

## BAB 6

## PEMBAHASAN

**6.1 Pembahasan Hasil Penelitian****6.1.1 Studi *in silico***

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara *in silico* menggunakan peralatan komputer dengan sistem operasi *Microsoft Windows 7* dengan *browser Google Chrome* versi 35.0.1916.153 m. Studi *in silico* yang dilakukan merupakan studi pendahuluan sebagai penunjang dari studi *in vivo*. Studi *in silico* yang dilakukan meliputi pencarian database protein LOX-1, pemodelan stuktur 3 dimensi dari protein LOX-1, prediksi aksesibilitas permukaan, analisis antigenisitas, prediksi epitop (sel B dan sel T), dan analisis homologi (antara protein LOX-1 manusia dengan protein manusia lainnya, dan antara protein LOX-1 manusia dengan protein LOX-1 tikus).

Database protein LOX-1 didapatkan dari server UniProt (<http://www.uniprot.org>) dimana semua informasi mengenai protein LOX-1 tersedia pada server ini, meliputi sekuens asam amino penyusun protein, fungsi protein secara molekuler, lokasi subseluler protein, modifikasi post translasi (*post translational modification* / PTM), produk alternatif, dan lain-lain.

Disfungsi endotel merupakan tahap awal terjadinya aterosklerosis yang sangat krusial dimana proses ini disebabkan oleh adanya interaksi antara LOX-1 dengan OxLDL (Tate, 2007). Dari data Uniprot dinyatakan bahwa LOX-1 merupakan reseptor pada sel endotel pembuluh darah yang berperan dalam pengenalan, internalisasi dan degradasi dari OxLDL dimana *C-type lectin domain*

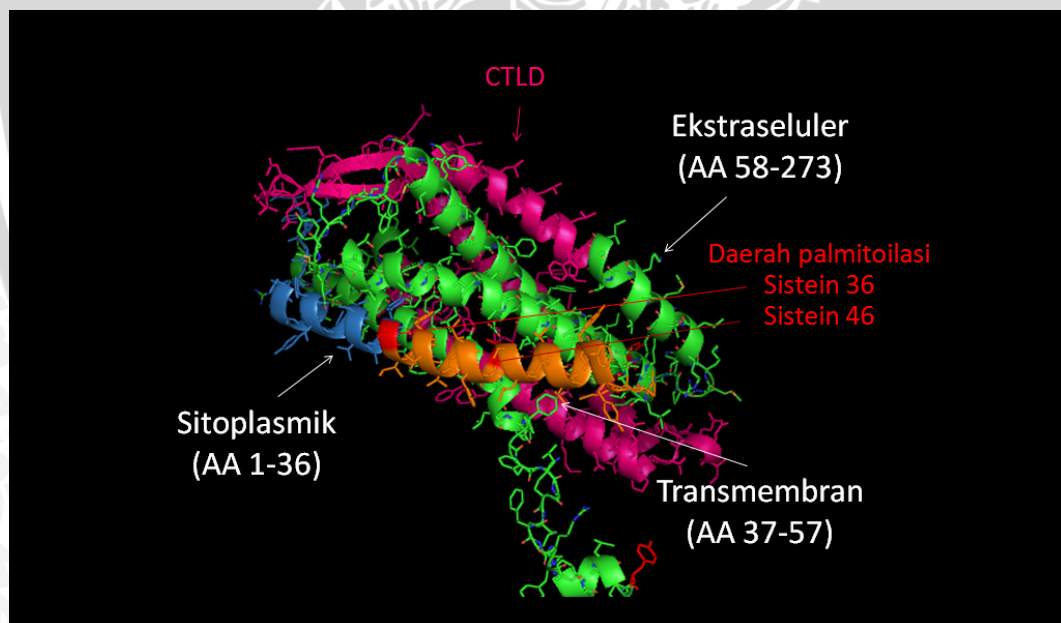
(CTLTD) merupakan domain pengenalan dan pengikatan LOX-1 dengan OxLDL, yaitu pada asam amino 151-265. LOX-1 terletak pada membran sel dimana lokalisasi LOX-1 pada *membrane raft* membutuhkan palmitoilasi (UniProt, 2014). *Raft microdomain* adalah daerah pada membran sel yang kaya akan spingolipid dan kolesterol dimana *lipid raft* ini merupakan bagian penting dalam signaling sel atau yang dikenal sebagai *platform* dari signaling (Ewing *et al.*, 2012).

LOX-1 mengalami modifikasi post translasi berupa glikosilasi *N-linked* yang berperan penting dalam ekspresi LOX-1 pada permukaan sel. Selain itu, LOX-1 juga mengalami PTM berupa palmitoilasi yang berperan penting pada lalu lintas (*trafficking*) dan fungsi dari reseptor LOX-1. LOX-1 mengalami palmitoilasi pada residu sistein 36 dan 46 yang berperan penting dalam lokalisasi LOX-1 pada *membrane / lipid raft* atau penarikan LOX-1 kedalam *raft microdomain*, serta dalam aktivitasnya meng-*uptake* ligan. Sistein 36 merupakan daerah palmitoilasi, sedangkan *conserved* sistein 46 berperan penting dalam perlipatan (*folding*) dan palmitoilasi dari sistein 36. LOX-1 menginternalisasi ligan OxLDL melalui jalur endositosis *caveola / raft-dependent*, kemudian menghantarkannya menuju endosom (Kuramochia *et al.*, 2013).

Terdapat tiga produk alternatif atau isoform dari LOX-1 dimana isoform 1 dipilih sebagai sekuens *canonical* yang terdiri dari 273 asam amino dengan berat molekul 30,959 Da. UniProtKB/Swiss-Prot memilih sekuens *canonical* berdasarkan empat kriteria, antara lain sekuens yang paling sering ada; sekuens yang paling mirip dengan sekuens *orthologous* pada spesies lain; panjang atau komposisi asam amino dapat mendeskripsikan domain, isoform, polimorfisme dan PTM yang paling jelas dibanding sekuens lainnya; dan jika tidak ada informasi apapun maka dipilih sekuens yang paling panjang. Isoform 1

mempunyai sekuens yang paling panjang dibanding isoform lainnya. Sekuens pada isoform 2 dan 3 berbeda dengan sekuens *canonical*, yaitu pada sekuens asam amino 142 - 273 untuk isoform 2 dan sekuens asam amino 189 – 273 untuk isoform 3.

Untuk mengetahui struktur 3 dimensi dari protein LOX-1, maka dilakukan pemodelan protein menggunakan SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) dan didapatkan tiga model dimana ketiganya mempunyai *sequence identity* sebesar 100%, *sequence similarity* sebesar 63% dengan range asam amino 141-270. Perbedaan ketiganya adalah hanya pada nilai QMEAN. *Template* tersebut kemudian digunakan untuk visualisasi domain LOX-1 beserta daerah palmitoilasi seperti pada Gambar 5.14.



**Gambar 5.14 Visualisasi Domain LOX-1 beserta Daerah Palmitoilasi.**

Prediksi aksesibilitas permukaan, analisis antigenisitas dan prediksi epitop didapatkan melalui server IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell>). Dari analisis yang dilakukan, didapatkan bahwa 6 sekuens peptida yang

diprediksi mempunyai akses permukaan (1 peptida pada domain sitoplasmik, 3 peptida pada domain NECK, dan 2 peptida pada CTLD), 8 sekuens peptida yang bersifat antigenik (1 peptida pada domain sitoplasmik, 1 peptida pada domain sitoplasmik-TM, 1 peptida pada domain TM-NECK dan 5 peptida dari CTLD), dan 10 sekuens peptida yang diprediksi sebagai epitop terhadap sel B (1 peptida pada domain sitoplasmik, 5 peptida pada domain NECK, dan 4 peptida pada CTLD). Posisi-posisi epitop ini selanjutnya dapat dialignmentasi (penyejajaran) untuk kemudian didapatkan sekuens peptida terbaik yang akan direkomendasikan sebagai sekuens dari vaksin peptida LOX-1. Sedangkan pada penelitian ini hanya bertujuan untuk menganalisis sekuens dan posisi asam amino mana saja dari protein LOX-1 yang diprediksi mempunyai aksesibilitas permukaan, bersifat antigenik dan sebagai epitop sel B.

Respons antibodi terhadap protein antigen membutuhkan pengenalan antigen melalui sel T helper dan koordinasi antara limfosit T dan B yang spesifik antigen terhadap antigen tersebut. Antigen protein dikenali oleh limfosit T dan B yang spesifik pada organ limfoid perifer dimana populasi sel yang teraktivasi akan bermigrasi pada organ ini untuk menginisiasi terjadinya respons imun humoral. Antigen akan di-uptake oleh sel dendritik (APC) dan dipresentasikan kepada sel T, kemudian sel Th akan teraktivasi dan terinduksi untuk mengekspresikan protein membran (CD40L) dan sitokin (Abbas, 2007). Selain prediksi epitop sel B, juga dilakukan prediksi epitop sel T yang juga tidak kalah penting.

Prediksi epitop sel T juga dilakukan pada server IEDB, namun sebelumnya dipilih jenis MHC beserta kelompok alel yang sesuai dimana IEDB akan memprediksi epitop sel T suatu protein menggunakan beberapa metode

yang sesuai dengan alel yang dipilih. Metode yang disediakan oleh server IEDB antara lain metode konsensus, *Average relative binding (arb)*, *combinatorial library*, *NN-align* (netMHCII-2.2), *SMM-align* (netMHCII-1.1), *Sturniolo*, dan *NetMHCIIpan*. Pada analisis yang dilakukan, dipilih metode yang direkomendasikan oleh IEDB (*IEDB recommended*) dan digunakanlah metode *NetMHCIIpan* yang disesuaikan dengan alel yang dipilih, yaitu alel MHC II pada populasi Indonesia, DRB1\*1431 dan DRB3\*0303.

Metode prediksi NetMHCIIpan dilakukan dengan skrining inti NetMHCIIpan (*NetMHCIIpan core*). Pada 20 sekuens peptida teratas, yaitu sekuens peptida yang mempunyai persentil terendah, terdapat sebanyak 6 inti NetMHCIIpan pada sekuens - sekuens peptida tersebut, antara lain LFRVRGAVS, LKINSTADL, VYAENCILA, FSICQKKAN, LWEDGSPLM, FIQQAISYS. Dari hasil prediksi juga didapatkan kemampuan afinitas epitop tersebut terhadap MHC II dimana diharapkan dengan afinitas yang tinggi maka APC akan mempresentasikan antigen peptida kepada sel T dengan lebih optimal sehingga didapatkan ikatan kompleks trimolekuler yang selanjutnya akan menstimulasi respons imun humoral dan seluler.

Dari analisis BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), didapatkan bahwa protein LOX-1 tidak mempunyai homologi yang tinggi dengan protein didalam tubuh dimana tidak ada sekuens asam amino yang memiliki kesamaan dengan susunan asam amino LOX-1 lebih dari 80%, sehingga potensi LOX-1 dalam menginduksi terjadinya autoimun cukup rendah. Sedangkan dari analisis BLASTP antara LOX-1 manusia dan hewan, didapatkan bahwa protein LOX-1 manusia memiliki homologi sebesar 50% dengan LOX-1 tikus yang digunakan sebagai hewan model. Studi *in silico* yang dilakukan adalah menggunakan

sekuens asam amino penyusun protein LOX-1 manusia dimana target utama pencegahan aterosklerosis adalah manusia. Dari hasil analisis yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa LOX-1 berpotensi untuk digunakan sebagai kandidat vaksin. Tentunya hal ini perlu diteliti lebih lanjut dengan dilakukannya studi *in vivo* dan *in vitro*.

### 6.1.2 Studi *in vivo*

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan *randomized post test only controlled group design* dengan model hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diberi diet aterogenik dan protein LOX-1 dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian protein LOX-1 terhadap pembentukan immunoglobulin G (IgG) anti-LOX-1.

Penelitian ini dilakukan selama 56 hari terhadap 28 ekor hewan coba tikus yang dibagi menjadi 7 kelompok penelitian, yaitu 2 kelompok kontrol (negatif dan positif), serta 5 kelompok perlakuan yang diberi diet aterogenik. Perbedaan dari lima kelompok ini terletak pada pemberian protein LOX-1 sebagai antigen dengan alum sebagai adjuvan yang diimunitasikan kepada hewan coba dengan berbagai dosis. Kelompok P<sub>1</sub> dengan pemberian 1 ng protein LOX-1 dalam 100 µl PBS + 100 µl alum, kelompok P<sub>2</sub> dengan pemberian 10 ng protein LOX-1 dalam 100 µl PBS + 100 µl alum, kelompok P<sub>3</sub> dengan pemberian 100 ng protein LOX-1 dalam 100 µl PBS + 100 µl alum, kelompok P<sub>4</sub> dengan pemberian 10000 ng (1 µg) protein LOX-1 dalam 100 µl PBS + 100 µl alum, dan kelompok P<sub>5</sub> dengan pemberian 100 µl alum saja. Protein LOX-1 yang diberikan dengan cara diimunitasikan ke hewan coba (vaksinasi aktif) dengan

ajuvan alum diharapkan dapat menginduksi pembentukan antibodi spesifik terhadap LOX-1 yang dapat mencegah terjadinya aterosklerosis.

### **6.1.1 Pengaruh Pemberian Diet terhadap Asupan Pakan dan Kenaikan Berat Badan Tikus**

Diet normal dan aterogenik diberikan pada semua kelompok penelitian dengan jumlah yang sama (homogen) dengan harapan semua pakan yang diberikan akan habis termakan dengan rerata jumlah asupan yang sama setiap harinya. Asupan pakan diukur setiap hari dengan cara menimbang sisa pakan dimana selisih antara berat pakan yang diberikan dengan sisa pakan dicatat sebagai jumlah asupan pakan.

Diet yang digunakan pada penelitian ini adalah diet standar yang digunakan secara internasional, yaitu diet *American Institution of Nutrition'93M* (AIN-93M) dengan beberapa modifikasi (Reeves *et al.*, 1993). Modifikasi yang dilakukan adalah dengan penggunaan vitamin dan mineral lokal, yaitu produk yang tersedia di Indonesia, bukan menggunakan vitamin dan mineral mix AIN'93. Namun tetap dilakukan penyesuaian komposisi antara vitamin dan mineral yang digunakan dengan vitamin dan mineral mix AIN-93M. Selain itu, modifikasi juga dilakukan pada penentuan diet aterogenik, dimana pada AIN-93M hanya ditetapkan diet tinggi lemak (*high fat diet*) saja, bukan diet aterogenik, sedangkan diet tinggi lemak berbeda dengan diet aterogenik. Diet tinggi lemak hanya dapat menginduksi terjadinya dislipidemia, bukan pembentukan plak aterosklerosis sehingga dilakukan penambahan bahan yang bersifat aterogenik seperti kolesterol, asam kolat dan propiltiourasil (PTU) (Pellizon, 2009).

Diet normal modifikasi AIN'93 M diberikan pada kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang tidak diberi perlakuan apapun, dengan nilai gizi 70% karbohidrat, 15 protein, dan 9% lemak dari total energi 3,9 Kkal/gram. Dalam 1 kg pakan terdiri dari 620 gram tepung jagung, 100 gram sukrosa, 40 gram minyak kedelai, 65 gram gelatin, 80 gram kasein, 50 gram *carboxy methyl cellulose* (CMC), dan 5 butir suplemen vitamin dan mineral (*Supravit*). Sedangkan diet aterogenik modifikasi AIN-93M diberikan pada kelompok kontrol positif, yaitu tikus model aterosklerosis, dan kelompok perlakuan, yaitu tikus yang diberikan protein LOX-1 dan alum dengan nilai gizi 33% karbohidrat, 50% lemak dan 16% protein dari total energi 4,8 Kkal/gram. Dalam 1 kg pakan terdiri dari 210 gram tepung jagung, 175 gram sukrosa, 105 gram minyak kelapa, 105 gram korvet, 50 gram minyak kedelai, 50 gram gelatin, 128 gram kasein, 51 gram CMC, 5 butir suplemen vitamin dan mineral (Handayani *et al.*, 2011; Handayani *et al.*, 2012), 3 gram asam kolat, 10 gram kolesterol (El-Shatanovi *et al.*, 2012), dan 20 gram PTU (Shirai *et al.*, 1984).

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa asupan pakan tikus adalah tidak homogen ( $p=0,017$ ), yaitu antara kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Hal ini kemungkinan dikarenakan berbedanya jenis diet yang diberikan. Jumlah asupan pakan pada kelompok kontrol negatif ditemukan lebih tinggi dibandingkan jumlah asupan pakan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan yang mendapatkan pakan diet aterogenik. Pada diet aterogenik, terdapat PTU dimana menurut Farmakope Indonesia IV, PTU mempunyai rasa yang pahit (Depkes, 1955), sehingga terjadi penurunan nafsu makan tikus. Pada penelitian ini, PTU diberikan bersamaan dengan bahan pakan lainnya dan dicampur menjadi sediaan solid dan diberikan secara per oral,



sehingga tikus dapat merasakan pahitnya rasa dari pakan yang berimplikasi pada penurunan nafsu makan dan asupan pakan tikus. Seharusnya dipilih rute atau bentuk sediaan lainnya untuk menyasiasi rasa pahit dari PTU seperti pada penelitian Pang *et al.* (2010), digunakan tikus *Sprague Dawley* (SD) sebagai hewan model aterosklerosis dengan pemberian makanan berupa emulsi tinggi lemak, terdiri dari campuran 4% kolesterol, 1% asam kolat dan 0,5% PTU dan minyak salad yang diberikan melalui rute intragastrik. Penggunaan rute intragastrik dengan bentuk sediaan emulsi dapat menjadi rekomendasi pemilihan rute dan bentuk sediaan untuk pemberian PTU yang mempunyai rasa pahit.

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa tidak terdapat pengaruh pemberian diet terhadap rerata kenaikan berat badan tikus ( $p=0,610$ ). Hal ini dapat disebabkan akibat rendahnya asupan pakan tikus. Tikus kelompok kontrol negatif mengalami kenaikan berat badan yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya, hal ini disebabkan oleh tingginya asupan pakan tikus pada kelompok ini dimana pada kelompok kontrol negatif, tikus diberikan diet normal yang mempunyai rasa lebih enak dibanding diet atherogenik yang pahit.

#### **6.1.2 Pengaruh Pemberian Protein LOX-1 dan Alum terhadap Kadar IgG anti-LOX-1**

Pada penelitian ini selain dilakukan pengukuran kadar IgG anti-LOX-1 serum, juga dilihat pengaruh dan kolerasi antara pemberian dosis protein LOX-1 dengan kadar IgG anti-LOX-1 serum tikus yang diberi diet atherogenik. Pemberian diet tinggi atherogenik dapat meningkatkan ekspresi LOX-1 yang diinduksi oleh interaksi antara OxLDL dan LOX-1 (Tate, 2007).

OxLDL dapat menginduksi ekspresi LOX-1, baik pada tingkat mRNA maupun tingkat protein yang bersifat *dose-dependent* dan *time-dependent*. ROS

memperantarai OxLDL dalam menginduksi ekspresi LOX-1 pada sel otot polos pembuluh darah melalui jalur transduksi NF- $\kappa$ B dan JNK (Sun and Chen, 2010). OxLDL dapat menginduksi terjadinya apoptosis sel endotel melalui aktivasi jalur stres retikulum endoplasma yang bersifat bergantung pada ekspresi LOX-1 (*LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway*). OxLDL dapat mengupregulasi ekspresi LOX-1 sehingga meningkatkan kadar Nox-4 dan mencetuskan tiga jalur terjadinya stres retikulum endoplasma yang menyebabkan aktivasi mediator pro-apoptosis seperti *C/EBP homologous protein* (CHOP), *B cell lymphoma 1* (Bcl-1) dan caspase 12 dimana aktivasi ini kemudian akan menginduksi terjadinya apoptosis dari sel endotel (Hong *et al.*, 2014).

Ajuvan ditambahkan pada vaksin dengan tujuan untuk meningkatkan respons antibodi terhadap antigen. Pada penelitian yang dilakukan oleh Littleton dan Gruenke (2013) yaitu mengenai studi perbandingan antara tiga jenis ajuvan pada hewan coba mencit, antara lain *Freund's complete adjuvant* (FCA), *Freund's incomplete adjuvant* (FIA), dan alum, dengan antigen berupa ovalbumin, didapatkan bahwa vaksinasi antigen-ajuvan dapat memicu produksi antibodi yang tinggi terhadap ovalbumin dimana dari tiga ajuvan tersebut, alum merupakan ajuvan yang *cost-effective* dan paling aman untuk diberikan kepada hewan coba (Littleton and Gruenke, 2013). Selain itu, alum telah digunakan oleh Iwamoto *et al.* (2009) sebagai ajuvan dari protein *recombinant human LOX-1* (rhLOX-1) dengan perbandingan 1:1 yang kemudian diimunisasikan pada ayam melalui rute intraperitoneal (i.p) sehingga dapat memproduksi antibodi. Limfa ayam kemudian diisolasi dan dilakukan amplifikasi gen region variable imunoglobulin ( $V_H$  dan  $V_L$ ) untuk mengonstruksi *single chain fragment variable*

(scFv) antibodi monoklonal menggunakan teknologi *phage display* (Iwamoto *et al.*, 2009).

Pada penelitian ini, didapatkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan kelompok penelitian terhadap kadar IgG anti-LOX-1 ( $p = 0,010$ ), yaitu antara kelompok  $K_n$  dan  $P_5$ , serta  $K_p$  dan  $P_5$ . Sedangkan dari uji kolerasi didapatkan bahwa terdapat kolerasi yang lemah antara dosis protein LOX-1 dan kadar IgG anti-LOX-1 ( $r = 0,436$ ) yaitu pada kelompok perlakuan 1 - 4 yang masing-masing diberikan protein LOX-1 dengan dosis 1 ng, 10 ng, 100 ng dan 1  $\mu$ g dalam 100  $\mu$ l PBS dan 100  $\mu$ l alum (1:1). Meskipun tidak ada perbedaan secara bermakna antar kelompok perlakuan, namun dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan kadar IgG anti-LOX-1 seiring dengan peningkatan dosis, sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis antigen yang digunakan pada penelitian ini belum cukup optimal untuk menginduksi pembentukan antibodi.

Penelitian eksplorasi dosis serupa dilakukan oleh Pauwels *et al.* (1979) yaitu mengetahui pengaruh dosis antigen terhadap produksi IgE pada tikus galur yang berbeda dimana tikus diimunisasi dua kali dengan interval waktu 28 hari melalui injeksi intraperitoneal 10 ng, 100 ng, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g, 1 mg antigen ovalbumin dengan ajuvan  $Al(OH)_3$  dalam volume 0,5 ml. Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa dosis antigen yang optimal dalam pembentukan IgE adalah berbeda dari satu galur dengan galur lainnya dan respons antibodi bersifat dependen terhadap dosis antigen dimana dosis antigen yang terlalu tinggi atau terlalu rendah justru dapat menurunkan produksi IgE. Dosis optimum ovalbumin dalam produksi IgE pada tikus galur BN, Wistar R/A dan PVG/C adalah 1  $\mu$ g, pada tikus DA adalah 10  $\mu$ g, dan pada tikus LEW adalah 100  $\mu$ g (Pauwels *et al.*, 1979). Penelitian lainnya yaitu oleh Weinreich *et al.* (2001) dengan tujuan

untuk mengetahui potensi vaksin subunit TB berbasis protein fusi antigen ESAT-6 dan 85B. Tikus diimunisasi dengan vaksin dosis 0,01 – 50 µg yang diemulsifikasi dengan 250 µg dimetil dioktadesil ammonium bromide dan ajuvan 25 µg monofosforil lipid A. Vaksin (0,2 ml/mencit) diinjeksikan sebanyak tiga kali secara subkutan dengan jarak 2 minggu. Dari penelitian ini, didapatkan bahwa 10 µg merupakan dosis optimum yang dapat memberikan proteksi pada limfa (Weinreich, *et al* (2001).

Pada penelitian ini, kadar IgG anti-LOX-1 tertinggi terdapat pada kelompok P5 yaitu kelompok tikus yang diberi diet aterogenik dan hanya diimunisasi dengan ajuvan alum, tanpa disertai pemberian antigen LOX-1. Dari hasil ini, muncul pertanyaan bagaimanakah mekanisme alum dalam menginduksi pembentukan IgG anti-LOX-1 pada tikus model aterosklerosis yang tidak diimunisasi dengan antigen LOX-1 dan bagaimana efek pemberian alum sebagai ajuvan terhadap perkembangan ateroskelrosis.

Alum dapat menginduksi ateroproteksi pada tikus hiperkolesterolemia akibat adanya *uptake* lokal dari antigen pada daerah injeksi. Dinyatakan mempunyai efek ateroprotektif meskipun tanpa disertai dengan pemberian antigen dalam imunisasi. Hal ini dibuktikan oleh Wigren *et al.* (2009) yang melakukan studi penelitian untuk membuktikan mekanisme kerja alum sebagai ajuvan dari vaksin aterosklerosis pada mencit C57BL/6 *wild type* dan Apoe *-/-* yang diberi diet tinggi lemak (0,15% kolesterol, 21% lemak). Mencit diinjeksikan alum (100 µl) dalam PBS (1:1) secara subkutan pada usia mencit 6, 9, dan 11 minggu. Dari hasil analisis splenosit didapatkan bahwa alum dapat meningkatkan sel Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> dan penurunan ekspresi marker aktivasi sel T seperti CD28 dan ICOS pada mencit Apoe *-/-*, namun tidak pada mencit *wild*

*type*. Pada mencit normal (*wild type*), alum dapat menginduksi peradangan yang ditandai dengan peningkatan sekresi TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  dari splenosit dan penurunan kadar IL-10 pada plasma dimana alum tidak mempengaruhi sel Treg atau ekspresi marker aktivasi pada CD4 sel T mencit *wild type* (Wigren *et al.*, 2009).

Dari penjelasan diatas muncul hipotesis mengenai alasan peningkatan kadar IgG anti-LOX-1 pada kelompok perlakuan 5, yaitu (Wigren *et al.*, 2009):

1. Peningkatan kadar IgG anti-LOX-1 disebabkan oleh mekanisme kerja alum yang dapat mengenali antigen *self* pada daerah injeksi. Antigen *self* yang dimaksud adalah LOX-1, yang dapat meningkat ekspresinya seiring dengan pemberian diet aterogenik.
2. Antigen ini kepada APC yang bermigrasi menuju jaringan limfatik perifer dimana APC tersebut dapat mengaktivasi Treg spesifik antigen untuk melawan autoimunitas terhadap antigen.
3. Adanya pengenalan antigen *self* oleh alum menyebabkan *uptake* LOX-1 oleh APC yang bermigrasi menuju jaringan limfatik perifer dimana APC tersebut dapat mengaktivasi Treg spesifik LOX-1 untuk melawan autoimunitas terhadap antigen, yaitu setelah beberapa hari diet aterogenik diberikan.

Ekspresi LOX-1 pada sel endotel dapat memediasi interaksi antara sel endotel dan platelet dimana platelet juga berperan penting dalam proses aterogenesis. Interaksi antara LOX-1 dengan OxLDL dapat menginduksi produksi ROS oleh sel endotel, sel imun (neutrofil, monosit, dan makrofag), dan juga platelet yang berperan penting dalam pembentukan trombus (Marwali *et al.*, 2007). *Adenine di-Phosphate* (ADP) merupakan agonis yang secara fisiologi

berperan penting pada homeostasis dan trombosis secara normal (Murugappa and Kunapuli, 2006). LOX-1 pada platelet berperan penting pada ikatan integrin platelet dengan fibrinogen melalui interaksinya dengan protein kinase C (PKC) yang distimulasi oleh ADP. Stimulasi ADP melalui reseptor ADP dapat mengaktifasi jalur signaling *inside-out* dari integrin platelet, yaitu  $\alpha_{ab}\beta_3$  yang melibatkan PKC. Pemblokadean LOX-1 dengan antibodi anti-LOX-1 dapat menghambat aktivasi integrin dengan menghambat aktivasi PKC. Sedangkan pemberian aspirin dan pravastatin secara sinergis dapat bekerja sebagai anti platelet dengan cara menurunkan ekspresi LOX-1 dan ROS (Marwali *et al.*, 2007). Pemblokadean LOX-1 dengan pemberian anti-LOX-1 juga dapat mencegah progresivitas terjadinya nefropati pada tikus jantan model diabetes dan dislipidemia (Domiguez *et al.*, 2008).

TGF- $\beta$ 1 juga dapat meng-*upregulasi* ekspresi LOX-1 dan *NADPH oxidase*, dan LOX-1 menginduksi produksi ROS dan sintesis TGF- $\beta$ 1, dimana dinyatakan bahwa terdapat hubungan umpan balik positif (*positive feedback*) antara TGF- $\beta$ 1, *NADPH oxidase* memediasi produksi ROS, dan LOX-1. ROS yang dihasilkan sebagai respons terhadap kaskade TGF- $\beta$ 1-*NADPH oxidase*-LOX-1 menyebabkan aktivasi MAPK yang diikuti dengan transkripsi gen pengkode kolagen. Pemberian antibodi anti-LOX-1 dapat menurunkan ekspresi *NADPH oxidase* dan aktivasi MAPK sehingga dapat menurunkan ekspresi TGF- $\beta$ 1 yang berperan dalam pembentukan kolagen (Hu *et al.*, 2008). Pemberian antibodi anti-LOX-1 dapat memblokade transduksi sinyal LOX-1 yang berimplikasi pada terjadinya aterogenesis, sehingga diharapkan dengan adanya pemberian vaksinasi protein LOX-1 maka akan menginduksi produksi antibodi anti-LOX-1 yang berperan dalam pencegahan aterosklerosis.

## 6.2 Implikasi terhadap Bidang Farmasi

Penelitian ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar dalam pengembangan vaksin aterosklerosis, yaitu dengan target produksi antibodi spesifik terhadap LOX-1. Namun, diperlukan analisis yang lebih dalam lagi mengenai perancangan vaksin aterosklerosis secara *in silico* berbasis protein LOX-1 sehingga pengembangan vaksin untuk kedepannya sudah menggunakan subunit protein atau vaksin peptida menggunakan sekuens peptida yang paling baik dalam menstimulasi respons imun berdasarkan analisis bioinformatika. Implikasi lainnya diluar dari penelitian ini yaitu untuk pencegahan aterosklerosis, LOX-1 dapat dijadikan target terapi untuk aterosklerosis dan penyakit kardiovaskuler, bahkan diabetes melitus sehingga diperlukan kajian dan penelitian lebih lanjut mekanisme kerja obat yang mungkin terkait dengan penghambatan LOX-1.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Ada beberapa keterbatasan dalam penelitian ini:

1. Hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dimana pada hewan model ini hanya dapat dilakukan pengambilan spesimen darah pada akhir penelitian (*post test only*) sehingga tidak dapat dilakukan pengamatan profil kadar antibodi IgG anti-LOX-1 dari awal hingga akhir penelitian.
2. Dosis protein yang digunakan terlalu kecil dimana pada penelitian ini belum terlihat puncak dari kadar antibodi, seharusnya dilakukan

percobaan dengan peningkatan dosis dari 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g dan 1 mg untuk menentukan dosis optimal protein dalam menginduksi pembentukan antibodi anti-LOX-1.

3. Hewan model kurang terbiasa dengan diet yang diberikan, terutama untuk diet aterogenik, dimana baik diet normal maupun aterogenik adalah modifikasi dari diet AIN-93M, yang merupakan diet standar internasional untuk hewan model tikus dan mencit (hewan pengerat). Permasalahan terdapat pada hewan yang digunakan pada penelitian ini telah terbiasa mendapatkan diet yang sering digunakan disini, yaitu diet PARS, sehingga tikus susah untuk beradaptasi dengan diet yang diberikan pada saat penelitian.
4. Biaya yang digunakan dalam penelitian ini terlalu besar, terutama pada protein, diet AIN-93M dan ELISA kit antibodi sehingga tidak dapat dilakukan pengukuran parameter standar seperti profil lipid (kolesterol, TG, HDL-c, LDL-c) dan juga jumlah dan ekspresi dari Treg menggunakan *flowcytometry* dimana mekanisme kerja alum melibatkan regulasi dari Treg.