$  serum pada kelompok perlakuan dengan pemberian vaksin *heat killed S. Typhimurium* + CFA-IFA lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan dengan pemberian vaksin tanpa disertai ajuvan maupun kelompok perlakuan dengan ajuvan saja. Namun, secara statistik hal tersebut tidak signifikan. Hal tersebut dimungkinkan adanya variasi biologis pada hewan coba (hewan coba tidak memenuhi kriteria inklusi penelitian), jumlah sampel yang kurang, dan rerata

asupan pakan kelompok perlakuan yang belum mendekati nilai normal sebesar 40 gram/hari. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap vaksin *heat killed S. Typhimurium* dengan ajuvan CFA-IFA mempengaruhi kadar TNF- $\alpha$  serum pada tikus Wistar jantan yang diberi diet tinggi lemak sehingga nantinya akan diperoleh hasil penelitian yang secara statistik diperoleh simpangan deviasi (SD) yang tidak terlalu besar.

Dan diharapkan di masa depan, vaksin *heat killed S. Typhimurium* dapat memberikan mamfaat yang baru bagi pencegahan penyakit sindroma metabolik.

