

EFEK ATEROPROTEKTIF *Agaricus Blazei Murrill* MELALUI

PENINGKATAN Treg DAN PENURUNAN Lp-PLA₂ PADA MENCIT

DENGAN DIET TINGGI LEMAK

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Doktor



oleh

DICKY KURNIAWAN TONTOWIPUTRO

127070100111013

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

MINAT BIOMEDIK

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2017

DISERTASI

EFEK ATEROPROTEKTIF *Agaricus Blazei* Murill MELALUI PENINGKATAN TREG DAN PENURUNAN Lp-PLA₂ dan Th17 PADA MENCIT DENGAN DIET TINGGI LEMAK

Oleh :
DICKY KURNIAWAN TONTOWIPUTRO
NIM :127070100111013

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : 30 Januari 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

✓ Prof.Dr.dr. Djanggan Sargowo, SpPD., SpJP.(K). FIHA. FACC. FAPCC. FESC.

FASC

Promotor

Prof. Muhammin Rifa'i, S.Si., PhD

Ko-Promotor 1

dr. Saifur Rohman.. SpJP(K)
FIHA, PhD

Penguji 1

Prof.Dr.dr. Askandar Tjokroprawiro,
SpPD-KEMD. FINASIM

Ko-Promotor 2

Prof.dr. Aris Widodo, SpFK, PhD

Penguji 2

Dr.dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

Penguji 3

Prof. Dr. dr. Djoni Djunaedi,
SpPD, KPTI, FINASIM

Penguji Luar

Malang,
Universitas Brawijaya

Fakultas Kedokteran

Dekan,



Dr.dr. Sri Andarni, M.Kes

NIP. 19580414 198701 2 001

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar – benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah DISERTASI ini tidak terdapat disertasi yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.



JUDUL DISERTASI:

EFEK ATEROPROTEKTIF *Agaricus Blazei* Murill MELALUI PENINGKATANTREG DAN PENURUNAN Lp-PLA₂ PADA MENCIT DENGAN DIET TINGGI LEMAK

Nama Mahasiswa : Dicky Kurniawan Tontowiputro
NIM : 127070100111013
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Minat : Biomedik
KOMISI PROMOTOR :
Promotor : Prof.Dr.dr. Djangan Sargowo,
SpPD.,SpJP.(K).FIHA.FACC.FCAPC.FESC.FASCC.
Ko-promotor 1 : Prof. Muhammin Rifa'i, S.Si.,Ph.D.
Ko-promotor 2 : Prof.Dr.dr. Askandar Tjokoprawiro, SpPD-KEMD.FINASIM

TIM DOSEN PENGUJI:

DosenPenguji 1 : dr. Moh. Saifurrohman, SpJP.(K),Ph.D.
DosenPenguji 2 : Dr.dr. Setyawati Soeharto, M.Kes.
DosenPenguji 3 : Prof.dr. M. Aris Widodo, MS.,SpFK.,PhD.

Tgl. UjianTertutup :

Tgl. UjianTerbuka :

SK Penguji :

KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Dicky Kurniawan Tontowiputro, Djangan Sargowo, Askandar Tjokroprawiro, Muhammin Rifa'i.
Atheroprotective effect of the *Agaricus blazei* Mur ill extract in High Fat Diet-Induced Mice: Medicinal Plants. Vol. 9 (2), June 2017. 107-113, 2017. Doi: 10.5958/0975-6892.2017.00016.8

Dicky Kurniawan Tontowiputro, Djangan Sargowo, Askandar Tjokroprawiro, Muhammin Rifa'i.
The Significance of *Agaricus blazei* as Immunomodulator on the Level of IL-17 in Balb/C Mice with Atherosclerosis. Vol 17(3) March 2018, 483-489. Doi : 10.4314/tjpv.v17i3.14

Dicky Kurniawan Tontowiputro, Djangan Sargowo, Askandar Tjokroprawiro, Muhammin Rifa'i.
Anti-inflammatory effects of *Agaricus blazei* Murill extract inhigh fat diet-induced mice. Accepted for publication and process publikasi.

Dicky Kurniawan Tontowiputro, Djangan Sargowo, Askandar Tjokroprawiro, Muhammin Rifa'i.
The Interaction of β -glucan on Dectin-1 receptor or TLR-2 might have the potency to activate function of Treg cell and production of anti-inflammatory cytokine. Accepted for publication and process publikasi.





UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Disertasi ini kutujukan kepada

Ayahanda H Tontowi Fadeli, SH, Mhum dan Ibunda tercinta Hj Netty Rosita,

Istri tersayang dr.Hj. Nina Handayani, SpM(K), Ketiga anakku

Andina Efra Elya

Muhammad Farrel Fattansyah Kurniawan

Alya Kamila Navadina

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. Disertasi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Tim Promotor, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankanlah saya menghaturkan terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi – tingginya kepada yang terhormat:

Prof.Dr.dr. Djanggan Sargowo, SpPD.,SpJP.(K).FIHA.FACC.FAPCC. FESC.FASCC. sebagai Promotor yang telah dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran telah memberikan dukungan mental, meluangkan waktu untuk berdiskusi dan member masukan pada penelitian saya. Kepada beliau saya ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya.

Prof. Muhammin Rifa’I, S.Si.,Ph.D., sebagai Ko-Promotor yang telah dengan sabar dan tidak mengenal lelah memberikan semangat, dukungan, bimbingan dan meluangkan waktu untuk konsultasi, koreksi, memberikan masukan baik materi keilmuan dan berbagai hal teknis yang sangat mendukung dalam pelaksanaan penelitian dan penyelesaian studi. Saya ucapan terima kasih yang tidak terhingga.

Prof.Dr.dr. Askandar Tjokoprawiro, SpPD-KEMD.FINASIM, sebagai Ko- Promotor yang telah dengan sabar dan tidak mengenal lelah memberikan semangat, dukungan, bimbingan dan meluangkan waktu untuk konsultasi, koreksi, memberikan masukan baik materi keilmuan dan berbagai hal teknis yang sangat mendukung dalam pelaksanaan penelitian dan penyelesaian studi. Saya ucapan terima kasih yang tidak terhingga.

Prof.dr. M. Aris Widodo, MS.,SpFK.,PhD., Dr.dr. Setyawati Soeharto, M.Kes., dr. Moh. Saifurrohman, SpJP.(K),Ph.D. dan Prof. Dr. dr. D12joni Djunaedi, SpPD-KPTI selaku Pengujii yang dengan sabar telah memberikan arahan untuk penyempurnaan disertasi ini, serta mendorong saya untuk terus maju. Saya ucapan terima kasih yang tidak terhingga.

Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito sebagai Rektor terdahulu dan Prof. Dr. dr. Mohammad Bisri, MS sebagai Rektor saat ini, karena atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang lalu, Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA., dan Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes Sebagai Dekan FKUB saat ini, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menyelesaikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Ketua Program Doktor Ilmu Kedokteran FKUB sebelumnya, Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., SpFK., PhD dan Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M.Kes., SpPK ketua saat ini, yang memberikan pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran FKUB.

Walikota Malang sebelumnya Drs.Peni Soeparto M.A.P. dan Ir. H. Mohammad Anton Walikota saat ini, sebagai pejabat yang berwenang memberikan tugas dan ijin belajar sepeda saya. Untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran FKUB.

Kepada Dinas Kesehatan Kota Malang sebelumnya dr. Enny Sekar Rengganigati (selaku atasan saya langsung) yang sangat berjasa memberikan kesempatan dan dorongan untuk menempuh pendidikan Doktoral di FKUB. Sekali lagi terima kasih saya ucapan khusus untuk ibu dr. Enny Sekar Rengganigati. Ucapan terima kasih juga untuk Kepala Dinas Kesehatan Kota Malang Saat ini Dr. dr. Asih Tri Rahmi, MM atas kesempatan yang diberikan melalui ijin perpanjangan studinya.

Bapak Widodo S.Si, PhD atas bimbingan dan bantuannya dalam penyelesaian penelitian pendahuluan In Silico saya di Fakultas Biologi Universitas Brawijaya Malang.

Akhmad Sabarudin, S.Si, M.Sc, Dr.Sc atas bimbingan dan bantuannya dalam penyelesaian penelitian pendahuluan pemeriksaan kadar β -glucan dengan menggunakan metode Uv-Vis di Fakultas Kimia Universitas Brawijaya Malang.

Dr. Adji Achmad Rinaldo Fernandes, S.Si, M.Sc atas bantuananya dalam rangkaian uji statistik, sehingga ditemukan dosis interpolasi Agaricus Blazei Murill yang bisa mencakup manfaat dari semua parameter yang disajikan.

Dosen – dosen pengampu Mata kuliah Penunjang Disertasi (MKPD), Prof. Dr. dr. Koesworini Handono M.Kes, SpPK, Dr. Saifur Rohman SpJP(K), PhD, FIHA, dan Dr. dr. Setyawati M.KEs, SpFK atas bimbingannya untuk memperdalam pengetahuan di bidang biologi molekuler dan riset yang selalu diberikan di tengah tengah kesibukan beliau selama ini.

Komite kelaikan etik penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, atas masukan yang telah diberikan untuk terlaksananya penelitian dengan baik dan lancar.

Para staf di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Biologi Universitas Brawijaya atas tempat dan waktu yang diberikan selama penelitian yang saya lakukan.

Asisten penelitian saya selama ini Febby Nurdiya Ningsih, SSi dan Sapti Puspitarini SSi, atas jerih payahnya dalam rangkaian penyelesaian penelitian utama dan tambahan saya.

Asisten publikasi ilmiah Yuyun Ika Christina, SSi dan Qonitatul Khasanah, SSi, serta asisten penulisan makalah – makalah ilmiah Aditya Paksi Amd.Kep dan Indah Nurul Afifah, SSi.

Kepada guru dan dosen saya semenjak saya masih di taman kanak - kanak sampai pendidikan doktoral di FKUB yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan bekal ilmu dan wawasan pengetahuan kepada saya.

Kepada seluruh teman seperjuangan di Program Doktor Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya angkatan 2012/2013: yang saling mendukung, memotivasi dan memberi semangat dalam menyelesaikan studi. Ucapan terima kasih yang tulus saya ungkapkan atas persahabatan, keakraban dan kekompakan yang telah terjalin selama ini.

Hal yang terutama, pada kesempatan ini, saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang serta terima kasih yang terdalam dari lubuk hati saya kepada orang tua saya Ayahanda H. Tontowi Fadeli, SH, M.Hum dan Ibunda tercinta Hj Netty Rosita atas segala cinta kasih, didikan dan teladan yang telah diberikan kepada saya, untuk bapak-ibu tercintalah penghargaan tertinggi atas pencapaian pendidikan ini saya persembahkan. Kepada istri saya tercinta, dr. Nina Handayani SpM(K) serta ketiga anakku Andina Efra Elya, Muhammad Farrel Fattansyah Kurniawan, dan Alya Kamila Navadina saya ucapan terima kasih atas cinta, doa, dukungan, pengertian dan kesabaran sehingga pendidikan ini bisa terselesaikan. Terima kasih untuk, adik – adik tercinta atas doa dan segala dukungannya.

KATA PENGANTAR

Dengan memanajatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atau Tuhan YME, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul:

EFEK ATEROPROTEKTIF *Agaricus Blazei* Murill MELALUI PENINGKATAN Treg DAN PENURUNAN Lp-PLA₂ dan Th17 PADA MENCIT DENGAN DIET TINGGI LEMAK.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi potensi *Agaricus blazei* Murill dalam mencegah terjadinya proses aterosklerosis dengan menggunakan tiga uji yaitu uji UV-Vis Spectrophotometry, uji *in vivo* dan uji *in silico*.

Dengan selesainya disertasi ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof.Dr.dr. Djanggan Sargowo, SpPD.,SpJP.(K).FIHA.FACC.FCAPC.FESC. FASCC sebagai Promotor.
2. Prof. Muhammin Rifa'i, S.Si.,Ph.D sebagai Ko-Promotor.
3. Prof.Dr.dr. Askandar Tjokroprawiro, SpPD-KEMD. FINASIM sebagai Ko-Promotor

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 14 Desember 2017

Penulis

RINGKASAN

Dicky Kurniawan Tontowiputro, NIM. 127070100111013. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,2017. Efek Ateroprotektif *Agaricus Blazei* Murrill Melalui Peningkatan Treg dan Penurunan Lp-PLA2 PADA Mencit dengan Diet Tinggi Lemak. Komisi Pembimbing Ketua:....., Anggota :

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit inflamasi kronik yang melibatkan berbagai interaksi tipe sel – sel yaitu sel endotel, makrofag, sel otot polos, dan limfosit. Aterosklerosis melibatkan respon imunitas ‘innate’ dengan cara perekutan dan aktivasi monosit/makrofag sebagai akibat respon terhadap akumulasi lipid yang mengalami modifikasi, terutama *oxidatively modified LDL* (*Ox-LDL*) dalam dinding arteri. Akumulasi sel-sel inflamasi dalam dinding arteri menyebabkan produksi kemokin, interleukin dan protease yang bersifat lokal, seperti *interferon gamma* (*IFN-γ*), *tumor necrosis factor alpha* (*TNF-α*) dan *ligand CD40* membran. Hal ini dapat meningkatkan influs monosit dan limfosit, sekaligus meningkatkan respon imun dan progresifitas lesi aterosklerosis. Peran Treg dalam penghambatan proses aterosklerosis juga sangat penting karena mampu memodulasi proses pro inflamasi menjadi proses yang pro anti inflamasi.

Agaricus blazei Murrill merupakan jamur yang memiliki bahan aktif β -glucan yang telah terbukti memiliki efek terhadap beberapa penyakit seperti obesitas, hipertensi, diabetes, hipercolesterolemia, hepatitis, aterosklerosis, dan penyakit jantung. Jamur ini juga terbukti dapat bersifat anti inflamasi, anti-tumor, dan analgesia. Penelitian tentang manfaat jamur ini dibidang kardiovaskular masih belum begitu banyak, jika dibanding penelitian-penelitian di bidang onkologi. Hingga saat ini belum didapatkan penelitian yang mengkaji efek *Agaricus blazei* Murrill dalam kaitannya dengan Treg pada sistem kardiovaskular. Peningkatan sel – sel Treg diharapkan dapat menekan respon inflamasi yang berlebihan yang terjadi pada mencit yang diinduksi diet tinggi lemak. Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahapan yaitu penelitian tahap I dengan menggunakan metode UV Vis Spectrophotometry, penelitian tahap II secara *in vivo* dan penelitian tahap 3 secara *in silico*.

Penelitian tahap I bertujuan untuk menentukan hasil analisis kuantitatif *Agaricus blazei* Murrill dengan metode Uv-Vis Spectrophotometry dan membandingkan kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dengan jamur lainnya, yaitu *Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*. Kadar absorbansi β -glucan dalam larutan standart dan sampel dihitung menggunakan UV-Vis Spectrophotometer (Genesys 10, Thermo Scientific™) dengan panjang gelombang 220 nm. Analisis UV-Vis Spectrophotometry menunjukkan bahwa *Agaricus blazei* Murrill memiliki kandungan β -glucan tertinggi yaitu sebesar 6,99%, sedangkan *Ganoderma sp.* dan *P. ostreatus* berturut-turut yaitu 1,78% dan 1,81%. Hasil tersebut membuktikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill sangat berpotensi sebagai alternatif jamur obat.

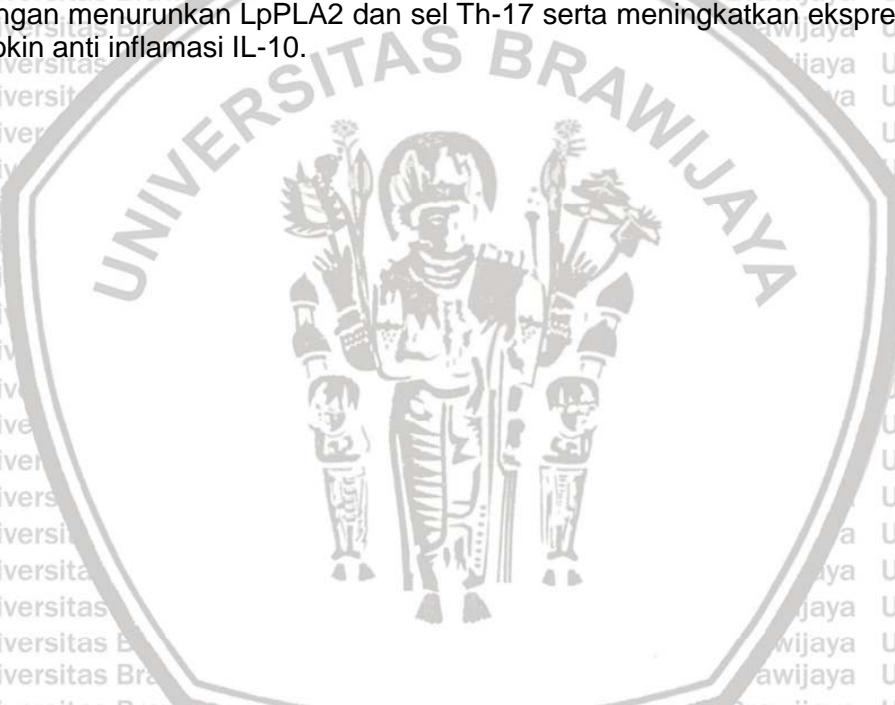
Penelitian tahap II bertujuan untuk membuktikan diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif *LpPLA₂*, dan sel – sel *Th17* pada mencit untuk membuktikan diet tinggi lemak dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺*, *IL-10* dan *TGF-β* pada mencit, membuktikan pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif *LpPLA₂* dan sel – sel *Th17* serta meningkatkan jumlah relatif sel – sel *TregCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada amencit dengan diet tinggi lemak. Pada tahap ini, mencit diinduksi dengan pakan tinggi lemak untuk mendapatkan model mencit HFD (High Fat Diet). Kemudian mencit HFD di treatment dengan ekstrak *A. blazei* Murrill dengan dosis rendah (100 mg/kgBB), dosis normal (200mg/kgBB), dan dosis tinggi (400 mg/kgBB) selama 12 minggu. Kemudian semua parameter dianalisis menggunakan flowcytometry untuk mengetahui jumlah relatif sel. Hasil analisis *in vivo* menunjukkan *Agaricus blazei* Murrill secara signifikan bekerja lebih utama dengan menurunkan tingkat oksidasi sel melalui penurunan enzim *Lp-PLA₂* dan sel *Th17*, meningkatkan ekspresi sel

Treg(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi *TGF-β* dan *IL-10*, serta menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi *IL-17* pada mencit dengan diet tinggi lemak.

Penelitian tahap III bertujuan untuk membuktikan ekstrak *Agaricus blazei* Murrill sebagai agonis reseptor *Dectin-1* dan *TLR2* dengan menggunakan analisis dengan ‘docking’ molekul dan menentukan komponen bioaktif dalam *Agaricus blazei* Murrill yang berpotensi sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan analisis dengan ‘docking’ molekul.

Pada tahap III dilakukan analisis interaksi *Agaricus blazei* Murrill dengan reseptor target menggunakan metode *molecular docking*. Analisis *in silico* membuktikan bahwa 1,3/1,6 β -glucan memiliki afinitas binding tertinggi dibandingkan dengan empat senyawa lainnya. Senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill, 1,3-1,6 β -glucan mampu berikatan dengan *TLR-2/1* dan *Dectin* yang memiliki potensi untuk mengaktifasi sel Treg dan produksi sitokin anti inflamasi. Ikatan tersebut memiliki aktifitas untuk menstimulasi signal cascade untuk memproduksi sitokin anti inflamasi dan fungsi sel T-regulator. Hasil penelitian ini membutuhkan studi lebih jauh untuk menjelaskan fungsi jamur tersebut dalam perkembangan anti atherosklerosis.

Berdasarkan Path Analysis didapatkan dosis optimal untuk mencapai kondisi oksidasi terendah (LpPLA2 terendah), dan inflamasi terendah (Th-17 terendah serta kadar Treg dan IL-10 tertinggi) yaitu 285 mg/kg BB yang mampu mencegah penyakit ateroklerosis yaitu dengan menurunkan LpPLA2 dan sel Th-17 serta meningkatkan ekspresi sel Treg dan sitokin - sitokin anti inflamasi IL-10.



SUMMARY

Atherosclerosis is one of chronic inflammatory diseases involving various cells - endothelial cells, macrophages, smooth muscle cells, and lymphocytes. Atherosclerosis involves 'innate' immune response by the recruitment and activation of monocytes/macrophages as a result of the response to modified lipid elevations, mainly oxidized LDL (Ox-LDL) in artery walls. The accumulation of inflammatory cells within the arterial wall causes local chemokine production, interleukins and proteases, such as gamma interferon (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and CD40 ligand membranes. This can increase monocyte and lymphocyte influenza, while enhancing the immune response and progression of atherosclerotic lesions. The role of Treg in inhibiting atherosclerosis process is also very important because it is able to modulate the pro-inflammatory process into a pro anti-inflammatory process.

Agaricus blazei Murrill is an edible mushroom contains active β -glucan compounds that has been shown to have an effect on several diseases such as obesity, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, hepatitis, atherosclerosis, and heart disease. This mushroom is also proven to be anti-inflammatory, anti-tumor, and analgesia. The research about the effectiveness of *A. blazei* Murrill on cardiovascular disease is not too much, when compared to oncology disease. The effects of *Agaricus blazei* Murrill on Treg production is still unclear. Increasing of Treg cells are expected to suppress the excessive inflammatory response of mice induced by high-fat diets. This research was conducted in 3 stages: UV Vis Spectrophotometric study, in vivo and in silicostudy.

The first stage aimed to compare the β -glucan content in *Agaricus blazei* Murrill extract with other fungi, namely *Ganoderma* Sp. and *Pleurotus ostreatus*. The β -glucan absorbance rate in standard and sample solutions was calculated using UV-Vis Spectrophotometer (Genesys 10, Thermo Scientific™) with a wavelength of 220 nm. UV-Vis Spectrophotometric analysis showed that *Agaricus blazei* Murrill had the highest β -glucan content of 6.99%, while *Ganoderma* sp. and *P. ostreatus* were 1.78% and 1.81%, respectively. These results prove that *Agaricus blazei* Murrill is very potential as an alternative medicinal mushroom.

The second stage aimed to analyze the effect of *A. blazei* extract in HFD-induced mice by enhancing the activation of regulator T cells, increasing the production of anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10, decreasing pro-inflammatory and decreasing PAF-AH-expressing cells in the spleen. The mice were induced with high-fat diet (HFD) and then treated with *A. blazei* Murrill extract at low dose (100 mg/kg BB), normal dose (200mg/kg BW), and high dose (400 mg/kgBW) for 12 weeks. All parameters are analyzed using flowcytometry analysis to obtain the relative amount of cells. The results showed that *Agaricus blazei* Murrill were significantly decreasing cell oxidation rate by decreasing Lp-PLA2 enzyme, increasing the expression of Treg cell (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$), increasing of anti-inflammatory cytokine TGF- β and IL-10, and decreased production of pro-inflammatory cytokines IL-17 in HFD mice.

The third stage aimed to investigate *Agaricus blazei* Murrill extract as Dectin-1 and TLR2 receptor agonists using molecular docking analysis and determine the bioactive component in *Agaricus blazei* Murrill undergoing Dectin-1 and TLR2 agonists based on molecular 'docking' analysis. Interaction *Agaricus blazei* Murrill analysis with target receptors was done using molecular docking method. In silico analysis proves that 1,3 / 1,6 β -glucan has the highest binding affinity compared to the other four compounds. The active compound of *Agaricus blazei* Murrill, 1,3-1,6 β -glucan is able to bind with TLR-2/1 and Dectin which has the potential action to activate Treg cells and the production of anti-inflammatory cytokines. The bond has an activity to stimulate cascade signals to produce anti-inflammatory cytokines and regulatory T cell functions.

Based on path analysis, the optimal dose for obtaining the lowest condition of oxidation (the lowest Lp-PLA2) and Inflammatory condition (the lowest Th-17 and the highest Treg and IL-10) is 285 mg/kg BB. This dose may be able to prevent the atherosclerosis disease by decreasing Lp-PLA2 and Th-17 cells and also enhancing the expression of T regulator cells and anti-inflammatory cytokines IL-10

DAFTAR ISI	
JUDUL DISERTASI	
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
KOMUNIKASI dan PUBLIKASI ILMIAH	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
KATA PENGANTAR	x
RINGKASAN	xi
SUMMARY	xiii
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xxv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	3
1.2.1 Sub Masalah.....	3
1.3. Tujuan	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat	5
1.4.1 Manfaat Akademis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB II LANDASAN TEORI.....	5
2.1. Definisi Aterosklerosis	5
2.2. Konstituen Fitokimia <i>Agaricus blazei</i> Murill	8
2.2.1 Komposisi Kimia	8
2.2.2 Campuran Aktif <i>Agaricus blazei</i> Murill.....	10
2.3. Sejarah Ditemukannya Peran Treg dalam Proses Aterosklerosis	13
2.4. Peran Imunitas ‘ <i>Innate</i> ’ dan Spesifik.....	14
2.5. Toleransi Imun.....	19
2.6. Macam-macam Treg	20
2.6.1 Sel-sel Treg natural (nTreg).....	21
2.6.2 Sel-sel Treg Adaptif	21
2.6.2.1 Treg FoXP3 ⁺	24
2.7. Signal Transduksi pada Treg	27
2.8. Peran Treg pada Inflamasi Vaskular.....	29
2.9. Peranan TGF beta (TGF-β) pada Treg	31
2.10. Peranan IL-10 pada Treg	33
2.11. Lipoprotein-Associated Phospholipase A ₂ (LpPLA ₂) sebagai Petanda terjadinya Proses Oksidasi	34

2.12. Peran Penting Th17 dalam Mempercepat Proses Aterosklerosis	36
BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN UMUM	39
3.1. Kerangka Konseptual.....	39
3.2. Hipotesis	42
BAB IV METODE PENELITIAN.....	44
4.1. Tempat Penelitian	44
4.2. Rancangan Penelitian	44
4.3. Sampel Penelitian	45
4.4. Kriteria Sampel	45
4.4.1 Kriteria Inklusi	45
4.4.2 Kriteria Ekslusi	45
4.5. Besar Sampel	46
4.6. Variabel penelitian	46
4.7. Prosedur Penelitian.....	46
4.7.1 Penentuan Dosis <i>Agaricus blazei</i> Murrill	46
4.7.2 Pembuatan Pakan Tikus dan Pemberian Ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill	46
4.7.3 Isolasi Sel Limpa/Spleen	47
4.7.4 Penghitungan Jumlah sel Limpa/Spleen	47
4.7.5 Pewarnaan Antibodi	48
4.7.6 Analisis Flowcytometry	48
4.7.7 Analisis Data	49
BAB V PENELITIAN TAHAP I	50
5.1. Latar Belakang	50
5.2. Metode Penelitian	52
5.2.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	52
5.2.2 Sampel Penelitian	52
5.2.3 Variabel Penelitian	52
5.2.4 Instrumen Penelitian.....	52
5.2.5 Tahapan Penelitian	52
5.2.6 Kurva Standar β -glucan	53
5.2.7 Persiapan Ekstrak	53
5.2.8 Pengukuran UV-Vis Spectrophotometer.....	53
5.3 Hasil dan Analisis	53
5.3.1 Kurva Standart β -glucan	53
5.3.2 Kandungan β -glucan pada Beberapa Jamur yang dapat Dikonsumsi	55
5.4 Pembahasan	56
5.5 Kesimpulan	58
BAB VI PENELITIAN TAHAP II	59
6.1 Latar Belakang	59
6.2 Metode Penelitian	63
6.2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	63
6.2.2 Prosedur Penelitian	63

6.2.2.1 Preparasi Struktur Ligand	63
6.2.2.2 Preparasi Struktur Reseptor	63
6.2.2.3 Docking	63
6.3 Pengolahan dan Analisis Data	64
6.3 Hasil dan Analisis	64
6.4 Pembahasan	67
6.5 Kesimpulan	68
BAB VII PENELITIAN TAHAP III.....	69
7.1 Latar Belakang	69
7.2 Metode Penelitian	70
7.2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	70
7.2.2 Sampel Penelitian	70
7.3.3 Variabel Penelitian	70
7.2.4 Perlakuan pada Hewan Coba	71
7.2.5 Penentuan Dosis <i>Agaricus blazei</i> Murrill	71
7.2.6 Isolasi Sel Limpa/Spleen/Lien	71
7.2.7 Perhitungan Jumlah Sel Limpa/Spleen/lien	71
7.2.8 Pewarnaan Antibodi	71
7.2.9 Analisis Flowcytometry	71
7.2.10 Pengolahan dan Analisis Data	71
7.3 Hasil dan Analisis	72
7.3.1 Penurunan Jumlah Relatif PAF-AH/LpPLA ₂ (CD11b/c+PAF-AH+)	72
7.3.2 Penurunan Jumlah Relatif Sitokin Pro-Inflamasi IL-17	74
7.3.3 Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti-Inflamasi IL-10(CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL-10 ⁺)	78
7.3.4 Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti-Inflamasi TGF- β (CD4 ⁺ CD25 ⁺ TGF- β ⁺)	80
7.3.5 Peningkatan Jumlah Relatif Sel T Regulator/ Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺)	83
7.4 Pembahasan	85
7.4.1 Penurunan jumlah relatif PAF-AH/LpPLA ₂ (CD11b/c+PAF-AH)	85
7.4.2 Penurunan jumlah relatif sitokin pro inflamasi IL-17	87
7.4.3 Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi IL-10	88
6.4.4 Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi TGF- β	89
6.4.5 Peningkatan Jumlah Relatif Sel T Regulator / Treg	91
7.5 Hasil Analisis of Variance (ANOVA)	91
7.6 Hasil Path Analysis	94
7.7 Hasil Multivariate Analysis of Variance (MANOVA)	99
7.7.1 Ortogonal Kontras 1 (HFD vs ND)	100
7.7.2 Ortogonal Kontras 2 (HFD vs Dosis)	101
7.7.3 Ortogonal Kontras 3 (Dosis vs ND)	101
7.7.4 Ortogonal Kontras 4 (Dosis 100 mg/mg BB vs ND)	102
7.7.5 Ortogonal Kontras 5 (Dosis 200 mg/mg BB vs ND)	103
7.7.6 Ortogonal Kontras 6 (Dosis 400 mg/mg BB vs ND)	104
7.8 Dosis Optimal	105
7.9 Kesimpulan	108

BAB VIII PEMBAHASAN UMUM	109
BAB IX KESIMPULAN DAN SARAN	117
9.1 Kesimpulan	117
9.2 Saran	118
DAFTAR PUSTAKA	119
LAMPIRAN	130



DAFTAR TABEL	
Tabel 2.1 Konversi dosis menurut FDA	9
Tabel 2.2 Campuran Aktif yang Terdapat dalam <i>Agaricus blazei</i> Murrill	10
Tabel 2.3 Subset sel T yang dijelaskan dalam aterosklerosis.....	21
Tabel 5.1 Peningkatan konsentrasi yang sesuai dengan kadar absorbansi pada korelasi linear	54
Tabel 5.2 Hasil perhitungan kandungan β -glucan pada beberapa jamur	56
Tabel 6.1 Afinitas binding antara TLR2/1 dengan substrat	65
Tabel 7.1 Hasil ANOVA.....	92
Tabel 7.2 Hasil Path Analysis.....	95
Tabel 7.3 Hasil MANOVA.....	99
Tabel 7.4 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 1 (HFD vs ND)	100
Tabel 7.5 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 2 (HFD vs Dosis)	101
Tabel 7.6 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 3 (Dosis vs ND).....	102
Tabel 7.7 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 4 (Dosis 100 mg (separuh dari dosis norma I) vs ND)	103
Tabel 7.8 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 5 (Dosis 200 mg (dosis normal) vs ND)	104
Tabel 7.9 Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 6 (Dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal) vs ND)	105
Tabel 8.1. Frekuensi <i>Treg</i> pada Penelitian Eksperimental Aterosklerosis pada Hewan Coba (Mencit) (Foks et al. 2015)	119
Tabel 8.2. Frekuensi <i>Treg</i> pada Penelitian Eksperimental Aterosklerosis pada pasien – pasien kardiovaskular (Foks et al. 2015).....	119

DAFTAR GAMBAR	
Gambar 2.1 Struktur dinding luar jamur termasuk β -glucan	10
Gambar 2.2 Bagian – bagian <i>Agaricus blazei</i> Murrill	12
Gambar 2.3 Rumus bangun beta-1,3-glucan	12
Gambar 2.4 Rumus bangun beta-1,6-glucan	12
Gambar 2.5 Rumus bangun beta-1,3/1,6-glucan	13
Gambar 2.6 Sub Kelas Sel-Sel T	18
Gambar 2.7 Interaksi di antara DC dan sel T	23
Gambar 2.8 <i>nTreg</i> dan <i>iTreg</i>	26
Gambar 2.9 'Signalling' Tergantung mTOR dalam diferensiasi sel CD4+	27
Gambar 2.10 Efek potensial Th1 yang bersifat proaterogenik dan Treg yang bersifat anti aterogenik	31
Gambar 2.11 Sitokin – sitokin Penghambat	33
Gambar 2.12 Model penentuan awal nasib menjadi iTreg versus menjadi Th17 yang dikontrol dengan kekuatan signal TCR	38
Gambar 5.1. Kurva standar yang dibuat dengan kadar absorbansi sesuai dengan peningkatan konsentrasi (50-500 ppm) pada panjang gelombang 220 nm untuk menghitung kandungan β -glucan pada beberapa jamur	54
Gambar 6.1. Interaksi antara TLR2/1 dengan molekul kecil (kuning)	66
Gambar 6.2. Ikatan antara β -glucan dengan Dectin	66
Gambar 7.1. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill menurunkan produksi enzim PAF-AH yang dihasilkan oleh makrofag pada mencit yang diinduksi dengan dengan diet tinggi lemak	73
Gambar 7.2. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi IL-17 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak	75
Gambar 7.3. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi IL-17 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak	77
Gambar 7.4. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill memicu produksi sitokin anti-inflamasi IL-10 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak	79
Gambar 7.5. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill mampu meningkatkan produksi sitokin TGF- β pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak	82
Gambar 7.6. Pemberian ekstrak <i>Agaricus blazei</i> Murrill mampu meningkatkan ekspresi sel Treg pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak	84
Gambar 7.7 Dosis Optimal pada Oksidasi (LpPLA2)	94
Gambar 7.8 Diagram Path	95
Gambar 7.9 Hasil Analisis	96
Gambar 7.10 Model Temuan	98
Gambar 7.11 Dosis Optimal pada Kondisi Inflamasi	106
Gambar 7.12 Dosis Optimal pada Kondisi Oksidasi dan Inflamasi	107
Gambar 8.1 Imunitas adaptif Ying dan Yang	117



Lampiran 1 Laik Etik Penelitian	130
Lampiran 2 Hasil Analisis Statistik Uji In vivo	131
Lampiran 3 Hasil ANOVA PAF-AH	143
Lampiran 4. Hasil Analisis Path.....	145
Lampiran 5. Hasil MANOVA.....	146



<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</u>	<u>Keterangan</u>
AbM		<i>Agaricus blazei</i> Murrill
ACS		Acute Coronary Syndrome
APC		Antigen Presenting Cell
ApoB100		Apolipoprotein B 100
CCR5		C-C chemokine receptor type 5
CD		Cluster of Differentiation
CD103		alpha E beta 7 integrin
CD127		Cluster of Differentiation 127
CD152		Cluster of Differentiation 152
CD25		Interleukin-2 receptor alpha chain
CD4		Cluster of Differentiation 4
CD40		Cluster of Differentiation 40
CD62L		L-selectin
CD8		Cluster of Differentiation 8
CD80		Cluster of Differentiation 80
CLA		conjugated linoleic acid
CR3		complement receptor 3
CRP		C Reactive Protein
CTL		cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4		cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CX3CR1		CX3C chemokine receptor
DC		Dendritic Cell
FIP		Fungal Immunomodulatory Proteine
FOXP3		Forkhead Box P3
G-CSF		Granulocytes Colony Stimulating Factor
GITR		neurophilin, the activation antigens glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
HFD		High Fat Diet
HLA-DR		Human Leukocyte Antigen – antigen D Related
HPLC		High-performance liquid chromatography
HSP		Heat Shock Protein
ICAM-1		Intercellular Adhesion Molecule 1
ICOS		T cell specific molecule and a member of the CD28 family
IFN- γ		Interferon Gamma
IgG		Immunoglobulin

IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IL-10	Inter Leukin-10
IL-12	Inter Leukin-12
IL-2	Inter Leukin-2
IL-35	Inter Leukin-35
IL-4	Inter Leukin-4
IL-5	Inter Leukin-5
IL-6	Inter Leukin-6
IL-7	Inter Leukin-7
LAG3	lymphocyte activation gene 3 protein
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL ^r	Low Density Lipoprotein Receptor ⁻¹
LpPLA2	Lipoprotein Phospholipase A2
LSD	Least Significance Difference
lysoPC	Lysophosphatidylcholines
MANOVA	Multivariate Analysis of Variance
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix metalloproteinases
NaOH	Sodium Hydroxide
ND	Normal Diet
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NLR	Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat containing Receptor
NOD	Non Obese Diabetic
NSTEMI	non ST-elevation Myocardial Infarction
nTreg	naturally occurring Treg
oxFA	<i>Formic acid oxidation</i>
Ox-LDL	Oxidized Low-Density Lipoprotein
oxPC	Oxidized phosphatidylcholine
PBS	Phosphate-buffered saline
PMN	poly morpho nuclear granulocyte
PRRs	Pattern recognition receptors
RA	rheumatoid arthritis
ROS	Reactive Oxygen Species
SLE	systemic lupus erythematosus
SMILES	simplified molecular-input line-entry system
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
Th1	T Helper
Th17	T Helper 1
Th2	T Helper 17
TLR	T Helper 2
TLR1	Toll-like Receptors
TLR2	Toll Like Receptor 1
TLR6	Toll Like Receptor 2
TNF-α	Toll Like Receptor 6
Treg	Tumor Necrosis Factor-Alpha
UAP	Tregulator
UV	unstable angina pectoris
Universitas Brawijaya	Ultraviolet





BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit inflamasi kronik yang melibatkan berbagai interaksi tipe sel – sel yaitu sel endotel, makrofag, sel otot polos, dan limfosit. Adanya akumulasi *LDL* merupakan faktor utama yang menyebabkan terjadinya aterosklerosis (Chistiakov et al. 2013). Sistem imunitas yang berperan dalam patogenesis aterosklerosis meliputi beberapa proses yaitu infark miokard, stroke, dan gangren iskemik (Hansson 2005; Hansson dan Libby 2006; Entin-Meer et al. 2009).

Aterosklerosis melibatkan respon imunitas innate dengan cara perekutan dan aktivasi monosit/makrofag sebagai akibat respon terhadap akumulasi lipid yang mengalami modifikasi, terutama *oxidatively modified LDL* (*Ox-LDL*) dalam dinding arteri. Proses tersebut segera diikuti dengan respon imunitas adaptif yang meliputi limfosit *T* spesifik antigen. Sebagian besar limfosit *T effector* yang ada di dalam lesi aterosklerotik adalah sel – sel *T-helper CD4⁺* dengan karakteristik fenotipe sebagai subset *T-helper pro inflamasi (Th1 subset)* (Hansson dan Libby 2006; Entin-Meer et al. 2009).

Akumulasi sel-sel inflamasi dalam dinding arteri menyebabkan produksi kemokin, interleukin dan protease yang bersifat lokal, seperti *interferon gamma (IFN-γ)*, *tumor necrosis factor alpha (TNF-α)* dan *ligand CD40 membran*. Hal ini dapat meningkatkan influx monosit dan limfosit, sekaligus meningkatkan respon imun dan progresifitas lesi aterosklerosis (Entin-Meer et al. 2009). Peran *Treg* dalam penghambatan proses aterosklerosis juga sangat penting karena mampu memodulasi proses pro inflamasi menjadi proses yang anti inflamasi (Chistiakov et al. 2013).

Agaricus blazei Murrill (AbM) atau (*A. brasiliensis*) merupakan suplemen kesehatan yang akhir – akhir ini mendapatkan perhatian lebih. *Agaricus blazei* Murrill mengandung beberapa bahan aktif yang telah terbukti memiliki efek terhadap kardiovaskular yaitu β -glucan dan protein bound polysaccharides (Li et al. 2004; Kim et al. 2005; Reyna-Villasmil et al. 2007) serta phenolic dan flavonoid (Carvajal et al. 2012). Beberapa penelitian membuktikan bahwa jamur ini dapat memperbaiki berbagai penyakit seperti obesitas, hipertensi, diabetes, anti inflamasi, anti tumor (Ellertsen et al. 2005; Ker et al. 2005; Zhong et al. 2005), analgesia (Gonzaga et al. 2013), hiperkolesterolemia, hepatitis, atherosclerosis, dan penyakit jantung (Firenzuoli et al. 2008). Penelitian tentang manfaat jamur ini dibidang kardiovaskular masih belum begitu banyak, jika dibanding penelitian–penelitian di bidang onkologi (Roupas et al. 2012). Hingga saat ini belum didapatkan penelitian yang mengkaji efek *Agaricus blazei* Murrill dalam kaitannya dengan Treg pada sistem kardiovaskular.

Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan analisis peran *Agaricus blazei* Murrill dalam meningkatkan sel – sel Treg yang selanjutnya diharapkan dapat menekan respon inflamasi yang berlebihan yang terjadi pada proses atherosclerosis. Titik tangkap *Agaricus blazei* Murrill pada sistem imunitas secara langsung melalui ikatannya dengan Dectin-1 (terutama disebabkan kandungan β -glucan) (Karumuthil-Melethil et al. 2008) dan TLR2 (terutama disebabkan oleh kandungan agaritin yang ada pada sel – sel dendritik) (Brodsky dan Medzhitov 2007; Karumuthil-Melethil et al. 2008). Respon yang akan terjadi selanjutnya adalah disekresikannya sitokin – sitokin anti inflamasi berupa IL-10 (Izawa dan Inoue 2004; Forland 2012) serta TGF- β (Abbas et al. 2014). Sitokin – sitokin anti inflamasi ini selanjutnya akan menstimulasi lahirnya Treg – Treg adaptif (Hertland 2011).

Mekanisme lain yang secara tidak langsung adalah melalui perannya sebagai antioksidan yang akan menangkap ROS yang berlebihan melalui mekanisme donor hidrogen, scavenger radikal bebas, *singlet oxygen quencher* serta sebagai reduktor dalam reaksi redoks (Dimitros 2000; Carvajal et al. 2012). Rendahnya ROS akan menghambat aktivasi *NFKB* sehingga menurunkan sekresi sitokin – sitokin pro inflamasi, kemokin – kemokin dan molekul – molekul adesi, sehingga mencegah aktivasi sel – sel T pro inflamasi yaitu *Th17* dan *CTL* (Lopez-Pastrana 2012).

1.2. Permasalahan

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, yang menjadi masalah utama penelitian ini adalah:

Apakah *Agaricus blazei* Murrill dapat mencegah terjadinya proses aterosklerosis pada mencit yang dipapar dengan diet tinggi lemak?

1.2.1. Sub Masalah

Untuk menjawab rumusan masalah di atas, maka perlu dijabarkan dengan menjawab beberapa masalah yang terkait sebagai berikut:

Rumusan Masalah Penelitian Tahap I

1. Bagaimana hasil analisis kuantitatif kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dengan metode UV-Vis Spectrophotometer?
2. Bagaimana kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dibandingkan dengan jamur makanan lainnya, yaitu *Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*?

Rumusan Masalah Penelitian Tahap II

1. Apakah ekstrak *Agaricus blazei* Murrill memiliki aktivitas sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan hasil analisis dengan ‘docking’ molekul?

2. Komponen bioaktif manakah dari ekstrak *Agaricus blazei* Murrill yang berpotensi sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan analisis dengan ‘*docking*’ molekul?
- Rumusan Masalah Penelitian Tahap III**
1. Apakah diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif sel *LpPLA₂*, dan *Th17* pada mencit?
 2. Apakah diet tinggi lemak dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada mencit?
 3. Apakah pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif *LpPLA₂*, dan sel – sel *Th17* pada mencit dengan diet tinggi lemak?
 4. Apakah pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada mencit dengan diet tinggi lemak?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah *Agaricus blazei* Murrill dapat mencegah terjadinya proses aterosklerosis.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan Khusus Penelitian Tahap I

1. Untuk menentukan hasil analisis kuantitatif *Agaricus blazei* Murrill dengan metode UV-Vis Spectrophotometer.
2. Untuk membandingkan kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dengan jamur makanan lainnya, yaitu *Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*.

Tujuan Khusus Penelitian Tahap II

1. Untuk membuktikan ekstrak *Agaricus blazei* Murrill memiliki aktivitas sebagai agonis reseptor *Dectin-1* dan *TLR2* dengan menggunakan analisis dengan 'docking' molekul.
2. Untuk menentukan komponen bioaktif dalam *Agaricus blazei* Murrill yang berpotensi sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan analisis dengan 'docking' molekul.

Tujuan Khusus Penelitian Tahap III

1. Untuk membuktikan diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif *LpPLA₂*, dan sel – sel *Th17* pada mencit
2. Untuk membuktikan diet tinggi lemak dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺*, *IL-10* dan *TGF-β* pada mencit
3. Untuk membuktikan pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif *LpPLA₂* dan sel – sel *Th17* pada mencit dengan diet tinggi lemak
4. Untuk membuktikan pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat meningkatkan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada mencit dengan diet tinggi lemak

1.4. Manfaat

1.4.1. Manfaat Akademis

Dari hasil penelitian ini diharapkan:

1. Mendapatkan bentuk hubungan antara *Treg* dengan mekanisme penghambatan terhadap proses aterosklerosis.
2. Memberikan informasi mekanisme proteksi *Agaricus blazei* Murrill melalui hambatan terhadap proses aterosklerosis.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Memberikan landasan ilmiah penggunaan *Agaricus blazei* Murrill sebagai substansi bioaktif dalam perlindungan terhadap proses terjadinya aterosklerosis.
2. Membuka peluang dikembangkannya *Agaricus blazei* Murrill sebagai agen proteksi terhadap terjadinya penyakit aterosklerosis.



BAB 2

LANDASAN TEORI

2.1. Definisi Aterosklerosis

Definisi aterosklerosis menurut *American Heart Association (AHA)*, adalah penyakit inflamasi kronik dengan aktivitas imunologik pada arteri – arteri

berukuran sedang dan besar, dimulai sejak masa kanak – kanak dan pada

beberapa orang berkembang cepat di usia 30 atau 50 tahunan. Aterosklerosis

merupakan penyakit yang kronik dan progresif dengan fase asimptomatis yang

panjang, dengan karakteristik berupa akumulasi sel – sel darah putih, debris

debris selular, kolesterol, asam lemak, kalsium, dan jaringan fibrosa (plak atau

ateroma) pada dinding – dinding arteri (Lopez-Pastrana et al. 2012).

Respon imunomodulasi memainkan peranan yang penting pada perkembangan, progresivitas, dan komplikasi penyakit – penyakit aterosklerosis

(Hansson dan Libby 2006; Herbin et al. 2012). Bukti – bukti yang ada

memberikan gambaran bahwasanya inflamasi vaskular pada aterosklerosis

dimodulasi oleh respon autoimun terhadap antigen sendiri (*self-antigen*) seperti

misalnya *oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL)* pada dinding vaskular

(Hansson dan Libby 2006; Cuneo dan Autieri 2009). Peranan sistem imun

dalam patogenesis aterosklerosis lebih kompleks daripada penyakit autoimun

klasik, seperti diabetes melitus tipe 1, *rheumatoid arthritis (RA)*, dan *systemic*

lupus erythematosus (SLE) (Lopez-Pastrana et al. 2012). Sistem imunitas

'innate' dan adaptif terlibat dalam perkembangan aterosklerosis, dan hal ini

sudah terbukti dan diterima secara luas (Zhong et al. 2012).

Sistem kontrol terhadap 'self antigen' bersifat berlapis dan evolusioner,

yaitu melibatkan thymus pada lini pertama serta peran aktif dari *Treg* di tingkat

perifer. Namun demikian, penyakit autoimun masih dapat saja terjadi, oleh

karena adanya modifikasi pada self antigen. Modifikasi ‘self antigen’ dapat merusak toleransi imun yang ada dan selanjutnya akan menyebabkan terjadinya respon imun yang merugikan (Abbas dan Lichtman 2010; Ketelhuth dan Hansson 2011). Semua subset sel T akan memperberat aterosklerosis, kecuali sel – sel *Treg*. Sel – sel *Treg* mampu membatasi inflamasi dan mencegah terjadinya formasi plak. Beberapa sub populasi dari *Treg* yaitu *nTreg Foxp3⁺* (*Treg* yang terlahir melalui seleksi di dalam thymus), *iTreg* (*Treg* yang terlahir dari konversi sel – sel T naif di jaringan limfoid perifer), dan sel – sel *Tr1* (sel T *CD4⁺* yang terinduksi oleh *IL-10*). Dengan demikian *CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T cells* (*Treg*) adalah sub populasi sel – sel T yang mempunyai spesialisasi pada supresi respon imun patologis terhadap “self- antigen” maupun antigen asing (Ketelhuth dan Hansson 2011).

2.2. Konstituen Fitokimia *Agaricus blazei* Murrill

2.2.1. Komposisi Kimia

Secara umum, komposisi kasar jamur adalah air (90%), protein (2-40%), lemak (2-8%), karbohidrat (1-55%), serat (3-32%) dan abu (8-10%) (abu terutama disusun dari garam, logam, dan sebagainya (Tabel 2.1.). Metabolit – metabolit aktif dapat diisolasi dari badan buah, miselium dari hasil kultur murni dan filtrat kultur. Saat ini, banyak usaha dilakukan untuk mendapatkan metabolit aktif dari miselia melalui kultur fermentasi yang direndam air untuk mendapatkan preparasi yang lebih murah.

Tabel 2.1. Komposisi *Agaricus blazei* Murrill (Liu 2008).

Komponen	Jumlah	Komponen	Jumlah
b-glucan	12.4 g	Plumbum	0.13 ppm
Protein	38.50 g	Hydrargyrum	0.18 ppm
Fat	2.60 g	Total chromium	0 µg
Carbohydrate	27.70 g	Vitamin in A (total caronene)	0
Agaritine	15.3 ppm	Vitamin B (total caronene)	Universitas Brawijaya
Fiber	20.60 g	Vitamin B1 (Thiamin)	0.63 mg
Sodium	8.40 mg	Vitamin B2 (Riboflavin)	3.04 mg
Calcium	22.50 mg	Vitamin B6	0.54 mg
Iron	10.10 mg	Vitamin B12	0 µg
Potassium	2920.00 mg	Niacin	33.50 mg
Phosphorus	952.00 mg	Pantothenic acid 2	2.90 mg
Magnesium	96.50 mg	Folic acid	230.00 µg
Zinc	7.87 mg	Biotin	123.00 µg
Copper	7.67 mg	Total vitamin C (Total c acid)	0mg
Manganese	0.825 mg	Vitamin D	56.7 µg
Iodine	0	Vitamin E (Total tocopherol)	0
Selenium	88.00 µg	Vitamin K1 loquinone)	0
Arsenicum	0 .48 ppm	Energy	288.00 kcal
Cadmium	2.01 ppm		

Catatan : Dalam 100 gram berat kering, diukur oleh laboratorium

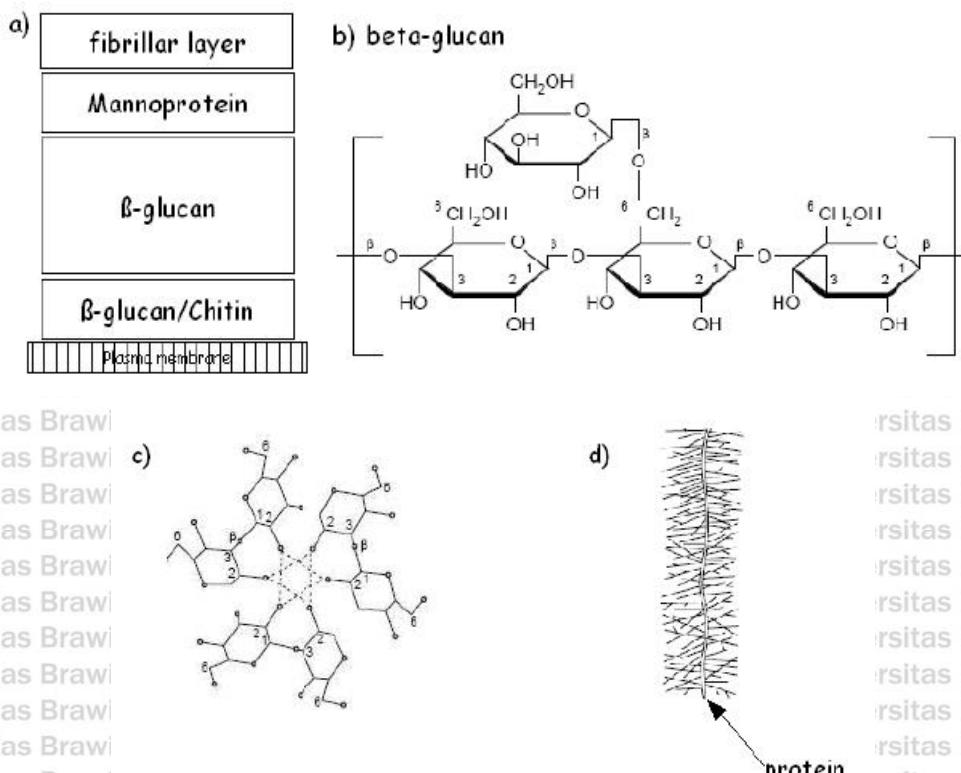
penelitian pangan Jepang. Agaritine diukur dengan laboratorium MASIS

menggunakan metode HPLC.

2.2.2. Campuran Aktif *Agaricus blazei* Murrill

Tabel 2.2. Campuran Aktif yang Terdapat Dalam *Agaricus blazei* Murrill (ATLAS World USA Inc 2010).

Campuran polisakarida	Campuran Non-polisakarida
α -glucans	conjugated linoleic acid (CLA)
β -1,3-glucans (Beta-glucan subtype)	ergosterol
β -1,6-glucans (Beta-glucan subtype)	sodium pyroglutamate
β -1,3/1,6-glucans (Beta-glucan subtype)	
β -galactoglucans	
chitin	
proteoglycans	
protein-bound polysaccharides	
xyloglucans	

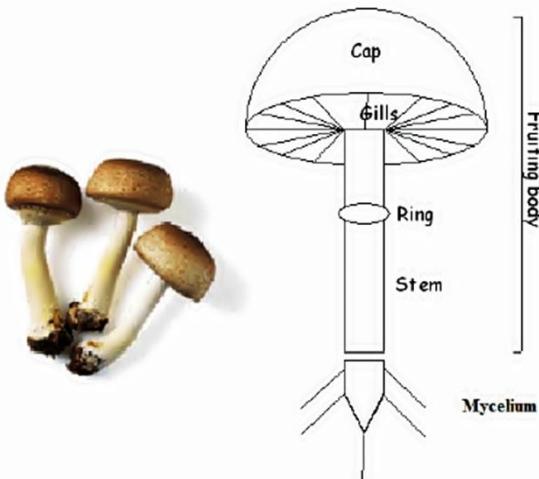


Gambar 2.1. Struktur dinding luar jamur termasuk β -glucan.

- Struktur dinding luar jamur yaitu:
- a) Dinding sel tersusun secara dominan oleh karbohidrat yang penting untuk integritas struktural dan daya tahan hidup sel – sel ini.
 - b) β -glucan membentuk komponen utama dari banyak dinding sel jamur dan terbentuk dalam susunan linear (β -(1->3)) atau bentuk cabangnya (β -(1->6)). Lapisan paling dalam adalah membran sel dua lapis, mengandung sterol (argosterol), dimana unit glukosil dari glucan tersusun sebagai rantai ulir yang panjang dari residu(β -(1->3))-glucan yang berhubungan dengan rantai samping β (1-6).
 - c) Tiga rantai β -(1->3) berjalan paralel dapat berhubungan untuk membentuk triple helix dan agregasi heliks – heliks (spiral – spiral) selanjutnya memproduksi jaringan fibril – fibril yang tidak larut dalam air.
 - d) Kompleks proteoglucan.

Alpha dan beta glucan adalah poliskarida yang ada di dalam *Agaricus blazei* Murrill yang bertanggung jawab untuk modulasi sistem kekebalan. Polisakarida – polisakarida ini terbuat dari unit – unit molekul *D-glucose* yang berulang, terikat satu dengan yang lain melalui ikatan glicosidic. Polisakarida – polisakarida ini hadir dalam variasi bentuk yang sangat beragam (diakibatkan banyaknya lokasi yang ditemui untuk ikatan glicosidic di antara unit – unit *D-glucose*). Protein – protein juga dapat ditempelkan pada polisakarida – polisakarida glucan ini (ATLAS World USA Inc 2010).

Komponen inti yang terdapat di dalam *Agaricus blazei* Murrill adalah β -glucan (Firenzuoli et al. 2008) yang terdiri dari rangka utama β -1,6 dan cabang – cabang samping β -1,3 (rasio 1:2). Namun demikian, *Agaricus blazei* Murrill mengandung beberapa bahan aktif selain β -glucan, seperti α -(1->4)-glucan, proteoglucan, lactin, ergosterol (provitamin D₂) (Førland 2011), agaritin (Endo et al. 2010), glucommannan, monnogalactoglucan, riboglucan (Kim et al.

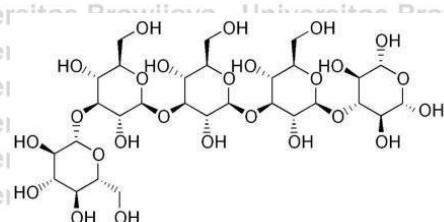


Gambar 2.2. Bagian – bagian *Agaricus blazei* Murrill (Forland 2011).

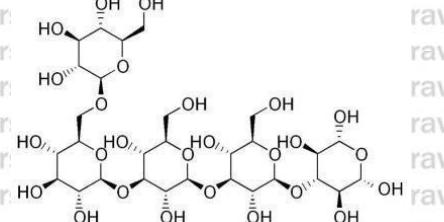
Di bawah ini adalah rumus bangun beberapa tipe *beta glucan*. *Beta glucan*

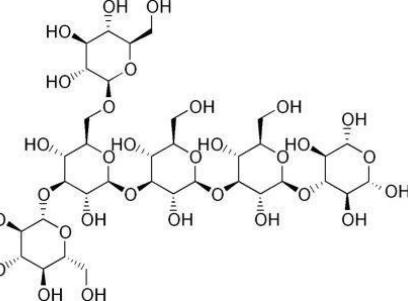
dibedakan melalui bagaimana molekul gula (*D-glucose*) menempel satu dengan yang lainnya. Nomor *beta glucan* menunjukkan bagaimana molekul gula tertempel satu dengan lainnya. Posisi numerik, berdasarkan molekul glukosa pusat, dengan penomoran tergantung karbon dalam urutan searah jarum jam.

Perbedaan di antara rumus bangun *alpha* dan *beta* disebabkan kiralitas (*chirality*) apakah rumus bangun unit glukosa terletak di atas atau di bawah (garis lebar tebal mengindikasikan posisi di atas, sementara garis putus – putus mengindikasikan posisi di bawah (ATLAS World USA Inc 2010).



Gambar 2.3. Rumus bangun *beta-1,3-glucan*. Gambar 2.4. Rumus bangun *beta-1,6-glucan*.





Gambar 2.5. Rumus bangun *beta-1,3/1,6-glucan*.

2.3. Sejarah Ditemukannya Peran *Treg* dalam Proses Aterosklerosis

Adanya lekosit di dalam arteri yang mengalami aterosklerosis ditemukan pertama kali di akhir tahun 1970-an (Gerrity et al. 1979). Selanjutnya laporan tentang bermacam – macam tipe lekosit yang ditemukan di dalam plak aterosklerosis dipublikasikan oleh Hansson pada tahun 2006 (Hansson dan Libby 2006). *Regulatory T cell* (*Treg*) juga ditemukan pada plak aterosklerosis. Peran *Treg* dalam mensupresi respon sel T yang pro aterogenik telah dibuktikan (Sakaguchi et al. 2006; Lopez-Pastrana et al. 2012). Peran *Treg* natural (*nTreg*) dalam eksperimen aterosklerosis pertama kali dilaporkan oleh Ait-Oufella dan kawan – kawan pada tahun 2006, yang menunjukkan rendahnya level *Treg* perifer yang terdeteksi dengan antibodi monokonal *anti-CD-25* menyebabkan peningkatan ukuran lesi aterosklerosis dan kerentanan untuk ruptur (vulnerabilitas) pada model mencit defisiensi gen *apolipoprotein E* (*ApoE*-/-) (Ait-Oufella et al. 2006).

Beberapa substrat *Treg* yang bertanggung jawab untuk mempertahankan toleransi imunologik dan mensupresi aktivitas imunitas sel – sel *T effector* yang berlebihan (Peterson 2012) akan mengurangi perkembangan aterosklerosis dengan melakukan down regulasi respon sel – sel T yang telah mengalami aktivasi (Sasaki et al. 2009). Subset – subset *Treg* mensekresikan dua sitokin utama yang bersifat anti inflamasi, yaitu *interleukin-10* (*IL-10*) dan *transforming*

growth factor (TGF- β). Kedua sitokin ini dapat mereduksi respon inflamasi

proaterogenik yang terlibat dalam aterosklerosis (Mallat dan Tedgui 2007).

Keseimbangan antara sel T effector dan Treg cukup jitu untuk mengendalikan perkembangan dan progresifitas aterosklerosis (Chistiakov et al. 2013).

2.4. Peran Imunitas ‘Innate’ dan Spesifik

Selama beberapa tahun, aterosklerosis digambarkan sebagai suatu penyakit yang disebabkan oleh akumulasi lipid pada dinding pembuluh darah.

Saat ini, setelah adanya penelitian yang luas disimpulkan bahwasanya aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronik yang multifaktorial dengan keterlibatan sistem imunologi (Samson et al. 2012). Dua dekade yang lalu,

limfosit T ditemukan ada dalam plak aterosklerosis. Sejak saat itu, penelitian

pada ranah ini telah memfokuskan pada kepentingan fungsional sel – sel

imunitas ini pada proses aterogenesis. Setidaknya dalam hal ini, sistem imun

mempunyai beberapa peran, yaitu: fungsi efektor dalam eliminasi komponen

antigen asing, eliminasi stres metabolismik endogen, fungsi imunotoleran terhadap

“self-antigen” dan fungsi imunosupresif dalam pengendalian respon imun

patogenik (Lopez-Pastrana et al. 2012).

Adanya retensi kolesterol pada regio subendotel arteri merupakan

kejadian patogenik utama, yang berkontribusi pada perkembangan aterosklerosis

(Samson et al. 2012). Kolesterol dan trigliserida tidak dapat larut dalam plasma,

selanjutnya ditransformasikan melalui LDL, yang secara normal memiliki asosiasi

dengan apolipoprotein B 100 (Apo-B-100). Interaksi antara ApoB100 yang

bermuatan positif, dan proteoglikan yang bermuatan negatif menyebabkan

retensi lipoprotein terkait ApoB pada dinding pembuluh darah arteri. Selanjutnya,

lipoprotein yang terpisah akan mengalami kerentanan untuk mengalami

modifikasi melalui oksidasi, pemecahan enzimatik dan agregasi serta menjadi

imunogenik yang pada akhirnya menimbulkan respon imun (Lopez–Pastrana et al. 2012). Sebagai contoh, Ox-LDL menginduksi respon autoimun dengan menimbulkan lahirnya anti Ox-LDL IgG pada lesi aterosklerosis (Ng et al. 2011). Oksidasi terhadap LDL bertanggung jawab terhadap lahirnya aldehid reaktif dan lipid – lipid yang terpotong, dengan cara memecah ikatan rangkap asam lemak pada fosfolipid, trigliserida, dan ester – ester kolesterol (Esterbauer et al. 1990).

Fosfolipid yang mengalami modifikasi dapat mengaktifkan *natural killer T cell* (NKT), makrofag, dan sel – sel endotelial (Hansson dan Hermansson 2011; Samson et al. 2012).

Respon imun ‘innate’ merupakan akibat dari adanya sinyals inflamasi melalui famili protein besar yang dikenal sebagai *pathogen-associated molecular pattern recognition receptor* (PRR), dimana meliputi “*toll like receptor*” (TLR), dan *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor* (NLR), dan lain – lain (Curtiss dan Tobias 2009). Reseptor ini dapat mengenali sinyal – sinyal bahaya terkait stres metabolismik endogen seperti kristal – kristal kolesterol dan Ox-LDL, yang selanjutnya terjadilah penggabungan kompleks protein yang mengaktifkan caspase 1 (*caspase-1-activating protein complexes*) yang bernama *inflamasome*. Kompleks protein ini merupakan sensor inflamasi. Aktivasi caspase-1 pro inflamasi penting untuk maturasi dan sekresi sitokin – sitokin pro inflamasi *IL-18* dan *IL-1 β* . Sebagai respon terhadap sinyal – sinyal bahaya yang berasal dari dalam dan luar yang diperantarai oleh PRR, maka terjadilah aktivasi sel – sel endotel. Komponen - komponen Ox-LDL dapat terikat pada TLR dan memicu terjadinya kaskade sinyalisasi serta aktivasi faktor transkripsi *NFkB*, yang menyebabkan upregulasi dan ekspresi gen yang mengkode molekul – molekul pro inflamasi seperti sitokin, kemokin, eikosanoid, proteinase, dan molekul – molekul kostimulatori sel T. Sebagai contoh, saat terjadi aktivasi, maka sel – sel endotel akan melakukan *upregulasi* molekul –

molekul adesi, seperti *vascular cell-adhesion molecule 1* (*VCAM-1*), *E-selectin*, *intracellular adhesion molecule 1* (*ICAM-1*), serta sekresi sitokin – sitokin dan kemokin – kemokin pro inflamasi (Ley et al. 2007). Sel – sel endotel yang mengalami aktivasi memainkan peranan penting dalam perekutan monosit, makrofag, sel T, sel dendritik dan sel – sel imun lainnya ke dalam dinding arteri. Sebagai tambahan, respon imun ‘*innate*’ yang lahir dari makrofag bermula ketika makrofag mencoba membersihkan deposit – deposit kolesterol di dalam arteri. Setelah bermuatan kolesterol, maka makrofag membentuk sel – sel busa dan “*fatty streak*”, yang mengendalikan proses inisiasi aterosklerosis. Sel – sel busa akan melapisi dinding arteri, mencetuskan respon inflamasi dan menjadi satu dari komponen – komponen utama tumbuhnya plak aterosklerosis. Makrofag – makrofag dan sel dendritik melahirkan radikal bebas oksigen, protease, faktor – faktor komplemen dan sitokin yang meningkatkan respon imunitas ‘*innate*’. Kapsula fibrosa tersusun dari komponen utama kolagen yang menutupi lesi, dan pada regio lengan terdiri dari sel – sel T yang teraktivasi, makrofag – makrofag, dan sel – sel mast (Samson et al. 2012).

Di samping sistem imunitas ‘*innate*’, peranan sistem imunitas adaptif dalam perkembangan aterosklerosis juga telah digambarkan dalam literatur. Sel – sel T mengenali auto antigen spesifik yang diproduksi dalam lingkungan yang relatif hiperlipidemik, termasuk di antaranya *Ox-LDL*, *heat shock protein 60/65* (*HSP 60/65*), β_2 *glycoprotein*, maupun peptida – peptida yang berasal dari *ApoB100* (Herbin et al. 2012). Komponen – komponen tersebut di atas dinamakan auto antigen, oleh karena merupakan target dari respon imun ‘*innate*’ dan adaptif (meskipun menjadi bagian dari pembentuk jaringan normal). Sel – sel T menjadi teraktivasi ketika makrofag atau sel – sel dendritik menampilkan auto antigen – antigen ini pada *major histocompatibility complexes* (*MHC*) di tempat lesi (plak) atau di dalam jaringan – jaringan limfoid.

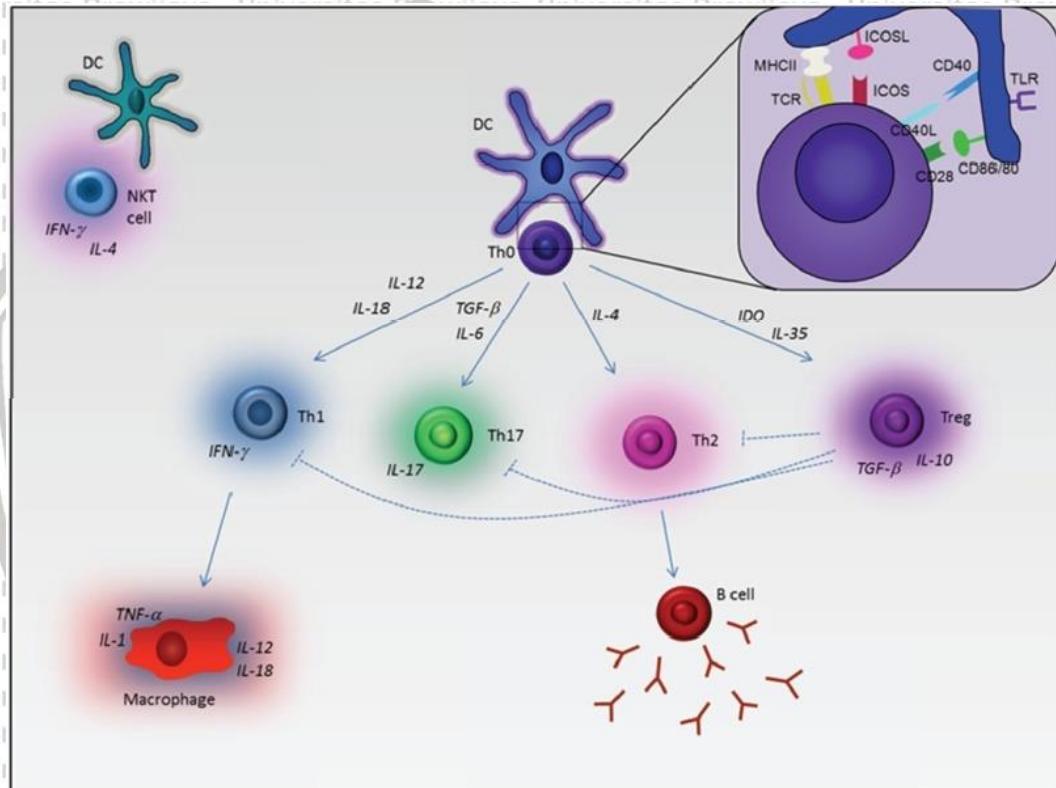
(Mallat et al. 2009). Secara lebih terperinci, pada tahap – tahap awal perkembangan aterosklerosis, sel – sel dendritik berakumulasi di dalam intima arteri yang mengalami gangguan aliran darah (salah satu faktor proaterogenik), melalui mekanisme yang melibatkan *VCAM-1* dan *CX3C chemokine receptor 1* (*CX3CR1*) atau yang dikenal dengan reseptor “*fractalkine*” atau *G-protein coupled receptor 13 (GPR13)* (Lopez–Pastrana et al. 2012).

Adanya akumulasi sel – sel dendritik selama perkembangan lesi berhubungan dengan inflamasi dan progresi lesi. Pembersihan lipid – lipid yang mengalami modifikasi dan struktur – struktur antigenik potensial lainnya dalam lesi akan menginduksi migrasi dan matrasi sel – sel dendritik (*DC*) menuju organ – organ limfoid sekunder, dimana mereka meningkatkan lahirnya sel – sel T patogen yang spesifik antigen dan/ atau lahirnya sel – sel *Treg*. Sel – sel T yang spesifik antigen ini selanjutnya akan bermigrasi menuju lesi aterosklerosis serta dapat direaktivasi dan sekaligus memodulasi respon imunoinflamasi. Kemampuan hidup (*survival*) dan pemeliharaan *Treg* lebih lemah dibanding dengan sel – sel *Teff*, yang pada akhirnya menyebabkan ketidak seimbangan imunitas adaptif sel T (Lopez–Pastrana et al. 2012).

Sel – sel *Th1* yang teraktivasi akan memproduksi sitokin – sitokin pro inflamasi, seperti *interferon-gama (IFN-γ)*, *tumor necrosis factor-α (TNF-α)* dan *ligand CD40 membrane*, yang akan mengamplifikasi respon imun melalui aktivasi makrofag, sel – sel otot polos vaskular, dan sel – sel endotel (Lopez–Pastrana et al. 2012). Produksi *interleukin-12 (IL-12)* oleh *DC* dan monosit/makrofag memainkan peranan yang penting dalam diferensiasi *Th1*, *upregulasi IFN-γ*, dan *down regulasi ekspresi IL-4 dan IL-5* pada sel – sel T (Mallat et al. 2009).

Sel – sel *Th2*, jarang terdeteksi pada lesi aterosklerosis, namun demikian induksinya akan meningkat pada keadaan lingkungan yang sangat hiperlipidemik (Mallat et al. 2009). *Th2* mensekresi berbagai macam sitokin termasuk *IL-4*, *IL-*

5, *IL-10*, *IL-13*, dan *IL-33*. Peranan *Th2* dalam aterosklerosis masih kontroversial (Lopez-Pastrana et al. 2012). *Th17* mensekresi *IL-17*, dimana berkaitan dengan respon pro inflamasi dan perkembangan atherosclerosis (Ng et al. 2011). Secara kontradiktif, Mallat dan kawan – kawan telah mengungkapkan bahwasanya *IL-17* bersifat ateroprotektif. Ketidakseimbangan antara *Th17/Treg* pada pasien pasien sindroma koroner akut telah dibuktikan. Sehingga hal ini menegaskan peran *Th17* dalam destabilisasi plak (Cheng et al. 2008).



Gambar 2.6. Sub Kelas Sel – sel T. Antigen akan dipresentasikan kepada sel – sel *Th* oleh molekul – molekul *MHC* kelas II (*MHC II*) pada sel – sel dendritik (*DC* = dendritic cell). Sel – sel *T* melalui *TCR* dapat mengenal antigen yang selanjutnya akan mengalami aktivasi. Selain interaksi *TCR-MHC* kelas II, aktivasi sel – sel *T* naif memerlukan kostimulasi. Molekul – molekul kostimulasi *CD80* dan *CD86* pada *APC* berinteraksi dengan *CD28* pada sel – sel *T*. Interaksi *CD80/86-CD28* diperlukan untuk setiap aktivasi sel *T*. Terdapat suatu molekul koinhibisi yang berinteraksi dengan *CD80* dan *CD86*. Berbeda dengan *CD28*, *CTLA-4*

memberikan signal inhibisi yang akan berlanjut dengan inaktivasi sel – sel T. DC juga mengekspresikan ligan *ICOS* (*ICOS Ligand/ICOSL*), dimana merupakan molekul kostimulasi dari famili yang sama dengan *CD80* dan *CD86*. *ICOS* yang diekspresikan pada sel – sel T akan berinteraksi dengan *ICOSL*. DC juga mengekspresikan *CD40* yang akan berinteraksi dengan *CD40L* dari sel – sel T. Antigen yang diambil DC akan menentukan pola molekul – molekul kostimulasi dan sitokin – sitokin yang disekresikan dari APC. Pola seperti ini akan menentukan nasib sel – sel T naif selanjutnya. Diferensiasi menjadi sel – sel *Th1* menghasilkan respon imun inflamasi. *IFN-γ* merupakan sitokin penting dalam diferensiasi dan fungsi sel *Th1* yang selanjutnya akan diikuti aktivasi makrofag. Interaksi *CD40-CD40L*, *ICOSL* dan *ICOS*, serta sekresi *IL-4* merupakan karakteristik respon sel – sel *Th2*. Diferensiasi menjadi sel – sel *Th2* menyebabkan aktivasi sel – sel B. Sel – sel B akan mensekresikan *IgG* yang spesifik terhadap antigen yang membantu membersihkan antigen yang ada. Antigen – antigen yang dipresentasikan pada DC dapat juga menginduksi sel – sel *Treg*. Sel – sel *Treg* adalah sel – sel penghambat imun yang akan mengurangi atau memperkecil respon imun dengan cara mensekresikan sitokin – sitokin anti inflamasi yaitu *IL-10* dan *TGF-β*. Sel – sel *Th17* mempunyai kesamaan dengan sel – sel *Th1* dan *Th2*, namun dianggap sebagai populasi sel – sel *Th* yang berbeda, dimana diferensiasinya terutama dikendalikan oleh *TGF-β* dan *IL-6*. Sel – sel *Th17* yang teraktivasi akan memproduksi sitokin pro inflamasi *IL-17*. Sel – sel *NKT* diaktivasi oleh antigen – antigen lipid yang ada pada *CD1* milik DC. Sel – sel *NKT* yang sudah teraktivasi akan memproduksi sitokin – sitokin pro inflamasi maupun anti inflamasi (Wigren 2011).

2.5. Toleransi Imun

Treg mempunyai fungsi yang sangat diperlukan dalam mempertahankan homeostasis imun. *Treg* mempunyai peranan yang penting dalam memediasi toleransi perifer, mencegah terjadinya penyakit – penyakit autoimun, dan

mensupresi respon inflamasi. Toleransi imun didefinisikan sebagai fungsi sistem imun dalam memelihara ketiadaan respon imun terhadap *self antigen* dan mensupresi terjadinya respon imunitas yang berlebihan yang dapat menyebabkan timbulnya manifestasi penyakit – penyakit autoimun dan aterosklerosis (Sakaguchi et al. 2008). Terdapat dua tipe toleransi, yaitu: toleransi sentral yang merupakan eliminasi sel – sel T yang *self-reactive* dari dalam *thymus* melalui proses yang disebut ‘seleksi negatif’. Toleransi yang kedua bernama toleransi perifer yang merupakan eliminasi sel – sel T *self-reactive* di luar *thymus*, seperti misalnya aktivitas imunosupresi *Treg* (Ketelhuth dan Hansson 2011).

2.6. Macam – macam *Treg*

Secara umum terdapat dua kelas sel – sel *Treg CD4⁺CD25^{high}*, yaitu *Treg natural* (*nTreg/naturally occurring Treg*) yang meliputi 5-10% dari seluruh sel – sel manusia yang mengandung *CD4⁺*. *Treg* jenis kedua adalah *Treg adaptif* (*adaptive/induced Treg cells/iTreg*). *nTreg* mengalami maturasi di dalam *thymus* dan akan mengekspresikan faktor transkripsi *Foxp3*. Secara eksperimental terdapat bukti – bukti bahwasanya *nTreg* akan ada tanpa adanya stimulasi antigen perifer (Sakaguchi et al. 2006; Sakaguchi et al. 2008). *iTreg* dilahirkan di perifer dari populasi sel – sel *T CD4⁺CD25⁺* dan diinduksi sebagai respon terhadap stimulasi antigen dan sitokin – sitokin tertentu. Sekali *Treg* mengalami aktivasi, *Treg* jenis ini dapat mensupresi sel – sel *T* lainnya melalui mekanisme yang berbeda – beda.

Tabel 2.3. Subset sel T yang dijelaskan dalam aterosklerosis

	Name	Physiological role	Common markers	Characteristic cytokines
T helper cells (CD4+) MHC class II restricted	Th1	Immunity against intracellular pathogens	T-bet, IL-12r, IL-18r, and CXCR3	IFN γ , TNF α , and LT α
	Th2	Immunity against extracellular parasites	GATA3, DEC2, MAF, IL-4r, IL-33r, CCR4, IL-17rb, CRTH2	IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10
	Th17	Immunity against different species of bacteria and fungus	ROR γ t, ROR γ , CCR4, and CCR6	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20
Tregs (CD4+) MHC class II restricted	Inducible Treg	Peripheral tolerance and immunoregulation	FOXP3, CD25, CTLA4, and GITR	TGF β and IL-10
	Natural Treg		FOXP3, CD25, CTLA4, GITR, and Helios	TGF β , IL-10, and IL-35
	Tr1		AhR, cMAF	IL-10 and IL-21
Cytotoxic T cells (CD8+) MHC class I restricted	CTL	Immunity against viruses and cancer	CD8, EOMES, T-bet, and BLIMP1	Perforin, granzymes, and granulysin; IFN γ and other cytokines also made by CD4+ T cells
CD4+ CD28null T cells	CD4+CD28null	Immunity against pathogens	No CD28, NKG2D, CX3CR1	IFN γ and TNF α , perforin, and granzymes
$\gamma\delta$ T cells	$\gamma\delta$ T cells	Mucosal immunity/barrier	$\gamma\delta$ TCR	IFN γ , IL-17A, IL-17F, IL-22
Natural killer T cells	NKT	Peripheral tolerance, Immunity against pathogens and cancer; Recognise lipid antigens	PLZF, NK1.1, CD56, CD1d restricted or not; Vα14-Jα18 (mouse); and Vα24-Jα18 (human)	IFN γ and IL-4

(Ketelhuth dan Hansson 2011)

2.6.1. Sel – sel Treg Natural ($nTreg$)

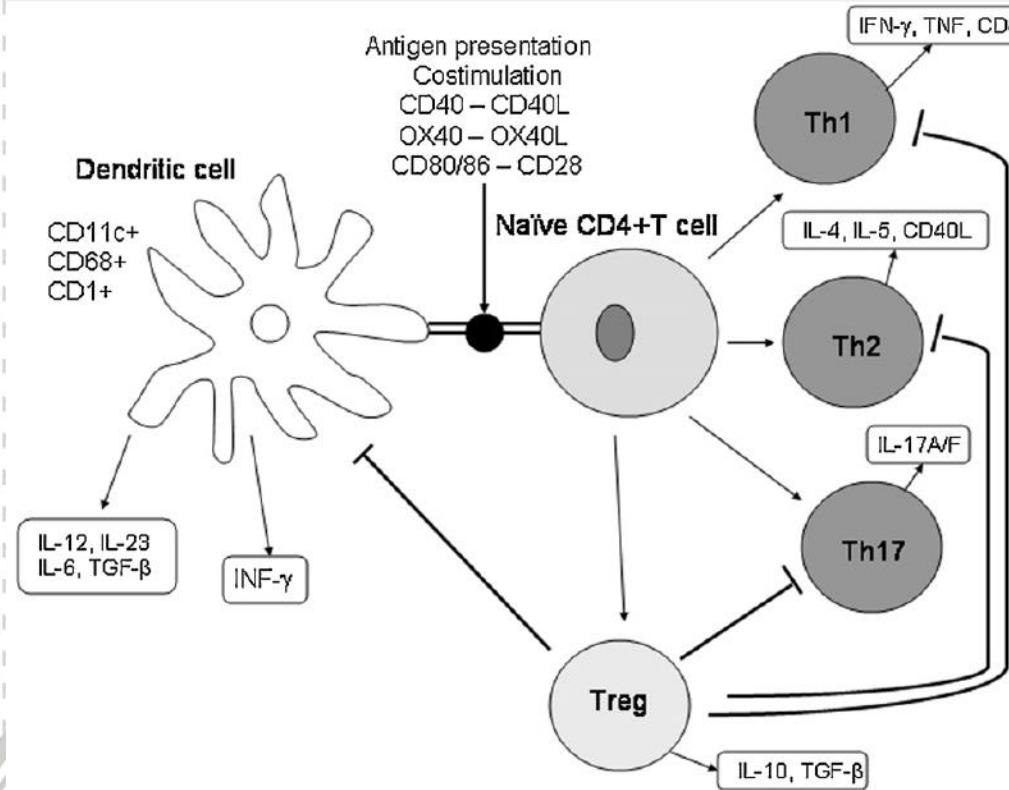
nTreg berkembang di dalam *thymus*, mempunyai karakteristik berupa ekspresi *CD4*, *CD25^{high}* dan faktor transkripsi *Foxp3* (Stephens dan Shevach 2007). Sel – sel ini dapat dikenali melalui koekspresi marker permukaan sel *CD4* dan *CD25*. Selain kedua marker ini, dapat dijumpai adanya marker – marker lain seperti *CD103*, *CD62L*, *lymphocyte activation gene 3 protein* (*LAG3*), *C-C chemokine receptor type 5* (*CCR5*), *neurophilin*, *the activation antigens glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor* (*GITR*), dan *cytotoxic T-lymphocyte protein 4*(*CTLA-4 ~ CD152*). Selain itu *nTreg* dapat dikenali oleh karena tidak adanya marker pemakan sel tertentu seperti *CD127* (*rantai α reseptör IL-7*). *nTreg* mengenali *self-antigen* spesifik dan mencegah autoimunitas melalui penghambatan limfosit – limfosit patogen (Lopez-Pastrana et al. 2012).

nTreg mengekspresikan faktor transkripsi *Foxp3* (anggota keluarga faktor

transkripsi *Fork-head* / *winged-helix* dan regulator utama fungsi dan perkembangan *Treg* di dalam *thymus*). *IL-2* menginduksi ekspresi *Foxp3* (Zorn



et al. 2006). *Foxp3* bertindak mengendalikan modul inti fungsi supresi *Treg* dengan mengatur ekspresi sejumlah molekul – molekul kunci, seperti *CTLA-4* dan *CD25*. Fungsi utama *nTreg* adalah menghambat aktivasi sel – sel T naif, namun selain itu juga mempunyai kemampuan mengendalikan sel – sel T efektor yang teraktivasi dan sel – sel memori *CD4⁺* dan *CD8⁺* (Chistiakov et al. 2013). *nTreg* *Foxp3⁺* yang sudah mengalami maturasi sempurna akan keluar dari *thymus* dan selanjutnya bermigrasi menuju organ – organ limfoid sekunder dimana mereka akan mensupresi proliferasi sel – sel T autoimun spesifik jaringan dan diferensiasinya menjadi *Th1*, *Th2*, dan *Th17*. Selain itu *Treg* juga menghambat aktivasi sel T poliklonal dan fungsi sel – sel B, makrofag, *DC* (Sasaki et al. 2012), sel – sel *NK* dan *NKT* (Chistiakov et al. 2013). *nTreg* melakukan aktivitasnya melalui kontak sel dengan sel (*cell-cell contact*), *TGF-β* terikat membran, *IL-10*, *CTLA-4* menghilangkan/mengambil *IL-2* yang berguna untuk proliferasi sel T efektor (van ES 2010; Wigren 2012), serta dengan mengekspresikan *IL-35* pada *nTreg* (*IL-35* merupakan sitokin anti inflamasi yang diekspresikan oleh *nTreg*, namun tidak diekspresikan oleh sel – sel T efektor istirahat ataupun yang teraktivasi (Collison et al. 2007).



(Christiakov 2013)

Gambar 2.7. Interaksi di antara DC dan sel T. DC bisa memperpresentasikan "self antigen" atherosclerosis, seperti misalnya yang berasal dari HSP-60 dan Ox-LDL kepada sel – sel naif, dengan dukungan molekul – molekul kostimulasi seperti CD40, Ox40L, CD80, dan CD86 yang menyebabkan terjadinya diferensiasi dan proliferasi sel T. Th17 juga memainkan peranan yang penting yang bersifat pro inflamasi dan proaterogenik. Treg yang diinduksi dari sel – sel T naif melalui mekanisme DC yang tolerogenik, mempunyai kemampuan menekan seluruh tipe sel – sel Teff serta menekan kemampuan stimulasi imun sel – sel DC matur. Sel – sel Treg mempunyai efek – efek anti aterogenik dan memainkan peranan penting dalam melawan atherosclerosis, terutama dengan menginhibisi sel – sel Th1 dan Th17 yang bersifat pro inflamasi melalui kontak sel ke sel (*cell to cell contacts*) dan dengan mensekresikan IL-10 dan TGF- β yang bersifat anti inflamasi (Christiakov 2013).

2.6.2. Sel – sel Treg Adaptif

Sel – sel Treg adaptif atau yang juga dikenal dengan “*inducible Treg/iTreg*” diinduksi di perifer dari prekursor – prekursor sel T CD4⁺CD25⁺, yang mendapatkan ekspresi CD25 (*IL-2 receptor α chain; IL-2Ra*). Treg berasal dari sel – sel T CD4⁺ naif di dalam jaringan limfoid sebagai respon terhadap antigen spesifik, bersamaan dengan adanya *TGF-β1*, *IL-10*, dan *IL-4* tanpa adanya sitokin – sitokin pro inflamasi, seperti *IFN-γ*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-12*. Adanya toleransi menyebabkan beberapa material yang tidak berbahaya (tolerogenik) seperti partikel – partikel dalam udara, bakteri komensal serta makanan tidak menimbulkan sinyal – sinyal bahaya. Hal ini penting, untuk mencegah reaktivitas imun yang tidak diinginkan (Christiakov et al. 2013).

Dalam kenyatannya, *iTreg* tergantung pada *IL-2* untuk perkembangan dan kehidupannya. Pada tempat lesi terjadinya aterosklerosis, *iTreg* mencegah pembentukan sel busa. *iTreg* juga mampu merubah diferensiasi makrofag dari bentuk *fenotipe M1* (makrofag yang memproduksi sitokin – sitokin pro inflamasi) menjadi *fenotipe M2* (makrofag yang memproduksi sitokin – sitokin anti inflamasi) (Lopez-Pastrana et al. 2012).

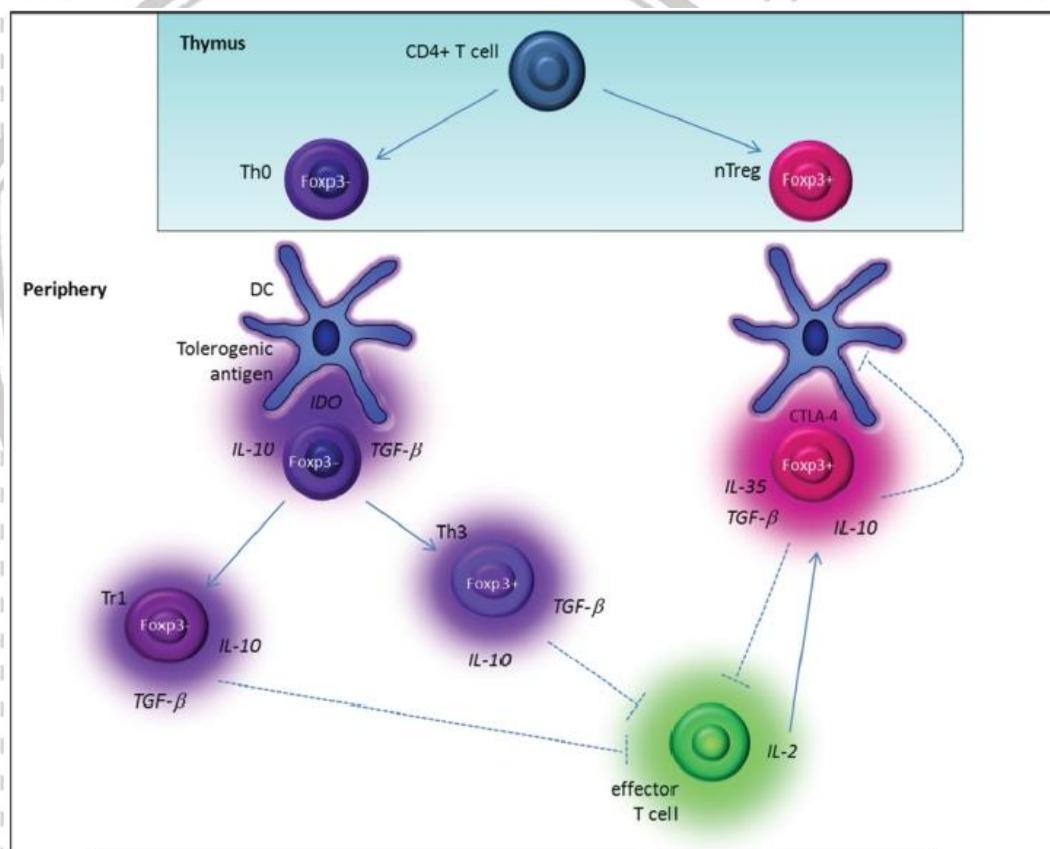
2.6.2.1. Treg Foxp3⁺

Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (natural/nTreg) berasal dari *thymus* dan dilepaskan ke jaringan perifer setelah melalui seleksi positif oleh *thymus* (*thymic-positive selection*). Sementara itu, *iTreg* terlahir dari konversi perifer (setelah stimulasi spesifik antigen) dari sel – sel T naif CD4⁺ yang telah matur atau dari limfosit – limfosit T efektor “self reactive” yang diselamatkan (Workman et al. 2009).

Treg *Foxp3⁺* dapat diinduksi dari perifer dari sel – sel T naif *CD4⁺CD25⁺* oleh *IL-2* dan *TGF-β* (Fantini et al. 2004; Chistiakov et al. 2013). Bersamaan dengan *TGF-β*, asam retinoat yang terlahir dari DC mukosa yang mempunyai spesialisasi secara fungsional dapat menginduksi ekspresi *Foxp3⁺* pada sel – sel Tnaif *CD4⁺* (Coombes et al. 2007). Untuk ekspresi *Foxp3* yang stabil dan kemampuan aktivitas supresif ditentukan oleh status demetilasi pada lokus *Foxp3⁺*. Profil metilasi promotor *Foxp3* akan memfasilitasi penentuan status Treg yang benar – benar dapat berfungsi penuh (Lal et al. 2009).

Treg Foxp3⁺ yang diinduksi oleh *TGF-β* dapat dengan cepat kehilangan ekspresi *Foxp3⁺* sekaligus kemampuan supresinya, sedangkan *nTregCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺* tidak bersifat demikian (Takaki et al. 2008). Penyebab utama dari hilangnya *Foxp3⁺* pada *Treg* adalah *IL-4* yang diproduksi oleh sel – sel *Th2*. *IL-4* merupakan supresor yang penting terhadap proses induksi *Foxp3*. *IL-4* dapat menyebabkan ‘down regulasi’ terhadap ekspresi *Foxp3* melalui cara tergantung *STAT-6* (Takaki et al. 2008). Selain itu *IL-4* mengaktifkan faktor transkripsi *Th2* yang bernama *Gata3*, dimana hal ini dapat memberikan blokade (hambatan) terhadap transkripsi *Foxp3* melalui ikatan langsung pada promotor *Foxp3* (Mantel et al. 2007). Faktor terakhir yang dapat mensupresi ekspresi *Foxp3* secara efisien adalah melalui faktor transkripsi *PU1*, dimana secara sementara terinduksi selama diferensiasi *Th2* (Hadjur et al. 2009). Sifat *TGF-β* selain mampu menginduksi munculnya *Treg Foxp3⁺*, juga menginduksi diferensiasi sel – sel *Th-17* apabila terdapat sitokin pro inflamasi yang bernama *IL-6* (Weaver et al. 2007). Sel – sel *Th-17* terlibat dalam meningkatkan respon autoimunitas dan inflamasi. *Treg Foxp3⁺* yang diinduksi oleh *TGF-β* mampu mensupresi diferensiasi *TH17* melalui antagonis fungsi *RORyt* (*RAR-related orphan receptor gamma*) (Zhou et al. 2008).

Adanya $IL-6$ tanpa disertai penambahan $TGF-\beta$ dari luar menyebabkan $nTregCD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ dapat berdiferensiasi menjadi produsen $IL-17$ (Xu et al. 2007; Kitani dan Xu 2008). Kenyataan berbeda ditunjukkan, bahwa $Treg$ yang diinduksi oleh $TGF-\beta$ dan $IL-2$ bersifat resisten terhadap konversi terkait $IL-6$ menjadi sel – sel $Th-17$ (Zheng et al. 2008). Oleh karena itu, $nTreg$ bukanlah bayangan cermin dari $Treg$ yang diinduksi oleh $TGF-\beta$. Kedua subset ini berbeda dalam hal spesifikasi pokok antigennya dan juga kekuatan sinyal reseptor sel T, serta kelengkapan – kelengkapan kostimulasinya yang dibutuhkan untuk perkembangannya /proliferasinya (Horwitz et al. 2008).



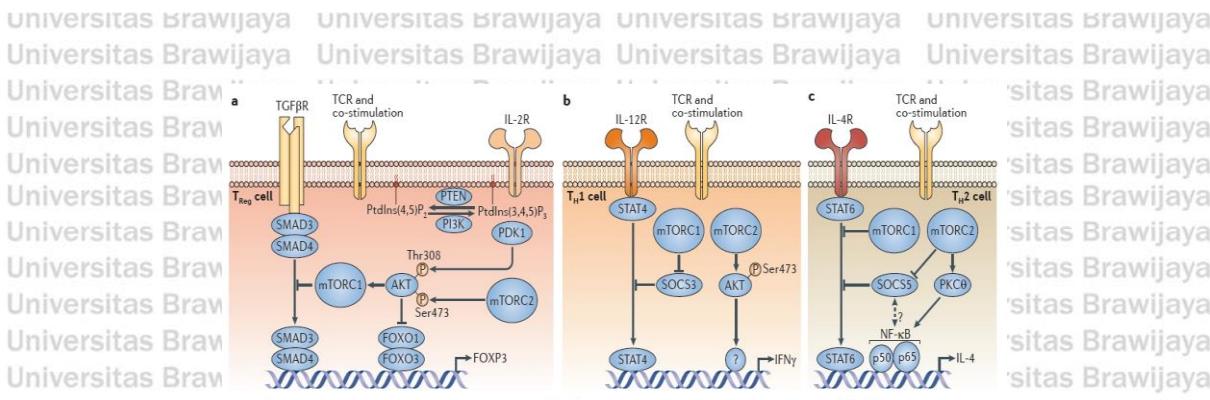
Gambar 2.8. $nTreg$ dan $iTreg$. $nTreg$ dan $iTreg$ dimatangkan di dalam thymus

dan mengekspresikan $Foxp3^+$. Sel – sel $Th0$ dapat berdiferensiasi menjadi $Tr1$ atau $Th3$ jika diaktivasi oleh antigen yang bersifat tolerogenik melalui sel – sel dendritik (DC). Baik $nTreg$ maupun $iTreg$ memproduksi sitokin – sitokin yang bersifat anti inflamasi, yaitu $IL-10$ dan $TGF-\beta$ yang dapat menghambat sel – sel

2.7. Signal Transduksi pada Treg

Sel – sel *iTreg* beraksi secara sinergis dengan *nTreg* untuk menghasilkan toleransi imun (Haribhai 2011). Inhibisi aktivitas *mammalian target of rapamycin* (*mTOR*) telah terbukti dapat menginduksi ekspresi *fork head box P3* (*FOXP3*) *de novo* (Gao 2007; Kang et al. 2008; Chi 2012), ataupun mengekspresikan populasi sel – sel *nTreg* yang sudah ada (Battaglia et al. 2005; Chi 2012). Sebaliknya, meningkatnya aktivitas *AKT* – baik melalui delesi *phosphatase and tensin homologue* (*Pten*) ataupun melalui *AKT* yang aktif secara konstitutif menyebabkan inhibisi diferensiasi sel *iTreg* yang tergantung *mTOR* (Haxhinasto et al. 2008; Procaccini 2010).

Dua jalur ‘downstream’ dapat memediasi efek inhibisi *mTOR* pada diferensiasi sel *iTreg* (Gambar: 4). Pertama, *SMAD3* - suatu faktor transkripsi kunci yang berfungsi pada ‘downstream’ signaling *TGF-β* dalam proses induksi *FOXP3* – diantagoniskan oleh signaling *mTOR* pada berbagai tipe sel, termasuk sel – sel T (Delgoffe 2009; Harada 2010; Rao et al. 2010). Kedua, *fork head box O1* (*FOXO1*) dan *FOXO3* yang akan menginduksi ekspresi *FOXP3* (Harada 2010; Ouyang 2010) akan diaktifasi oleh fosforilasi yang tergantung *AKT*. Namun demikian, bagaimana hal ini dikontrol oleh signaling *mTOR complex 2* (*mTORC2*) masih memerlukan studi lanjutan (Merkenschlager dan von Boehmer 2010).



Gambar 2.9. ‘Signalling’ Tergantung *mTOR* dalam diferensiasi sel CD4⁺. a) Untuk

diferensi sel – sel *Treg*, induksi ekspresi *FOXP3* tergantung faktor – faktor transkripsi yaitu *SMAD3*, *SMAD4*, *fork head box 01 (FOXO1)*, dan *FOXO3 – mammalian target of rapamycin (mTOR)* menghambat lahirnya sel – sel *iTreg* dengan cara mengantagonis fungsi downstream *SMAD3* dan *SMAD4* dari signaling *transforming growth factor-β receptor (TGFBR)* dan dengan cara menginduksi eksklusi inti *FOXO1* dan *FOXO3*. Kedua efek ini kemungkinan dimediasi oleh *mTOR complex1 (mTORC1)* dan *mTORC2* berturut – turut. b)

Pada diferensiasi sel – sel *T helper 1 (Th1)*, *mTORC1* menghambat induksi *supressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)* – regulator negatif yang penting untuk meningkatkan *signalling interleukin-12 receptor (IL-12R)* dan diferensiasi sel Th1. Sebagai tambahan *mTORC2* diperlukan untuk aktivasi *AKT*, dimana juga berkontribusi terhadap produksi *interferon-γ (IFNγ)*. c) *mTORC2* meningkatkan diferensiasi sel Th2 melalui dua mekanisme : dengan cara mencegah ekspresi *SOCS5*, yang merupakan regulator negatif *signalling IL-4R* dan *STAT6*; dan dengan mengaktifasi *protein kinase Cθ (PKCθ)* dan oleh karena itu meningkatkan transkripsi melalui *nuclear factor-κB (NF-κB)* – *mTORC1* mempunyai peran regulasi negatif terhadap *signalling STAT6* dan diferensiasi sel Th2(*IPDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PtdIns(4,5)P2, phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate; PtdIns(3,4,5)P3, phosphatidylinositol-3, 4,5-trisphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homologue; TCR, T cell receptor; TGFβR, TGFβ receptor (Chi 2012).*

Studi – studi terdahulu mengenai signalling *mTOR* dalam respon sel T terfokus pada efek anti proliferatif yang dimiliki rapamycin (bersifat inhibitor). *mTOR* mempunyai peranan yang mendasar dalam menentukan nasib sel pada sel – sel *CD4⁺* dan *CD8⁺* yang teraktivasi oleh antigen. Inhibisi pada *mTOR* akan memfasilitasi induksi sel – sel T *CD4⁺* yang anergi dan bersifat regulator. Dua hal ini adalah komponen paling penting terjadinya toleransi perifer. Selain terjadinya toleransi perifer, juga terjadi diferensiasi sel – sel T memori *CD8⁺* (Chi 2012). Sel – sel T *CD4⁺* memberikan respon terhadap stimulasi antigen dengan berkembang menjadi keturunan sel efektor tertentu, seperti misalnya sel – sel *Th1*, *Th2*, dan *Th17* yang mempunyai fungsi efektor dan kemampuan spesial atau menjadi *Treg* yang selanjutnya akan mecegah reaksi imun yang berlebihan (Zhu et al. 2010). Penelitian yang dilakukan Powell dan kawan – kawan menyimpulkan bahwasanya *mTOR* meningkatkan diferensiasi sel – sel *Teff* (Delgoffe 2009). Sel – sel T *Mtor¹⁻* mempunyai marker aktivasi normal dan kadar produksi *IL-2* sebagai respon terhadap stimulasi *TCR*, namun gagal untuk berdiferensiasi menjadi sel – sel *Th1*, *Th2*, dan *Th17*. Lebih jauh lagi, sel – sel T *Mtor¹⁻* tidak mampu untuk mengaktifasi protein *STAT* yang selektif terhadap jenis keturunannya ataupun mengekspresikan faktor transkripsi kunci (*master*) yang selektif terhadap keturunannya (*STAT4* dan *T-bet* untuk sel – sel *Th1*; *STAT6* dan *GATA3* untuk sel – sel *Th2*; serta *STAT3* dan *RORγt* untuk sel – sel *Th17*). Hasil – hasil ini menyimpulkan peran *mTOR* yang sangat diperlukan dalam diferensiasi sel – sel *Teff CD4⁺* (Delgoffe 2009). Pada sel – sel T *Mtor¹⁻* yang mengalami stimulasi *TCR* akan menghasilkan induksi spontan dan ekspresi *Foxp3*, walaupun tanpa disertai stimulus sitokin eksogen. *Mtor¹⁻* berkontribusi terhadap inhibisi induksi sel – sel *Treg*, kemungkinan melalui mekanisme downstream tertentu (Delgoffe 2009; Lee 2010; Delgoffe 2011).

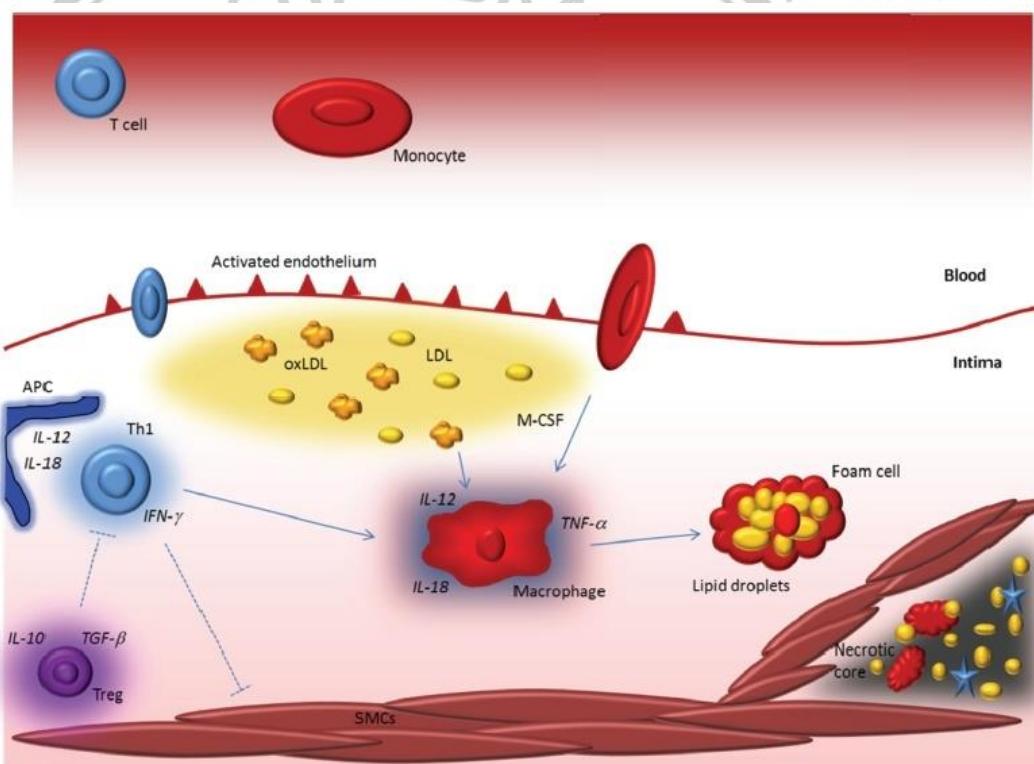
2.8. Peran Treg Pada Inflamasi Vaskular

Treg menyusun 5-10% dari total cell CD4⁺ perifer dan bertanggung jawab dalam menekan respon sistem imun yang hiperaktif di sel – sel vaskular. Efek supresi Treg tidak terbatas pada sel – sel imunitas adaptif, seperti sel – sel CD4⁺ dan sel – sel T CD8⁺, ataupun sel – sel B, namun juga dapat mensupresi sel – sel imunitas ‘innate’ seperti NK, monosit, makrofag, sel – sel dendritik (DC) dan neutrofil. Lemahnya Treg menyebabkan gangguan keseimbangan Treg dan sel – sel Teff, sehingga terjadilah inflamasi vaskular (Lopez-Pastrana et al. 2012).

Sel – sel endotel memainkan peranan penting di dalam kejadian kejadian imunologis, dan memberikan gambaran populasi sel – sel yang sangat heterogen dan mempunyai kemampuan memodulasi fungsi sel – sel imun (Ait-Oufella et al. 2007; Cao et al. 2007; Danese et al. 2007). Beberapa penelitian menunjukkan bahwasanya sel – sel endotel memainkan peranan yang penting pada onset awal terjadinya aterosklerosis dengan merubah dari keadaan tenang menjadi pro inflamasi sehingga terjadilah proses inflamasi (Pober dan Sessa 2007; Yan dan Hansson 2007). Selama terjadinya inflamasi, sel – sel endotel menunjukkan peningkatan daya tangkap terhadap lekosit, serta terlibat dalam perekrutan lekosit ke dalam lapisan interstitial jaringan (Aird 2007). Selain hal di atas, sel – sel endotel secara kondisional dapat bertindak sebagai antigen presenting cell (APC). Apabila sel – sel endotel bertindak sebagai APC, maka secara efektif dapat mempresentasikan alloantigen kepada limfosit, dan terjadilah aktivasi sel T, termasuk dalam hal ini adalah Treg (Lopez-Pastrana et al. 2012).

Peran imunologik sel – sel endotel mengikat secara signifikan ketika sel – sel endotel teraktivasi, menyebabkan peningkatan ekspresi HLA-DR (suatu tipe MHC kelas II, molekul MHC kelas II), dan kostimulator sel T, seperti CD86 dan CD80 (Mallat et al. 2009). Ekspresi molekul – molekul kostimulator pada sel – sel endotel dapat memberikan sinyal tambahan bagi Treg untuk berinteraksi

dengan sel – sel endotel. Pada HUVEC, Treg menunjukkan efek supresinya pada *Ox-LDL Lippopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response* dengan cara mereduksi aktivasi jalur *NF- κ B*, serta melalui “*down regulasi*” ekspresi *vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)*, *monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)*, dan *IL-6* (He et al. 2010). Kelainan adesi sel – sel *Teff* pada endotel yang mengalami inflamasi diinduksi oleh “*down regulasi*” *E-selectin* dan *P-selectin* yang diperantarai adenosin pada endotel vaskular (Ohmichi et al. 2011). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwasanya terdapat mekanisme baru supresi imunitas yang diperantarai *Treg* invivo, yaitu melalui hambatan adesi lekosit pada endotel (Ring et al. 2009).



Gambar 2.10. Efek potensial Th1 yang bersifat proaterogenik dan Treg yang bersifat anti aterogenik. Sel – sel Th1 meningkatkan inflamasi plak dan destabilisasi melalui pelepasan *IFN- γ* (Wigren et al. 2011). Interferon gamma merupakan inhibitor dari proliferasi sel dan tipe *IFN- γ* yang berbeda terlibat dalam regulasi pembentukan paracrine dan autocrine. *IFN- γ* diproduksi oleh limfosit T

yang teraktifasi dan akan dilepaskan selama respon imun dan kondisi inflamasi. Sel – sel otot polos arterial akan memberikan respon terhadap *IFN-γ* dengan mengekspresikan gen – gen MHC kelas II seperti HLA-DR (Hansson et al. 1989). *IFN-γ* akan mengaktifasi makrofag dan mencegah infiltrasi sel – sel otot polos. *Treg* mempunyai potensi menghambat sel – sel *Th1* dan oleh sebab itu dapat mencegah perkembangan plak selanjutnya (Wigren et al. 2011).

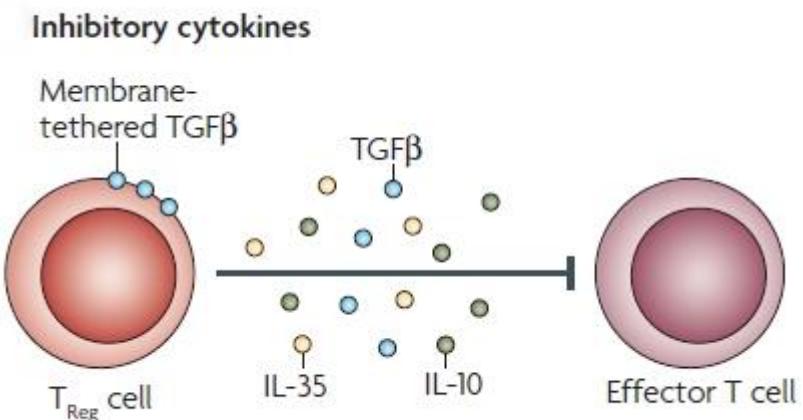
2.9. Peranan TGF beta (*TGF-β*) pada *Treg*

TGF beta adalah protein tersekresi yang mengontrol proliferasi, diferensiasi sel, dan fungsi – fungsi lainnya pada sebagian besar sel. Protein ini memainkan peran penting dalam imunitas (Wiki:2). Sebagian besar jaringan mengekspresikan gen – gen yang mengkode *TGF-β*. Berbeda dengan sitokin anti inflamasi *IL-10* yang terekspresi secara minimal pada jaringan – jaringan yang tidak terstimulasi karena memerlukan “trigger” tertentu (Li et al. 2012).

TGF-β beraksi sebagai faktor anti proliferatif pada sel – sel epitelial normal. Beberapa sel yang mensekresikan *TGF-β* juga mempunyai reseptor untuk *TGF-β* (*autocrine signaling*). *TGF-β* berperan penting dalam regulasi sistem imun melalui sel – sel *Treg Foxp3⁺* dan sekaligus berperan dalam diferensiasi sel – sel *Treg Foxp3⁺* dan *Th17* (Hill et al. 2009).

TGF-β berperan dalam perkembangan *nTreg*. Pada monosit *TGF-β^{-/-}* terbukti mengalami kematian akibat autoimunitas yang berat, sesuai dengan peran penting sitokin ini dalam toleransi imun. Aspek penting dari penyakit yang menyertainya berhubungan dengan adanya defek sel – sel *Treg* (Yuan dan Malek 2012). Data – data dari beberapa penelitian menyabutkan bahwa perkembangan sel – sel *Treg FoxP3⁺* dari prekursor – prekursor *FoxP3^{neg}* tidak dipengaruhi oleh penambahan atau blokade *TGFβ* (Burchill et al. 2008; Lio et al. 2008). Sehingga hal ini meningkatkan kemungkinan bahwasanya *TGFβ* tidak

terlibat dalam perkembangan *Treg* di thymus, namun lebih berperan sebagai signal survival selama awal perkembangan *Treg* (Yuan dan Malek 2012). Selain untuk *nTreg*, signal *TGF β* diperlukan untuk produksi *iTreg* invitro dan invivo. *TGF β* juga mensupport produksi *iTreg* dibawah kondisi ‘signaling’ *TCR* yang kuat, dimana hal ini secara normal mengarahkan kepada sel – sel *Teff* (Gottschalk et al. 2010). ‘Signaling’ tergantung *TGF β* secara langsung berhubungan dengan induksi *FoxP3* pada sel – sel *iTreg*. Blokade terhadap smad2 dan smad3 hanya berpengaruh sebagian pada hambatan induksi *FoxP3* yang diinduksi oleh *TGF β* (Lu et al. 2010), menunjukkan bahwa sel – sel *iTreg* kemungkinan juga akibat aktivasi jalur *ERK* dan *JNK/MAPK* yang tergantung oleh *TGF β* . Sel – sel *iTreg* bisa berasal dari sel – sel prekursor *CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$* thymus yang kemudian keluar dari thymus dan mendapatkan ekspresi *Foxp3* serta memiliki fungsi supresif di perifer setelah bertemu dengan ‘self antigen’ dan *IL-2*, tanpa tergantung *TGF β* (Yuan dan Malek 2012).



Gambar 2.11. Sitokin – sitokin Penghambat. Sitokin – sitokin yang bersifat menghambat, yaitu *IL-10*, *IL-25*, dan *TGF β* akan menyebabkan sel – sel *Treg* mampu menukar sel – sel *T* effektor (Vignali et al. 2008).

2.10. Peranan *IL-10* Pada Treg

Dikenal sebagai human *cytokine synthesis inhibitory factor* (*CSIF*). *IL-10* merupakan faktor anti inflamasi melalui kompleks reseptor yang terdiri atas dua protein reseptör *IL-10-1* dan dua protein reseptör *IL-10-2*, sehingga reseptör fungsionalnya terdiri atas 4 molekul reseptör *IL-10* (Mosser dan Zhang 2008). *IL-10* terutama diproduksi oleh monosit, dan juga dari beberapa sel lainnya seperti limfosit (*Th2*), monosit, sel – sel Treg *CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺* dan oleh beberapa subset tertentu dari sel – sel B dan T yang teraktivasi. *IL-10* dapat memberikan hambatan terhadap aktivitas *NFκB* (Said et al. 2010). *IL-10* mampu menginhibisi sintesis sitokin – sitokin proinflamasi seperti *IFN-γ*, *IL-2*, *IL-3*, *TNF-α*, dan *GM CSF*. Selain itu *IL-10* juga dapat menampilkan kemampuan yang poten untuk mensupresi kemampuan presentasi antigen dari sel – sel APC (Sikka et al. 2013).

IL-10 merupakan sitokin antiaterogenik yang poten. Pengukuran kadar *IL-10* telah dilakukan pada beberapa studi klinik untuk mencoba mengevaluasi nilainya sebagai prediktor kejadian kardiovaskular yang tidak diinginkan (Tedgui dan Mallat 2006).

Pasien – pasien dengan APTS yang mengalami serangan jantung dalam tiga bulan masa pengawasan mempunyai kadar *IL-10* yang lebih rendah saat masuk Rumah Sakit, dibandingkan pasien – pasien dengan evolusi yang nonkomplikasi (Tedgui dan Mallat 2006; Anguera et al. 2002). Peningkatan kadar *IL-10* dalam serum berhubungan secara konsisten dengan perbaikan secara signifikan pada pasien – pasien dengan sindroma koroner akut (Heeschen et al. 2003; Tedgui dan Mallat 2006).

Menurunnya kadar *IL-10* dalam serum tidak hanya merupakan marker prediktif instabilitas plak yang mengarah terhadap terjadinya sindroma koroner.

akut, namun lebih penting lagi merupakan indikasi adanya prognosis yang buruk,

bahkan setelah terjadinya iskemik akut yang disebabkan oleh instabilitas plak.

2.11. Lipoprotein – Assosiated Phospholipase A₂ (LpPLA₂) Sebagai Petanda Terjadinya Proses Oksidasi

LpPLA₂ adalah suatu enzim *phospalipase A₂* pada manusia dikode oleh gen *PLA₂G₇* dikenal sebagai *platelet activating factor acetyl hydrolase* (*LpPLA₂*), (Tew et al. 1996). Di dalam darah terangkut bersama *LDL* dan kurang dari 20% berhubungan dengan *HDL*. Enzim ini diproduksi oleh sel-sel inflamasi dan menghidrolisa *oxidizedphospholipid* di dalam *LDL* (Mohler et al. 2008). *LpPLA₂* terlibat dalam perkembangan aterosklerosis. Pada lesi aterosklerosis manusia, ditemukan dua sumber utama *LpPLA₂* yang bisa diidentifikasi, termasuk yang dibawa ke dalam lapisan intim yang terkait dengan *LDL* (dari sirkulasi) dan dari sintesis *de novo* oleh sel-sel inflamasi pada plak (makrofag sel-sel T dan sel-sel mast). Oleh karena itu, saat ini digunakan sebagai marker penyakit jantung (Mohler et al. 2008).

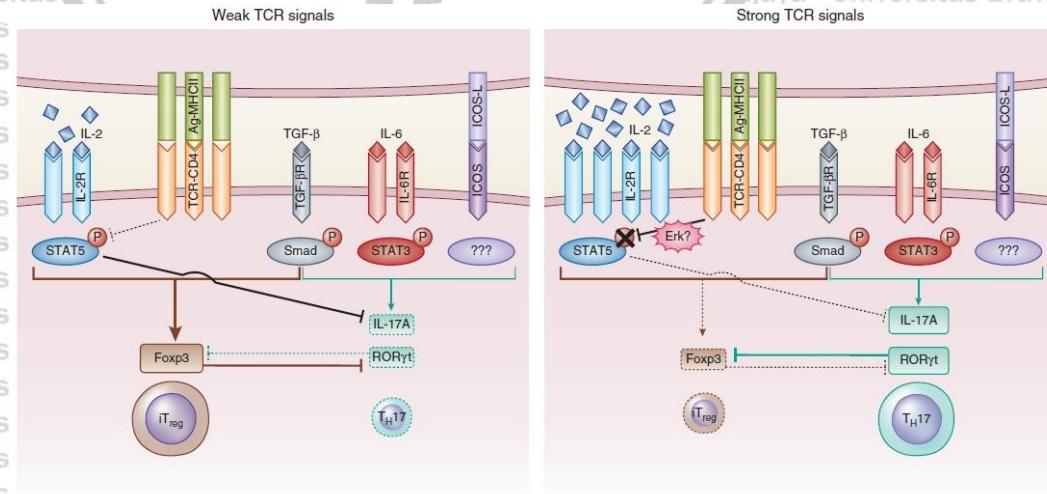
Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa *LP-PLA2* berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis. *LP-PLA2* adalah salah satu dari kelompok enzim yang berperan dalam hidrolisis fosfolipid. *LP-PLA2* dihasilkan oleh sel inflamasi yang terdapat di sirkulasi dan intima pembuluh darah serta diupregulasi pada plak aterosklerosis dan secara kuat diekspresikan oleh makrofag dalam *fibrous cap* pada lesi yang rawan ruptur. Sebagian besar *LP-PLA2* berikatan dengan *LDL* dalam sirkulasi (80%) selain berikatan dengan *HDL*, *Lp(a)* dan lipoprotein lain yang mengandung *Apo B-100*. Peran kunci *LP-PLA2* dalam aterogenesis berada pada proses hidrolisis *Oxidized Low Density Lipoprotein* (*Ox-LDL*), yang dihasilkan *LDL* saat teroksidasi di dinding arteri. Hidrolisis *Ox-LDL* oleh *LP-PLA2* menghasilkan produk samping yang bersifat proinflamasi dan aterogenik, yaitu

lifosfatidilkolin (*LyoPC*) dan *Oxidized Fatty Acid* (*OxFa*). *LyoPC* berperan penting dalam aterogenesis karena dapat menarik monosit, merusak fungsi endotel, menyebabkan kematian sel dengan menganggu membran plasma serta menginduksi apoptosis pada sel otot polos dan makrofag. Kadar *LP-PLA2* yang tinggi pada plak yang rawan ruptur juga dilepaskan menuju sirkulasi darah. Sebagian sel inflamasi yang terdapat di plak aterosklerosis menghasilkan lebih banyak *LP-PLA2* dan akibatnya dapat meningkatkan progresi ateroma. Oleh karena itu *LP-PLA2* merupakan *crossroad* penting antara metabolisme lipid dan respon inflamasi (Weintraub 2008; Epps dan Wilensky 2011). Plak dengan tudung fibroateroma yang tipis atau ruptur menunjukkan peningkatan *LP-PLA2* dibanding lesi yang stabil dan kadarnya lebih tinggi pada inti nekrotik serta di sekitar makrofag. Hal tersebut menandakan adanya keterkaitan antara *LP-PLA2* dan instabilitas plak. Selain itu juga menunjukkan bahwa *LP-PLA2* cenderung berperan sebagai penanda plak yang rawan ruptur serta memberikan informasi penting yang menunjukkan pasien dengan aktifitas penyakit aterosklerosis tingkat tinggi yang ditandai oleh inflamasi vaskular (Weintraub 2008; Epps dan Wilensky 2011).

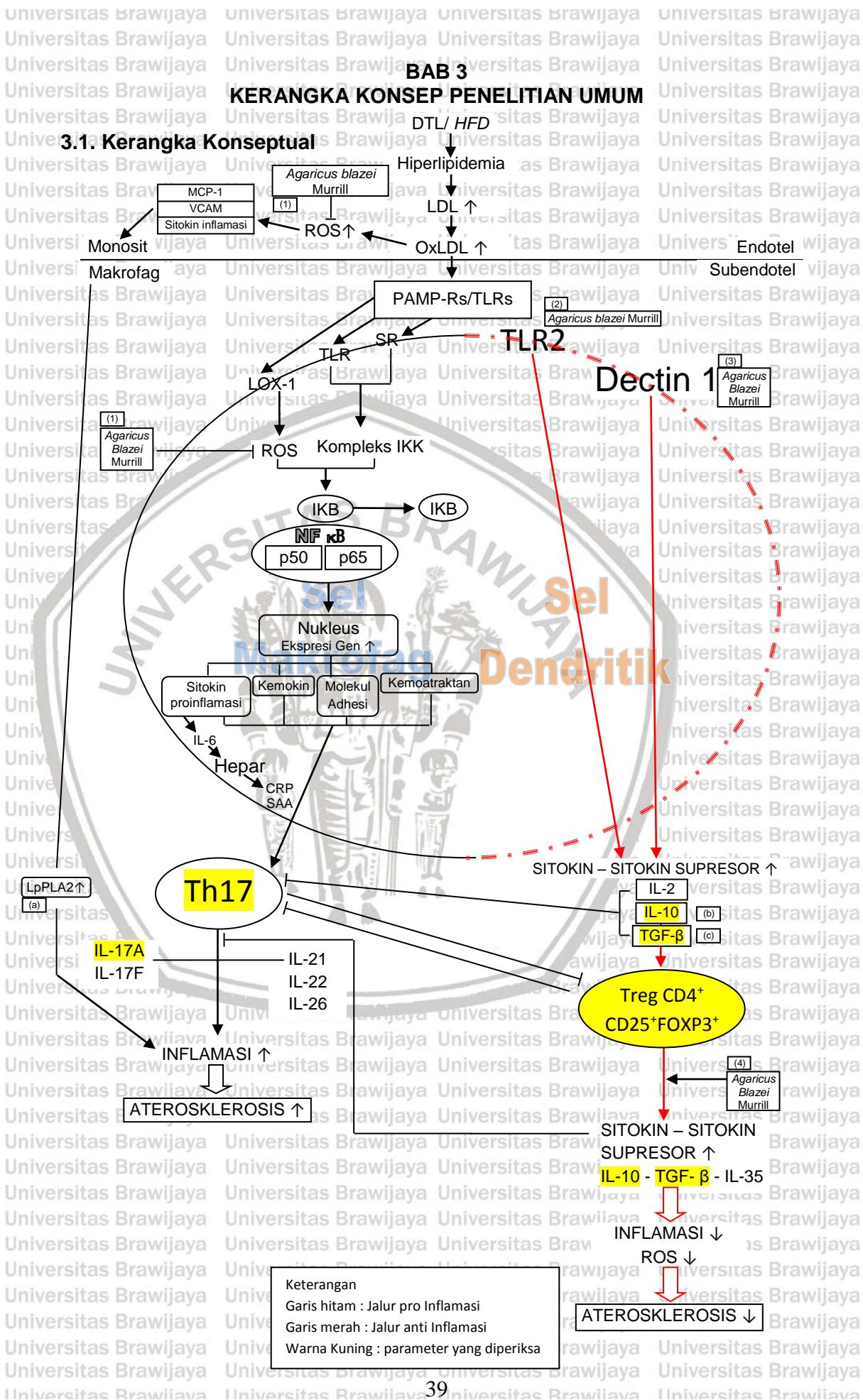
2.12. Peran Penting *Th17* dalam Mempercepat Proses Ateroklerosis

Sel *Th17* adalah sub set *Th CD4⁺* yang menginduksi. Sel – sel ini memainkan peranan penting dalam berbagai penyakit – penyakit inflamasi dan autoimun. Lahirnya sel – sel *Th17* melibatkan *IL-6*, *IL-21*, dan *IL-23*, faktor transkripsi *RORyt* (*retioic acid receptor related orphan receptor-yt*) dan *STAT3* (*signaling transducer and activator of transcription 3*) (Vignali et al. 2008), serta *TGFβ* (Hetland et al. 2011). Jalur *IL-2-STAT5* menunjukkan mampu menghambat diferensiasi *Th17*. Ketika *IL-2* hadir secara eksogen pada kultur yang mengarah pada lahirnya *IL-*

17, maka lahirnya sel – sel yang memproduksi *IL-17* juga akan terganggu, padalah pada waktu yang bersamaan terjadi peningkatan frekuensi sel – sel *FOXP3*. *FOXP3* dan *RORyt* akan selalu saling mempengaruhi (Yamane dan Paul 2012). Selain dipengaruhi oleh induksi pada faktor – faktor transkripsi tertentu, kekuatan signal *TCR* juga merupakan elemen kunci dalam penentuan nasib untuk berkembang menjadi sel – sel T naif ini tidak akan berubah menjadi sel – sel *Th17* dan sebagai gantinya akan mengekspresikan *FOXP3*, walaupun dalam keadaan terpapar dengan adanya sitokin – sitokin penginduksi *Th17* (Iezzi et al. 2009; Turner et al. 2009; Molinero et al. 2011). Signal *TCR* yang kuat secara sementara menghambat aktivasi *STAT5* yang dikontrol *IL-2*, walaupun terdapat produksi *IL-2* yang berlimpah oleh sel – sel T *CD4⁺* yang teraktivasi (Altin et al. 2011). Sehingga dapat disimpulkan bahwa kemungkinan lahirnya sel – sel *Th17* memerlukan signal – signal *TCR* yang kuat untuk menghambat jalur *IL-2* – *STAT5*. Pemahaman terhadap dasar – dasar molekul yang bertumpu pada kontrol jalur *IL-2-STAT5* berperan antara kekuatan signal *TCR* dapat memberikan pengertian yang lebih baik dalam menerangkan keseimbangan nasib subset sel T helper, dimana saling dipengaruhi satu dengan lainnya.



Gambar 2.12. Model penentuan awal nasib menjadi *iTreg* versus menjadi *Th17* yang dikontrol dengan kekuatan signal TCR. Selama fase awal diferensiasi *Th17*, sel – sel T CD4⁺ naif memerlukan kombinasi sitokin *IL-6* dan *TGFβ* serta kostimulasi (termasuk ICOS), juga signal TCR yang kuat untuk menginduksi ekspresi *RORyt* dan sitokin – sitokin *Th17* (gambar kanan), ketika sel – sel T CD4⁺ naif menerima signal TCR yang lemah dibawah kondisi polarisasi yang mengarah kepada *Th17*, diferensiasi menjadi sel – sel *iTreg* yang mengekspresikan *FoxP3* lebih dipilih (gambgar kiri), meskipun signal – signal TCR yang lemah hanya menginduksi sejumlah kecil produksi *IL-2* dan ekspresi *IL-2R*, aktivasi *STAT5* diperantara *IL-2* akan menghambat produksi *IL-17A* dan menginduksi ekspresi *FoxP3*. Hal ini selanjutnya akan mensupresi induksi *RORyt* dan dengan demikian menyebabkan tendensi kearah diferensiasi menjadi *iTreg*. Di sisi lain, meskipun terdapat produksi *IL-2* dan ekspresi *IL-2R* yang berlimpah, inhibisi sementara terhadap aktivasi *STAT5* oleh signal TCR yang kuat menyebabkan kegagalan induksi *FOXP3*, namun menyebabkan ekspresi gen yang mengkode *RORyt* dan sitokin – sitokin *Th17*, sehingga menyebabkan terjadinya diferensiasi menjadi *Th17*, smad, *signal-transductor protein* (*sav*) *downstream of the receptor for TGFβ* (*TGF-βR*) (Yamane 2012).



- Keterangan Citasi
- (1). Dimitrios 2006; Carvajal et al. 2012.
- (2). Forland et al. 2011; Goodridge dan Underhill 2008; Underhill 2007; Dillon et al. 2006; Slack et al. 2007.
- (3). Chan et al. 2007; Firenzuoli et al. 2008; Ikuzawa et al. 1988; Forland et al. 2011; Sartor 2010.
- (4). Karumuthil-Melethil et al. 2008; Wigren 2011; Collison et al. 2007
- (a). Weintraub 2008; Epps and Wilensky 2011.
- (b). Forland et al. 2011.
- (c). Karumuthil-Melethil et al. 2008; George et al. 2012; Lopez-Pastrana et al. 2012.

PENJELASAN KERANGKA KONSEP

Peningkatan lemak dalam diet akan diikuti dengan peningkatan kadar kolesterol dalam darah, yang ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total dan *LDL*. Adanya proses oksidasi yang terjadi di dalam tubuh akan meningkatkan pula jumlah *LDL* yang teroksidasi (*OxLDL*). Seiring dengan meningkatnya kadar *OxLDL* di dalam sirkulasi, akan disertai dengan meningkatnya ekspresi *MCP-1*, *VCAM*, dan sitokin – sitokin pro inflamasi. Hal ini akan menyebabkan proses migrasi monosit dari dalam sirkulasi menuju lapisan subendotelial. Selanjutnya monosit yang bermigrasi tersebut akan berubah menjadi makrofag. *Makrofag foam cell* dan sel – sel inflamasi lainnya (monosit, sel T, dan sel mast) akan menghasilkan *LP-PLA2*. Sel – sel inflamasi menghasilkan *LP-PLA2* sebagai respon terhadap stimulasi oleh *OxLDL*.

Sebagian *LP-PLA2* akan diselesaikan ke dalam sirkulasi untuk berikatan dengan *LDL*.

Di sisi lain, *OxLDL* merupakan *PAMP* (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) yang akan dikenali oleh *PAMP-Rs/TLRs* (*Pathogen Associated Molecular Pattern Receptors/Toll Like receptors*). Ikatan *ligand-receptor* ini akan mengaktifasi jalur *signaling* pro inflamasi, dimana akan terjadi aktivasi *NFKB* yang akan diikuti dengan peningkatan ekspresi gen – gen yang berhubungan dengan sitokin – sitokin pro inflamasi (diantaranya *IL-6*), kemokin – kemokin, molekul – molekul adhesi, dan beberapa macam kemoaktraktan. Hal ini akan menyebabkan rangsangan kepada *Th17*, *Th1*, *Th2*, dan *CTL* (*cytotoxic T lymphocyte*). Peningkatan jumlah *Th17* akan ditandai dengan peningkatan sitokin – sitokin yang berasal dari *Th17* yaitu: *IL-17A*, *IL-17F*, *IL-21*, *IL-22* dan *IL-26*. Jumlah *IL-6* yang meningkat akan memberikan pengaruh pada hepar untuk memproduksi *acute phase reactant* yaitu *CRP* dan *SAA*.

Di sisi lain, sel – sel dendritik sebagai salah satu APC utama pada proses aterosklerosis mempunyai 2 macam reseptor yang berguna untuk menyebabkan perubahan pada sel – sel tersebut, yaitu terjadinya respon imunitas yang tolerogenik (mengaktifasi jalur *signaling* yang bersifat anti inflamasi). Respon sel – sel dendritik yang bersifat tolerogenik akan timbul apabila zat aktif (*si β -glucan* dan *polysaccharide peptide* dari jamur *Agaricus blazei* Murrill) berikatan dengan *TLR2* dan *Dectin-1*. Ikatan antara ligan (β glucan dan *PSP*) dengan reseptor *TLR2* ataupun *Dectin-1* akan menghasilkan peningkatan sekresi sitokin – sitokin supresor yaitu *IL-10*, *TGF- β* , dan juga *IL-2*. Ketiga macam sitokin ini akan mengaktifasi *Treg* *Foxp3*, *CD4 $^+$* , *CD25 $^+$* . Dan begitu juga selanjutnya, peningkatan *Treg* *Foxp3*, *CD4 $^+$* , *CD25 $^+$* akan diikuti oleh sekresi sitokin – sitokin yang bersifat supresor bagi aktivitas sel – sel T efektor. Sitokin – sitokin yang bersifat supresor ini yaitu *IL-10*, *IL-35* dan *TGF- β* akan mampu meredam inflamasi dan menurunkan produksi *ROS*, yang pada akhirnya akan menurunkan proses aterosklerosis.

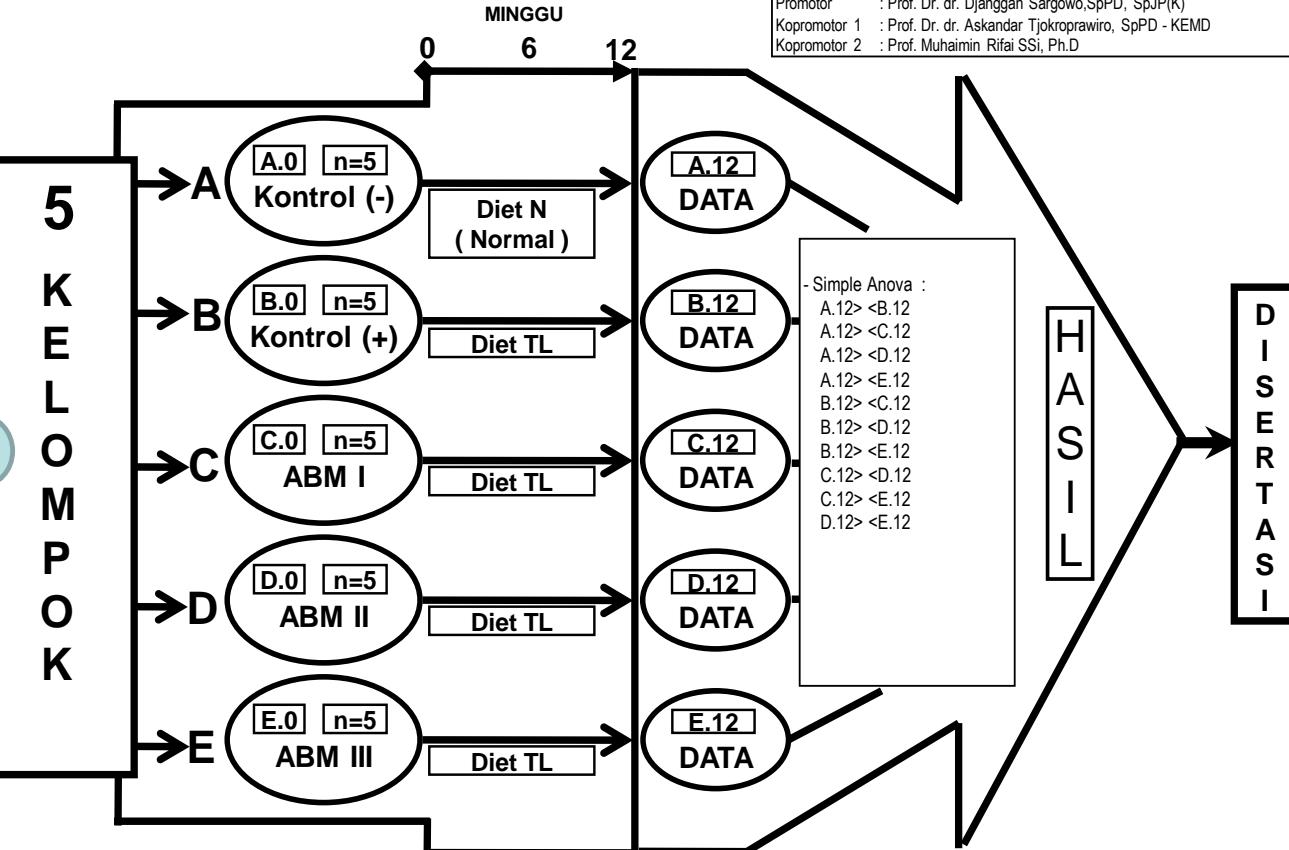
PENAPISAN UMUM	INKLUSI	EKSKLUSI
<ul style="list-style-type: none"> Mencit usia 8 minggu Sehat 	<ul style="list-style-type: none"> Jantan Sehat Tidak cacat badan Bulu tidak rontok Bergerak aktif 	<ul style="list-style-type: none"> Tidak mau makan Sakit Mati Betina

PARAMETER	INFORMASI LAIN
<ul style="list-style-type: none"> Treg TGF-β IL-10 TH17 Lp-PLA₂ 	<ul style="list-style-type: none"> Variabel Bebas : Dosis agaricus blazei murill Variabel Tergantung : Treg, TGF-β, IL-10, TH17, LP-PLA₂ Variabel Kendali : Jenis Kelamin, Umur, Berat Badan, Jenis Makanan, Kesehatan Mencit, dan Suhu Ruang



PROTOKOL DISERTASI

(MODIFIKASI SISTEM ROKET, TJOKROPRAWIRO, 1978)



DAFTAR SINGKATAN
<ul style="list-style-type: none"> BALB/c = Mencit albino yang dikembangbiakkan di laboratorium dimana mempunyai galur – galur tertentu yang digunakan dalam penelitian R = Randomisasi n = Jumlah Mencit A.12 = Mencit kontrol (-) pada akhir (minggu-12) terapi B.12 = Mencit kontrol (+) pada akhir (minggu-12) terapi C.12 = Mencit dengan dosis ABM I pada akhir terapi D.12 = Mencit dengan dosis ABM II pada akhir terapi E.12 = Mencit dengan dosis ABM III pada akhir terapi ABM = Agaricus Blazei Murill ABM I = Mencit yang mendapatkan dosis agaricus blazei murill 50mg/kgBB ABM II = Mencit yang mendapatkan dosis agaricus blazei murill 100mg/kgBB ABM III = Mencit yang mendapatkan dosis agaricus blazei murill 200mg/kgBB Diet N = Diet Normal Diet TL = Diet Tinggi Lemak

3.2. Alur Penelitian

3.3. Hipotesis

Hipotesis Penelitian Tahap I

1. Kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dapat dianalisis secara kuantitatif dengan metode UV-Vis Spectrophotometer.
2. Kandungan β -glucan dalam ekstrak *Agaricus blazei* Murrill lebih tinggi dibandingkan dengan jamur makanan lainnya, yaitu *Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*.

Hipotesis Penelitian Tahap II

1. Ekstrak *Agaricus blazei* Murrill memiliki aktivitas sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan hasil analisis dengan ‘docking’ molekul.
2. β -glucan dan agaritin dapat berperan sebagai agonis *Dectin-1* dan *TLR2* berdasarkan analisis dengan ‘docking’ molekul.

Hipotesis Penelitian Tahap III

1. Diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif *LpPLA₂*, dan *Th17* pada mencit.
2. Diet tinggi lemak dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada mencit.
3. Pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan penurunan jumlah relatif *LpPLA₂*, dan sel – sel *Th17* pada mencit dengan diet tinggi lemak.
4. Pemberian *Agaricus blazei* Murrill dapat menyebabkan peningkatan jumlah relatif sel – sel *Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*, *IL-10*, dan *TGF-β* pada mencit dengan diet tinggi lemak.

BAB 4

4.1. Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba akan dilakukan di laboratorium

Farmakologi FKUB Malang. Untuk analisis bioaktif akan dilakukan di Jurusan

Kimia Politeknik Negeri Malang. Sedangkan penelitian secara *in silico* dilakukan

di Laboratorium BioInformatika Program Pascasarjana Fakultas Biologi
Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian adalah 18 Juli 2018 – 26 Oktober 2018.

ercitas Bra

4.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain eksperimen murni (*true*

experimental laboratory) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan

menggunakan rancangan percobaan *post test only controlled group design* untuk

mengetahui pengaruh pemberian peptida polisakarida (*Polysaccharide peptide*)

PSP) terhadap kadar *Treg*, *TGF- β* , *IL-10*, *Th17*, dan *LP-PLA2*. Penelitian ini

dilakukan dengan cara menguji pengaruh pemberian ekstrak *A. blazei* pada

perubahan parameter – parameter tersebut pada mencit (*Mus musculus*) jantan

yang diberikan diet tinggi lemak selama 12 minggu.

Pada lanjut dilakukan analisis kandungan *Agaricus blazei* Muiri dengan

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Analisis Interaksi Agaricus blazei Murrill dengan Reseptor Target Secara In Silico. Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Analisis secara *in silico* menggunakan metode molecular docking. Pada Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

1. Kontrol negatif
2. Kontrol positif
3. Diet tinggi lemak + *Agaricus blazei* Murrill I (100 mg/kgBB)
4. Diet tinggi lemak + *Agaricus blazei* Murrill II (200mg/kgBB)
5. Diet tinggi lemak + *Agaricus blazei* Murrill III (400 mg/kgBB)

4.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian tahap pertama adalah ekstrak *Agaricus blazei* Murrill yang diproduksi oleh PT. Agaricus Sido Makmur Sentosa (ASIMAS) Lawang - Malang. Untuk sampel pada penelitian tahap II menggunakan mencit (*Mus musculus*) jantan.

4.4. Kriteria Sampel

4.4.1. Kriteria Inklusi

Tahap I: Ekstrak jamur yang diproduksi oleh PT. Agaricus Sido Makmur Sentosa (ASIMAS) Lawang – Malang.

Tahap II: (-)

Tahap III: Mencit (*mus musculus*) jantan dengan kriteria jalur *BALB/c*, umur 7-8 minggu serta memiliki kondisi sehat yang ditandai dengan adanya kaki – kaki yang tidak bengkok/cacat, bulu yang tidak rontok, serta mampu bergerak aktif. Kriteria eksklusi adalah mencit yang tidak mau makan, sakit atau mati.

4.4.2. Kriteria Eksklusi

Tahap I: Jamur yang diproduksi selain dari PT. Agaricus Sido Makmur Sentosa (ASIMAS) Lawang – Malang.

Tahap II: (-)

Tahap III: Mencit yang tidak mau makan, mengalami penurunan keadaan fisik, sakit, dan mati.

4.5. Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan rumus besar sampel eksperimental; yaitu:

$$(P-1)(n-1) \geq 15 \quad (\text{Federer 1955})$$

P= banyak kelompok dengan perlakuan dan n= jumlah pengulangan. Pada penelitian ini jumlah kelompok ada 5 dengan jumlah pengulangan perkelompok sebanyak 5 kali.

4.6. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : dosis *Agaricus blazei* Murrill
- b. Variabel tergantung : *Treg*, *TGF-β*, *IL-10*, *Th17*, dan *LP-PLA2*.
- c. Variabel kendali : jenis kelamin, umur, berat badan, jenis makanan, kesehatan mencit dan suhu ruang.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Penentuan dosis *Agaricus blazei* Murrill

Penentuan dosis *Agaricus blazei* Murrill didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dosis 200 mg/kgBB. Dosis *Agaricus blazei* Murrill yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: dosis rendah 100 mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

4.7.2. Pembuatan Pakan Tikus dan Pemberian Ekstrak *Agaricus blazei* Murrill

Pakan tikus diberikan secara oral, sedangkan ekstrak *Agaricus blazei* Murrill diberikan melalui sonde, pakan standar terdiri dari pakan ayam/PARS (air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phosphor, antibiotika, coccidiostat) 66.6% dan tepung terigu 33.4%. Sedangkan diet tinggi lemak terdiri dari pakan standar (pakan ayam / PARS 66.6% dan tepung terigu 33.4%) dan ditambah kuning

telur bebek 5%, lemak kambing 10%, minyak kelapa 1%, asam kolat 0,03 gram dan minyak babi 1,07 gram (Murwani et al. 2006).

4.7.3. Isolasi Sel Limpa/Spleen

Pada penelitian ini digunakan limpa/spleen sebagai sumber sampel pemeriksaan *Treg*, *Th17*, *TGF-β*, dan *IL-10*. Limpa yang didapat dari mencit yang sudah dibedah selanjutnya disuspensi dengan PBS. Sel – sel limpa/spleen yang didapatkan dari proses isolasi ini kemudian di *filter* dengan menggunakan *wire*. Setelah di filter dilanjutkan dengan proses sentrifugasi sampai dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. Proses ini mehasilkan supernatan dan *pellet*, dimana *pelletnya* disuspensi dengan PBS 1ml, sedangkan supernatannya dibuang.

Untuk mendapatkan *homogenate*, maka hasil suspensi *pellet* tersebut dipipet. *Homogenate* yang ada (±200 µl) selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus baru untuk kemudian ditambahkan 500 ml PBS. Dilakukan sentrifugasi ulang dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 20°C selama 5 menit. Seperti pada proses sebelumnya, supernatan yang baru didapat kembali dibuang, sedangkan *pelletnya* diberikan tambahan antibodi untuk kemudian dilakukan analisis dengan *flowcytometri*.

4.7.4. Penghitungan Jumlah Sel Limpa/Spleen

Penghitungan sel dari organ limpa/spleen dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Suspensi *pellet* (mengandung sel – sel) yang didapat dari hasil isolasi diambil sebanyak 10 µl dan dimasukkan ke dalam *microtube* dan ditambahkan 90 µl ‘Evans Blue’ untuk kemudian dihomogenkan.

Perhitungan sel – sel yang hidup dilakukan dengan menggunakan kamar hitung dan *haemocytometer*. Sel – sel yang hidup akan tampak bening (tidak berwarna), sedangkan sel – sel yang mati akan berwarna biru.

Perhitungan untuk mengetahui jumlah sel hidup, dilakukan pada 4 (empat) kotak sedang. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$\Sigma \text{ Sel Limfosit} = \Sigma \text{ sel hitung} \times 4 \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

4.7.5. Pewarnaan Antibodi

Pada penelitian ini digunakan dua macam pewarna, yaitu pewarna ekstraselular dan pewarna intraselular. Terdapat dua kelompok antibodi, yaitu

kelompok A (ekstraselular) yang berupa: *CD4 CD25* dan kelompok B (intraselular) yang terdiri dari : *CD4 CD25 Foxp3*, *CD4 CD25 IL-10*, *CD4 CD25 TGF-β*, *CD4 IL-17A*, dan *LpPLA2*.

Sebelum dilakukan dua tahap pewarnaan, *pellet* yang sudah didapat terlebih dahulu ditambahkan 50 μl *PBS*, dipipeting, dan diinkubasikan di dalam *ice box* selama 20 menit.

Pewarnaan tahap awal (ekstraselular) dilakukan dengan memberikan penambahan 50 μl antibodi spesifik pada sel – sel (*pellet*). Untuk antibodi kelompok intraseluler, perlakuananya dengan menambah 100 μl *cytofix-cytoperm* lalu dipipeting dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 20 menit. Setelah itu ditambahkan *washsperm* sebanyak 500 μl dan disentrifugasi pada putaran 500 rpm (pada suhu yang sama) selama 5 menit. Proses akhir pada tahap pewarnaan ini ditandai dengan penambahan anibodi spesifik untuk pewarnaan intraselular.

4.7.6. Analisis Flowcytometri

Setelah tahapan pewarnaan antibodi, maka sel ditambahkan dengan 400 μl *PBS* untuk kemudian dimasukkan ke dalam *cuvet flowcytometri* dan dipipeting.

Selanjutnya dilakukan koneksi antara komputer dengan alat *flowcytometri* pada keadaan “*acquiring*” dan *setting Software BD cell Quest Pro™*. Dilakukan *setting plot* pada *acquiring mode*. *Flowcytometri* dijalankan dalam keadaan *Low-Run*.

Setelah *flowcytometri* siap, kemudian cuvet yang sudah disiapkan sebelumnya dipasang pada nozzle BD Biosciences FACT CaliburTM *flowcytometri*.

4.7.7. Analisis Data

Analisis data hasil *flowcytometri* menggunakan 'SPSS versi 17.0 for windows'. Data yang digunakan berupa jumlah relatif (prosentase) sel CD4, CD25, Foxp3, CD4 CD25 IL-10, CD4 CD25 TGF- β , CD4 IL-17A, dan LpPLA2 yang diuji normalitas dan homogenitasnya. Data yang berdistribusi normal, diuji dengan one-way ANOVA dengan nilai $p= 0,5\%$. Jika $p<0,5\%$ maka dapat disimpulkan bahwa antara masing – masing kelompok perlakuan didapatkan perbedaan yang nyata.



BAB 5

PENELITIAN TAHAP I

Studi Perbandingan Kandungan β -glucan dalam *Agaricus blazei* Murrill,

Ganoderma sp. dan *Pleurotus ostreatus*

5.1. Latar Belakang

Agaricus blazei Murrill saat ini telah banyak direkomendasikan sebagai suplemen makanan terbaru di beberapa negara seperti Jepang, Korea, Cina dan Taiwan. Jamur ini memiliki efek terapi medis (*medicinal mushroom*), dan secara historis telah digunakan sebagai bahan terapi tradisional (Chang 1999). Di negara timur para penduduk menggunakan fraksi terlarut air panas dari *Agaricus blazei* Murrill sebagai obat. Penggunaan *Agaricus blazei* Murrill ternyata telah ditulis dalam sejarah kedokteran Romawi di sekitar area mediteran (laut tengah) dari abad ke empat hingga abad ke lima belas oleh Orivasios dan Apuleius untuk mengobati ulkus malignan di daerah laring (Ramoutsaki et al. 2002; Firenzuoli et al. 2008).

Secara umum, kandungan *Agaricus blazei* Murrill dikelompokkan dalam polisakarida dan non-polisakarida, termasuk air (90%), protein (2-40%), fat (2-8%), karbohidrat (1-55%), serat (3-32%) dan abu (8-10%) (Liu et al.

2008; Atlas World USA Inc, 2010). Berdasarkan Atlas World USA Inc (2010), polisakarida yang terkandung dalam *Agaricus blazei* Murrill antara lain adalah α -glucans; β -1,3-glucans; β -1,6-glucans; β -1,3/1,6-glucans; β -galactoglucans; chitin; proteoglycans; protein-bound polysaccharides, dan xyloglucans.

Kandungan metabolit aktif dapat diisolasi dari tubuh buah dan mycelium. β -glucan adalah komponen utama yang terkandung dalam *Agaricus blazei* Murrill (Firenzuoli et al. 2008) dan berkembang menjadi rantai β -1,6 dan β -1,3 sebagai rantai samping (rasio 1:2). Akan tetapi, ada beberapa komponen

aktif lainnya yang terkandung dalam jamur ini seperti α -(1->4)-glucan, proteoglucan, lactin, ergosterol (provitamin D₂) (Forland 2011), agaritine (Endo et al. 2010), glucommannan, monnogalactoglucan, riboglucan (Kim et al. 2005; Biedron et al. 2012), isoflavone (Oh et al. 2010), dan senyawa antioksidan (Izawa dan Inoue 2004; Forland 2011). β -glucan diklasifikasikan dalam polisakarida alami yang terdapat dalam ragi, jamur, dan gandum (Rahar et al. 2011; McCleary dan Draga 2016). β -glucan sangat banyak ditemukan dalam dinding sel (Stone 2009). Ada beberapa macam struktur rantai β -glucan yang dipengaruhi oleh licheninase dan β -glucanase (Novak dan Vetvicka 2008; Rop et al. 2009). β -glucan juga diketahui sebagai anti-obesitas sehingga dapat menyeimbangkan pola makan (Rai et al. 2005). Bioaktivitas β -glucan dalam kasus kardiovaskular tidak terlalu banyak diteliti, dibandingkan dengan kasus onkologi (Roupas et al. 2012). Akan tetapi, beberapa penelitian menunjukkan bahwa campuran polisakarida khususnya β -glucan dan protein yang mengikatnya dapat mencegah penyakit kardiovaskular. Indikasi β -glucan sebagai jamur yang berpotensi mencegah penyakit jantung diduga melalui beberapa mekanisme (Li et al. 2004; Chen dan Raymond 2008). Ada beberapa jamur yang dapat dikonsumsi selain *Agaricus blazei* Murrill yang telah diketahui memiliki kandungan β -glucan seperti *Ganoderma* sp. dan *Pleurotus ostreatus* (Rai et al. 2005). Berdasarkan latar belakang tersebut maka diperlukan eksplorasi lebih lanjut untuk membandingkan jumlah β -glucan pada *Agaricus blazei* Murrill dengan jamur lainnya *Ganoderma* sp. dan *Pleurotus ostreatus*.

5.2. Metode Penelitian

5.2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2017 di jurusan Kimia Politeknik Negeri Malang.

5.2.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah ekstrak jamur *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma* sp. dan *Pleurotus ostreatus*. *Agaricus blazei* Murrill diperoleh dari Lawang, Malang, *Ganoderma* sp. diperoleh dari LIPI, Cibinong, Bogor dan *Pleurotus ostreatus* diperoleh dari pasar tradisional Malang. Semua sampel segar dikeringkan dalam oven.

5.2.3. Variabel Penelitian

Variable bebas dalam penelitian ini adalah jamur *Agaricus blazei* Murrill, sedangkan variable terikatnya adalah hasil analisa kuantitatif berupa kadar absorbansi β -glucan yang terdapat dalam *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma* sp. dan *Pleurotus ostreatus*.

5.2.4. Instrumen Penelitian

Instrumen dalam penelitian ini adalah UV-Vis Spectrophotometer (Genesys 10, Thermo Scientific™).

5.2.5. Tahapan Penelitian

Tahap I :Studi Perbandingan Kandungan β -glucan dalam *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma* sp. dan *Pleurotus ostreatus*

Tahap II :uji in vivo efek *Agaricus blazei* Murrill dalam pencegahan aterosklerosis melalui peningkatan *Treg* dan penurunan *LpPLA₂* pada mencit yang diberikan diet tinggi lemak.

Tahap III : analisis in silico β -glucan dan agaritin pada reseptor *Dectin-1* dan *TLR2* yang terdapat pada sel – sel dendritik.

5.2.6. Kurva standar β -glucan

Kurva standar β -glucan dibuat dari pengukuran larutan standar β -glucan.

Pada penelitian ini, β -D-glucan didapat dari barley (SIGMA-ALDRICH® Cas Numb. 9041229). Larutan stok β -glucan dibuat dari 1000 ppm standar β -glucan yang dilarutkan dalam 0,1 M NaOH. Larutan stok dilarutkan dalam 0,1 M NaOH untuk membuat konsentrasi larutan standar menjadi 50-500 ppm (Tabel 5.1.).

Kadar absorbansi β -glucan dalam larutan standar dihitung menggunakan UV-Vis Spectrophotometer (Genesys 10, Thermo Scientific™) dengan panjang gelombang 220 nm.

5.2.7. Persiapan Ekstrak

Sampel kering jamur sebanyak 4,033 gram dimaserasi dalam 100 mL etanol selama 24 jam. Setelah 24 jam maserasi, homogenate disaring kertas filter Whatman. Filtrat yang didapat kemudian disaring lagi menggunakan filter miliopore 0,2 micron. 1 mL filtrate diencerkan 500x sebelum diukur menggunakan UV-Vis Spectrophotometer. Ekstrak *Agaricus blazei* Murrill disiapkan sebanyak 0,373 gram lalu dilarutkan dalam 100 mL etanol. 1 mL larutan diencerkan 50x sebelum diukur (Shokri et al. 2008).

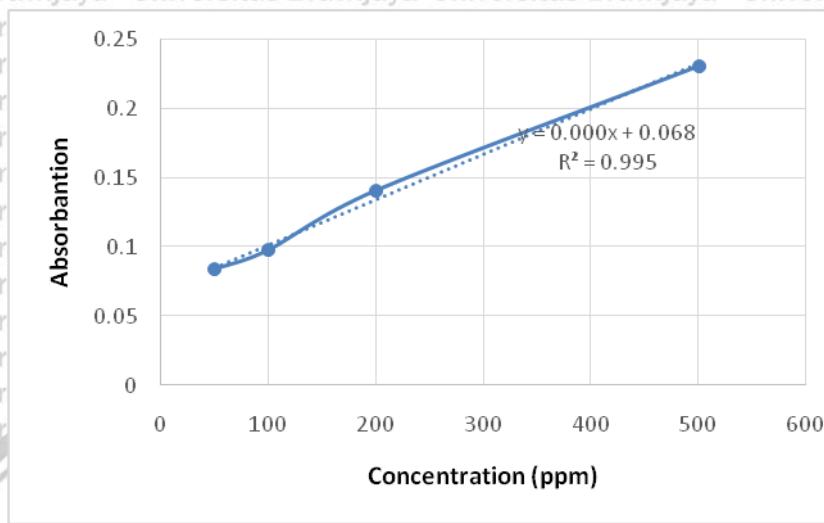
5.2.8. Pengukuran UV-Vis Spectrophotometer

Semua sampel ekstrak dibaca menggunakan UV-Vis Spectrophotometer (Genesys 10, Thermo Scientific™) dengan panjang gelombang 220 nm.

5.3. Hasil dan Analisis

5.3.1. Kurva standar β -glucan

Kurva standar pada gambar 1 yang dibuat dengan menggunakan kadar absorbansi yang proporsional dengan kenaikan konsentrasi (Tabel 5.1.). Rumus korelasi yang didapatkan dari kurva tersebut dibuat dengan menggunakan metode regresi linear (Rumus 1) (Cuadros-Rodríguez et al. 2007). Koefisien



Gambar 5.1. Kurva standar yang dibuat dengan kadar absorbansi sesuai dengan peningkatan konsentrasi (50-500 ppm) pada panjang gelombang 220 nm untuk menghitung kandungan β -glucan pada beberapa jamur.

Korelasi linear dalam kurva standar digunakan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa yang dapat dijelaskan melalui perubahan absorbansi. Kurva standar digunakan untuk menghitung secara kuantitatif kandungan β -glucan dalam setiap sampel dan menentukan rumus standar (rumus 2). Koefisien korelasi (R^2) yang dibuat menunjukkan linearitas yang baik dengan nilai $R^2 = 0,9954$ (Gambar 1).

Tabel 5.1. Peningkatan konsentrasi yang sesuai dengan kadar absorbansi pada korelasi linear

Concentration (ppm)	50	100	200	500
Absorbance	0,084	0,098	0,141	0,231

5.3.2. Kandungan β -glucan pada beberapa jamur yang dapat dikonsumsi

(Edible Mushroom)

Kandungan β -glucan pada setiap sampel jamur yang dapat dikonsumsi dapat dihitung setelah konsentrasi diketahui. Nilai absorbansi pada setiap sampel ekstrak jamur dan nilai pengenceran digunakan untuk mendapatkan konsentrasi (ppm) dengan memasukkan nilai tersebut pada rumus 2, dimana nilai y menunjukkan absorbansi dan x menunjukkan nilai pengenceran. Hasil perhitungan ditunjukkan pada tabel 5.2. Nilai konsentrasi (ppm) dimasukkan dalam Rumus 3 untuk menghitung massa β -glucan yang terkandung dalam sampel. Volume pelarut yang digunakan sebesar 100 mL.

$$\text{Massa (mg)} = \text{ppm} \times \text{volume} \dots\dots\dots(3)$$

Massa β -glucan yang terkandung dalam sampel dan total massa pada sampel dimasukkan dalam rumus 4 untuk menghitung kandungan β -glucan (dalam persen).

$$\% \text{ kandungan} = \frac{\text{massa senyawa}}{\text{total massa sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

Berdasarkan pada perhitungan diatas (Tabel 5.2.a) dapat diketahui bahwa *Agaricus blazei* Murrill memiliki kandungan β -glucan tertinggi yaitu sebesar 6,99%. Hal ini menunjukkan bahwa dalam 100 gram *Agaricus blazei* Murrill kering terdapat 6,99 gram β -glucan. *Ganoderma* sp. dan *P. ostreatus* juga terkandung β -glucan tetapi jumlahnya tidak sebanyak pada *Agaricus blazei* Murrill berturut – turut yaitu 1,78% dan 1,81%.



Tabel 5.2. Hasil perhitungan kandungan β -glucan pada beberapa jamur.

Sample	Total Mass of sample (mg)	Dilution Number	Absorbance	Concentration (ppm)	Content (%)
<i>Agaricus blazei</i> Murrill.	0,327	50	0,206	218666,67	6,99
<i>Ganoderma</i> sp.	1,005	50	0,176	17866,67	1,78
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,002	200	0,096	18133,33	1,81

5.4. Pembahasan

Menurut McCleary dan Draga (2016), ada variasi β -glucan berdasarkan dengan struktur rantai dan protein di dalamnya. Adanya indikasi bahwa kandungan β -glucan pada *Agaricus blazei* Murrill yang tinggi dibandingkan dengan jamur lain tetapi tidak berarti bahwa jamur lain tersebut tidak mengandung glucan. Pada penelitian ini, larutan β -D-glucan standar hanya digunakan sebagai marker yang selanjutnya hanya struktur β -sheet pada glucan yang terdeteksi dan dihitung.

Penelitian ini juga membuktikan bahwa sitokin *IL-17* secara signifikan menurun setelah dilakukan pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada dosis 100 mg/kg BB pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. *Agaricus blazei* Murrill memiliki banyak kandungan bioaktif berupa polisakarida dan non polisakarida. β -glucan pada *Agaricus blazei* Murrill merupakan polisakarida yang secara alamiah terdapat pada ragi, bakteri, alga dan fungi. β -glucan juga dikenal memiliki efek anti-bakteri, anti-viral, dan imunomodulator dalam mencegah dan

mengobati berbagai penyakit (Hozova et al. 2004). Pada penelitian ini juga ditemukan fakta bahwa kadar sitokin pro inflamasi *IL-17* yang diproduksi sel T *CD4* pada dosis 200 mg/kg BB (D2) dan 400 mg/kg BB (D3) tidak secara signifikan mengalami penurunan jika dibandingkan dengan mencit dengan diet tinggi lemak tanpa perlakuan apapun. Pada kelompok mencit yang mendapatkan perlakuan D2 dan D3 juga ditemukan jumlah relatif *CD8⁺/IL-17⁺* yang lebih tinggi dibandingkan dengan D1. Tanriverdi et al. (2005) menjelaskan, bahwa pada konsentrasi tertentu β -glucan dapat memicu reaksi pro inflamasi dan pembentukan granuloma.

β -glucan merupakan polisakarida yang paling banyak ditemukan pada beberapa jamur. Berdasarkan ikatan glicosidic, β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan merupakan yang paling sering diteliti berdasarkan efektifitasnya dalam berperan sebagai imunomodulator (Wacker 2002; Rop et al. 2009). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa struktur triple helix pada β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan berhubungan dengan aktivitasnya dalam memodulasi sistem imun. Struktur triple helix memainkan peranan penting dalam memicu efek anti-tumor (Zhang et al. 2005; Soltanian et al. 2009). β -glucan juga terlibat dalam mengatur sistem metabolisme yang berhubungan dengan lemak dan gula. Hal ini mengindikasikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill memiliki potensi tinggi dalam mengatur sistem imun dan proses metabolism (Rop et al. 2009).

Menurut Li et al. (2004), campuran polisakarida dan ikatan protein dalam *Agaricus blazei* Murrill berpotensi dalam melawan penyakit kardiovaskular. Beberapa penelitian telah membuktikan potensi dari jamur *Agaricus blazei* dalam mencegah proses aterogenesis melalui tiga pathway yaitu melalui perbaikan dyslipidemia (Ellegard dan Anderson 2007; Nilsson et al. 2007), perbaikan kerusakan endotel yang berhubungan dengan dyslipidemia (Roupas et al. 2012), dan aktivitas antioksidan dari senyawa aktif seperti β -glucan, phenolic,

dan *flavonoid* pada *Agaricus blazei* Murrill (Dimitros 2006; Carvajal et al. 2012). Aktivitas antioksidan pada flavonoid *Agaricus blazei* Murrill akan mencegah oksidasi dari *LDL* yang juga secara otomatis mencegah aktivasi dan recruitment imunitas adaptif (Entin-Meer et al. 2009). Bioaktivitas β -glucan sebagai agen ateroprotektif melalui jalur anti infliasi mengindikasikan kemampuannya dalam berikatan dengan reseptor *Dectin-1* dan *TLR2*, khususnya β -(1→3)-(1→6)-glucan. Menurut Tontowiputro et al. (2017), β -(1→3)-(1→6)-glucan berikatan dengan *TLR2*, dengan nilai afinitas Kcal/mol Afinitas tersebut lebih kuat daripada ikatan *FIP* terhadap *TLR2*. Struktur β -glucan ini sangat potensial untuk mengaktifasi *TLR2* dan *Dectin-1*. *Toll Like receptor* (*TLR*) tipe 2 dapat menginduksi peningkatan sitokin supresor secara signifikan dan menaikkan fungsi *Treg* (Zanin-Zhorov et al. 2006). Kolaborasi *TLR2* dan *Dectin-1* dapat menyeimbangkan respon imun pro dan ati inflamasi (Goodridge dan Underhill 2008).

Penelitian oleh Chen et al. (2013) membuktikan bahwa 1,3- β -glucan berefek pada keseimbangan sitokin *Th1/Th2* dengan meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi secara *in vitro*. Pemberian 1,3- β -glucan secara *in vitro* dapat menurunkan sekresi sitokin *Th1* dan meningkatkan sekresi sitokin *Th2*. Lebih jauh, 1,3- β -glucan dapat meningkatkan sekresi *IL-10* dan *TGF-β*. Berdasarkan hasil tersebut, 1,3- β -glucan secara *in vitro* meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi yang memungkinkan terjadi penurunan level sitokin *Th1* dan peningkatan sitokin *Th2* pada co-kultur makrofag mencit dan limfosit secara *invitro* (Chen et al., 2013).

Penelitian ini mengindikasikan potensi *Agaricus blazei* Murrill pada penyakit kardiovaskular, khususnya pada atherosklerosis, berdasarkan kandungan β -glucan yang tinggi pada jamur tersebut.

5.5. Kesimpulan

Analisis UV-Vis Spectrophotometry pada beberapa jamur yang bisa dimakan menunjukkan bahwa *Agaricus blazei* Murrill berpotensi sebagai sumber β -glucan yang tinggi dibandingkan dengan jamur yang lain! Hasil tersebut membuktikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill sangat berpotensi sebagai alternatif jamur obat.



6.1. Latar Belakang

Ekspresi *in silico* pertama kali digunakan di publik pada tahun 1989 saat digelarnya kursus “*cellular automata: Theory and Applications*” yang diadakan di Los Alamos, New Mexico. Pada saat itu, Pedro Miramontes menggunakan istilah ‘*in silico*’ untuk eksprimen – eksperimen yang secara keseluruhan dilakukan di computer (Miramontes 1992).

Di dalam dunia medis, studi *in silico* mempunyai manfaat yang sangat banyak, diantaranya mempercepat penemuan – penemuan baru dan mampu mereduksi kebutuhan akan pelaksanaan penelitian dan sekaligus menekan biaya yang dibutuhkan untuk terlaksananya penelitian – penelitian baik di lingkup laboratorium maupun di lingkup penelitian klinis, satu hal yang Nampak yaitu dengan deteksi untuk penapisan dan produksi kandidat obat baru (Rohrig et al. 2010, Ludwig Institute for Cancer Research 2010).

Peran *Agaricus blazei* Murrill dalam meningkatkan *Treg* diketahui dari penelitian yang mengujicobakan pemberian *Agaricus blazei* Murrill dalam pengobatan colitis pada model tikus coba. Pada model tikus ini, penyerapan β -1,3 glucan dalam usus dikenali oleh sel – sel lipatan mikro (*microfold cell*) dan oleh DC (Chan et al. 2007; Firenzuoli et al. 2008). β -glucan selanjutnya ditransportasikan DC kepada limfosit pada *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT) dan juga mengalami perjalanan di dalam sirkulasi (Ikuzawa et al. 1988; Forland et al. 2011). Mekanisme di atas tampaknya serupa dengan yang terjadi pada manusia akan mengabsorbsi fragmen – fragmen kecil bioaktif β -glucan.

yang bersifat imuno modulator di dalam intestinal untuk selanjutnya ditransportasikan ke dalam sistem limfoid dan peredaran darah (Sartor 2010). Komponen utama di dalam *Agaricus blazei* Murrill yang mempunyai efek imuno modulasi adalah β -glucan dengan reseptornya yang bernama *Dectin-1* (*dendritic cell associated c type lectin-1*). Selain *Dectin-1* terdapat reseptor lain yaitu: *lactosyleramide* dan *CR3*. *Dectin-1* merupakan PRR primer untuk glucan jamur dan secara alamiah merupakan reseptor spesifik milik sel – sel dendritik (DC). Reseptor ini juga terdapat pada tipe sel – sel lainnya, termasuk makrofag, monosit, sel – sel PMN (poly morpho nuclear granulocyte) dan subset sel – sel T (Brown et al. 2002; Taylor et al. 2002; Forland et al. 2011). *Dectin-1* dijumpai secara berlimpah pada tempat masuknya patogen (interstitial dan pulmo) (Reid et al. 2004).

Ekspresi *dectin-1* secara bermakna ditingkatkan oleh sitokin – sitokin yang berkaitan dengan *Th2*, khususnya *IL-4* dan *IL-13*, dimana *IL-10* dan *LPS* akan berperan dalam proses ‘down regulasi’ ekspresi *dectin-1* (Willment et al. 2003; Forland et al. 2011). *Dectin-1* secara spesifik dapat mengenali β -(1,3)-glucan dan β -(1,6)-glucan baik dalam bentuk terlarut maupun partikel (Brown 2006), seperti zymosan (ekstraks dinding sel ragi yang terdiri dari β -glucan, mannan, chitin, protein, dan lipid) (Forland 2011). TLR dan reseptor imunitas alamiah lainnya secara luas terekspresi pada APC. Sitokin – sitokin yang diproduksi oleh karena ligasi reseptor imunitas natural akan menjembatani sistem imunitas natural dan adaptif. Respon imun natural dimediasi melalui sejumlah pattern recognition receptor (PRR), seperti TLR dan C-type lectin yang dimodulasi secara primer oleh agen – agen mikroba. Adanya interaksi dengan ligan – ligan yang sesuai, reseptor – reseptor pada APC dan sel – sel imunitas natural lainnya selanjutnya akan mengaktifasi jalur signaling yang menyebabkan

produksi serangkaian sitokin – sitokin pro inflamasi dan / atau upregulasi ligan kostimulator seperti *CD80* dan *CD86* (Roy dan Mocarski 2007). *TLR2* mengenali lipoproteiny / lipopeptida (*LP*) dan peptidoglycan mikroorganisme. Reseptornya memiliki keunikan karena kemampuannya untuk membentuk heteromer dengan *TLR1* atau *TLR6* untuk memediasi signaling intra selular dan signal *LP* bakteri melalui *TLR2* yang tergantung dengan *TLR1* dan *TLR6* (Karumuthil-Melethil et al. 2008, Omueti et al. 2005). Signal yang tergantung maupun tidak tergantung *TLR1* dan *TLR6* menyebabkan pola identik aktivasi gen, yang mengindikasikan bahwa heteromerisasi *TLR2* dengan *TLR1* atau *TLR6* merupakan proses perkembangan yang evolusioner untuk mengekspresikan spektrum ligan sehingga sistem imunitas natural mampu mengenali struktur – struktur yang berbeda dari berbagai *LP* yang terdapat pada berbagai patogen (Farhat et al. 2008). Lebih jauh lagi disebutkan bahwasanya agonis *TLR2* menunjukkan potensi untuk menginduksi sejumlah sitokin supresor secara signifikan, serta peningkatan fungsi *TregCD4⁺ CD25⁺* (Zanin-Zhorov et al. 2006).

Dectin-1, suatu ‘C-type lectin’ memainkan peranan yang penting dalam mengenali jamur melalui komponen β -glucannya. *Dectin-1* diketahui berkolaborasi dengan *TLR2* dalam menginduksi keseimbangan respon imunitas antara yang pro dengan yang anti inflamasi oleh APC (Goodridge dan Underhill 2008, Underhill 2007). Signaling pada *Dectin-1* secara signifikan berkontribusi pada ekspansi dan fungsi sel – sel *Treg*. Beberapa studi yang menggunakan *zymosan* (komponen dinding sel jamur) telah menunjukkan hasil adanya interaksi secara simultan dengan *TLR2* dan *dectin-1* untuk menginduksi sejumlah besar sitokin – sitokin supresor (Dillon et al. 2006, Slack et al. 2007).

Pada penelitian lain yang menggunakan *zymosan* pada tikus *NOD* (*Non Obese Diabetic* – tikus yang digunakan sebagai model diabetes tipe 1)

didapatkan hasil sebagai berikut : peningkatan produksi *IL-10* dan *TGF- β 1* disertai dengan penurunan produksi *IFNy* pada sel – sel T. Hal ini mengindikasikan bahwa fungsi sel T pada tikus yang diberikan *zymosan* mengalami modulasi; kemungkinan melalui *IL-2*, *IL-10*, dan *TGF- β 1* yang disekresikan oleh APC melalui signaling pada *TLR2* dan *dectin-1*. Selain itu, didapatkan hasil pada tikus yang diterapi dengan *zymosan*, menunjukkan peningkatan fungsi supresi *Treg CD4⁺ CD25⁺* secara bermakna, walaupun jumlah sel – sel *Treg* tidak meningkat secara signifikan. Dari sini, peneliti menyimpulkan adanya peningkatan fungsi dari *nTreg* yang diperantarai respon imunitas alamiah melalui *TLR2* dan *dectin-1* (Karumuthil-Meleshil et al. 2008).

Data lain penelitian di atas menunjukkan adanya peningkatan produksi *TGF- β 1* dan *IL-10* pada sel – sel T *CD4⁺ CD25⁺* yang diberi perlakuan dengan *zymosan*, sementara itu, sel – sel T *CD4⁺ CD25⁻* pada kelompok perlakuan *zymosan* juga menunjukkan peningkatan *IL-10*, namun tidak disertai peningkatan *TGF- β 1*. Sejalan dengan beberapa penelitian yang lain, *IL-10* dan *TGF- β 1* dapat menjadi mediator utama peningkatan fungsi supresi sel – sel T *CD4⁺ CD25⁺* (Karumuthil-Meleshil et al. 2008).

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, untuk mengeksplorasi lebih

jauh aktivitas *Agaricus blazei* Murrill, diperlukan pendekatan biomedik sehingga setelah melakukan penelitian tahap II yang dilakukan secara *in vivo*, akan didapatkan kajian mengenai interaksi *Agaricus blazei* Murrill dengan target reseptor yang terletak pada sel – sel dendritik. Beberapa bioaktif yang terdapat di dalam *Agaricus blazei* Murrill akan diujicobakan dalam penelitian *in silico* ini. Bioaktif yang terkandung di dalam *Agaricus blazei* Murrill akan dinilai apakah mempunyai tempat ikatan (*binding site*) yang sama serta apakah afinitas ikatannya (*binding affinity*) mempunyai energi yang sama atau lebih rendah dengan ligan agonis alamiah untuk reseptor *Dectin-1* dan *TLR2*.

bioaktif yang terkandung di dalam *Agaricus blazei* Murrill akan dinilai apakah mempunyai tempat ikatan (*binding site*) yang sama serta apakah afinitas ikatannya (*binding affinity*) mempunyai energi yang sama atau lebih rendah dengan ligan agonis alamiah untuk reseptor *Dectin-1* dan *TLR2*.

6.2. Metode Penelitian

6.2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Analisis *in silico* dilakukan pada bulan Mei 2016 bertempat di Laboratorium

Bioinformatika Program Pasca Sarjana Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya

Malang.

6.2.2. Prosedur Pemeriksaan

6.2.2.1. Preparasi Struktur Ligand

Struktur ligand: agaritin, B-Glucan, dan small molekul lainnya di gambar

dan konversi menjadi simplified molecular-input line-entry system (SMILES)

menggunakan software PubChem editor (Cheng et al. 2014). Struktur SMILES

kemudian di konversi menjadi strukutr 3D dalam format Portable Document

Format (PDF) menggunakan software Discovery Studio (Dassault Systèmes)

BIOVIA 2015).

6.2.2.2. Preparasi Struktur Reseptor

Struktur reseptor human dectin dimodelkan dengan menggunakan swiss

model berdasarkan template mouse dectin (PDB code 2bpd) (Biasiniet al. 2014

). Sedangkan struktur komplek TLR2-TLR1 diambil dari protein data bank dengan

kode akses 2Z7X (Berman et al. 2000, Jinet al. 2007).

6.2.2.3. Docking

Interaksi antara protein dengan small molekul (*ligand*) dilakukan

menggunakan Autodoc Vina yang terintegrasi dalam software pyrx (Dallakyan

danOlson 2015, Trott danOlson 2010). Docking dilakukan berdasarkan dengan

memberlakukan reseptor sebagai molekul yang rigid sedangkan ligand diset

sebagai molekul yang flexible dan di grade pada daerah aktif site. Hasil docking

dan interaksi ikatan antara ligand dan reseptor di analisis dengan menggunakan

software Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA 2015).

6.2.3. Pengolahan dan Analisis Data

Data dari hasil analisis *in silico* berupa posisi dan kekuatan energy muatan ekstrak *Agaricus blazei* Murrill dengan reseptor *Dectin-1* dan *TLR2*.

6.3. Hasil dan Analisis

Analisis docking telah dilakukan untuk mengetahui afinitas ikatan antara kompleks molekul *TLR2/1* (reseptor) dan 4 ligan ($1,3\beta$ -glucan; $1,3/1,6\beta$ -glucan; Agaritin, β -glucan, control positif). Ikatan hydrogen, posisi ikatan dan jarak diantara reseptor dan ligan juga ditentukan untuk menganalisis potensi ligan terhadap aktivitas reseptor. Afinitas ikatan digunakan sebagai parameter untuk

menentukan kemampuan setiap ligan dalam mengikat reseptor. Hasil menunjukkan bahwa $1,3/1,6\beta$ -glucan memiliki afinitas ikatan tertinggi dibandingkan dengan empat senyawa lainnya (Tabel 6.1.). Sedangkan afinitas

ikatan dari $1,3\beta$ -glucan, agaritin, β -glucan, dan control positif dengan *TLR2/1* adalah berturut – turut yaitu -7,6, -7,7, -7,5 dan -7,7 (Gambar 6.1.). Agaritin

mempunyai potensi mengaktivasi *TLR2* karena posisi pengikatan dan afinitas ikatannya (-7.7 Kcal/mol) sama dengan senyawa yang telah terbukti mengaktivasi *TLR2*. Jika β -glucan dapat mengativasi *TLR2*, maka $1,3\beta$ -glucan

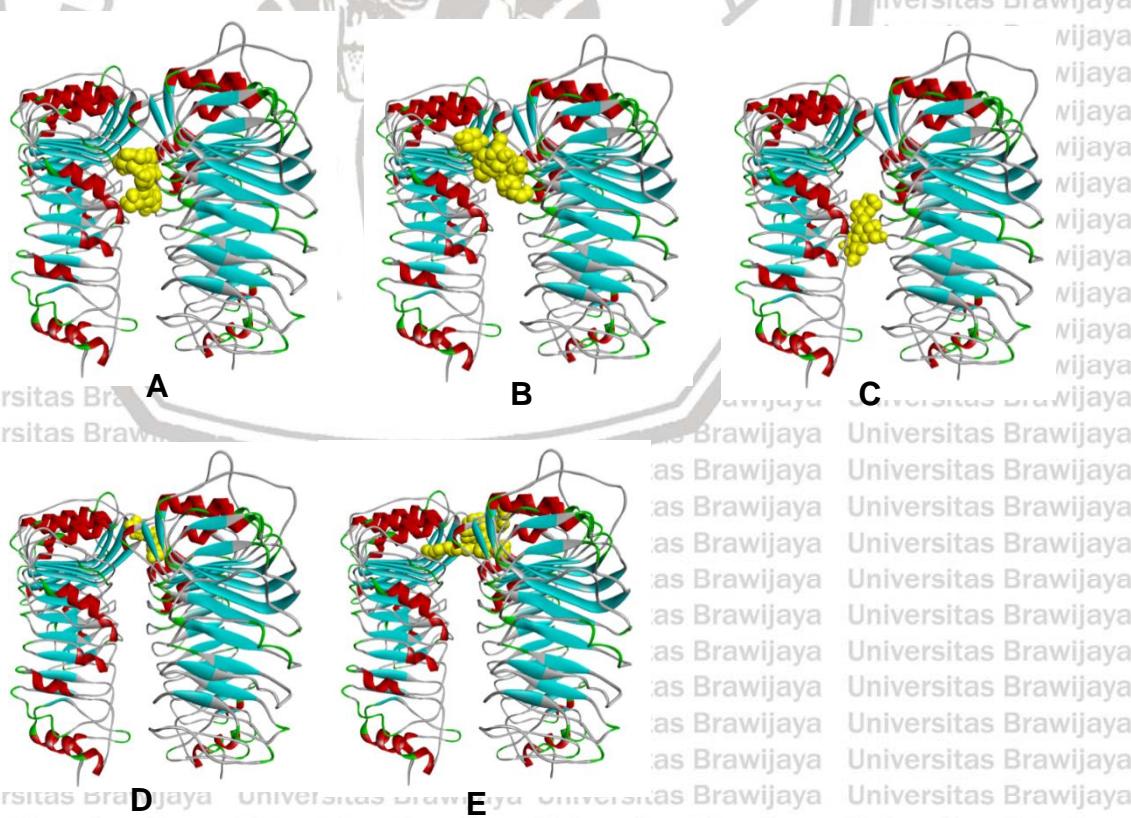
dan $1,3/1,6\beta$ -glucan maka sangat dimungkinkan juga mampu mengativasi *TLR2*, karena posisi pengikatannya sama dan bahkan memiliki afinitas ikatan yang lebih baik.

Posisi ikatan antara $1,3/1,6\beta$ -glucan dengan *Human Dectin-1* memiliki kesamaan dengan kompleks β -glucan dan *mouse Dectin-1* (data experimental). Data ini menunjukkan bahwa $1,3/1,6\beta$ -glucan memiliki potensi untuk mengaktifasi *Human Dectin-1*. Analisis lebih jauh mengindikasikan bahwa kompleks diantara $1,3/1,6\beta$ -glucan dengan *Human Dectin-1* memiliki afinitas

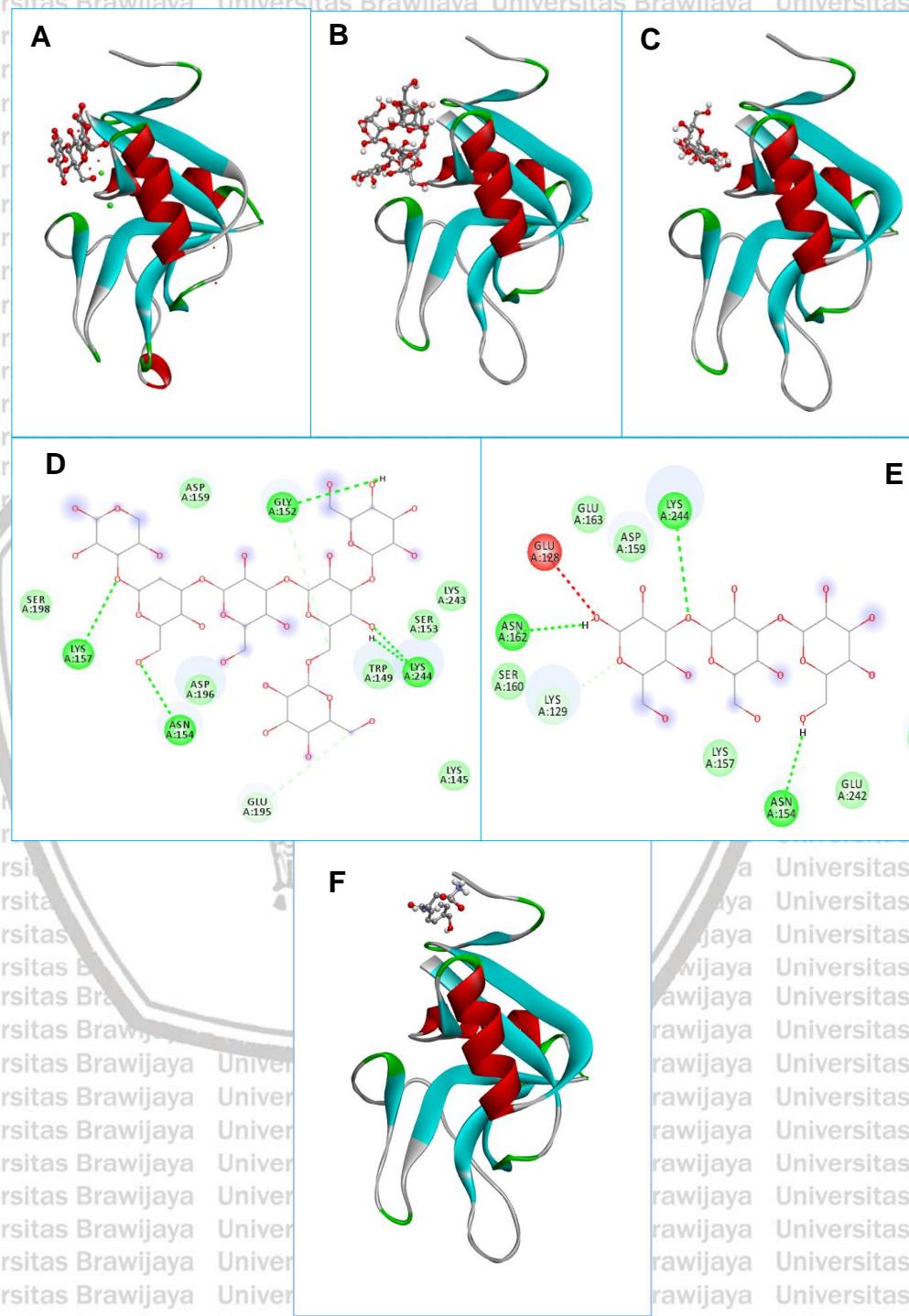
ikatan sebesar -5.2 kcal/mol, sedangkan β -glucan dengan Human Dectin-1 memiliki afinitas ikatan sebesar -5.9 kcal/mol (Gambar 7.2.). Agaritin tidak memiliki ikatan dengan baik pada dectin karena tidak adanya ikatan hydrogen dan energy yang dihasilkan terlalu besar.

Tabel 6.1. Afinitas ikatan antara TLR2/1 dengan substrat.

Substrate	Binding Affinity (Kcal/mol)
1,3 β -glucan	-7.6
1,3/1,6 β -glucan	-8.1
Agaritin	-7.7
β -glucan	-7.5
Kontrol positif	-7.7



Gambar 6.1. Interaksi antara TLR2/1 dengan molekul kecil (kuning). (A)
Interaksi antara posisi TLR2/1 dengan 1,3 β -glucan (B), 1,3/1,6 β -glucan, (C)
Agaritine, (D) β -glucan, (E) Kontrol positif.



Gambar 6.2. Ikatan antara β -glucan dengan Dectin. (A) Interaksi antara β -glucan dengan Mouse Dectin-1, (B) 1,3-1,6 β -glucan dengan Human Dectin-1, (C) β -glucan

6.4. Pembahasan

Data yang telah diperoleh dari analisis *in silico* menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam *Agaricus blazei* Murril (1,3-1,6 β -glucan) terikat dengan *TLR2/TLR1* dan juga *Dectin-1*. Ikatan tersebut memiliki aktifitas untuk menstimulasi signal cascade untuk memproduksi sitokin anti inflamasi dan fungsi sel T regulator. Data ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menjelaskan tentang jamur tersebut meningkatkan sitokin *IL-10* pada human *peripheral blood mononuclear cells* (*hPBMC*) (Jeurink et al. 2008). Senyawa utama dalam *Agaricus blazei* Murrill adalah β -glucan dan zymosan (ekstrak dinding sel yeast yang berisi β - glucan, mannan, chitin, proteins, dan lipids yang menarget reseptors pesifik *Dectin-1*) (Brown 2006; Forland et al. 2011).

Reseptor *Dectin-1* ditemukan pada makrofag, monosit, sel *PMN* dan subset sel T (Brown 2006; Forland et al. 2011; Taylor et al. 2002). *Dectin-1* secara signifikan mengatur sitokin yang berhubungan dengan *Th2* khususnya *IL-4* dan *IL-13* dan juga *IL-10* (Forland et al. 2011; Taylor et al. 2002; Willment et al. 2003). Reseptor ini diketahui terlibat dengan *TLR2* dalam menginduksi keseimbangan respon imun antara pro dan anti inflamasi (Goodridge dan Underhill 2008; Underhill, 2007). Signaling *Dectin-1* akan menyebabkan ekspansi dan aktifasi fungsi sel T regulator. Beberapa penelitian menggunakan zymosan yang telah menunjukkan interaksi yang simultan antara *TLR2* dan *Dectin-1* untuk menginduksi sitokin supresor dalam jumlah besar (Dillon et al. 2006; Slack et al. 2007).

Bberapa zat bioaktif dalam jamur seperti polisakarida, molekul kecil dan protein kompleks memiliki manfaat dalam bidang farmakologi (Ferreira et al. 2010; Wacker, 2010; Swain et al. 2015; Wong et al. 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa zymosan dapat meningkatkan produksi $TGF-\beta 1$ dan $IL-10$, dan fungsi supresif sel $TregCD4^+CD25^+$. Aktivasi $Treg$ dapat terjadi melalui ikatan $TLR2$ dan *Dectin-1* (Karumunthil-Meleshil et al. 2008). $TLR2$ mengenali lipoprotein/lipopeptide (*LP*) dan peptidoglikan yang membentuk heteromer dengan $TLR1$ atau $TLR6$ secara intraseluler (Karumunthil-Meleshil et al. 2008; Omueti et al. 2005; Farhat et al. 2008). Lebih jauh, $TLR2$ agonist menunjukkan potensi untuk menginduksi beberapa sitokin supresor secara signifikan dan meningkatkan sel $TregCD4^+CD25^+$ (Zanin-Zhorov et al. 2006). Atherosklerosis yang disebabkan oleh aktivasi monosit atau makrofag dalam merespon akumulasi *LDL* yang teroksidasi (*Ox-LDL*). Sehingga peningkatan sel T regulator melalui senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill ($1,3-1,6\beta$ -glucan) memiliki potensi dalam menormalkan sistem imun yang meningkat untuk mencegah atherosklerosis (Sakaguchi et al. 2008).

6.5. Kesimpulan

Senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill, $1,3-1,6\beta$ -glucan mampu

berikan dengan $TLR-2/1$ dan *Dectin* yang memiliki potensi untuk mengaktifasi sel $Treg$ dan produksi sitokin anti inflamasi. Hasil penelitian ini membutuhkan studi lebih jauh untuk menjelaskan fungsi jamur tersebut dalam perkembangan anti atherosklerosis.

BAB 7

PENELITIAN TAHAP III

UJI IN VIVO

7.1. Latar Belakang

LDL merupakan faktor utama yang menyebabkan terjadinya proses

aterosklerosis, dimana mekanisme inflamasi dan imunitas berperan secara

signifikan dalam proses aterogenesis. Aterosklerosis merupakan penyakit

inflamasi kronik, dimana berbagai tipe sel – sel imunitas terlibat di dalamnya

(Chistiakov et al. 2013). Sistem imunitas memainkan peran utama dalam

patogenesia aterosklerosis, yang meliputi beberapa proses yaitu infark miokard,

stroke, dan gangren iskemik (Hansson 2005; Hansson dan Libby 2006; Entin-

Meer et al. 2009).

Peran *Treg* dalam penghambatan proses aterosklerosis memainkan

peranan penting, karena mampu memodulasi proses pro inflamasi menjadi

proses yang pro anti inflamasi (Chistiakov dkk, 2013). Penelitian mengenai

Agaricus blazei Murrill akhir – akhir ini banyak dilakukan oleh peneliti. A.

brasiliensis dilaporkan telah dapat memperbaiki gejala – gejala penyakit yang

terkait gaya hidup, meliputi obesitas, hipertensi, diabetes, anti inflamasi, anti

tumor, penghambat kanker, efek peningkatan sistem kekebalan (Ellertsen et al.

2005; Ker et al. 2005; Kobayashi et al. 2005, Zhong et al. 2005, Bellini et al.

2006; Huan dan Mau 2006), modulasi stres oksidatif setelah inflamasi dan

infeksi (Huang et al. 2010), analgesia (Gonzaga et al. 2013),

hiperkolesterolemia, hepatitis, aterosklerosis, dan penyakit jantung (Firenzuoli et

al. 2008).

A. *Subrufescens* atau yang disebut juga sebagai *Agaricus brasiliensis wasser/Agaricus blazei ss. Heinemann/Agaricus blazei Murrill* mempunyai bahan aktif berupa campuran polisakarida yang memiliki efek terhadap kardiovaskular, baik secara langsung maupun tidak langsung. Campuran polisakarida yang telah terbukti memiliki efek terhadap kardiovaskular yaitu *glucan* (terutama β -*glucan*) dan *protein bound polysaccharides* (Li et al. 2004; Kim et al. 2005; Reyna-Villasmil et al. 2007; Chen dan Raymond 2008; Roupas et al. 2012). Selain kedua komponen utama di atas, terdapat komponen lain yang juga memiliki efek kardiovaskular yaitu *phenolic* dan *flavonoid* (Carvajal et al. 2012).

7.2. Metode Penelitian

7.2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUB Malang pada tanggal 16 Juli 2016 sampai dengan 26 Oktober 2016.

7.2.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan mencit (*mus musculus*) jantan dengan kriteria jalur *BALB/c*, umur 8 minggu serta memiliki kondisi sehat yang ditandai dengan adanya kaki – kaki yang tidak bengkok / cacat, bulu yang tidak rontok, serta mampu bergerak aktif. Kriteria eksklusi adalah mencit yang tidak mau makan, sakit atau mati.

7.2.3. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas : dosis *Agaricus blazei* Murrill.

b. Variabel tergantung : *Treg*, *TGF- β* , *IL-10*, *Th17*, dan *Lp-PLA2*.

e. Variabel kendali : jenis kelamin, umur, berat badan, jenis makanan, kesehatan mencit dan suhu ruang.

7.2.4. Perlakuan Pada Hewan Coba

Perlakuan pada hewan coba dilakukan selama 12 minggu. Tiap minggu diperiksa berat badannya, sedangkan pakan diberikan setiap hari, dimana setiap harinya dihitung sisa pakan yang tidak termakan.

7.2.5. Penentuan Dosis *Agaricus blazei* Murrill

Penentuan dosis *Agaricus blazei* Murrill didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu dosis 200 mg/ kgBB. Dosis *Agaricus blazei* Murrill yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: dosis 100 mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

7.2.6. Isolasi Sel Limpa/ Spleen / Lien

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.7.3.

7.2.7. Penghitungan Jumlah Sel Limpa/Spleen / Lien

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.7.4.

7.2.8. Pewarnaan Antibodi

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.7.5.

7.2.9. Analisis Flowcytometri

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.7.6.

7.2.10. Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data hasil *flowcytometri* menggunakan 'SPSS versi 17.0 for windows'. Data yang digunakan berupa jumlah relatif (prosentase) sel CD4 CD25 FOXP3, CD4 CD25 IL-10, CD4 CD25 TGF- β , CD4 IL-17A, dan Lp-PLA2 yang diuji normalitas dan homogenitasnya. Data yang berdistribusi normal, diuji dengan one-way ANOVA dengan nilai $p = 0,5\%$. Jika $p < 0,5\%$ maka dapat

disimpulkan bahwa antara masing – masing kelompok perlakuan didapatkan perbedaan yang nyata.

7.3.3 Hasil dan Analisis

7.3.1 Penurunan Jumlah Relatif *LpPLA2* (*CD11b/c+LpPLA2+*)

Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase (*LpPLA2*) merupakan enzim

penghidrolisis *LDL* yang teroksidasi (*oxLDL*) yang timbul karena adanya induksi

lemak tinggi. Peran *LpPLA2* sangatlah penting pada fungsi efektor monosit/

makrofag yang diketahui terlibat dalam proses inflamasi pada penyakit

aterosklerosis. Plasma *LpPLA2* atau lebih dikenal sebagai *Lp-PLA2* dihasilkan

oleh sel-sel inflamasi seperti makrofag, monosit, sel T dan sel mast. Tingginya

enzim *LpPLA2* menjadi indikator dalam penyakit atherosklerosis. Pada penelitian

ini membuktikan bahwa jumlah relatif makrofag yang menghasilkan enzim

LpPLA2 (*CD11b/c+LpPLA2+*) meningkat secara signifikan sebesar 18.04%

setelah diinduksi dengan diet tinggi lemak selama 12 minggu

dibandingkan mencit sehat (5.44%). Hal ini menunjukkan bahwa konsumsi

makanan tinggi lemak pada mencit dapat menyebabkan tingginya stres oksidatif

yang kemudian diikuti oleh tingginya enzim *LpPLA2*.

Hasil *flowcytometry* menunjukkan bahwa pemberian secara oral ekstrak

Agaricus blazei Murrill selama 12 minggu dapat mereduksi stres oksidatif melalui

penurunan enzim *LpPLA2* pada mencit diet tinggi lemak. Pemberian ekstrak

Agaricus blazei Murrill pada semua dosis perlakuan mampu menurunkan jumlah

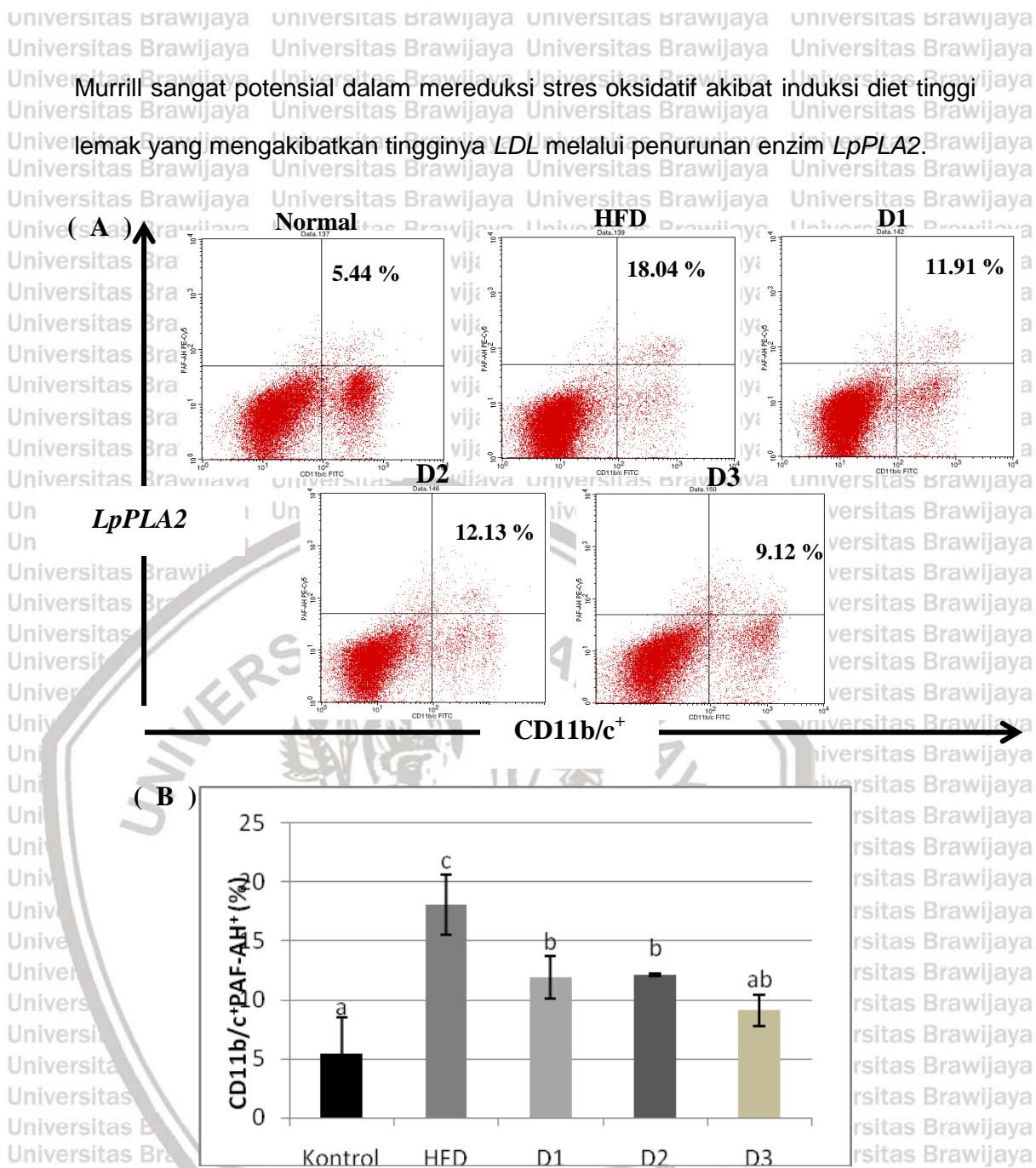
relatif *CD11b/c+LpPLA2+* secara signifikan (D1: 11.91%; D2: 12.13; D3: 9.12%)

dibandingkan dengan mencit diet tinggi lemak tanpa pemberian ekstrak *Agaricus*

blazei Murrill (*HFD: 18,04%*) (Gambar 7.1.). *LpPLA2* terbentuk akibat *LDL*

yang teroksidasi dan secara teoritis terbukti berperan dalam pembentukan plak

atherosklerotik. Dengan hasil tersebut maka dapat disimpulkan *Agaricus blazei*



Gambar 7.1. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill menurunkan produksi enzim *LpPLA2* yang dihasilkan oleh makrofag pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. A) Jumlah relatif enzim *LpPLA2* (*CD11b/c+LpPLA2*) pada lien mencit yang diinduksi dengan diet tinggi

lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu.

B) Data hasil flowcytometry dalam tabulasi dengan Microsoft Excel dan dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Data diperoleh dari rata-rata ± SD

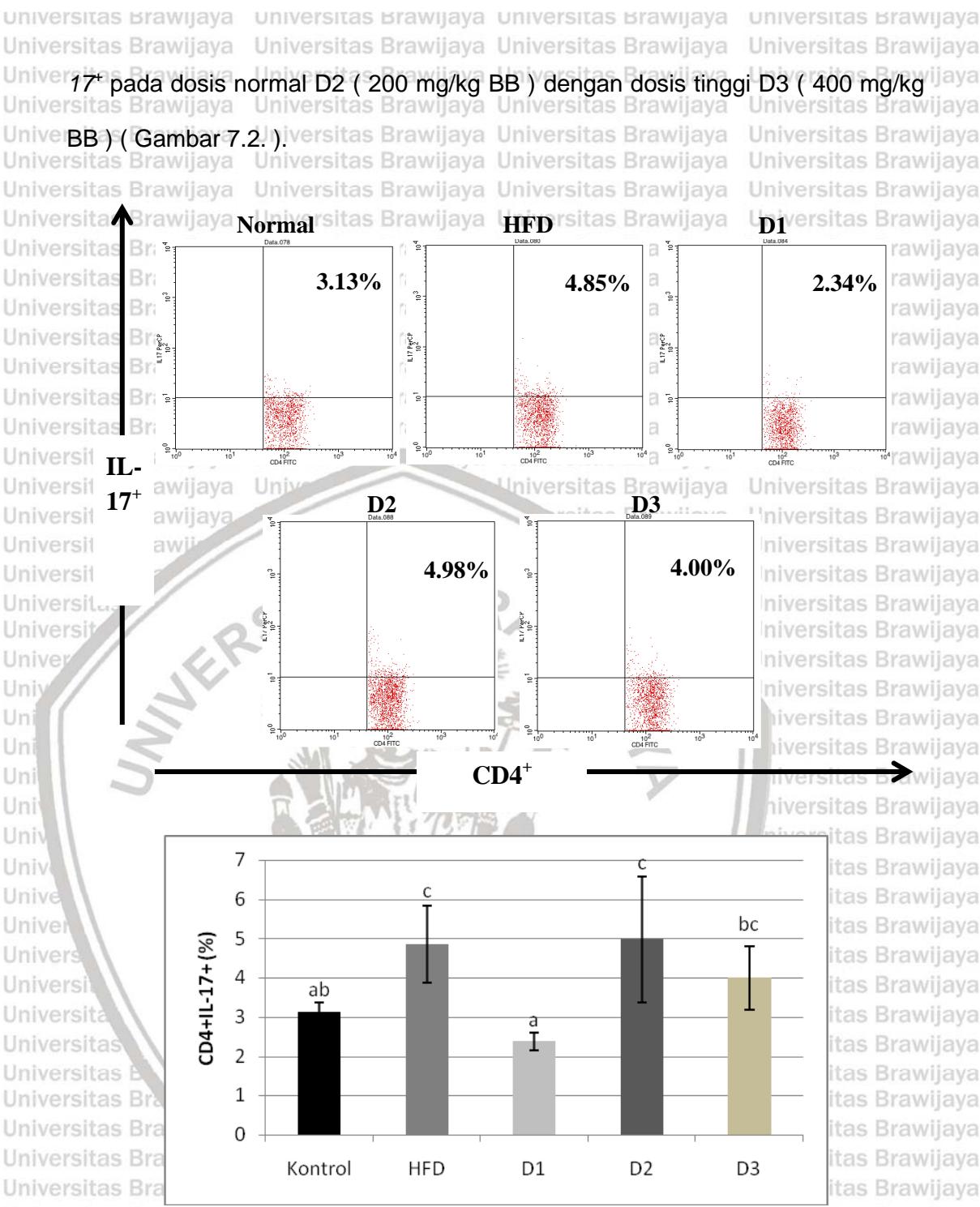
pada masing-masing perlakuan dengan $p \leq 0.05$. Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan Uji Tukey.

Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/ kg BB); D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/ kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/ kg BB).

7.3.2. Penurunan Jumlah Relatif Sitokin Pro Inflamasi *IL-17*

Sitokin *IL-17* secara luas digunakan untuk marker inflamasi khususnya pada penyakit aterosklerosis dan arthritis. Sitokin ini diekspresikan oleh beberapa sel termasuk sel *Th17*, monosit, neutrophil, dan sel *NK*. Dikarenakan *IL-17* adalah sitokin yang banyak diproduksi oleh *Th17*, maka *IL-17* sering digunakan untuk mempelajari peran *Th17* dalam proses aterogenesis. Pada penelitian ini, sitokin *IL-17* diamati pada sel T *CD4⁺*, *CD8⁺* dan *CD11b/c*. Hasil analisis *flowcytometry* menunjukkan bahwa produksi sitokin *IL-17* yang diproduksi sel T *CD4⁺* pada mencit dengan diet tinggi lemak mengalami peningkatan secara signifikan dibandingkan dengan mencit sehat/kontrol (4.85% vs 3.13%) (Gambar 7.2.).

Peningkatan *IL-17* pada mencit yang diinduksi dengan dengan diet tinggi lemak mengindikasikan adanya proses inflamasi, dimana inflamasi adalah penyebab terbesar aterosklerosis yang muncul pada setiap tahapan aterosklerosis. Akan tetapi, jumlah relatif sel T *CD4⁺/IL-17⁺* setelah pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill secara signifikan ($p < 0.05$) mengalami penurunan sebesar 2.38% dibandingkan dengan mencit *HFD* (*High Fat Diet*) (Gambar 7.2.). Dosis rendah D1 (100 mg/kg BB) *Agaricus blazei* Murrill adalah dosis yang efektif dalam menurunkan kadar sitokin *IL-17* dibandingkan dengan dosis lainnya. Tetapi tidak ada perbedaan signifikan antara jumlah relatif sel T *CD4⁺/IL-*



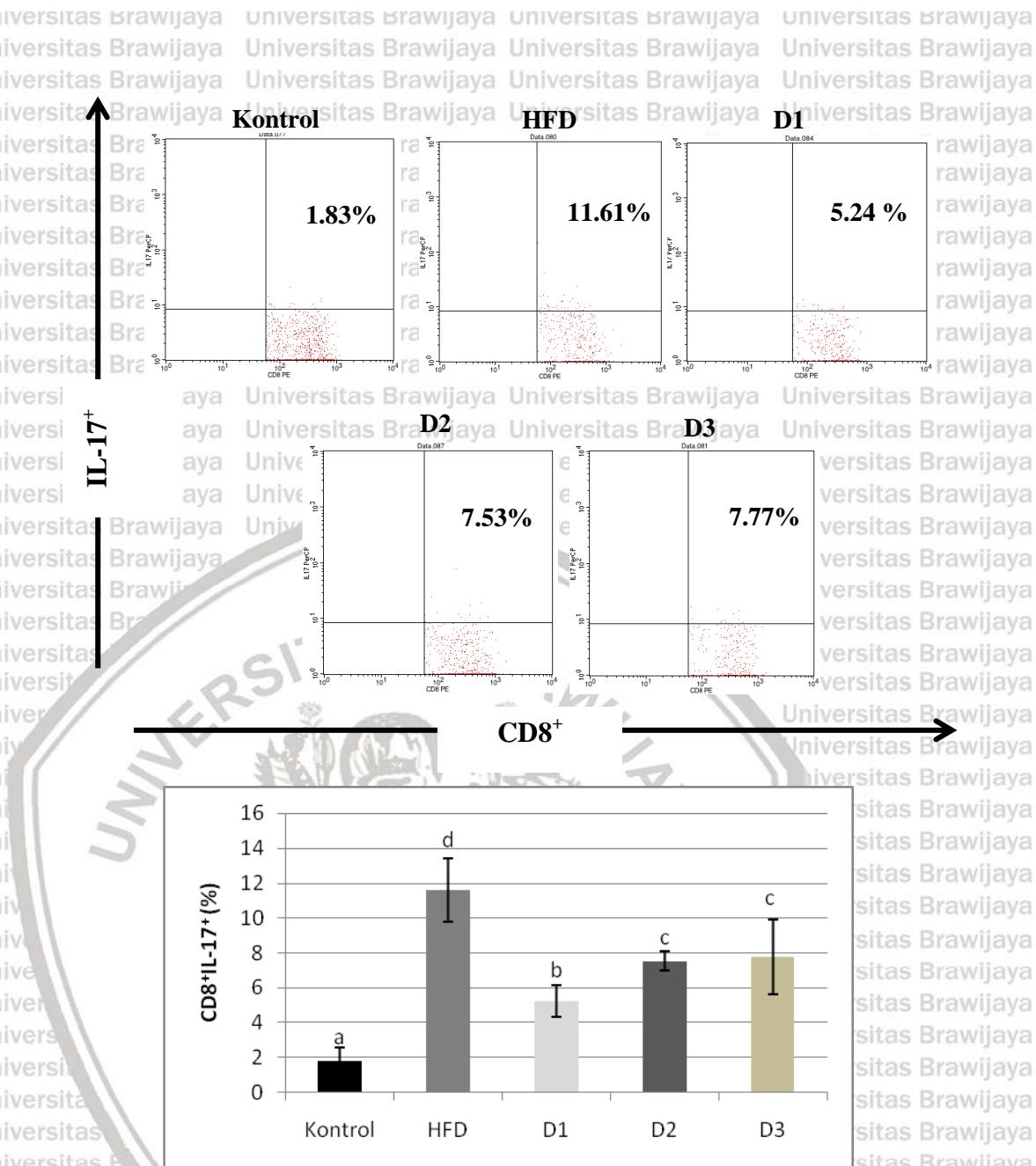
Gambar 7.2. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi IL-17 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. A) Jumlah relatif sitokin IL-17 (sel T CD4⁺IL17⁺) pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu. B) Data hasil flowcytometry ditabulasi di Microsoft Excell dan dianalisis menggunakan SPSS

for Windows. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada masing-masing perlakuan dengan $p \leq 0,05$. Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan Uji Tukey.

Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/ kg BB); D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/ kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/ kg BB).

Peningkatan produksi sitokin *IL-17* ternyata tidak hanya ditemukan pada sel T CD4 saja, tetapi juga pada sel T CD8. Pada penelitian ini, mencit Balb/c yang diberikan diet tinggi lemak bertujuan untuk menginduksi terjadinya aterosklerosis. Adanya induksi diet tinggi lemak pada mencit selama 12 minggu dapat memicu peningkatan sitokin *IL-17* yang ditandai dengan jumlah relatif sel T CD8⁺ *IL-17*⁺ yang tinggi pada mencit *HFD* dibandingkan dengan mencit sehat (11.61% vs 1.83%) (Gambar 7.3). Hal ini mengindikasikan bahwa sitokin *IL-17* adalah salah satu sitokin pro inflamasi yang terlibat dalam proses perkembangan penyakit aterosklerosis.

Hasil *flowcytometry* menunjukkan dengan adanya pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murril pada dosis rendah (100 mg/kg BB) secara signifikan mampu menurunkan produksi sitokin *IL-17* oleh sel T CD8 dibandingkan dengan dosis lainnya secara berturut-turut yaitu D1 (100 mg/kg BB) sebesar 5.24, D2 (200 mg/kg BB) sebesar 7.53 dan D3 sebesar 7.77% (Gambar 6.3). Pada dosis D2 dan D3 tidak berbeda nyata sehingga yang paling efektif dalam menurunkan produksi sitokin *IL-17* oleh sel T CD8+ pada mencit diet tinggi lemak adalah dosis rendah (100 mg/kg BB).



Gambar 7.3. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill menurunkan produksi sitokin pro inflamasi IL-17 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. A) Jumlah relatif sitokin IL-17 (sel T $CD8^+IL-17^+$) pada jenjencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu. B) Data hasil flowcytometry ditabulasi di Microsoft Excell dan dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada masing-masing perlakuan

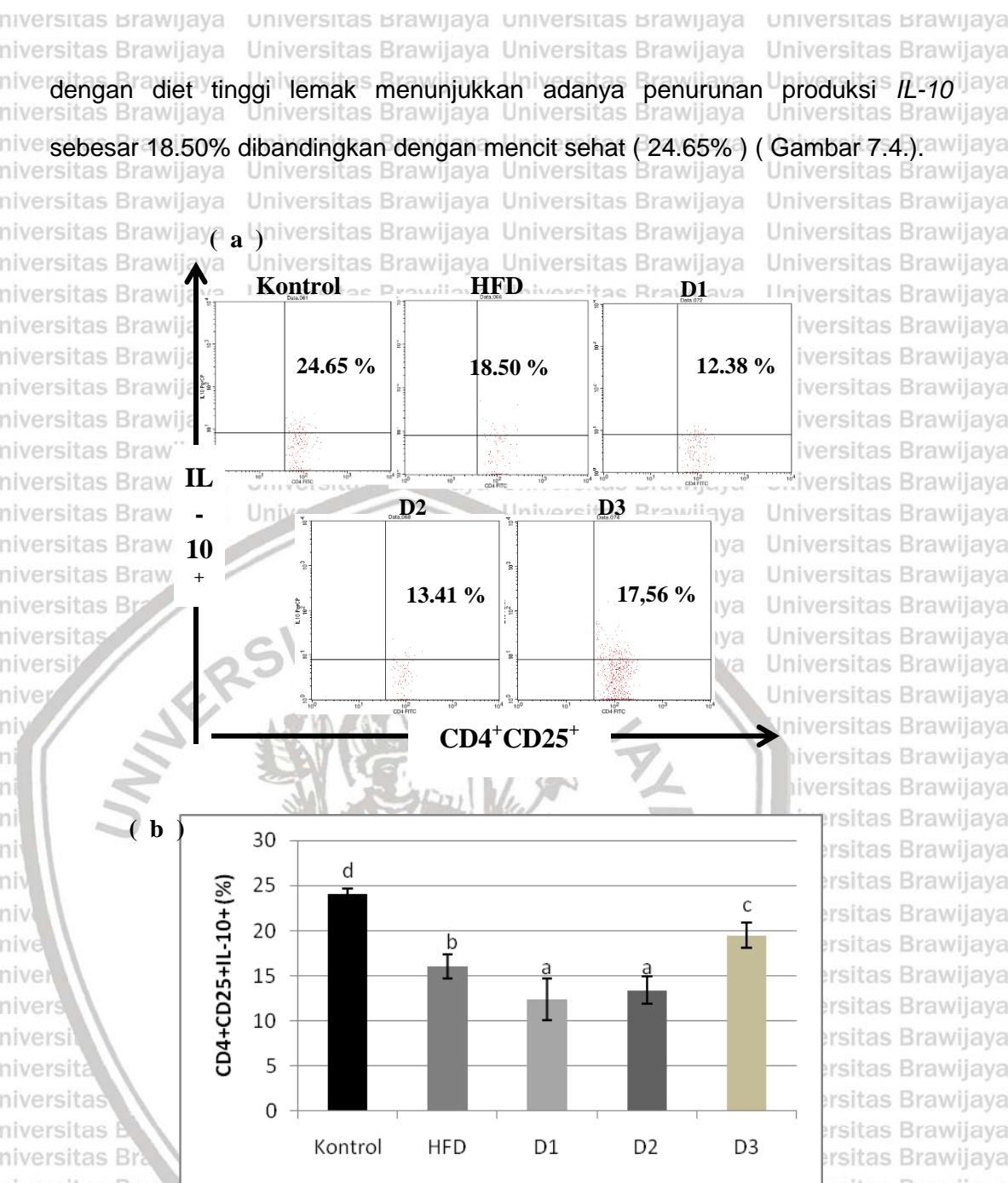
dengan $p \leq 0,05$. Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan Uji Tukey.

Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/kg BB); D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/kg BB).

CD11b/c adalah molekul yang diekspresikan pada permukaan leukosit seperti monosit, neutrophil, sel NK, granulosit dan makrofag. Sel-sel tersebut juga memproduksi sitokin pro-inflamasi *IL-17*, sehingga pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan pada sel yang memiliki molekul penanda *CD11b/c*. Penelitian ini membuktikan, bahwa jumlah relatif *CD11b/c⁺IL-17⁺* pada mencit dengan diet tinggi lemak secara signifikan meningkat dua kali lipat dibandingkan dengan mencit sehat (19.12% vs 8.98%) (Gambar 7.3.). Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill mampu menurunkan jumlah relatif *CD11b/c⁺IL-17⁺* pada dosis rendah D1 (100 mg/kg BB) dibandingkan dengan dosis lainnya (D1: 14.39%; D2: 20.77%; D3: 22.77%). Data ini mengindikasikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill dapat dijadikan sebagai agen *immunomodulator*, dimana dosis optimal dalam menurunkan sitokin *IL-17* pada sel T *CD4*, *CD8* dan *CD11b/c* adalah dosis rendah yaitu 100 mg/kg BB.

7.3.3. Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi *IL-10* (*CD4⁺CD25⁺IL-10⁺*)

Sitokin *IL-10* diketahui sebagai sitokin supresif yang sangat efektif dalam menurunkan inflamasi pada penyakit aterosklerosis. Perkembangan penyakit aterosklerosis dapat diminimalisir dengan adanya sitokin anti-inflamasi yang akan memicu homeostatis dalam tubuh. Adanya induksi diet tinggi lemak dapat menurunkan produksi sitokin *IL-10*. Mencit yang diinduksi dengan dengan



Gambar 7.4. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill memicu produksi sitokin anti-inflamasi IL-10 pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. A) Jumlah relatif sitokin IL-10 ($CD4^+CD25^+IL-10^+$) pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu. B) Data hasil flowcytometry ditabulasi di Microsoft Excell dan dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada masing-masing perlakuan

dengan $p \leq 0,05$. Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan Uji Tukey.

Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/ kg BB); D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/ kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/ kg BB).

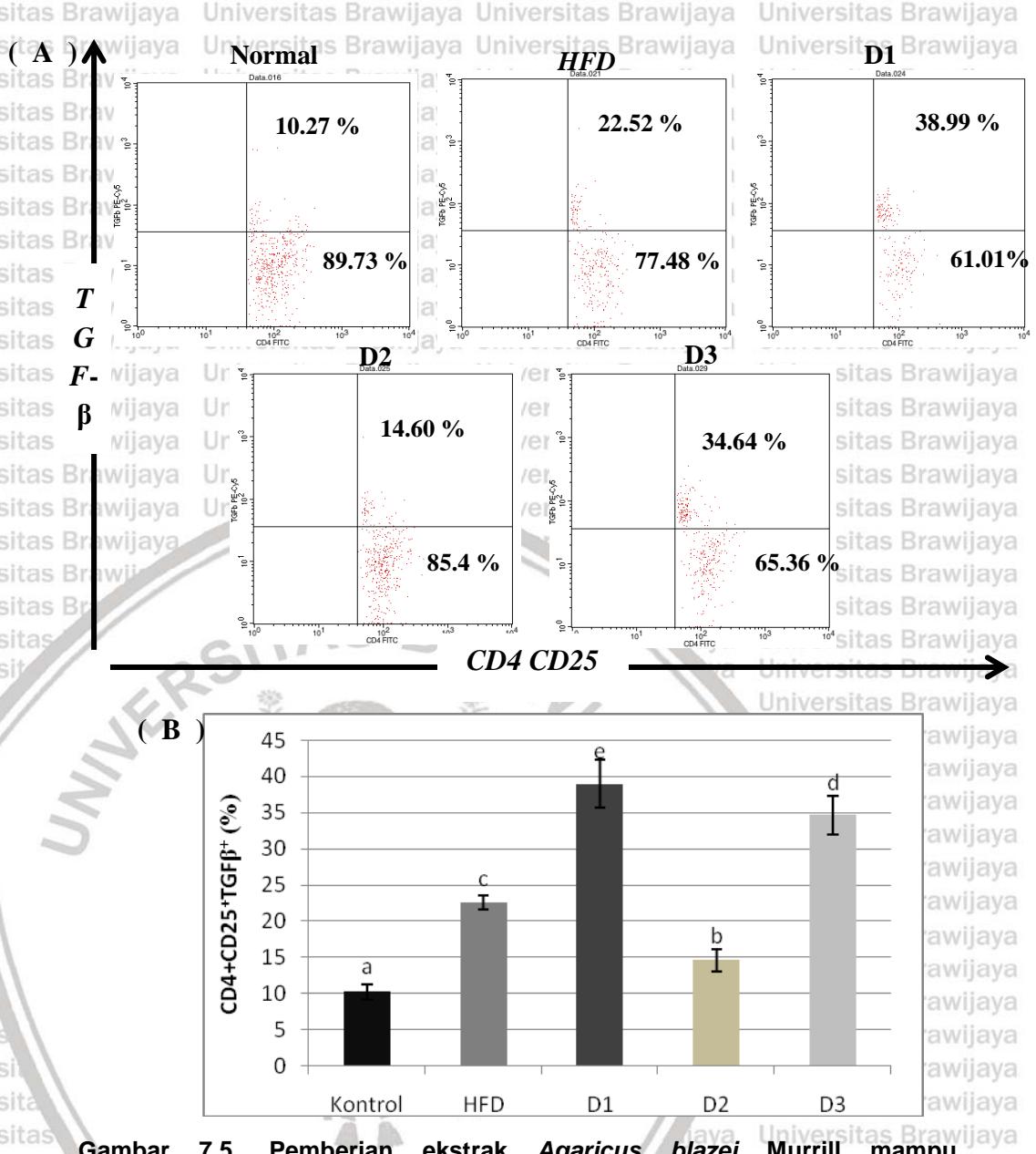
Hasil *flowcytometry* menunjukkan bahwa pemberian *Agaricus blazei* Murrill menstimulasi sitokin anti-inflamasi *IL-10* yang diproduksi oleh sel *Treg* ($CD4^+CD25^+$) pada dosis tinggi D3 (400 mg/kg BB) sebesar 17.56%, tetapi tidak lebih tinggi daripada mencit sehat. Sedangkan pada dosis rendah D1 (100 mg/kg BB) dan dosis normal (200 mg/kg BB) tidak mampu mengembalikan jumlah normal sitokin *IL-10* (D1: 12.38%; D2: 13.41%). Hal ini dimungkinkan, oleh karena pada dosis D1 dan D2 yang bekerja lebih banyak adalah sitokin anti-inflamasi *TGF-β* dibandingkan dengan *IL-10*.

7.3.4. Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi *TGF-β* ($CD4^+CD25^+TGF-β^+$)

Pemberian terapi ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada mencit dengan diet tinggi lemak memberikan pengaruh yang signifikan pada produksi sitokin anti-inflamasi *TGF-β*. *TGF-β* sangat penting dalam mengurangi proses inflamasi yang berlebihan. Analisis *flowcytometry* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada dosis rendah (100mg / kg BB) pada mencit yang diinduksi dengan dengan diet tinggi lemak (*HFD*) dapat meningkatkan produksi sitokin *TGF-β* secara signifikan dibandingkan dengan dosis perlakuan yang lain ($p < 0,05$) (Gambar 7.5.). Jumlah relatif sitokin *TGF-β* pada dosis rendah (100 mg/kg BB) meningkat hingga mencapai 38.99% dan pada dosis tinggi (400

mg/kg BB) juga mengalami peningkatan sebesar 34.64%, namun tidak setinggi pada dosis rendah. Analisis *flowcytometry* juga menunjukkan jumlah relatif sitokin *TGF-β* pada dosis normal (200 mg/kg BB) mengalami penurunan hingga 14.60%. Penurunan sitokin *TGF-β* tersebut dimungkinkan karena yang lebih dominan bekerja pada dosis tersebut adalah *Treg* yang tidak menghasilkan *TGF-β*, yang jumlahnya lebih besar yaitu sebesar 85.4% (Gambar 7.5.). Hal ini menunjukkan bahwa sitokin anti inflamasi *TGF-β* bekerja dominan pada dosis rendah D1 dan dosis tinggi D3 dalam mengurangi inflamasi pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. Peningkatan *TGF-β* ini sangatlah penting dalam perkembangan penyakit aterosklerosis seperti inflamasi, fibrosis, kemotaksis, proliferasi dan apoptosis, dimana pada pasien aterosklerosis sering terjadi penurunan aktivitas sitokin *TGF-β*.

Sel dendritik adalah salah satu APC yang memiliki 2 reseptor untuk respon tolerogenik dan anti-inflamasi pada penyakit aterosklerosis. Adanya peran *Agaricus blazei* Murrill sangatlah penting dalam respon tolerogenik yang erat kaitannya dengan kandungan bahan aktif di dalam jamur tersebut. Respon tolerogenik ini terjadi ketika bahan aktif dalam *Agaricus blazei* Murrill yaitu β -glucan, agaritin, polisakarida dan peptide berikatan dengan reseptor *TLR-2* dan *Dectin-1*. Akibat ikatan tersebut mengakibatkan produksi sitokin supresif seperti *IL-10*, *TGF-β*, dan *IL-2*. Sitokin-sitokin tersebut akan mengaktifasi sel *Treg* yang selanjutnya akan mensekresikan sitokin *IL-10*, *TGF-β*, dan *IL-35* yang bersifat supresif (anti inflamasi). Sitokin supresif atau anti-inflamasi ini memiliki kemampuan untuk mengurangi inflamasi, mereduksi ROS dan selanjutnya akan mengurangi perkembangan penyakit aterosklerosis.



Gambar 7.5. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill mampu

meningkatkan produksi sitokin $TGF-\beta$ pada mencit yang diinduksi dengan

dengan diet tinggi lemak. A) Jumlah relatif sitokin anti-inflamasi $TGF-\beta$ (sel T $CD4^+CD25^+TGF-\beta^+$) pada jien mencit yang diinduksi dengan dengan diet tinggi lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu.

B) Data hasil flowcytometry ditabulasi di Microsoft Excell dan dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada

masing-masing perlakuan dengan $p \leq 0,05$. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan Uji Tukey.

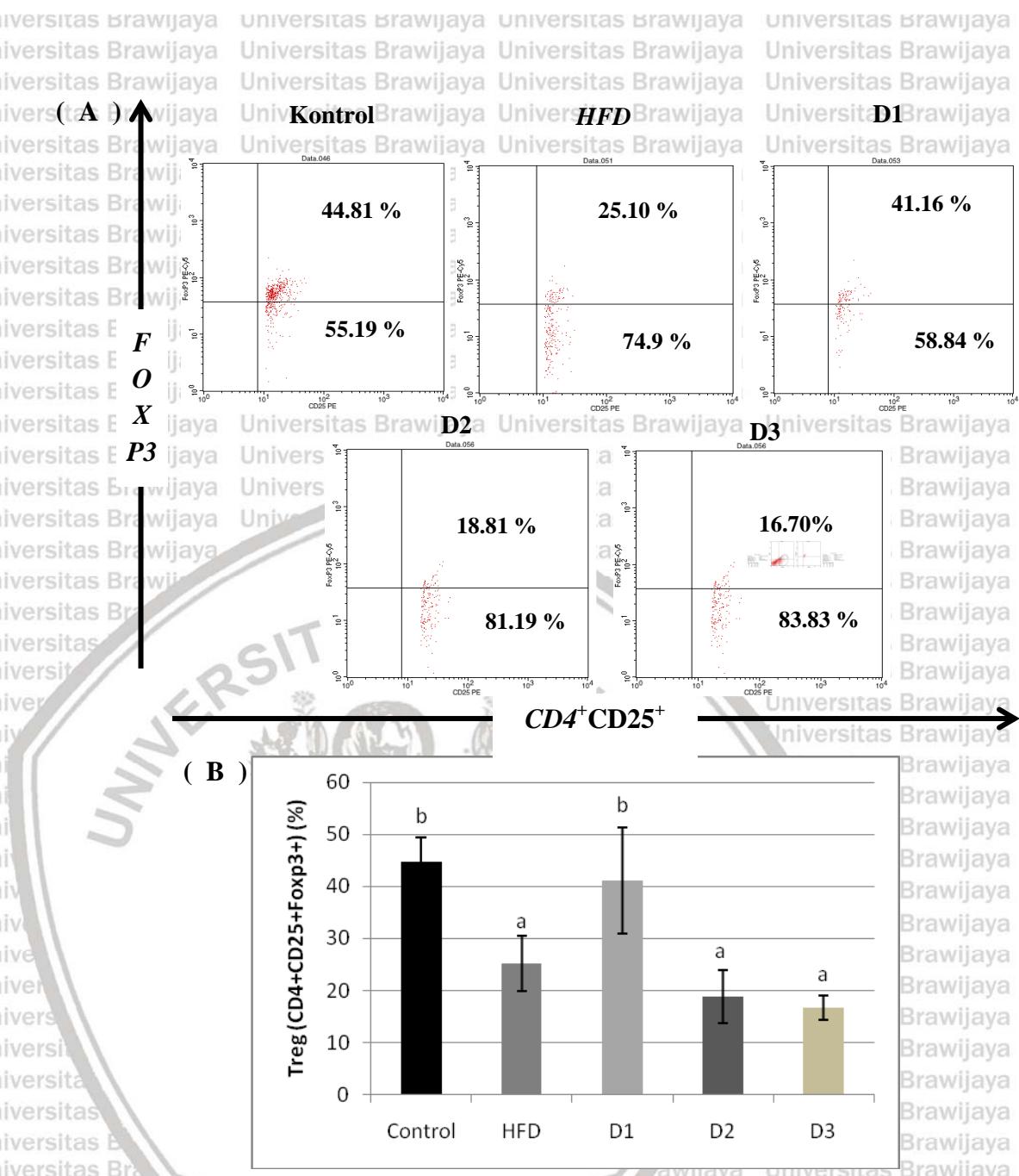
Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/kg BB);

D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/kg BB).

7.3.5. Peningkatan Jumlah Relatif Sel T Regulator/Treg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$)

Agaricus blazei Murrill merupakan salah satu jamur yang sangat berpotensi dalam mengatasi penyakit aterosklerosis. Pada penelitian ini, pengaruh pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada mencit dengan diet tinggi lemak dapat dilihat dari jumlah relatif sel *Treg* (sel *T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*). Konsumsi pakan yang mengandung lemak tinggi selama 12 minggu secara signifikan menurunkan ekspresi sel *Treg* pada mencit dibandingkan dengan mencit sehat ($p<0.05$) (Gambar 7.6.). Jumlah relatif sel *Treg* menurun hingga 25.10% dari jumlah normal sel *Treg* pada mencit kontrol yaitu 44.81%.

Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak ini terbukti mampu mengembalikan jumlah sel *Treg* pada kadar normal menyamai mencit kontrol. Pada mencit dengan diet tinggi lemak (*HFD*) yang diberi perlakuan dengan dosis rendah D1 (100 mg/ kg BB) mampu meningkatkan jumlah relatif sel *Treg* secara signifikan (41.16%) dibandingkan dengan dosis lainnya ($p<0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa dosis rendah (100 mg/kg BB) adalah dosis optimal dalam memodulasi sel *Treg* pada mencit dengan diet tinggi lemak.



Gambar 7.6. Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill mampu meningkatkan ekspresi sel Treg pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. **A)** Jumlah relatif sel Treg (sel T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) pada lien mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian oral ekstrak *Agaricus blazei* Murrill selama 12 minggu. **B)** Data hasil flowcytometry ditabulasi di Microsoft Excell dan dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada masing-masing perlakuan

dengan $p \leq 0.05$. Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan Uji Tukey.

Keterangan: Kontrol: mencit sehat; *HFD*: Mencit yang diinduksi dengan dengan *High Fat Diet*; D1: mencit *HFD* dan diberi dosis rendah (100 mg/kg BB); D2: mencit *HFD* dan diberi dosis normal (200 mg/kg BB); D3: mencit *HFD* dan diberi dosis tinggi (400 mg/kg BB).

Dosis normal (200 mg/kg BB) dan dosis tinggi (400 mg/kg BB) tidak mampu mengembalikan jumlah sel *Treg* dalam jumlah normal (D2: 18.81%; D3: 16.70%). Peningkatan jumlah *Treg* pada mencit diet tinggi lemak yang diberi ekstrak *Agaricus blazei* Murrill secara oral mengindikasikan bahwa komponen aktif dalam jamur tersebut mampu memicu aktifasi sel *Treg* yang mengekspresikan *FOXP3*. Dimana seperti yang telah diketahui *Treg* yang mengekspresikan *FOXP3* memiliki peran anti-inflamasi dengan menekan sitokin antiinflamasi *IL-10* dan *TGF-β1*.

7.4. Pembahasan

7.4.1. Penurunan jumlah relatif *LpPLA2/ LpPLA₂* (*CD11b/c⁺LpPLA₂*)

Penelitian ini menggunakan mencit Balb/c yang diinduksi dengan konsumsi lemak tinggi untuk mendapatkan model mencit ateroskelosis. Hasilnya memperlihatkan bahwa mencit dengan pemberian perlakuan *High Fat Diet* (*HFD*) memproduksi enzim *Lp-PLA2* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan mencit sehat. Hal ini menunjukkan bahwa induksi lemak tinggi dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif yang ditandai dengan tingginya produksi enzim *Lp-PLA2*. Enzim *Lp-PLA2* dihasilkan sebagai suatu bentuk respon terhadap stimulasi *oxLDL* khususnya *oxPC* yang merupakan substrat *Lp-PLA2* (Shi et al. 2009, Wang et al. 2009).

Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (*Lp-PLA2*) atau yang lebih dikenal dengan nama plasma *Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase* (*LpPLA2*) merupakan enzim *phospholipase* dengan berat molekul sebesar 50 kDa. Enzim ini banyak diproduksi oleh makrofag, limfosit dan sel mast dan termasuk sub tipe superfamili *phospholipase A2* yang berfungsi sebagai enzim penghidrolisis fosfatidilkolin teroksidasi (*oxPC*) sebagai bagian dari *LDL* yang telah teroksidasi (*oxLDL*) sehingga menghasilkan *lysoPC* dan *oxFA* yang sangat proaterogenik karena menyebabkan umpan balik positif terhadap produksi *ROS* dan *LpPLA2*. Peningkatan produksi *ROS* dan *LpPLA2* secara bersama-sama akan memacu proses aterogenesis. *Lp-PLA2* dapat dijadikan marker/petanda ketidakstabilan plak sebelum pecah (Sudhir 2005; Sudhir 2006). *LpPLA2* berbentuk tidak aktif ketika berada dalam peredaran darah, dimana sekitar 80% enzim ini terikat pada *apoB* di *LDL* (Irribaren 2006). Pada saat adanya akumulasi *LDL* ke lapisan sub endotel dinding pembuluh darah, *LpPLA2* juga masuk ke dalamnya dan menjadi aktif pada saat *LDL* mengalami oksidasi.

Berdasarkan Gambar 6.3. terlihat bahwa pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada dosis D3 (400 mg/kg BB) pada mencit dengan diet tinggi lemak terbukti menyebabkan penurunan kadar enzim *LpPLA2* atau *LpPLA₂* yang bermakna (*p*<0.05) hingga mendekati jumlah normal pada mencit sehat. Dari data ini dapat ditafsirkan bahwa ketiga dosis ekstrak *Agaricus blazei* Murrill sama-sama dapat menurunkan kadar *Lp-PLA2* tetapi yang lebih optimal hanya pada dosis D3.

7.4.2. Penurunan Jumlah Relatif Sitokin Pro Inflamasi *IL-17*

Interleukin-17 merupakan sitokin pro inflamasi yang memiliki efek proaterogenik dengan menginduksi produksi sitokin, kemokin dan matriks

metalloproteinase. Sel T yang mampu memproduksi sitokin ini bukan Th1 dan Th2, melainkan Th17 (Miossec et al. 2009). Banyak studi melaporkan, bahwa sel T diklasifikasikan ke dalam Th1, Th2 dan Th17. *IL-17* diproduksi oleh beberapa tipe sel hematopoietik seperti *Th17*, sel *NK*, makrofag, sel dendritik, netrofil dan sel mast. Sel-sel ini secara cepat akan memproduksi *IL-17* akibat respon sitokin pro-inflamasi (Liuzzo et al. 2013). *IL-17* ini juga akan menstimulasi *G-CSF* (*Granulocytes Colony Stimulating Factor*) yang berperan dalam proses granulopoiesis dan memicu sel-sel imun. *IL-17* menginduksi apoptosis pada sel endotel dan *cardiomyocytes* dengan mengaktifkan caspase-3 dan caspase-9 dan *upregulasi* dari *Bax/ Bcl-2* yang akan menyebabkan kerusakan endotel. (Liuzzo et al. 2013; Pober 2011).

Penelitian ini membuktikan bahwa sitokin *IL-17* secara signifikan menurun setelah dilakukan pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada dosis 100 mg/kg BB pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. *Agaricus blazei* memiliki banyak kandungan bioaktif berupa polisakarida dan non polisakarida. β -*glucan* pada *Agaricus blazei* Murrill merupakan polisakarida yang secara alamiah terdapat pada ragi, bakteri, alga dan fungi. β -*glucan* juga dikenal memiliki efek anti-bakteri, anti-viral, dan imunomodulator dalam mencegah dan mengobati berbagai penyakit (Hozova et al. 2004).

Pranamuda et al. (2012) melaporkan bahwa aktivitas *imunomodulator* β -*glucan* pada proliferasi limfosit secara *in vitro* dapat diamati dengan menggunakan uji MTT. Hasil penelitian tersebut menyebutkan bahwa ekstrak β -*glucan* pada dosis tertentu mampu menginduksi proliferasi limfosit pada manusia.

Proliferasi sel limfosit tertinggi ditemukan pada dosis 250 ppm. Penelitian lain juga membuktikan bahwa pada dosis 100 mg/kg BB, β -*glucan* yang berasal dari *Caripia montagnei* mampu menurunkan reaksi proinflamasi pada mencit model peritonitis. Reaksi anti-inflamasi ditunjukkan dengan peningkatan kadar sitokin

anti-inflamasi *IL-10* serta penurunan sitokin pro inflamasi *IFN-γ* (Queiroz et al. 2010). Jedinak et al. (2011) juga membuktikan bahwa β -glucan dari jamur *Pleurotus ostreatus* mampu menekan kadar sitokin pro-inflamasi dengan mengukur kadar dari *IFN-γ*, *IL-2* dan *IL-6*. Pada penelitian ini juga menemukan fakta bahwa kadar sitokin pro-inflamasi *IL-17* yang diproduksi sel T CD4 pada dosis 200 mg/kg BB (D2) dan 400 mg/kg BB (D3) tidak secara signifikan mengalami penurunan jika dibandingkan dengan mencit dengan diet tinggi lemak tanpa perlakuan apapun. Pada kelompok mencit yang mendapatkan perlakuan D2 dan D3 juga ditemukan jumlah relatif $CD8^+L-17^+$ yang lebih tinggi dibandingkan dengan D1. Tanriverdi et al. (2005) menjelaskan, bahwa pada konsentrasi tertentu β -glucan dapat memicu reaksi pro-inflamasi dan pembentukan granuloma. Mekanisme β -glucan sebagai agen imunostimulator dapat dijelaskan dengan ikatan β -glucan itu sendiri dengan reseptor membran komplemen CR3 pada makrofag (Sarangi et al. 2006; Radji 2010). Ikatan antara β -glucan dengan makrofag akan mengaktifasi makrofag dan sel-sel yang memproduksi sitokin yang memicu respon imun spesifik (Rop et al. 2009).

7.4.3. Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi *IL-10*

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa fungsi efektor sel *Treg* sangat erat kaitannya dengan pengaruh dari sitokin supresif seperti *TGF-β* dan *IL-10*. Sel *Treg* sangat penting dalam toleransi imun dan kerusakan populasi sel T (efek supresif). Sel *Treg* dilaporkan menghasilkan beberapa sitokin seperti *IL-10*, *TGF-β* yang berfungsi untuk menghambat aktifasi sel T (Rifai dan Widodo 2014). *IL-10* merupakan sitokin anti inflamasi yang efektif dalam mencegah aterosklerosis. *IL-10* banyak diproduksi oleh makrofag dan subset Th2. *IL-10* memiliki efek anteroprotektif pada perkembangan plak dan juga pada tahapan aterosklerosis dengan mempengaruhi proses inflamasi lokal dalam lesi

aterosklerotik (Libby et al. 2011). Penurunan kadar *IL-10* dapat memicu akumulasi aktifitas *MMP* dimana hal tersebut juga akan memicu ketidakstabilan plak yang dapat menyebabkan kejadian kardiovaskular akut pada individu tertentu (Mallat et al. 1999; Holven et al. 2006; Amento et al. 1991). Target terapi pada sitokin supresif sangatlah penting dalam menurunkan kadar penyakit inflamasi. Penemuan dalam penelitian yang ada menunjukkan bahwa *IL-10* yang diproduksi oleh sel *Treg* sangatlah penting dalam menurunkan perkembangan aterosklerosis pada mencit model *HFD*. Peningkatan *IL-10* akibat pemberian *Agaricus blazei* Murrill merupakan salah satu terapi yang dapat diterapkan pada individu dengan penyakit aterosklerosis.

Agaricus blazei Murrill sangat kaya akan β -glucan merupakan salah satu polisakarida yang memiliki aktifitas imunomodulator yang sangat kuat. β -glucan merupakan stimulator yang sangat potensial pada makrofag, monosit dan sel *NK*. Efek tersebut diperantarai melalui lectin-binding, tempat untuk β -glucan pada reseptor komplemen 3 (*CR3*) / (*CD11b/18*), toll like reseptor 2 (*TLR2*) dan *dectin-1*. Makrofag yang mengandung reseptor membran spesifik dapat berikatan dengan polisakarida dan glikoprotein seperti *TLR4*, *CD14*, *complement receptor 3* (*CR3*), reseptor scavenger, *dectin-1*, dan reseptor *mannose*. Ikatan antara reseptor tersebut selanjutnya mengaktifasi *NF- κ B*, yang dapat mengontrol ekspresi dari gen dalam mengaktifasi makrofag (Libby et al. 1996).

7.4.4. Peningkatan Jumlah Relatif Sitokin Anti Inflamasi *TGF- β*

TGF- β (*transforming growth factor- β*) merupakan salah satu sitokin yang sangat penting dalam meregulasi perkembangan dari penyakit aterosklerosis yang meliputi inflamasi, fibrosis, kemotaksis, proliferasi dan apoptosis. *TGF- β* memiliki 3 isoform yaitu *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, dan *TGF- β 3*. Ketiga isoform tersebut berikatan dengan reseptor yang sama dan memiliki fungsi yang sama. Beberapa penelitian banyak dilakukan pada isoform *TGF- β 1* dan kaitannya dengan

aterosklerosis. $TGF-\beta$ erat kaitanya dengan pembentukan plak aterosklerotik dimana kadarnya akan menurun pada tempat ateroklerotik (Jiang et al. 2004). Ligan $TGF-\beta$ dan reseptornya diekspresikan oleh sel endotel, sel otot polos, makrofag, dan sel T pada lesi aterosklerotik pada manusia (Bobik et al. 1999). Banyak penelitian membuktikan bahwa $TGF-\beta$ dapat menghambat perkembangan penyakit aterosklerosis. Salah satu jalur utama yaitu melalui penghambatan proliferasi dan migrasi serta menstimulasi apoptosis dari sel otot polos vaskular dan sel endotel, dan juga berpotensi menghambat sistem imun. Peningkatan aktifasi dari sel *Treg* berefek sangat besar pada sekresi sitokin anti-inflamasi $IL-10$ dan $TGF-\beta$ (Chistiakov et al. 2003).

Sel dendritik adalah salah satu APC yang memiliki 2 reseptor untuk respon tolerogenik dan anti-inflamasi pada penyakit aterosklerosis. Adanya peran *Agaricus blazei* Murrill sangatlah penting dalam respon tolerogenik yang erat kaitannya dengan kandungan bahan aktif di dalam jamur tersebut. Respon tolerogenik ini terjadi ketika bahan aktif dalam *Agaricus blazei* Murrill yaitu β -glucan, polisakarida dan peptida-peptida lainnya berikatan dengan reseptor *TLR-2* dan *Dectin-1*. Akibat ikatan tersebut mengakibatkan peningkatan produksi sitokin supresif seperti $IL-10$, $TGF-\beta$, dan $IL-2$. Sitokin tersebut akan mengaktifasi sel *Treg* yang selanjutnya diikuti dengan sekresi sitokin supresif tersebut. Sitokin supresif atau bersifat anti-inflamasi ini memiliki kemampuan untuk mengurangi inflamasi, mereduksi ROS dan selanjutnya akan mengurangi perkembangan penyakit aterosklerosis.

7.4.5. Peningkatan Jumlah Relatif Sel T Regulator / *Treg*

Agaricus blazei Murrill merupakan jamur yang biasa dimanfaatkan dalam bidang kesehatan oleh negara oriental dan kebanyakan digunakan untuk terapi pada penyakit kanker (Firenzuoli et al. 2008). Banyak senyawa aktif yang terkandung dalam jamur ini dan telah diteliti manfaatnya dalam bidang

farmakologi. Senyawa tersebut seperti *polysaccharide compounds like β (beta -1,6-glucan, alpha-1,6- dan alpha-1,4-glucan, glucomannan, β -1,3-glucan* dan masih banyak lagi. β -glucan memiliki ukuran dan struktur yang beragam dan memiliki kemampuan sebagai *imunomodulator* (Yang et al. 1996; Shu dan Wen 2003). Hetland et al. (2013) membuktikan bahwa pemberian terapi menggunakan *Agaricus blazei* Murrill dapat meningkatkan sel *Treg* setelah 2 minggu perlakuan pada penderita *myeloma*. Ekstrak *Agaricus blazei* Murrill secara klinis berefek sebagai imunosupresif dan anti-inflamasi pada penderita *myeloma* yang menerima kemoterapi dosis tinggi. Serupa dengan penelitian tersebut, pada penelitian ini juga ditemukan bahwa ekstrak *Agaricus blazei* Murrill secara signifikan meningkatkan jumlah sel *Treg* pada *lien* mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak.

Sel *Treg* ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) merupakan kunci utama dalam toleransi imunitas dan mengatur fase induksi pada sistem imun (Lee dan Rifa'i 2011). Sel *Treg* $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ yang dibawa dari timus ditemukan dalam lesi aterosklerotik (Rohm et al. 2015). Dalam peranannya yang memiliki efek supresif, sel *Treg* membutuhkan *Foxp3* agar dapat bekerja. Kadar ekspresi *Foxp3* merupakan faktor utama yang mempengaruhi efek supresif sel *Treg* (Chauhan et al. 2009). Peningkatan jumlah sel *Treg* pada *lien* mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill mengindikasikan bahwa senyawa dalam jamur tersebut mampu memicu aktifasi dari sel *Treg*. Sel *Treg* yang mengekspresikan *Foxp3* memiliki peran anti-inflamasi dengan mensekresikan sitokin anti-inflamasi *IL-10* dan *TGF- β* (Kyaw et al. 2016).

7.5. Hasil Analisis of Variance (ANOVA)

Berikut disajikan hasil analisis of variance (ANOVA) berbasis satu variabel respon (*LpPLA2*) secara parsial, pada perbandingan antara kelompok kontrol dan terapi (pemberian dosis). Hasil analisis ANOVA secara lengkap disajikan pada Lampiran 3, dengan hasil sebagai berikut (adanya perbedaan yang signifikan terlihat jika nilai P-value < 0.05):

Tabel 7.1. Hasil ANOVA

No	Tipe pengujian	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	Parsial	<i>LpPLA2</i>	F = 57.571	0.000	Signifikan

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 3)

Hasil analisis di atas memperlihatkan bahwa secara simultan maupun parsial, adanya perbedaan kelompok (kontrol negatif, kontrol positif, pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murill dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB) akan berdampak pada perbedaan nilai *LpPLA2*. Pengujian lanjutan menggunakan *Least Significance Difference (LSD)*, diperoleh sebagai berikut:

1. Perbandingan *HFD* vs *ND*, diperoleh rata-rata *LpPLA2* kelompok *HFD* (*High Fat Diet*) rata-rata *LpPLA2* sebesar 18.04, dan kelompok *ND* (Normal Dosis) sebesar 5.44. Hasil pengujian *LSD* terlihat nilai *Sig* sebesar 0.000, artinya terdapat perbedaan nilai *LpPLA2* yang signifikan antara kelompok *HFD* dengan kelompok *ND*, dengan pemberian lemak (pada kelompok *HFD*), dapat meningkatkan nilai *LpPLA2* sebesar 12.6, atau dengan selang kepercayaan 95%, dengan pemberian lemak dapat meningkatkan *LpPLA2* pasien antara 10.81 hingga 14.39, dibandingkan dengan pasien kontrol (*ND*).

2. Perbandingan *HFD* vs Dosis (*D1-D2-D3*), hasil pengujian *LSD* terlihat nilai *sig HFD* vs *D1* sebesar 0.000, *sig HFD* vs *D2* sebesar 0.000, dan *sig*

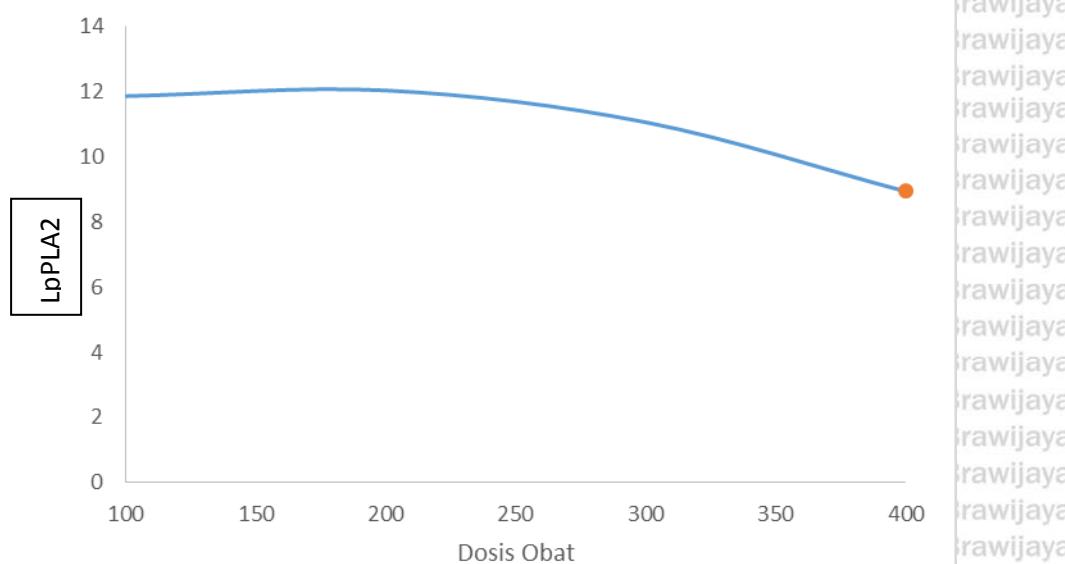
HFD vs D3 sebesar 0.000. Hal ini memperlihatkan bahwa nilai *LpPLA2* kelompok HFD lebih tinggi dibandingkan nilai *LpPLA2* kelompok pemberian dosis.

3. Perbandingan Dosis vs ND, hasil pengujian LSD terlihat nilai sig ND vs D1 sebesar 0.000, sig ND vs D2 sebesar 0.000, dan sig ND vs D3 sebesar 0.000. Hal ini memperlihatkan bahwa nilai *LpPLA2* kelompok diet normal / *normal diet* (ND).

- Dengan selang kepercayaan 95%, pemberian dosis 100 mg (D1), memberikan selisih perbedaan nilai *LpPLA2* antara 4.67 hingga 8.27 dibandingkan dengan kelompok ND.
- Dengan selang kepercayaan 95%, pemberian dosis 200 mg (D2), memberikan selisih perbedaan nilai *LpPLA2* antara 4.89 hingga 8.48 dibandingkan dengan kelompok ND.
- Dengan selang kepercayaan 95%, pemberian dosis 400 mg (D3), memberikan selisih perbedaan nilai *LpPLA2* antara 1.88 hingga 5.47 dibandingkan dengan kelompok ND.

Berdasarkan paparan di atas terlihat bahwa pemberian dosis 400 mg/kg BB akan memberikan hasil *LpPLA2* terendah dibandingkan pemberian dosis lain, dan nilainya cukup dekat dengan kelompok ND. Untuk mendapatkan berapa besar dosis optimal (terbaik), disajikan pada lampiran 3, dengan tingkat prediksi sebesar 56.2%. Dosis optimal terlihat pada kadar 400 mg/kg BB, akan diperoleh prediksi nilai *LpPLA2* terendah (Gambar 7.7). Adapun persamaan yang diperoleh sebagai berikut:

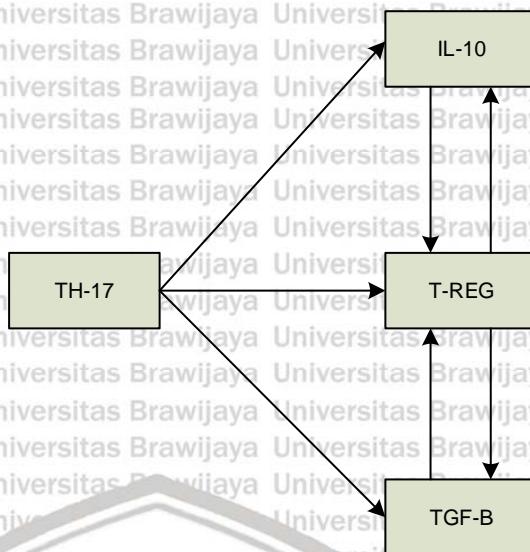
$$LpPLA2 = 10.54 + 0.019 \text{ Dosis} - 0.0000575 \text{ Dosis}^2$$



Gambar 7.7. Dosis Optimal pada Oksidasi (*LpPLA2*)

7.6. Hasil Path Analysis

Berdasarkan kerangka konseptual pada bab 3, terdapat kelompok pro inflamasi (*Th-17*) dan anti inflamasi (*IL-10*, *Treg*, dan *TGF-β*) dan terlihat *Th-17* berpengaruh terhadap *IL-10*, *TGF-β*, dan *Treg*. Di sisi lain, *IL-10* dan *TGF-β* berpengaruh terhadap *Treg*, dan berikutnya *Treg* berpengaruh terhadap *IL-10* dan *TGF-β*. Analisis yang tepat digunakan adalah *Path Analysis* (Analisis Jalur) dengan melibatkan variabel eksogen (variabel penyebab/prediktor/independen) yaitu *Th-17*, dan variabel endogen (variabel akibat/respon/dependen) yaitu *IL-10*, *TGF-β*, dan *Treg* (Gambar 7.8).

**Gambar 7.8 Diagram Path**

Hipotesis yang diuji adalah sebagai berikut:

1. *Th-17* berpengaruh terhadap *IL-10*
2. *Th-17* berpengaruh terhadap *TGF-β*
3. *Th-17* berpengaruh terhadap *Treg*
4. *IL-10* berpengaruh terhadap *Treg*
5. *TGF-β* berpengaruh terhadap *Treg*
6. *Treg* berpengaruh terhadap *IL-10*
7. *Treg* berpengaruh terhadap *TGF-β*

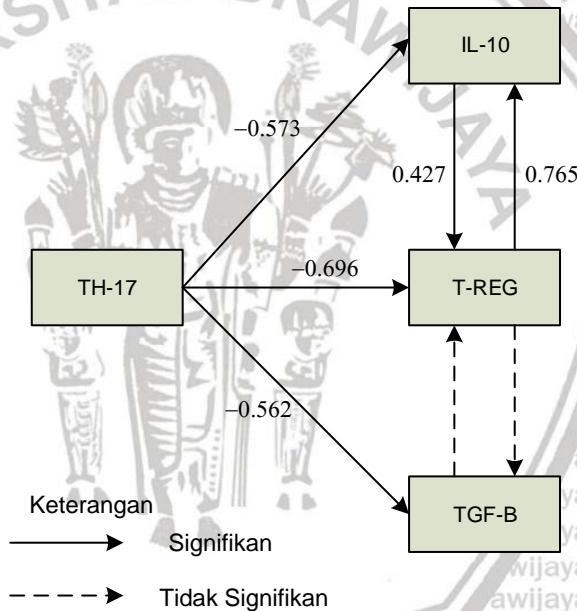
Tabel 7.2. Hasil Path Analysis

No	Variabel Penyebab	Variabel Akibat	Koefisien Path	P-value	Keterangan
1	<i>Th-17</i>	<i>IL-10</i>	-0.573	0.017	Signifikan Negatif
2	<i>Th-17</i>	<i>TGF-β</i>	-0.562	0.035	Signifikan Negatif
3	<i>Th-17</i>	<i>Treg</i>	-0.696	0.000	Signifikan Negatif
4	<i>IL-10</i>	<i>Treg</i>	0.427	0.010	Signifikan Positif
5	<i>TGF-β</i>	<i>Treg</i>	0.441	0.664	Tidak Signifikan
6	<i>Treg</i>	<i>IL-10</i>	0.765	0.017	Signifikan Positif
7	<i>Treg</i>	<i>TGF-β</i>	0.403	0.121	Tidak Signifikan
$R^2_{IL-10} = 0.363$					

$R^2_{TGF-B} = 0.189$	$R^2_{TREG} = 0.618$	$R^2_{total} = 1 - (1-0.363)(1-0.189)(1-0.618) = 0.8026 = 80.26\%$
-----------------------	----------------------	--

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 4)

Koefisien determinasi total sebesar 80.26%, artinya sebesar 80.26% keragaman total dapat dijelaskan pada *Path Analysis* pada tabel 7.2, sedangkan sisanya 14.08% yang tidak mampu dijelaskan oleh *Path Analysis* (adanya 14.08% variabel yang tidak teramat dalam *Path Analysis*). Koefisien determinasi > 75% mengindikasikan model yang diperoleh sangat bagus, dengan rincian $R^2 > 75\%$ sangat bagus, R^2 antara 50-75% bagus, R^2 kurang dari 50% model kurang bagus (Hair, et. al, 2010).



Gambar 7.9. Hasil Analisis

Berdasarkan diagram *Path Analysis* pada gambar 7.9. dapat dijelaskan yaitu: Pertama, pada pengujian *Th-17* terhadap *IL-10*, diperoleh koefisien *path* sebesar -0.573, dan P-value sebesar 0.017. Karena P-value < 0.05 dan koefisien *path* bertanda negatif mengindikasikan adanya pengaruh *Th-17* yang signifikan dan negatif terhadap *IL-10*. Semakin tinggi nilai *Th-17*, akan mengakibatkan

semakin rendah (menurun) nilai $IL-10$. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah nilai $Th-17$, akan mengakibatkan semakin tinggi (meningkat) nilai $IL-10$. Kedua, pada pengujian $Th-17$ terhadap $TGF-\beta$, diperoleh koefisien $path$ sebesar -0.562, dan P-value sebesar 0.035. Karena P-value < 0.05 dan koefisien $path$ bertanda negatif mengindikasikan adanya pengaruh $Th-17$ yang signifikan dan negatif terhadap $TGF-\beta$. Semakin tinggi nilai $Th-17$, akan mengakibatkan semakin rendah (menurun) nilai $TGF-\beta$. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah nilai $Th-17$, akan mengakibatkan semakin tinggi (meningkat) nilai $TGF-\beta$.

Ketiga, pada pengujian $Th-17$ terhadap $Treg$, diperoleh koefisien $path$ sebesar -0.696, dan P-value sebesar 0.000. Karena P-value < 0.05 dan koefisien $path$ bertanda negatif mengindikasikan adanya pengaruh $Th-17$ yang signifikan dan negatif terhadap $Treg$. Semakin tinggi nilai $Th-17$, akan mengakibatkan semakin rendah (menurun) nilai $Treg$. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah nilai $Th-17$, akan mengakibatkan semakin tinggi (meningkat) nilai $Treg$.

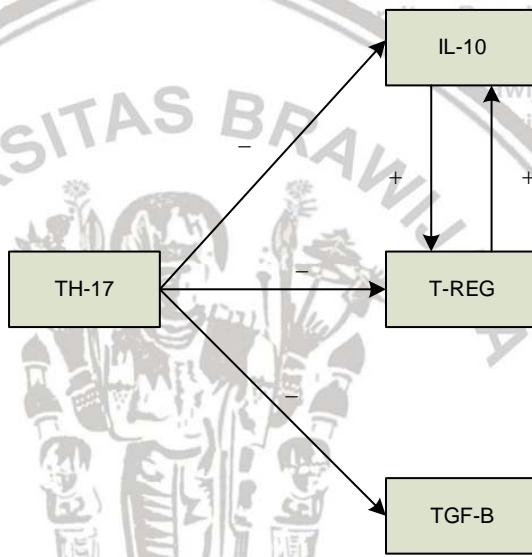
Keempat, pada pengujian $IL-10$ terhadap $Treg$, diperoleh koefisien $path$ sebesar 0.427, dan P-value sebesar 0.010. Karena P-value < 0.05 dan koefisien $path$ bertanda positif mengindikasikan adanya pengaruh $IL-10$ yang signifikan dan positif terhadap $Treg$. Hal ini memperlihatkan bahwa semakin tinggi nilai $IL-10$, akan mengakibatkan semakin tinggi pula $Treg$.

Kelima, pada pengujian $TGF-\beta$ terhadap $Treg$, diperoleh koefisien $path$ sebesar 0.441, dan P-value sebesar 0.664. Karena P-value > 0.05 mengindikasikan tidak terdapat pengaruh $TGF-\beta$ terhadap $Treg$ (dari Path Analysis terlihat bahwa tidak ada pengaruh langsung antara $TGF-\beta$ terhadap $Treg$).

Keenam, pada pengujian $Treg$ terhadap $IL-10$, diperoleh koefisien $path$ sebesar 0.765, dan P-value sebesar 0.017. Karena P-value < 0.05 dan koefisien

path bertanda positif mengindikasikan adanya pengaruh *Treg* yang signifikan dan positif terhadap *IL-10*. Hal ini memperlihatkan bahwa semakin tinggi nilai *Treg*, akan mengakibatkan semakin tinggi pula *IL-10*.

Ketujuh, pada pengujian *Treg* terhadap *TGF-β*, diperoleh koefisien *path* sebesar 0.403, dan P-value sebesar 0.121. Karena P-value > 0.05 mengindikasikan tidak terdapat pengaruh *Treg* terhadap *TGF-β* (dari *Path* Analysis terlihat bahwa tidak ada pengaruh langsung antara *Treg* terhadap *TGF-β*.



Gambar 7.10. Model Temuan

Hasil *Path Analysis* ini menemukan bahwa sel *Th-17* yang tinggi akan

menyebabkan penurunan jumlah sitokin *IL-10*, *TGF-β*, dan sel *Treg*. Nilai *IL-10* yang semakin tinggi akan mengakibatkan tingginya nilai *Treg*, dan sebaliknya dengan nilai *Treg* yang tinggi akan mampu meningkatkan *IL-10*. Penelitian ini menemukan bahwa antara sel *T-regulator* dan sitokin *TGF-β* tidak saling berpengaruh.

7.7. Hasil Multivariate Analysis of Variance (MANOVA)

Jika pada bab sebelumnya, analisis of variance (ANOVA) dikerjakan berbasis lima variabel respon (*Th-17*, *Treg*, *IL-10*, dan *TGF-β*) secara parsial, padahal ditemukan bahwa antara keempatnya (pro inflamasi dan anti inflamasi) saling berkorelasi (hasil *Path Analysis*), sehingga diperlukan pengujian secara simultan (menggunakan nilai respon keempat secara serempak yaitu *Th-17*, *Treg*, *IL-10*, dan *TGF-β*). Analisis ini dikenal dengan MANOVA. Hasil analisis MANOVA secara lengkap disajikan pada Lampiran 3, dengan hasil sebagai berikut (adanya perbedaan yang signifikan terlihat jika nilai P-value < 0.05):

Tabel 7.3. Hasil MANOVA

No	Tipe pengujian	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	Simultan	<i>Th-17</i> , <i>Treg</i> , <i>IL-10</i> , dan <i>TGF-β</i>	Wils Lambda = 52.573	0.000	Signifikan
2	Parsial	<i>Th-17</i>	F = 31.389	0.000	Signifikan
3	Parsial	<i>IL-10</i>	F = 30.747	0.000	Signifikan
4	Parsial	<i>TGF-β</i>	F = 82.806	0.000	Signifikan
5	Parsial	<i>Treg</i>	F = 55.529	0.000	Signifikan

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

Hasil analisis pada tabel 9.3. di atas memperlihatkan bahwa secara simultan maupun parsial, adanya perbedaan kelompok (kontrol negatif, kontrol positif, pemberian dosis 100 mg, 200 mg, dan 400 mg) akan berdampak pada perbedaan nilai *Th-17*, *Treg*, *IL-10*, dan *TGF-β*. Pengujian secara parsial secara detail tersaji pada Gambar 6.3.1 sampai 6.3.7 (bab 6). Pada subbab ini fokus pada pengujian secara simultan (MANOVA), agar dapat kesimpulan yang lebih komprehensif. Karena adanya perbedaan yang signifikan, maka diperlukan perbandingan lanjutan (*post hoc*) untuk pengujian manakah perlakuan yang baik. Mengingat perlakuan (kelompok) yang dipakai pada jenjang yang berbeda

- (ada kontrol negatif, positif, pemberian dosis pada berbagai tingkatan), sehingga pengujian lanjutan menggunakan ortogonal kontras, dengan perbandingan sebagai berikut:
1. Membandingkan hasil pada kelompok *HFD* vs *ND*
 2. Membandingkan hasil pada kelompok *HFD* vs Dosis
 3. Membandingkan hasil pada kelompok Dosis vs *ND*
 4. Membandingkan hasil pada kelompok Dosis 100 mg/kg BB vs *ND*
 5. Membandingkan hasil pada kelompok Dosis 200 mg/kg BB vs *ND*
 6. Membandingkan hasil pada kelompok Dosis 400 mg/kg BB vs *ND*

7.7.1. Ortogonal Kontras 1 (*HFD* vs *ND*)

Hasil pengujian pada tabel 9.4 memperlihatkan bahwa nilai P-value 0.000 < 0.05 mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok *HFD* vs kelompok *ND*. Secara parsial terlihat bahwa dengan pemberian makanan berlemak (pada *HFD*), akan meningkatkan secara signifikan 55% nilai *Th-17*, serta menurunkan masing-masing nilai *IL-10* dan *Treg* sebesar 25% dan 44%.

Akan tetapi (agak unik), nilai *TGF-β* kelompok pasien *HFD* dibandingkan *ND* malah menurun 119% (untuk selanjutkan, dimungkinkan tidak mempertimbangkan *TGF-β*, karena hasil *Path Analysis* memperlihatkan bahwa *TGF-B* tidak saling berpengaruh terhadap sesama anti inflamasi).

Tabel 7.4. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 1 (*HFD* vs *ND*)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	<i>TH-17</i> , <i>TREG</i> , <i>IL-10</i> , dan <i>TGF-B</i>	T-Hoteling = 105.258	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata <i>ND</i>	Rata-rata <i>HFD</i>	Perse Perubahan <i>ND</i> terhadap <i>HFD</i>
2	<i>TH-17</i>	3.13	4.85	55%
3	<i>IL-10</i>	24.65	18.50	-25%

4	TGF-B	10.27	22.52	119%
5	TREG	44.81	25.10	-44%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.7.2. Ortogonal Kontras 2 (*HFD vs Dosis*)

Hasil pengujian pada tabel 7.5 memperlihatkan bahwa nilai P-value 0.000 < 0.05 mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok *HFD* vs kelompok Dosis. Secara parsial terlihat bahwa tanpa pemberian dosis obat (pada *HFD*), akan menurunkan secara signifikan 22% nilai *Th-17*, serta meningkatkan masing-masing nilai *TGF-β* dan *Treg* sebesar 31% dan 2%. Akan tetapi (agak unik), nilai *IL-10* kelompok pasien *HFD* dibandingkan Dosis malah menurun 54% (untuk selanjutkan, dimungkinkan tidak mempertimbangkan *IL-10*).

Tabel 7.5. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 2 (*HFD vs Dosis*)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	TH-17, TREG, IL-10, dan TGF-β	T-Hoteling = 34.742	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata <i>HFD</i>	Rata-rata Dosis	Per센 Perubahan Dosis terhadap <i>HFD</i>
2	<i>Th-17</i>	4.85	3.77	-22%
3	<i>IL-10</i>	18.50	14.45	-22%
4	<i>TGF-β</i>	22.52	29.41	31%
5	<i>Treg</i>	25.10	25.55	2%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.7.3. Ortogonal Kontras 3 (*Dosis vs ND*)

Hasil pengujian pada tabel 7.6 memperlihatkan bahwa nilai P-value 0.000 < 0.05 mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok Dosis vs kelompok *ND*. Secara parsial terlihat bahwa dengan pemberian makanan berlemak disertai pemberian dosis, akan meningkatkan secara signifikan 20% nilai *Th-17*, serta menurunkan masing-masing nilai *IL-10* dan *Treg*.

sebesar 41% dan 43%. Akan tetapi (agak unik), nilai $TGF-\beta$ kelompok pasien Dosis dibandingkan ND malah meningkat 186%.

Tabel 7.6. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 3 (Dosis vs ND)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	<i>Th-17</i> , <i>Treg</i> , <i>IL-10</i> , dan <i>TGF-β</i>	T-Hoteling = 410.64	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata	Rata-rata	Persen Perubahan
		<i>ND</i>	Dosis	Dosis terhadap <i>ND</i>
2	<i>Th-17</i>	3.13	3.77	20%
3	<i>IL-10</i>	24.65	14.45	-41%
4	<i>TGF-β</i>	10.27	29.41	186%
5	<i>Treg</i>	44.81	25.55	-43%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.7.4. Ortogonal Kontras 4 (Dosis 100 mg/mg BB vs ND)

Hasil pengujian pada tabel 7.7 memperlihatkan bahwa nilai P-value 0.000 < 0.05 mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok Dosis 100 mg/kg BB (separuh dari dosis normal) vs kelompok ND. Secara parsial terlihat bahwa dengan pemberian makanan berlemak disertai pemberian dosis 100 mg (separuh dari dosis normal), akan meningkatkan secara signifikan 25% nilai *Th-17*, serta juga meningkatkan masing – masing nilai *IL-10* dan *Treg* sebesar 50% dan 8%. Di sisi lain, nilai *TGF-β* kelompok pasien Dosis 100 mg (separuh dari dosis normal) dibandingkan ND akan meningkat 280%.

Tabel 7.7. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 4 (Dosis 100 mg (separuh dari dosis norma I) vs ND)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	Th-17, <i>Treg</i> , <i>IL-10</i> , dan <i>TGF-β</i>	T-Hotelting = 429.014	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata <i>ND</i>	Rata-rata Dosis 100 mg (separuh dari dosis normal)	Persen Perubahan Dosis 100 mg (separuh dari dosis normal) terhadap <i>ND</i>
2	<i>Th-17</i>	3.13	2.34	-25%
3	<i>IL-10</i>	24.65	12.38	-50%
4	<i>TGF-β</i>	10.27	38.99	280%
5	<i>Treg</i>	44.81	41.16	-8%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.7.5. Ortogonal Kontras 5 (Dosis 200 mg/kg BB vs ND)

Hasil pengujian pada tabel 7.8. memperlihatkan bahwa nilai P-value $0.000 < 0.05$ mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok Dosis 200 mg/kg BB (dosis normal) vs kelompok *ND*. Secara parsial terlihat bahwa dengan pemberian makanan berlemak disertai pemberian dosis 200 mg/kg BB (dosis normal), akan meningkat secara signifikan 59% nilai *Th-17*, serta juga menurunkan masing-masing nilai *IL-10* dan *Treg* sebesar 46% dan 58%. Di sisi lain, nilai *TGF-β* kelompok pasien Dosis 200 mg/kg BB (dosis normal) dibandingkan *ND* akan meningkat 42%.

Tabel 7.8. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 5 (Dosis 200 mg (dosis normal) vs ND)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	<i>Th-17, Treg, IL-10, dan TGF-β</i>	T-Hoteling = 429.014	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata ND	Rata-rata Dosis 200 mg (dosis normal)	Persen Perubahan Dosis 200 mg (dosis normal) terhadap ND
2	<i>Th-17</i>	3.13	4.98	59%
3	<i>IL-10</i>	24.65	13.41	-46%
4	<i>TGF-β</i>	10.27	14.6	42%
5.	<i>Treg</i>	44.81	18.81	-58%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.7.6 Ortogonal Kontras 6 (Dosis 400 mg/kg BB vs ND)

Hasil pengujian pada tabel 7.9. memperlihatkan bahwa nilai P-value $0.000 < 0.05$ mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok Dosis 400 mg/kg BB (dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal)) vs kelompok ND. Secara parsial terlihat bahwa dengan pemberian makanan berlemak disertai pemberian dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal), akan meningkatkan secara signifikan 28% nilai *Th-17*, serta juga menurunkan masing-masing nilai *IL-10* dan *Treg* sebesar 29% dan 63%. Di sisi lain, nilai *TGF-β* kelompok pasien Dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal) dibandingkan ND akan meningkat 237%.



Tabel 7.9. Hasil MANOVA Lanjutan: Kontras 6 (Dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal) vs ND)

No	Variabel Respon	Statistik Uji	P-value	Keterangan
1	<i>Th-17</i> , <i>Treg</i> , <i>IL-10</i> , dan <i>TGF-β</i>	T-Hotelting = 429.014	0.000	Signifikan
No	Variabel Respon	Rata-rata <i>ND</i>	Rata-rata Dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal)	Persen Perubahan Dosis 400 mg (dua kali dari dosis normal) terhadap <i>ND</i>
2	<i>Th-17</i>	3.13	4.00	28%
3	<i>IL-10</i>	24.65	17.56	-29%
4	<i>TGF-β</i>	10.27	34.64	237%
5	<i>Treg</i>	44.81	16.70	-63%

Sumber: Data Primer Diolah (2017), (Lampiran 5)

7.8. Dosis Optimal

Permasalahan yang timbul pada hasil analisis MANOVA (kontras 3-6)

adalah manakah yang lebih baik antara dosis rendah dan dosis tinggi. Sehingga

diperlukan alat analisis yang lebih komprehensif untuk mendapatkan berapa

besar dosis optimal (terbaik). Mengingat 4 variabel yang diuji secara sekaligus,

diperlukan reduksi dimensi menggunakan analisis faktor. Mengingat hasil skor

faktor dengan koefisien sebagai berikut:

$$\text{Inflamasi} = 0.813 \text{ } Th-17 - 0.402 \text{ } IL-10 - 0.043 \text{ } TGF-β - 0.945 \text{ } Treg$$

Semakin tinggi nilai skor inflamasi mengindikasikan semakin tinggi skor

Th-17, dan semakin rendah skor *IL-10*, *TGF-β*, dan *Treg*, sebaliknya semakin

rendah nilai skor inflamasi mengindikasikan semakin rendah nilai *Th-17*, dan

semakin tinggi skor *IL-10*, *TGF-β*, dan *Treg* (gambar 9.5). Pemilihan model

terbaik untuk mendapatkan dosis optimal (berbasis R^2) tertinggi adalah model

kuadratik (atau kubik, tetapi dari prinsip parsimoni, terpilih model kuadratik yang

106

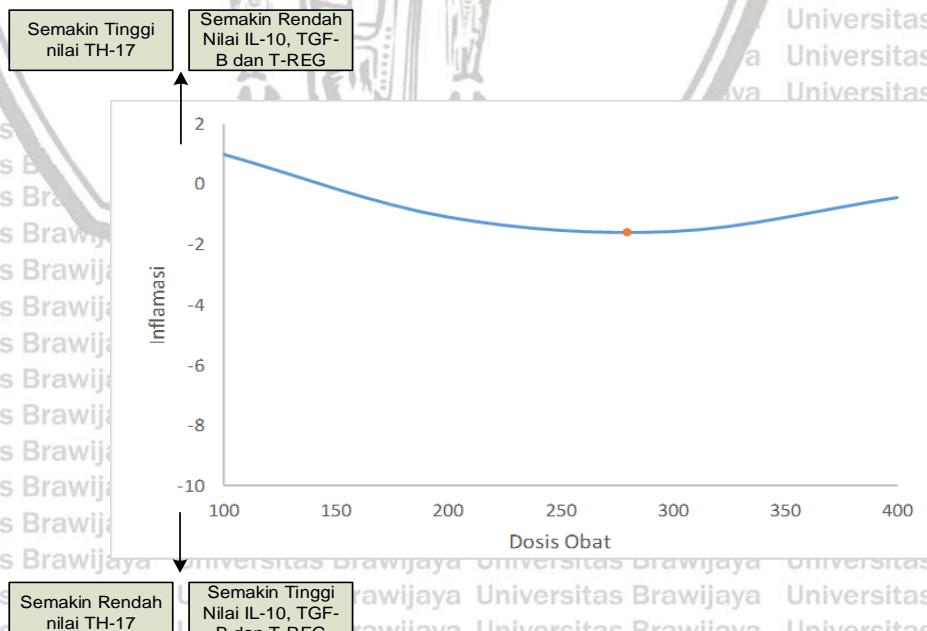
lebih sederhana), dengan R^2 tertinggi yaitu 97.9%. Adapun persamaan yang diperoleh sebagai berikut:

$$\text{Inflamasi} = 4.704 - 0.045 \text{ Dosis} + 0.0000804 \text{ Dosis}^2$$

Untuk mendapatkan dosis optimal, diperoleh dengan cara menurunkan (diferensial) persamaan di atas, dan menyamakan dengan nol sehingga diperoleh dosis optimal sebagai berikut:

$$\text{Dosis-optimal} = (-(-0.045))/(2 \times 0.0000804) = 279 \text{ mg/kg BB}$$

Berdasarkan hasil di atas, diperoleh dosis optimal untuk menekan kondisi inflamasi yaitu 279 mg/kg BB, dimana dosis ini mampu memberikan hasil terbaik yaitu dengan, *Th-17* terendah dan *TGF- β* , *IL-10*, dan *Treg* tertinggi. Namun dosis optimal tersebut hanya mengukur marker – marker yang terkait pada kondisi inflamasi (*Th-17*, *Treg*, *IL-10*, dan *TGF- β*), dan tidak mengukur marker – marker pada kondisi oksidasi (*LpPLA2*) dimana aterosklerosis diawali dengan adanya tingkat stres oksidatif yang tinggi akibat akumulasi *LDL* yang tinggi. Untuk itu analisis lebih lanjut dibutuhkan untuk mendapatkan dosis yang lebih optimal yang bekerja pada dua kondisi tersebut.

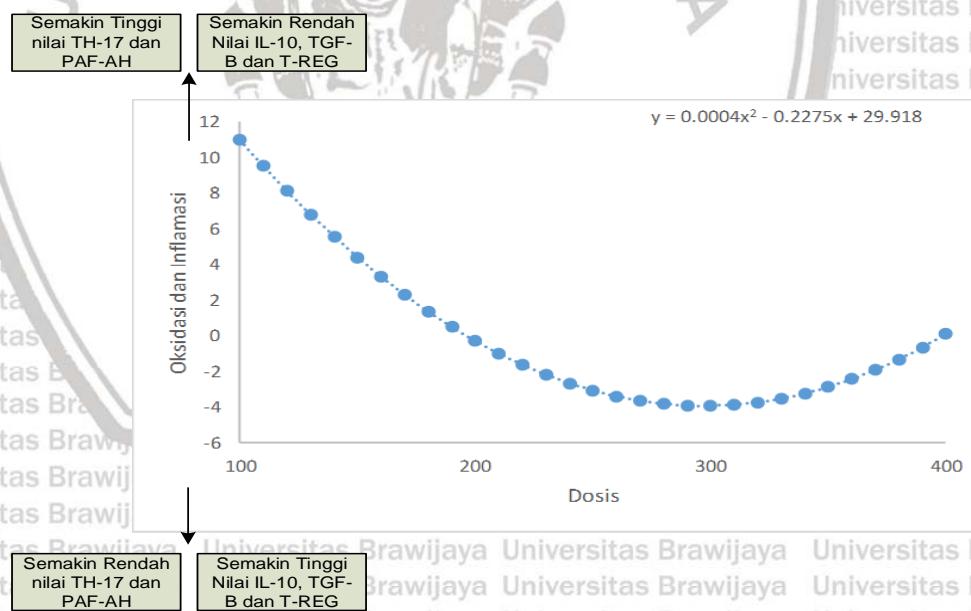


Gambar 7.11. Dosis Optimal pada Kondisi Inflamasi

Analisis lebih lanjut tersebut dilakukan dengan cara menggabungkan marker oksidasi (*LpPLA2*), dan marker – marker inflamasi (*Th-17*, *Treg*, *IL-10*, dan *TGF-β*) (Gambar 7.11.). Untuk mendapatkan dosis optimal tersebut, diperoleh dengan cara menurunkan (diferensial) persamaan inflamasi di atas, dan menyamakan dengan nol sehingga diperoleh dosis optimal sebagai berikut:

$$\text{Dosis-optimal} = (-(-0.2275))/(2 \times 0.0004) = 285 \text{ mg/kg BB}$$

Berdasarkan hasil tersebut, didapatkan bahwa dosis optimal untuk menekan proses oksidasi (*LpPLA2*), dan inflamasi (penurunan *Th-17*, peningkatan *Treg*, *IL-10*, dan *TGF-β*) yaitu 285 mg/kg BB. Dosis ini mampu mencegah penyakit ateroklerosis yaitu dengan menurunkan *LpPLA2* dan sel *Th-17* dan meningkatkan sitokin anti inflamasi *TGF-β*, dan *IL-10* serta meningkatkan ekspresi sel *Treg*.



Gambar 7.12. Dosis Optimal pada Kondisi Oksidasi dan Inflamasi

7.9. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian tahap III ini adalah *Agaricus blazei* Murrill secara signifikan bekerja lebih utama dengan menurunkan tingkat oksidasi sel melalui penurunan enzim *Lp-PLA2* dan sel *Th17*, meningkatkan ekspresi sel *Treg* ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$), meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi *IL-10*, dan menurunkan produksi sitokin pro inflamasi *IL-17* pada mencit dengan diet tinggi lemak.



BAB 8

PEMBAHASAN UMUM

Penelitian ini memfokuskan pada tiga titik tangkap dalam penghambatan aterosklerosis, yaitu pertama dengan cara menurunkan stres oksidasi yang dapat diamati dengan melihat penurunan jumlah relatif *LpPLA2*; kedua dengan melihat penurunan sel – sel *Th17* yang ditandai dengan penurunan jumlah relatif *IL-17A* yang dihasilkannya; dan ketiga dengan melihat peningkatan jumlah relatif sel – sel *Treg* yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah relatif sel – sel *Treg* itu sendiri, maupun sitokin – sitokin yang dihasilkannya, yaitu *Treg* dan *IL-10*.

Pada penelitian ini ditemukan bukti bahwa dari beberapa bioaktif yang terdapat di dalam *Agaricus blazei* Murrill, yang paling menonjol adalah β -glucan (daripada agaritin) oleh karena : (1) Punya 2 reseptor dengan ikatan yang kuat yaitu: *Dectin-1* dan *TLR2* (agaritin hanya berikatan dengan reseptor *TLR2* dan tidak berikatan dengan reseptor *Dectin-1*). (2) Jumlah β -glucan di dalam *Agaricus blazei* Murrill jauh lebih banyak yaitu 12,4g / 100g *Agaricus blazei* Murrill vs 0,00153g / 100g *Agaricus blazei* Murrill (~ 8104,58 kali lebih banyak daripada agaritin). (3) Energi ikatan yang diperlukan β -glucan untuk ‘docking’ dengan reseptor *TLR2/1* lebih kecil yaitu -8,1 vs agaritin yang memerlukan energy ikatan sbesar -7,7 pada reseptor yang sama.

Lipoprotein-associated phospholipase A2 (*Lp-PLA2*) merupakan anggota *superfamily phospholipase A2* yang unik. Penelitian klinis dan epidemiologik sebelumnya menunjukkan bahwa *Lp-PLA2* banyak digunakan sebagai biomarker pada kasus – kasus kardiovaskular karena hubungannya dengan penyakit stroke dan jantung (Sabatine et al., 2007). *Lp-PLA2* menghidrolisis *oxidized phospholipids* pada *oxLDL* sebagai respon terhadap dua kunci utama mediator pro-inflamasi *lysophatidylcholines* (*lysoPCs*) dan

oxidized non-esterified fatty acids (oxNEFAs) dimana kedua mediator tersebut memainkan peranan penting dalam proses aterogenesis. *LysoPCs* akan menghasilkan pembentukan *ROS* dan mengatur ekspresi sitokin pro inflamasi dan molekul adesi (Davis et al., 2008). *Lp-PLA2* diekspresikan oleh makrofag pada lesi aterosklerotik. *Lp-PLA2* secara signifikan meningkat pada beberapa penyakit jantung. Adanya *oxLDL* dapat menginduksi ekspresi *Lp-PLA2* yang digabungkan dengan pemahaman sebelumnya bahwa akumulasi *oxLDL* pada plak aterosklerotik, dapat menjelaskan mekanisme ekspresi *Lp-PLA2* yang meningkat selama perkembangan aterosklerosis (Wang et al., 2010). Hal ini sangat sesuai dengan penemuan pada penelitian ini, dimana ekspresi *Lp-PLA2* secara signifikan meningkat karena pemberian diet tinggi lemak pada mencit. Regulasi *Lp-PLA2* ini sangatlah penting dalam perkembangan penyakit aterosklerosis, karena dengan menurunnya enzim ini maka tingkat stress oksidatif sel pada penyakit aterosklerosis dapat ditekan. Penghambatan *Lp-PLA2* dapat menurunkan ekspresi gen inflamasi yang disebabkan oleh *oxLDL* dan menurunkan toksitas *oxLDL* dalam arteri.

Penelitian ini menggunakan mencit *Balb/c* yang diinduksi dengan konsumsi lemak tinggi untuk mendapatkan model mencit aterosklerosis. Hasilnya memperlihatkan bahwa mencit dengan pemberian perlakuan *High Fat Diet* (*HFD*) memproduksi enzim *Lp-PLA2* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan mencit sehat. Hal ini menunjukkan bahwa induksi diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif, yang ditandai dengan tingginya produksi enzim *Lp-PLA2*. Enzim *Lp-PLA2* dihasilkan sebagai suatu bentuk respon terhadap stimulasi *oxLDL* khususnya *oxPC* yang merupakan substrat *Lp-PLA2* (Shii et al., 2009; Wang et al., 2009). Pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill pada dosis D3 (400 mg/kg BB) pada mencit dengan diet tinggi lemak

terbukti menyebabkan penurunan jumlah relatif enzim *LpPLA2* yang bermakna ($p<0.05$) hingga mendekati jumlah normal pada mencit sehat. Dari data ini dapat ditafsirkan bahwa ketiga dosis ekstrak *Agaricus blazei* Murrill sama-sama dapat menurunkan kadar *Lp-PLA2*, tetapi yang lebih optimal hanya pada dosis D3.

Sel *Th17* yang menghasilkan sitokin *IL-17* diketahui sangat berhubungan dengan respon proinflamasi dan perkembangan atherosklerosis (Dart et al., 2010). Beberapa penelitian membuktikan bahwa respon imun terhadap *oxLDL* yang berlebihan akan meningkatkan ekspresi jalur *Th17*. Lebih detail Lim et al. (2014) menemukan bahwa mencit yang kekurangan gen pengkode reseptor *LDL* dan enzim apolipoprotein *mRNA* akan menyebabkan hiperlipidemia dan atherosklerosis dengan peningkatan sitokin *IL-17*. Adanya *oxLDL* akan meningkatkan produksi sitokin *IL-6* yang mana akan menginduksi diferensiasi sel *Th17*. Lebih jauh lagi, adanya produksi berlebihan (overproduksi) dari *ROS* pada penyakit atherosklerosis akan menginduksi respon *cAMP element-binding protein-dependent IL-17* (Kotla et al., 2013) yang mengindikasikan adanya peran *IL-17* dalam inflamasi pembuluh darah. Pada penelitian ini membuktikan dengan adanya akumulasi *LDL* akibat diet tinggi lemak pada mencit menyebabkan ekspresi sitokin *IL-17* menjadi meningkat. Salah satu target yang sangat potensial untuk mengatasi penyakit atherosklerosis adalah dengan meningkatkan ekspresi sel *Treg* yang nantinya diharapkan dapat menekan ekspresi sitokin pro-inflamasi *IL-17* melalui hambatan langsung atau melalui sitokin supresif yang dihasilkannya yaitu *IL-10* dan *TGF-β*.

Beberapa penelitian menyebutkan adanya korelasi negatif antara jumlah *Th17* dan sel *Treg* pada pasien – pasien dengan lesi atherosklerotik. Hal ini menunjukkan bahwa adanya mekanisme sel *Treg* dalam meregulasi atherosklerosis, yaitu dengan menghambat sel *Th17* (Zheng et al., 2012). Sitokin



inhibitor *IL-10* dan *TGF-β* secara kuat berperan dalam efek supresif sel *Treg* dalam penyakit aterosklerosis. Sel *Treg* yang menghasilkan *IL-10* akan menurunkan respon imun pada mencit *ApoE*- dengan cara menurunkan ukuran plak dan menekan inflamasi yang ditunjukkan dengan rendahnya produksi sitokin *IFN-γ* (Mallat et al., 2003). Hal ini juga sejalan dengan penemuan pada penelitian ini bahwa adanya peningkatan sel *Treg* yang disebabkan oleh pemberian ekstrak

Agaricus blazei Murrill akan menurunkan inflamasi pada mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak (ditandai dengan penurunan jumlah relatif sitokin *IL-17*). Peningkatan sel *Treg* tersebut melibatkan sitokin anti-inflamasi yang dihasilkannya yaitu *IL-10* setelah pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill. Hal ini mengindikasikan bahwa terdapat korelasi antara sel *Treg* dengan sitokin pro-inflamasi *IL-17* dan sitokin anti-inflamasi *IL-10* yang berefek pada pencegahan penyakit aterosklerosis.

β -glucan merupakan polisakarida yang paling banyak ditemukan pada beberapa jamur. Berdasarkan ikatan *glycosidic*, β -(1→3)-(1→6)-glucan merupakan yang paling sering diteliti berdasarkan efektifitasnya dalam peranannya sebagai imunomodulator (Wacker 2002; Rop et al. 2009). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa struktur *triple helix* pada β -(1→3)-(1→6)-glucan berhubungan dengan aktifitasnya dalam memodulasi sistem imun. β -glucan juga terlibat dalam pengaturan sistem metabolisme yang berhubungan dengan lemak dan gula. Hal ini mengindikasikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill memiliki potensi tinggi dalam mengatur sistem imun dan proses metabolisme (Rop et al., 2009). Menurut McCleary dan Draga (2016), ada variasi β -glucan berdasarkan dengan struktur rantai dan protein didalamnya.

Adanya indikasi bahwa kandungan β -glucan pada *Agaricus blazei* Murrill yang tinggi dibandingkan dengan jamur makanan yang lain tetapi tidak berarti bahwa jamur lain tersebut tidak mengandung komponen glucan. Pada penelitian ini,

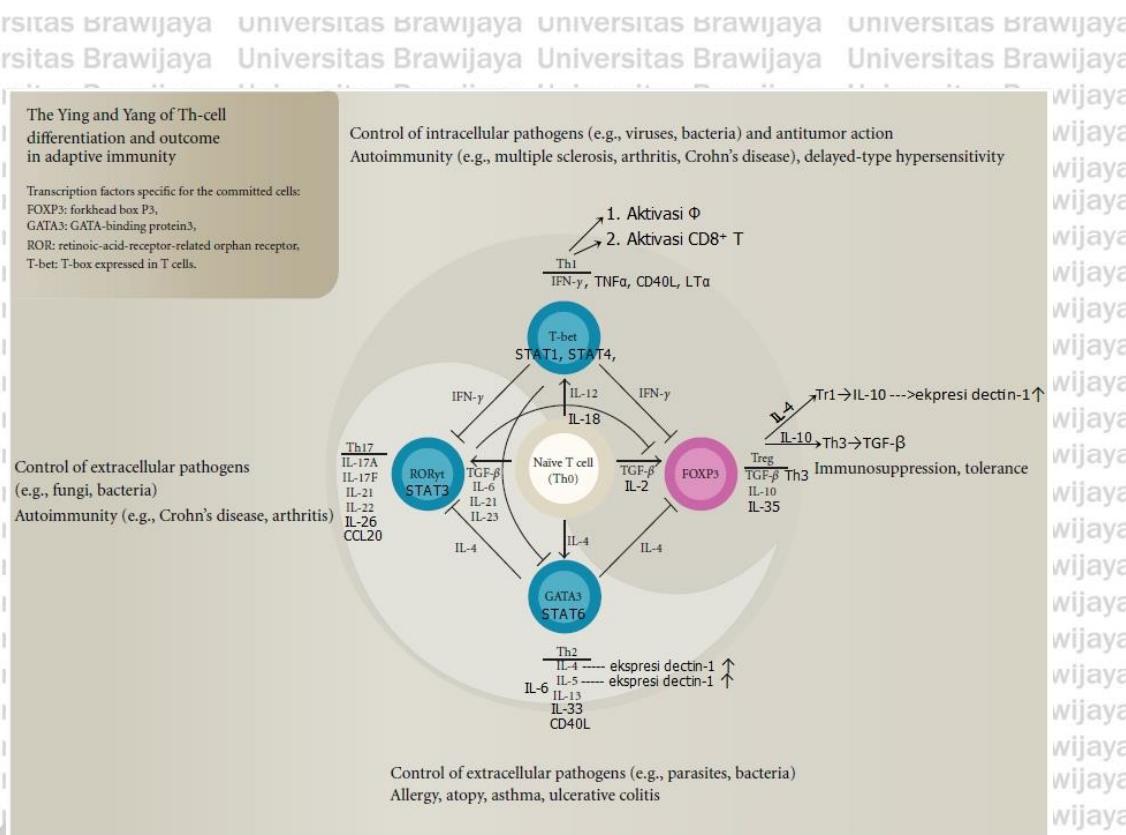
larutan β -D-glucan standar hanya digunakan sebagai marker yang selanjutnya hanya struktur β -sheet pada glucan yang terdeteksi dan dihitung. Menurut Li et al. (2004), campuran polisakarida dan ikatan protein dalam *Agaricus blazei* Murrills berpotensi dalam melawan penyakit kardiovaskular. Beberapa penelitian telah membuktikan potensi dari jamur *Agaricus blazei* Murrill dalam mencegah proses aterogenesis melalui tiga jalur yaitu melalui perbaikan dislipidemia (Ellegard dan Anderson 2007; Nilsson et al. 2007), perbaikan kerusakan endotel yang berhubungan dengan dislipidemia (Roupas et al. 2012), dan aktivitas antioksidan dari senyawa aktif seperti β -glucan, phenolic, dan flavonoid pada *Agaricus blazei* Murrill (Dimitros 2006; Carvajal et al., 2012). Aktivitas antioksidan dari flavonoid *Agaricus blazei* Murrill akan mencegah oksidasi dari LDL, yang juga secara otomatis mencegah aktivasi dan perekran imunitas adaptif (Entin-Meer et al., 2009).

Bioaktivitas β -glucan sebagai agen ateroprotektif melalui jalur anti inflamasi mengindikasikan kemampuannya dalam berikatan dengan reseptor Dectin-1 dan TLR2 , khususnya β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan. Menurut Tontowiputro et al. (2017), β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan berikatan dengan TLR2, dengan nilai afinitas -8.1 Kcal/mol. Afinitas tersebut lebih kuat daripada ikatan FIP terhadap TLR2. Struktur β -glucan ini sangat potensial untuk mengaktifasi TLR2 dan Dectin-1. Toll Like receptor (TLR) tipe 2 dapat menginduksi peningkatan sitokin supresor secara signifikan dan menaikkan fungsi Treg (Zanin-Zhorov et al., 2006). Kolaborasi TLR2 dan dectin-1 dapat menyeimbangkan respon imun pro dan anti inflamasi (Goodridge dan Underhill 2008). Hasil dari penelitian ini mengindikasikan potensi *Agaricus blazei* Murrill pada pencegahan penyakit kardiovaskular, khususnya pada aterosklerosis, berdasarkan kandungan β -glucan yang tinggi pada jamur tersebut. Analisis UV-Vis Spectrophotometry pada penelitian ini menunjukkan bahwa *Agaricus blazei* Murrill berpotensi

sebagai sumber β -glucan yang tinggi dibandingkan dengan jamur makanan yang lain (*Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*). Fungsi efektor sel *Treg* sangat erat kaitannya dengan pengaruh dari sitokin supresif *TGF- β* dan *IL 10*. Sel *Treg* menghasilkan beberapa sitokin seperti *IL-10*, *TGF- β* yang berfungsi untuk menghambat aktifitas sel T (Rifai dan Widodo, 2014). *IL-10* merupakan sitokin antiinflamasi yang efektif dalam mencegah aterosklerosis. *IL-10* banyak diproduksi oleh makrofag dan sel *Th2*. *IL-10* memiliki efek ateroprotektif pada perkembangan plak dan juga pada tahapan aterosklerosis dengan mempengaruhi proses inflamasi lokal dalam lesi aterosklerotik (Libby et al. 2011). Penurunan kadar *IL-10* dapat memicu akumulasi aktifitas *MMP* dimana hal tersebut juga akan memicu ketidakstabilan plak yang dapat menyebabkan kejadian kardiovaskular akut pada individu tertentu (Mallat et al. 1999; Holven et al. 2006; Amento et al. 1991). Penemuan dalam penelitian yang ada menunjukkan bahwa *IL-10* yang diproduksi oleh sel *Treg* sangatlah penting dalam menurunkan perkembangan aterosklerosis pada mencit model *HFD*.

Pada penelitian ini pemberian *Agaricus blazei* Murrill terbukti menyebabkan peningkatan marker – marker anti inflamasi yang meliputi *Treg* dan sitokin yang dihasilkannya yaitu *IL-10*. Peningkatan *IL-10* sebagai sitokin utama yang bersifat anti inflamasi tidak disertai peningkatan *TGF- β* . Dari uji statistik yang kami lakukan pada penelitian ini didapatkan data bahwa tidak keterkaitan antara *Treg* dengan *TGF- β* . Hal ini kemungkinan disebabkan β -glucan yang bersifat sebagai imunomodulator, artinya bisa berfungsi sebagai agen pro inflamasi, tergantung dengan dosis yang diberikan (Tanriverdi et al. 2005). Yang kedua, *TGF- β* juga dapat berperan sebagai agen pro inflamasi apabila bertemu dengan sitokin *IL-6*, *IL-21* atau/dan *IL-23*. Bertemuanya salah satu atau lebih sitokin – sitokin ini dengan *TGF- β* justru akan memicu perubahan

sel – sel T naif (*Th0*) menjadi *Th17* yang bersifat pro inflamasi (Heartland et al. 2011). Sel *Treg* (*CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*) merupakan kunci utama dalam toleransi imunitas dan mengatur fase induksi pada sistem imun (Lee dan Rifa'i 2011). Sel *Treg* (*CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺* yang dibawa dari timus ditemukan dalam lesi aterosklerotik (Rohm et al. 2015). Kadar ekspresi *Foxp3* merupakan faktor utama yang mempengaruhi efek supresif sel *Treg* (Chauhan et al. 2009). Peningkatan jumlah sel *Treg* pada *lien* mencit yang diinduksi dengan diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak *Agaricus blazei* Murrill mengindikasikan bahwa senyawa dalam jamur tersebut mampu memicu aktifasi dari sel *Treg*. Sel *Treg* yang mengekspresikan *Foxp3* memiliki peran dalam proses anti inflamasi dengan mensekresikan sitokin anti inflamasi *IL-10* dan *TGF-β* (Kyaw et al. 2016). Hasil analisis *in silico* menunjukkan bahwa senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill yaitu 1,3-1,6 β -glucan mampu berikatan dengan *TLR-2/1* dan *Dectin* pada sel – sel APC yang memiliki potensi untuk mengaktifasi sel *Treg* dan meningkatkan produksi sitokin – sitokin anti inflamasi. Ikatan tersebut memiliki aktifitas untuk menstimulasi kaskade sinyal untuk memproduksi lebih banyak sitokin – sitokin anti inflamasi dan meningkatkan fungsi sel *Treg*. Data ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menjelaskan tentang jamur tersebut terbukti meningkatkan sitokin *IL-10* pada *human peripheral blood mononuclear cells* (*hPBMC*) (Jeurink et al. 2008). Peningkatan sel T regulator melalui senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill (1,3-1,6 β -glucan) memiliki potensi dalam menormalkan sistem imun yang tidak seimbang (cenderung pro inflamasi), sehingga berguna untuk mencegah atherosclerosis (Sakaguchi et al. 2008).



Gambar 8.1. Imunitas adaptif Ying dan Yang. Terdapat keseimbangan antara respon

Th dimana Th1 menghambat Th2, Th17, dan Treg. Peningkatan Th1 dan Th17 pada individu – individu yang rentan dapat menyebabkan lahirnya penyakit autoimun. Regulasi oleh sel – sel Treg dapat menghasilkan imunosupresi dan toleransi (diadaptasi dari Hetland dkk. 2011).

Kajian tentang Treg di dalam modulasi respon imun pada kasus aterosklerosis sudah ditunjukkan pada beberapa studi eksperimental baik pada manusia maupun pada hewan coba, dimana pada kasus – kasus aterosklerosis jumlah Treg yang ada akan turun sebagian atau bahkan tidak ada sama sekali.

Penelitian yang dilakukan Oufella et al. menunjukkan bahwasanya mencit model aterosclerosis $LDLr^{1-}$ yang kekurangan CD28 atau CD80/86 (molekul – molekul kostimulan yang penting untuk homeostasis dan perkembangan Treg) menunjukkan jumlah Treg yang menurun (memiliki asosiasi dengan peningkatan proses aterosklerosis). Pada penelitian tersebut dilakukan penambahan perlakuan dengan antibodi spesifik CD25 untuk menurunkan Treg (PC61) dan

hasilnya adalah terjadinya perburukan pada tempat lesi aterosklerosis (bertambah ukurannya) (Ait Oufell et al. 2006). Peranan *Treg Foxp3⁺* terhadap perkembangan aterosklerosis pertama kali diterangkan dengan adanya pernurunan sebagian *Treg Foxp3⁺* setelah pemberian vaksinasi yang berbasis sel dendritik yang dapat memprovokasi respon sel – sel T sitotoksik terhadap sel – sel yang mengekspresikan *Foxp3* dan akhirnya menyebabkan peningkatan aterosklerosis. Pada tahun 2013, Klingenberg et al. mempublikasikan penelitiannya yang menunjukkan bahwa penuruna spesifik *Treg Foxp3⁺* dengan menggunakan mencit *DREG / LDLr^{-/-}* meningkatkan perkembangan aterosklerosis 2,1 kali lipat (Klingenberg et al. 2013).

Keberadaan *Treg* pada lesi – lesi aterosklerosis telah dibuktikan baik pada manusia maupun hewan coba (de Boer et al. 2007, Heller et al. 2006), dimana pada sebagian besar studi jumlahnya akan menurun pada mencit – mencit hiperkolesterolemik dan pada pasien - pasien dengan penyakit kardiovaskular, jika dibandingkan dengan kontrol sehat. Pada mencit *ApoE^{-/-}* mengalami penurunan jumlah *Treg* (baik berupa sel – sel *CD4⁺CD25⁺* atau sel – sel *CD25⁺Foxp3⁺* pada organ – organ limfoid dibandingkan dengan mencit *C57BL/6* dan mencit *ApoE^{-/-}* yang lebih muda yang tidak mempunyai bukti adanya lesi aterosklerosis (Mor et al. 2007).

Ketika diberikan perlakuan dengan diet tinggi lemak mencit *ApoE^{-/-}* menunjukkan reduksi pada sel – sel *CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺* jika dibandingkan dengan mencit yang diberi perlakuan dengan diet standar (Wang et al. 2014). Pada mencit – mencit dengan *LDLr^{-/-}*, *Treg CD4⁺Foxp3⁺* di dalam sirkulasi dan pada lesi akan mencapai puncak pada 4 minggu setelah pemberian diet tinggi lemak, namun jumlah sel *Treg* ini selanjutnya akan menurun, menghasilkan

akumulasi sel – sel T efektor yang berkontribusi terhadap progresifitas penyakit (Maganto-Garcia et al. 2011). Serupa dengan penelitian tersebut, pada manusia menunjukkan rendahnya *Treg* dalam sirkulasi berasosiasi dengan peningkatan resiko sindroma koroner akut dan penurunan lesi *Treg* mempunyai asosiasi dengan peningkatan vulnerabilitas lesi (Dietel et al. 2013). Secara keseluruhan, hamper seluruh studi eksperimental pada manusia menunjukkan bahwa pasien – pasien dengan angina tidak stabil / *unstable angina pectoris* (*UAP*) dan *non ST-elevation Myocardial Infarction* (*NSTEMI*) menunjukkan penurunan jumlah *Treg* di dalam darah jika dibandingkan dengan individu – individu sehat atau pasien – pasien angina pektoris stabil (*Stable Angina Pectori / SAP*) (Foks et al. 2015).

Tabel 8.1. Frekuensi *Treg* pada Penelitian Eksperimental Aterosklerosis pada Hewan Coba (Mencit) (Foks et al. 2015).

Fenotipe <i>Treg</i>	Frekuensi pada Penyakit	Referensi
<i>CD4⁺CD25⁺</i> atau <i>CD25⁺Foxp3⁺</i>	↓ pada organ – organ limfoid mencit <i>ApoE^{-/-}</i> dibandingkan mencit <i>C57Bl6</i> atau mencit <i>ApoE^{-/-}</i> muda.	Mor 2007
<i>CD4⁺Foxp3⁺</i>	↑ pada <i>LDLr^{-/-}</i> lien mencit hipercolesterolemia.	Maganto-Garcia 2011
	↓ pada sirkulasi dan aorta mencit hipercolesterolemia <i>LDLr^{-/-}</i> .	
<i>CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺</i>	↓ pada mencit <i>ApoE^{-/-}</i> hiper kolesterol.	Wang 2014

Tabel 8.2. Frekuensi *Treg* pada Penelitian Eksperimental Aterosklerosis pada pasien – pasien kardiovaskular (Foks et al. 2015).

Fenotipe <i>Treg</i>	Frekuensi pada Penyakit	Referensi
<i>CD4⁺CD25^{+high}</i>	↓ Σ kapasitas supresif pada pasien – pasien ACS dibandingkan dengan pasien – pasien angina stabil dan individu – individu sehat, juga terjadi penurunan Foxp3 dan ekspresi CTLA-4.	Mor 2006
	↔ tidak ada korelasi antara <i>Treg</i> sirkulasi dan ketebalan arteri karotis.	Ammiranti 2010
	↓ pada pasien – pasien non ST elevasi MI vs kontrol.	
	↑ pada pasien – pasien <i>acute STEMI</i> vs kontrol.	
<i>CD3⁺Foxp3⁺</i>	↓ jumlahnya pada seluruh tahapan lesi aterosklerosis.	de Boer 2007
<i>CD4⁺Foxp3⁺</i>	↓ jumlah berassosiasi dengan ↑ pelepasan sitokin – sitokin pro inflamasi dan ↑ resiko kejadian koroner akut namun bukan stroke	Wigren 2012
	↓ pada pasiens – pasien MI dibandingkan individu – individu sehat	Ghourbanian G 2012
	↓ pada lesi – lesi yang mudah pecah (<i>vulnerable lesions</i>)	Dietel 2013
<i>CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺</i>	↓ pada pasien – pasien ACS (<i>SAP</i> , <i>UAP</i> , dan <i>Acute MI</i>) dibanding dengan individu – individu sehat, berasosiasi dengan ekspansi sel – sel Th17 pada pasien – pasien <i>UAP</i> dan <i>MI</i> .	Han 2007
	↓ jumlahnya disertai ↓ IL-10 pada pasien – pasien dengan kejadian kardiak rekuren disbandingkan dengan pasien – pasien stabil.	George 2012
	↓ jumlahnya disertai ↑ metilasi DNA pada region demetilasi	Jia 2013

<i>CD4⁺CD25⁺</i>	spesifik <i>Treg</i> pada <i>Foxp3</i> pada pasien – pasien ACS vs kontrol ↔ tidak ada hubungan antara kadar <i>Treg</i> dan ketebalan intima-media (juga tidak ada korelasi dengan <i>Foxp3</i> dan mRNA <i>IL-10</i> , atau kadar <i>IL-10</i> serum).	Ammirati 2010
<i>CD127^{low}</i>	↓ pada pasien – pasien ACS <i>NSTEMI</i> .	Zhang 2012
	↑ pada thrombi.	Klingenberg 2013
<i>CD4⁺ICOS⁺</i>	↓ pada pasien – pasien <i>MI</i> dan <i>SAP</i> vs individu – individu sehat,	Ghourbanjui G 2012
<i>CD4⁺LAP⁺</i>	↓ pada <i>MI</i> (<i>STEMI</i> dan <i>NSTEMI</i>) vs pasien – pasien <i>SAP</i> dan kontrol sehat.	Lin 2013
	↓ jumlah dan kapasitas supresif pada pasien – pasien <i>UAP</i> dan <i>acute MI</i> vs pasien – pasien <i>chronic SAP</i> dan pasien – pasien dengan sindroma nyeri dada.	Zhu 2014
<i>CD4⁺GARP⁺</i>	↓ jumlahnya pada pasien – pasien <i>UAP</i> dan <i>acute MI</i> vs pasien – pasien <i>SAP</i> dan sindroma nyeri dada.	Zhu 2014
	↓ jumlah dan kapasitas supresinya serta ↓ jumlah TGFβ pada pasien – pasien <i>ACS</i> vs pasien – pasien <i>SAP</i> dan pasien – pasien kontrol.	Meng 2014

Ada beberapa mekanisme yang dapat menerangkan adanya korelasi terkait *Treg* dan progresifitas aterosklerosis. Mekanisme pertama yaitu oleh karena daya hidup (*survival*) *Treg* seperti yang ditemukan Zhang et al. yang menemukan peningkatan apoptosis *Treg* pada pasien – pasien *NSTEMI* dibandingkan dengan *Treg* pada pasien – pasien dengan sindroma nyeri dada / *SAP* kronik (Zhang et al. 2012). *Treg* dari pasien – pasien *NSTEMI* berisi lebih sedikit kadar mRNA dari gen anti apoptotik *Bcl-2* dan lebih banyak kadar gen pro apoptotik *Bak*. Lebih jauh lagi didapatkan bukti bahwa apoptosis *Treg* terinduksi oleh *OxLDL* dan dalam hal ini peningkatan kadar *OxLDL* pada pasien – pasien *NSTEMI*, menandakan *OxLDL* terlibat di dalam defek *Treg* pada pasien – pasien penyakit kardiovaskular. Sebelumnya More et al. juga telah mengobservasi bahwa *OxLDL* dapat mereduksi jumlah *TregCD4⁺CD25⁺* *In Vitro*, sebagian oleh karena induksi apoptosis (Mor et al. 2006). Penelitian yang dilakukan Jie et al. menunjukkan bahwa terdapat ketergantungan dosis *OxLDL* (*dose dependent*) dari peningkatan metilasi pada regio demetilasi yang spesifik *Treg* di dalam gen *Foxp3*, sehingga demikian akan mengurangi ekspresi *Foxp3* pada PBMe yang diisolasi dari individu yang sehat (Foks et al. 2015, Jia et al. 2013). Penurunan kadar *Treg* yang didefinisikan sebagai demetilasi pada region demetilasi *Foxp3*

dapat di amati pada pasien – pasien ACS dan hal ini berhubungan dengan derajat keparahan ACS. Mekanisme kedua yang dapat menjelaskan penurunan jumlah *Treg* pada pasien – pasien kardiovaskular yaitu adanya gangguan keluarnya *Treg* dari timus pada pasien dengan *NSTEMI* yang ditandai dengan rendahnya kadar *Treg CD45 RO-CD45 RA⁺CD31⁺* dalam sirkulasi di banding pasien – pasien dengan sindroma nyeri dada / *SAP* kronik.

Dari analisis jalur / *path analysis* juga didapatkan fakta bahwa parameter – parameter dalam kelompok inflamasi yang disajikan memiliki hubungan sebab akibat satu arah yaitu jumlah relatif *Th17* akan berbanding dengan jumlah relatif *IL-10*, *Treg*, dan *TGFβ*. Sedangkan *Treg* mempunyai hubungan sebab akibat dua arah dengan *IL-10* saja, dan hal ini tidak terjadi pada *TGFβ*. Koefisien determinansi total dari analisis jalur ini sebesar 80,26% menandakan model yang diperoleh sangat bagus (sangat bagus apabila $R > 75\%$) dan menunjukkan adanya fakta bahwa sebesar 80,26% keragaman total dapat dijelaskan pada analisis jalur ini, sedangkan 14,08% sisanya tidak mampu dijelaskan.

Pada penelitian ini terdapat 5 parameter yang diukur, dimana di antara 5 parameter tersebut ada beberapa parameter yang peningkatan atau penurunannya tersebut bergantung dosis (*dose dependent*). Maka dari itu peneliti membagi parameter – parameter tersebut menjadi dua golongan yaitu marker – marker yang berkaitan dengan kondisi inflamasi yang meliputi, parameter selular yaitu *Th17* dan *Treg*, dan parameter sitokin yaitu *TGFβ* dan *IL-10* dan yang kedua adalah marker yang berkaitan dengan kondisi oksidasi yaitu *LpPLA2*. Permasalahan timbul untuk menentukan dosis berapa yang dipilih untuk mendapatkan dosis optimal yang dapat mewakili semua parameter dalam kelompok inflamasi, mengingat hasilnya tidak semuanya menunjukkan adanya ‘*dose dependence*’, yaitu jumlah *CD4⁺ IL-17* dan *TGFβ*. Dengan pendekatan

untuk mendapatkan dosis optimal yang dapat mewakili semua parameter dalam kelompok inflamasi, mengingat hasilnya tidak semuanya menunjukkan adanya ‘*dose dependence*’, yaitu jumlah *CD4⁺ IL-17* dan *TGFβ*. Dengan pendekatan

statistik didapatkan dosis 279 mg/kg BB. Dosis ini diambil berdasarkan pendekatan secara interpolasi, dimana dosis yang didapat tidak keluar dari rentang dosis yang diujikan. Dosis 279 mg/kg BB akan mendapatkan hasil secara serempak *Th17* yang terendah, sedangkan *Treg*, *IL-10*, dan *TGF β* mempunyai nilai yang paling tinggi. Untuk parameter oksidasi yaitu *LpPLA2*, didapatkan angka yang menunjukkan ketergantungan dosis (*dose dependence*) dimana pada kelompok hewan coba yang dipapar dengan *HFD* akan mempunyai hasil yang paling tinggi dan akan semakin menurun jumlah relatifnya seiring dengan peningkatan dosis. *Agaricus blazei* Murrill yang diberikan. Permasalahan ikembali muncul saat menentukan dosis yang bisa mewakili semua parameter yang diujikan dalam penelitian ini, baik marker – marker pada kelompok inflamasi maupun marker terjadinya oksidasi. Dari uji statistik yang dilakukan dengan memakai pendekatan interpolasi, didapatkan dosis 285 mg/kg BB sebagai dosis yang paling ideal, yang menggabungkan kondisi tingkat inflamasi dan oksidasi yang terendah.

Penggunaan model statistik untuk menentukan dosis optimal di dalam

suatu model penelitian telah dianut dan dipakai dalam penelitian modern di bidang medis selama beberapa dekade terakhir. Beberapa permasalahan seperti adanya ditribusi kesalahan (*error distribution*) seringkali dilupakan. Dengan menggunakan pendekatan statistik berbasis komputer akan diperoleh jawaban dari kurva kalibrasi dan ketidakpastian yang berhubungan dengan lokasi pada ‘fitted curve’. Model simulasi dengan menggunakan program komputer mempunyai nilai potensial untuk mencari solusi pada berbagai situasi. Sehingga tidak hanya pendekatan secara interpolasi, pendekatan secara interpolasi pun bisa dilakukan (Kay et al. 1986).

BAB 9

KESIMPULAN DAN SARAN

9.1. Kesimpulan

1. Analisis UV-Vis Spectrophotometry pada beberapa *edible mushroom* menunjukkan bahwa *Agaricus blazei* Murrill berpotensi sebagai sumber β -glucan yang tinggi dibandingkan dengan jamur makanan yang lain (*Ganoderma Sp.* dan *Pleurotus ostreatus*). Hasil tersebut membuktikan bahwa *Agaricus blazei* Murrill sangat berpotensi sebagai alternatif jamur sebagai obat, khususnya dalam pencegahan aterosklerosis.

2. Senyawa aktif dari *Agaricus blazei* Murrill, 1,3-1,6 β -glucan mampu berikatan dengan TLR-2/1 dan Dectin yang memiliki potensi untuk mengaktifasi sel *Treg* dan memicu produksi sitokin anti inflamasi.

3. *Agaricus blazei* Murrill secara signifikan bekerja lebih utama dengan menurunkan tingkat oksidasi sel melalui penurunan enzim *Lp-PLA2*, meningkatkan ekspresi sel T regulator (*CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺*), meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi *TGF-β* dan *IL-10*, serta menurunkan produksi sitokin pro inflamasi *IL-17* pada mencit dengan diet tinggi lemak.

4. Berdasarkan *Path Analysis* didapatkan dosis optimal untuk mencapai kondisi oksidasi terendah (*LpPLA2* terendah), dan inflamasi terendah (*Th-17* terendah serta kadar *Treg* dan *IL-10* tertinggi) yaitu 285 mg/kg BB yang mampu mencegah penyakit ateroklerosis yaitu dengan menurunkan *LpPLA2* dan sel *Th-17* serta meningkatkan ekspresi sel *Treg* dan sitokin - sitokin anti inflamasi *IL-10*.

9.2. Saran

Hasil penelitian ini membutuhkan studi lebih jauh untuk menjelaskan fungsi jamur tersebut dalam perkembangan anti aterosklerosis serta perlu dilakukan uji lanjutan mengenai mekanisme *imunomodulator Agaricus blazei Murrill* melalui *single compound β-glucan*, serta peranannya dalam mempengaruhi kadar sitokin – sitokin lain yang bersifat pro inflamasi.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K, and Lichtman A.H (2010). Cellular and Molecular Immunology. Updated Edition. Oxford Elsevier Ltd. USA.
- Abbas A.K, Lichtman A.H, and Pillai S (2014). Basic Immunology. Elsevier 4, 44
- Aird W.C (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100, 158
- Ait-Oufella H, Horvat B, Kerdiles Y, et al (2007). Measles virus nucleoprotein induces a regulatory immune response and reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* 116, 1707
- Ait-Oufella H, Salomon B.L, Potteaux S, et al (2006). Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 12, 180
- Altin J.A, Tian L, Liston A, (2011). Decreased T-cell receptor signaling through CARD11 differentially compromises forkhead box protein 3-positive regulatory versus TH2 effector cells to cause allergy. *J Allergy Clin Immunol* 127, 1277
- Amento E.P, Ehsani N, Palmer H, et al (1991). Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11, 1223
- Ammirati E, Cianflone D, Banfi M, Vecchio V, Palini A, De Metrio M, Marenzi G, Panciroli C, Tumminello G, Anzuini A, Palloschi A, Grigore L, Garlaschelli K, Tramontana S, Tavano D, Airoldi F, Manfredi AA, Catapano AL, Norata GD (2010). Circulating CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} regulatory t-cell levels do not reflect the extent or severity of carotid and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1832
- Anguera I, Miranda-Guardiola F, Bosch X, et al (2002). Elevation of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and decreased risk of coronary events in patients with unstable angina. *Am Heart J* 144, 811
- ATLAS World USA Inc. (2010). Active compounds contained in *Agaricus blazei*
- Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M.G (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+regulatory T cells. *Blood* 105, 4743
- Bellini M.F, Angeli J.P, Matuo R, et al (2006). Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicol in Vitro* 20, 355
- Berman H.M, Westbrook J, Feng Z, et al (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42, W252
- Biedron R, Tangen J.M, Maresz K, et al (2012). *Agaricus blazei* Murill immunomodulatory properties and health benefits. *Functional Foods in Health and Disease* 2, 428
- Bobik A, Agrotis P, Kanellakis R, et al (1999). Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 99, 2883
- Brodsky I, Medzhitov R (2007). Two Modes of Ligand Recognition by TLRs. *Cell* 130, 979
- Brown G.D (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology* 6, 33

- Brown G.D, Taylor P.R, Reid D.M, et al (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196, 407
- Burchill M.A, Yang J, Vang K.B, et al (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112
- Cao X, Cai S.F, Fehniger T.A, et al (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635
- Carvajal A.E, Koehlein E.A, Soares A.A, (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology* 46, 493
- Chan Y, Chang T, Chan C.H, et al (2007). Immunomodulatory effects of *Agaricus blazei* Murill in Balb/cByJ mice. *J Microbiol Immunol Infect* 40, 201
- Chang S.T (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *Int J of Med Mushrooms* 1, 291
- Chauhan S.K, Saban D.R, Lee H.K et al (2009). Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol* 182, 148
- Chen J and Raymond K (2008). Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management* 4, 1265
- Cheng X, Yu X, Ding Y.J, et al (2008). The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 127, 89
- Chi H (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature reviews immunology* 12, 325
- Christiakov D.A, Sobenin I.A, Orekhov A.N (2013). Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response. *Immunol Lett* 151, 10
- Collison L.W, Workman C.J, Kuo T.T., et al (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566
- Coombes J.L, Siddiqui K.R, Arancibia-Cárcamo C.V, et al (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757
- Cuneo A.A and Autieri M.V (2009). Expression and function of anti-inflammatory interleukins: the other side of the vascular response to injury. *Curr Vasc Pharmacol* 7, 267
- Curtiss L.K and Tobias P.S (2009). Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50, 340
- Dallakyan S and Olson A.J (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1263, 243
- Danese S, Dejana E, Fiocchi C (2007). Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 178, 6017
- Dart M.L, Jankowska-Gan E, Huang G, et al (2010). Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type V in atherosclerosis. *Circ Res* 107, 1106
- Dassault Systèmes BIOVIA. (2015). Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, Dassault Systèmes. San Diego.
- Davis B, Koster G, Douet L.J, et al (2008). Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A2 in oxidized human low density lipoprotein. *J Biol Chem* 283, 6428

- de Boer O.J, van der Meer J.J, Teeling P, van der Loos C.M, van der Wal A.C (2007). Low numbers of foxp3 positive regulatory t cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS ONE* 2, 779
- Delgoffe G.M (2009). The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30, 832
- Delgoffe G.M (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature Immunol* 12, 295
- Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, Verhoeven E, Achenbach S, Garlichs CD (2013). Decreased numbers of regulatory t cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis* 230, 92
- Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, et al (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916
- Dimitrios B (2006). Sources of natural phenolics antioxidants.Trends in Food Science and Technology 17, 505
- Ellegard L, and Andersson H (2007). Oat bran rapidly increases bile acid excretion and bile acid synthesis: an ileostomy study. *Eur J Clin Nutr* 61, 938
- Ellertsen L.K, Hetland G, et al. (2005). Effect of a medicinal extract from Agaricus blazei Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. *Int Immunopharmacol* 6, 133
- Endo M, Beppu H, et al. (2010). Agaritine purified from Agaricus blazei Murrill exerts anti-tumor activity against leukemic cells. *Biochim Biophys Acta* 1800, 669
- Entin-Meer M, Afek A, et al. (2009). Regulatory T-Cells, FoxP3 and Atherosclerosis. *Landes Bioscience and Springer Science + Business Media Chapter* 8, 106
- Epps K.C, and Wilensky R.L (2011). LP-PLA2-A Novel Risk Factor for High risk Coronary and Carotid Artery Disease. *J Intern Med* 269, 94
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, et al. (1990). "Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein." *Chem Res Toxicol* 3, 77
- Fantini M.C, Becker C, et al. (2004). TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4+CD25+ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149
- Farhat K, Riekenberg S, et al. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukocyte Biol* 83, 692
- Ferreira I.C, Vaz J.A., Vasconcelos M.H, et al (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents Med Chem* 10, 424
- Firenzuoli F, Gori L, et al. (2008). The Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. *Advance Access Publication* 5, 3
- Foks A.C, Lichtman A.H, Kuiperay J (2015). Treating Atherosclerosis with Regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(2), 280
- Forland D.T, Johnson E, et al. (2011). Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murill on Expression of Cytokines

- and Calprotectin in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's disease. *Scand J Immunol* 73, 66
- Gao W (2007). Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 7, 1722
- George J, Schwartzberg S, Medvedovsky D, Jonas M, Charach G, Afek A, Shamiss A (2012). Regulatory t cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis* 222, 519
- Gerrity R.G, Naito H.K, et al. (1979). Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol* 95, 775
- Ghoubani Gazar S, Andalib A, Hashemi M, Rezaei A (2012). CD4⁽⁺⁾Foxp3⁽⁺⁾ Treg and its ICOS⁽⁺⁾ subsets in patients with myocardial infarction. *Iranian journal of immunology* 9, 53
- Gonzaga M.L, Menezes T.M, et al. (2013). Structural characterization of β -glucans isolated from Agaricus blazei Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2, 152
- Goodridge H.S, and Underhill D.M (2008). Fungal recognition by TLR2 and dectin-1. *Handb Exp Pharmacol.* 183, 87
- Gottschalk R.A, Corse E, et al. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med* 207, 1701
- Hadjur S, Bruno L, et al. (2009). IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: the role of Th2 cells, Gata3 and PU.1. *Immunol Lett* 122, 37
- Han SF, Liu P, Zhang W, Bu L, Shen M, Li H, Fan YH, Cheng K, Cheng HX, Li CX, Jia GL (2007). The opposite-direction modulation of CD4⁺CD25⁺ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clin Immunol* 124, 90
- Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubia R, Gabbiani G (1989). Interferon γ inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific α -smooth muscle action in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 170, 1595
- Hansson G.K (2005). Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685
- Hansson G.K, and Libby P (2006). The immune response in atherosclerosis: a double edged sword. *Nat Rev Immunol* 6, 508
- Hansson G.K, and Hermansson A (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12, 204, 212
- Harada Y (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* 207, 1381
- Haribhai D (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35, 109
- Haxhinasto S, Mathis D, et al. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J Exp Med* 205, 565
- He S, Li M, et al. (2010). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells protect the proinflammatory activation of human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2621
- Heeschen C, Dimmeler S, et al. (2003). Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 107, 2109
- Herbin O, Ait-Oufella H, et al. (2012). Regulatory T-cell response to apolipoprotein b100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 605

- Hetland G, Johnson E, et al. (2011). The Mushroom Agaricus blazei Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. *Advances in Pharmacological Sciences* 2011, 1.
- Hetland G, Tangen J, Tierens A, et al (2013). The Agaricus blazei-based mushroom extract, AndosanTM, has immuno-suppressive and antiinflammatory effects when used as supplement to multiple myeloma patients receiving high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. doi: 10.3389/conf.f immu.2013.02.00740
- Heller E.A, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn S.L, Lok V.M, Aikawa E, Moore K.J, Luster A.D, Gerszten R.E (2006). Chemokine cxcl10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory t cells. *Circulation* 113, 2301
- Hill J.J, Tammy-Lynn T, et al. (2009). Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Proteome Sci* 7, 2
- Holven K.B, Halvorsen B, Bjerkeli V, et al (2006). Impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from hyperhomocysteinemic subjects. *Stroke* 37, 1731
- Horwitz D.A, Zheng S.G, et al. (2008). Natural and TGF- β -induced Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 29, 429
- Hozova B, Kuniak L, Kelemenova B (2004). Application of β -D-Glucans Isolated from Mushrooms Pleurotus ostreatus (Pleuron) and Lentinus edodes (Lentinan) for Increasing the Bioactivity of Yoghurts. *Czech J Food Sci* 22, 204
- Huan S.J, and Mau J.L (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from Agaricus blazei with various doses of g-irradiation. *Food Sci Technol* 39, 707
- Huang C-H, Tsai H-N, et al. (2010). Agaricus Blazei Murill Ameliorates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Acta Cardiol Sin* 26, 235
- Ikuzawa M, Matsunaga K, et al. (1988). Fate and Distribution of an antitumor protein-bound polysaccharide PSK (Krestin). *Int J Immunopharmacol* 10, 415
- Iribarren, C (2006). Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Cardiovascular Risk State of the evidence and Future Directions. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 26, 5
- Izawa S, and Inoue Y (2004). A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from Agaricus blazei Murill. *Applied Microbiology & Biotechnology* 64, 537
- Jedinak A, Shailesh D, Qing-li W, et al (2011). Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. *Nutrition Journal* 10,52 doi: 10.1186/1475-2891-10-52
- Jia L, Zhu L, Wang JZ, Wang XJ, Chen JZ, Song L, Wu YJ, Sun K, Yuan ZY, Hui R (2013). Methylation of foxp3 in regulatory t cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 228, 346
- Jiang X, Zeng H.S, Guo Y, et al (2004). The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chin Med J (Engl)* 117, 1825

- Jin M.S, Kim S.E, Heo J.Y, et al (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* 130, 1071
- Kang J, Huddleston S.J, et al. (2008). De novo induction of antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J Leukoc Biol* 83, 1230
- Karumuthil-Meletihil S, Perez N, et al. (2008). Induction of Innate Immune Response through TLR2 and Dectin 1 Prevents Type 1 Diabetes. *J Immunol* 181, 8323
- Kay C, Nix ABJ, Kemp KW, Rowlands RJ (1986). Dose-interpolation of immunoassay data: Uncertainties associated with curve-fitting. *In Medicine* 5, 183
- Ker Y.B, Chen K.C, et al. (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerged-cultured Agaricus blazei mycelia. *J Agric Food Chem* 53, 7052
- Ketelhuth D.F, and Hansson G.K (2011). Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 106, 779
- Kim G.Y, Lee M.Y, et al. (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from Agaricus blazei on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 5, 1523
- Kitani A, and Xu L (2008). Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol* 1, S43
- Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodthoff D, Ketelhuth DF, Lundberg AM, Rudling M, Nilsson SK, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Luscher T.F, Jauhainen M, Sparwasser T, Hansson G.K (2013). Depletion of Foxp3⁺ regulatory t cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest* 123, 1323
- Kobayashi H, Yoshida R, et al. (2005). Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from Agaricus blazei Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 527
- Kotla S, Singh N.K, Heckle M.R., et al (2013). The transcription factor CREB enhances interleukin-17A production and inflammation in a mouse model of atherosclerosis. *Sci Signal* 6, 83
- Kyaw T, Ban-Hock T, Bobik A (2006). Foxp3+CD4+ Regulatory T-Cell Subtypes and Atherosclerosis. *Circulation Research* 119, 1151
- Lai G, Zhang N, et al. (2009). Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 182, 259
- Lee K (2010). Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* 32, 743
- Lee Y-H, and Rifa'i M (2011). CD4+CD25+FOXP3⁺ regulatory T cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Trop Life Science* 1, 1
- Ley K, Laudanna C, et al. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7 678
- Li C, Ha T, et al. (2004). Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1->3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61, 538
- Li X, Mai J, et al. (March 2012). IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS ONE* 7, e33628

- Libby P, Ridker P.M, and Hansson G.K (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317
- Lim H, Kim, Y.U, Sun H, et al (2014). Proatherogenic conditions promote autoimmune T helper 17 cell responses in vivo. *Immunity* 40, 153
- Lin Y.Z, Lu SH, Lu ZD, Huang Y, Shi Y, Liu L, Wang X.Y, Ji Q.W (2013). Downregulation of cd4+lap+ and cd4+cd25+ regulatory t cells in acute coronary syndromes. *Mediators of inflammation* 2013, 764082
- Lio C.W, Hsieh C.S, et al. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100
- Liu Y, Fukuwatari Y, et al. (2008). Immunomodulating Activity of Agaricus brasiliensis KA21 in Mice and in Human Volunteers. *eCAM* 5(2), 205
- Liuzzo G, Trotta F, Pedicino D (2013). Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad and the unknown. *Eur Heart J* 34, 556-9 doi: 10.1093/eurheartj/ehs399
- Lopez-Pastrana J, Sha X, et al. (2012). Regulatory T Cells and Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol* 12, 1
- Lu L, Wang J, et al. (2010). Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* 184, 4295
- Ludwing Institute for Cancer Research (2010). New computation tool for cancer treatment. *ScienceDaily* 12, 2010
- Maganto-Garcia E, Tarrio M.L, Grabie N, Bu D.X, Lichtman A.H (2011). Dynamic changes in regulatory t cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 124, 185
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85, e17
- Mallat Z, Gojova A, Brun V, et al (2003). Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 108, 1232–1237 doi: 10.1161/01.CIR.0000089083.61317.A1.
- Mallat Z, Taleb S, et al. (2009). The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50, S364
- Meng K, Zhang W, Zhong Y, Mao X, Lin Y, Huang Y, Lang M, Peng Y, Zhu Z, Liu Y, Zhao X, Yu K, Wu B, Ji Q, Zeng Q (2014). Impairment of circulating cd4cd25garp regulatory t cells in patients with acute coronary syndrome. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33, 621
- Mantel P.Y, Kuipers H, et al. (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5, e329
- Merkenschlager M, and von Boehmer H (2010). PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J Exp Med* 207, 1347
- Miossec P, Korn T, Kuchroo V.K (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888–898 doi: 10.1056/NEJMra0707449
- Miramontes P (1992). Un modelo de automata celular para la evolucion de los acidos nucleicos (A cellular automaton model for the evolution of nucleic acids). Tesis de doctorado en matematicas. UNAM.
- Mohler E.R, Ballantyne C.M, et al. (2008). The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 51(17), 1632

- Molinero L.L, Miller M.L, et al. (2011). High TCR stimuli prevent induced regulatory T cell differentiation in a NF- κ B-dependent manner. *J Immunol* 186, 4609
- Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J (2006). Altered status of CD4 $^{(+)}$ CD25 $^{(+)}$ regulatory t cells in patients with acute coronary syndromes. *European heart journal* 27, 2530
- Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George J (2007). Role of naturally occurring cd4+ cd25+ regulatory t cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 893
- Mosser D.M, and Zhang X (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226(1), 205
- Murwani S, Ali M, Muliartha K (2006). Diet aterogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) sebagai model hewan aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran brawijaya* 22, 6
- Ng H.P, Burris R.L, et al. (2011). Attenuated atherosclerotic lesions in apoE-Fcγ-chain-deficient hyperlipidemic mouse model is associated with inhibition of *Th17* cells and promotion of regulatory T cells. *J Immunol* 187, 6082
- Nilsson L.M, Abrahamsson A, et al. (2007). Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 707
- Oh T.W, Kim Y.A., et al. (2010). Semipurified fractions from the submerged-culture broth of *Agaricus blazei* Murill reduce blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Agric Food Chem* 58, 4113
- Ohmichi Y, Hirakawa J, et al. (2011). Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *J Exp Med* 208, 1015
- Omueti K.O, Beyer J.M, et al. (2005). Domain exchange between human Toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* 280 36616
- Ouyang W (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nature Immunol* 11, 618
- Peterson R.A (2012). Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 40, 186
- Pober J.S (2011). Interleukin-17 and atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1465, doi:10.1161/ATVBAHA.111.228338
- Pober J.S, and Sessa W,C (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* *Nat Rev Immunol* 7, 803
- Pranamuda H, Giarni R, Pradana A., et al (2012). Aplikasi beta glukan sebagai bahan berkhasiat imunomodulator dan antikanker. Prosiding InSINas Kemenristek Jakarta
- Procaccini C (2010). An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity* 33, 929
- Queiroz L.S, Nascimento M.S, Cruz A.K, et al. (2010). Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti inflammatory activity. *International Immunopharmacology* 10, 34 doi:10.1016/j.intimp.2009.09.015
- Radji M (2010). Imunologi dan Virologi. Cetakan pertama. PT. ISFI Penerbitan. Jakarta.
- Ramoutsaki I.A, Ramoutsakis I.A, et al. (2002). Therapeutic methods for otolaryngological problems during the byzantine period. *Anne Otol Rhinol Laryngol* 111, 553

- Rao R.R, Li Q, et al. (2010). The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32, 67
- Reid D.M, Montoya M, et al. (2004). Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J Leukoc Biol* 76, 86
- Reyna-Villasmil N, Bermudez-Pirela V, et al. (2007). Oat-derived beta-glucan significantly improves HDLC and diminishes LDLC and non-HDL cholesterol in overweight individuals with mild hypercholesterolemia. *Am J Ther* 14 203
- Rifa'i M, Widodo N (2014). Significance of propolis administration for homeostasis of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells controlling hyperglycemia. *Springer Plus* 3, 526
- Ring S, Oliver S.J, et al. (2009). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1287-e2
- Rohm I, Atiskova Y, Drobnik S, (2015). Decreased regulatory T cells in vulnerable atherosclerotic lesions: imbalance between pro and anti inflammatory cells in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2015, 1
- Rohrig U.F, Awad L, Grosdidier A, et al. (2010). Rational Design of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitors. *Journal Of Medical Chemistry*. 53, 1172
- Rop O, Mlcek J, Jurikova T (2009). Beta-glucans in Higher Fungi and Their Health Effect. *Article Nutrition Rev* 67, 624
- Roupa P, Margetta C, et al. (2012). Mushroom Varieties – Effects on Health: Agaricus bisporus (common white button, brown / crimini, portabella). *CSIRO Food and Nutritional Sciences* 1, 1
- Roy C.R and Mocarski E.S (2007). Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* 8, 1179
- Sabatine M.S, Morrow D.A., O'Donoghue M, et al (2007). Prognostic utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2463
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, et al. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775
- Sakaguchi S, Setoguchi R, et al. (2006). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 305, 51
- Samson S, Mundkur L, et al. (2012). Immune response to lipoproteins in atherosclerosis. *Cholesterol* 2012, 1
- Sarangi I, Ghosh D, Bhutia S.K, et al (2006). Anti-tumor and Immunomodulating Effects of Pleurotus ostreatus Mycelia derived Proteoglycans. *International Journal of Immunopharmacology* 6, 1287, doi: 10.1016/j.intimp.2006.04.002
- Sartor R.B (2010). Genetics and Environmental Interactions Shape the Intestinal Microbiome to Promote Inflammatory Bowel Disease Versus Mucosal Homeostasis. *Gastroenterology* 139, 1816
- Sasaki N, Yamashita T, et al. (2009). Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation* 120, 1996
- Sasaki N, Yamashita T, et al. (2012). Regulatory T cells in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 19, 503

- Shi Y, Zhang P, Zhang L, et al (2007). Role of Lipoprotein-associated Phospholipase A2 in Leukocyte Activation and Inflammatory Responses. *Atherosclerosis* 191, 54
- Shokri H, Asadi F, Khosravi A.R (2008). Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Prod Res* 22(5), 414
- Shu C.H, and Wen B.J (2003). Enhanced shear protection and increased production of an anti-tumor polysaccharide by *Agaricus blazei* in xanthan-supplemented cultures. *Biotechnology Letters* 25, 873
- Sikka G, Miller K.L, et al. (2013). Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. *Exp Gerontol* 48, 128
- Slack E.C, Robinson M.J, et al. (2007). Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and *IL-10* production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* 37, 1600
- Sudhir K (2005). Clinical review: lipoprotein-associated phospholipase A2, a novel inflammatory biomarker and independent risk predictor for cardiovascular disease. *J Clin Endo Metab* 90, 3100
- Sudhir K (2006). Vascular Health and Risk Management. Lipoprotein-associated phospholipase A2, vascular inflammation and cardiovascular risk prediction. *Vasc Health Risk Manag* 2, 153
- Suzuki I, Sakurai T, Hashimoto K, Oikawa S, Masuda A, Ohsawa M, Yadomae T (1991). Inhibition of experimental pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma by orally administered beta-glucan in mice. *Chem Pharm Bull* 39, 1606-8
- Swain R.P, Subudhi B.B, Mahapatra A.K, et al (2015). Bridging Between Disease, Prevalence and Treatment of Diabetes Mellitus: A Review. *International journal of PharmTech Research* 7, 212
- Takaki H, Ichiyama K, et al. (2008). STAT6 Inhibits *TGF-β1*-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 283, 14955
- Tangen J-M, Anne T, Jo C, Marilene B, Ole KO, Anne-Marie ST, Junbai W, Geir ET, Geir H (2015). Immunomodulatory Effects of the *Agaricus blazei* Murrill-Based Mushroom Extract AndoSan in Patients with Multiple Myeloma Undergoing High Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized, Double Blinded Clinical Study. *BioMed Research International* ID718539: 1:11 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/718539>
- Tanriverdi P, Yuksel B.C, Rasa K, et al (2005). The effects of selective nitric oxide synthase blocker on survival, mesenteric blood flow and multiple organ failure induced by zymosan. *J Surg Res* 124 67
- Taylor P.R, Brown G.D, et al. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169, 3876
- Tedgui A. and Mallat Z (2006). Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev* 86 515
- Trott O, and Olson A.J, (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455
- Turner M.S, Kane L.P, et al. (2009). Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *J Immunol* 183, 4895
- Underhill D.M (2007). Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and nods. *Immunol Rev* 219, 75

- van Es T., van Puijvelde G.H, et al. (2010). Vaccination against Foxp3(+) regulatory T cells aggravates atherosclerosis. *Atherosclerosis* 209, 74

Vignali D.A, Collison L.W, et al. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523

Wang W.Y, Li J, Yang D, et al (2010). OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways. *Cardiovasc Res* 85, 845. doi:10.1093/cvr/cvp367

Wang Z, Mao S, Zhan Z, Yu K, He C, Wang C (2014). Effect of hyperlipidemia on foxp3 expression in apolipoprotein e-knockout mice. *Journal of cardiovascular medicine* 15, 273

Wasser S.P (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms* 12, 1

Weaver C.T, Hatton R.D, et al. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25, 821

Weintraub H.S (2008). Identifying the Vulnerable Patient with Rupture-Prone Plaque. *Am J Cardiol* 101, 3F

Wen-Yi, Wang, Jie, et al (2010). OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways. *Cardiovascular Research* 85, 845, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp367>.

Wigren M (2011). Protective Immunity in Atherosclerosis. *Malmö Lund University* 1

Wigren M, Bjorkbacka H, Andersson L, Ljungcrantz I, Fredrikson GN, Persson M, Bryngelsson C, Hedblad B, Nilsson J (2012). Low levels of circulating CD4⁺Foxp3⁺ T cells are associated with an increased risk for development of myocardial infarction but not for stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2000

Willment J.A, Lin H.H, et al. (2003). Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 171, 4569

Wong J.H, Ng T.B, Cheung R.C, et al (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms, *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1221

Workman C.J, Szymczak-Workman A.L, et al. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life* 66, 2603

Xu L, Kitani A, et al. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-β. *J Immunol* 178 6725

Yamane H, and Paul W.E (2012). Cytokines of the γc family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nature Immunology* 13, 1037

Yan Z.Q, and Hansson G.K (2007). Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev* 219, 187

Yang M, Lin L, and Chang J.C (1996). Submerged fermentation and amino acid analysis of Agaricus blazei mycelium. *Edible Fungi of China* 16, 41

Yuan X, and Malek T.R (2012). Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Human Immunology* 73, 773

Zanin-Zhorov A, Cahalon L, et al. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116, 2022

Zhang WC, Wang J, Shu YW, Tang TT, Zhu ZF, Xia N, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Xiao H, Yuan J, Liao MY, Cheng LX, Liao YH, Cheng X (2012).

Impaired thymic export and increased apoptosis account for regulatory T cell defects in patients with non-st segment elevation acute coronary syndrome. *The Journal of biological chemistry* 287, 34157

Zheng S.G, Wang J, et al. (2008). Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol Lett* 180, 7112

Zheng Y, Wang Z, Deng L, et al (2012). Osteopontin promotes inflammation in patients with acute coronary syndrome through its activity on IL-17 producing cells. *Eur J Immunol* 42, 2803. doi:10.1002/eji.201242475.

Zhong M, Tai A, et al. (2005). In vitro augmentation of natural killer activity and interferon-g production in murine spleen cells with agaricus blazei fruiting body fractions. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 2466

Zhong Y, Wang X, et al. (2012). "CD4(+)LAP (+) and CD4 (+)CD25 (+)Foxp3 (+) Regulatory T Cells Induced by Nasal Oxidized Low-Density Lipoprotein Suppress Effector T Cells Response and Attenuate Atherosclerosis in ApoE(-/-) Mice. *J Clin Immunol* 32, 1104

Zhou L, Lopes J.E, et al. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 453, 236

Zhu Z.F, Meng K, Zhong Y.C, Qi L, Mao X.B, Yu K.W, Zhang W, Zhu P.F, Ren Z.P, Wu B.W, Ji Q.W, Wang X, Zeng Q.T (2014) Impaired circulating cd4+ lap+ regulatory t cells in patients with acute coronary syndrome and its mechanistic study. *PLoS One* 9, e88775

Zorn E, Nelson E.A, et al. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT dependent mechanism 926 and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108, 1571

**LAMPIRAN 1. Laik Etik Penelitian****LAMPIRAN**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 335 / EC / KEPK – S3 / 09 / 2016

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- | | |
|--------------------------|--|
| JUDUL | : Efek Ateroprotektif <i>Agaricus blazei Murrill</i> Melalui Peningkatan T-Reg dan Penurunan Lp-PLA ₂ Pada mencit Dengan Diet Tinggi Lemak. |
| PENELITI | : dr. Dicky Kurniawan Tontowiputro, SH, Sp.PD |
| UNIT / LEMBAGA | : S3 Ilmu Kedokteran – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya |
| TEMPAT PENELITIAN | : Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Komputasi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya, Struktur dan Perkembangan Hewan Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. |

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 08 SEP 2016



Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
 Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

LAMPIRAN 2. Hasil Analisis Statistik Uji In Vivo

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4IL17	1	.303	5	.150	.899	5	.403
	2	.299	5	.164	.810	5	.097
	3	.304	5	.147	.834	5	.149
	4	.300	5	.161	.774	5	.049
	5	.215	5	.200	.934	5	.621
CD8IL17	1	.301	5	.158	.908	5	.459
	2	.301	5	.158	.907	5	.447
	3	.300	5	.160	.921	5	.533
	4	.198	5	.200	.980	5	.936
	5	.300	5	.162	.848	5	.189
PAFAH	1	.300	5	.161	.883	5	.325
	2	.300	5	.159	.883	5	.325
	3	.301	5	.159	.883	5	.325
	4	.311	5	.129	.882	5	.320
	5	.301	5	.158	.883	5	.325
CD4CD25TGFb	1	.301	5	.158	.908	5	.459
	2	.301	5	.158	.907	5	.447
	3	.300	5	.160	.921	5	.533
	4	.198	5	.200	.980	5	.936
	5	.300	5	.162	.848	5	.189
CD4CD25Foxp3	1	.300	5	.161	.901	5	.418
	2	.300	5	.160	.882	5	.318
	3	.147	5	.200	.984	5	.955
	4	.169	5	.200	.989	5	.978
	5	.300	5	.161	.847	5	.184
CD4CD25IL10	1	.301	5	.157	.886	5	.337
	2	.300	5	.160	.921	5	.535
	3	.300	5	.159	.912	5	.477
	4	.300	5	.161	.911	5	.472
	5	.300	5	.161	.922	5	.545

a. Lilliefors Significance Correction

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

2. Statistik Deskriptif

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
CD4IL17	1	5	3.1280	.25144	.11245	2.8158	3.4402	2.76
	2	5	4.8480	.85508	.38241	3.7863	5.9097	4.18
	3	5	2.3780	.19880	.08890	2.1312	2.6248	2.04
	4	5	4.9800	1.39289	.62292	3.2505	6.7095	2.58
	5	5	3.9980	.70176	.31384	3.1266	4.8694	3.28
	Total	25	3.8664	1.25787	.25157	3.3472	4.3856	2.04
CD8IL17	1	5	10.2680	1.07890	.48250	8.9284	11.6076	8.67
	2	5	22.5220	.97684	.43686	21.3091	23.7349	21.48
	3	5	38.9880	3.24970	1.45331	34.9530	43.0230	33.88
	4	5	14.5980	1.52066	.68006	12.7098	16.4862	12.56
	5	5	34.6420	2.66700	1.19272	31.3305	37.9535	30.29
	Total	25	24.2036	11.49745	2.29949	19.4577	28.9495	8.67
PAFAH	1	5	5.4400	2.13546	.95501	2.7885	8.0915	2.42
	2	5	18.0420	1.79959	.80480	15.8075	20.2765	15.50
	3	5	11.9120	1.29047	.57712	10.3097	13.5143	10.09
	4	5	12.1280	.07430	.03323	12.0357	12.2203	12.02
	5	5	9.1180	.93692	.41900	7.9547	10.2813	7.79
	Total	25	11.3280	4.42270	.88454	9.5024	13.1536	2.42
CD4CD25TGFb	1	5	10.2680	1.07890	.48250	8.9284	11.6076	8.67
	2	5	22.5220	.97684	.43686	21.3091	23.7349	21.48
	3	5	38.9880	3.24970	1.45331	34.9530	43.0230	33.88
	4	5	14.5980	1.52066	.68006	12.7098	16.4862	12.56
	5	5	34.6420	2.66700	1.19272	31.3305	37.9535	30.29
	Total	25	24.2036	11.49745	2.29949	19.4577	28.9495	8.67
CD4CD25Foxp3	1	5	44.8100	4.63169	2.07135	39.0590	50.5610	40.00
	2	5	25.1020	5.30647	2.37313	18.5131	31.6909	20.00

	3	5	41.1620	10.24460	4.58152	28.4416		53.8824	29.09	55.56
	4	5	18.8080	5.07166	2.26811	12.5107		25.1053	12.50	26.09
	5	5	16.7000	2.42583	1.08486	13.6879		19.7121	12.74	18.77
Total	25	29.3164	13.04373	2.60875	23.9322		34.7006	12.50	55.56	
CD4CD25IL10	1	5	24.6480	.88392	.39530	23.5505		25.7455	23.39	25.89
	2	5	18.4980	2.44624	1.09399	15.4606		21.5354	14.75	21.57
	3	5	12.3820	1.60266	.71673	10.3920		14.3720	10.26	14.77
	4	5	13.4100	1.04405	.46692	12.1136		14.7064	12.02	14.96
	5	5	17.5600	2.98899	1.33672	13.8487		21.2713	12.91	21.17
Total	25	17.2996	4.79368	.95874	15.3209		19.2783	10.26	25.89	

3. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4IL17	2.328	4	20	.091
CD8IL17	.973	4	20	.444
PAFAH	.827	4	20	.524
CD4CD25TGFb	.973	4	20	.444
CD4CD25Foxp3	1.787	4	20	.171
CD4CD25IL10	.816	4	20	.530

4. ANOVA

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4IL17	Between Groups	24.908	4	6.227	9.531	.000
	Within Groups	13.066	20	.653		
	Total	37.974	24			
CD8IL17	Between Groups	3084.175	4	771.044	174.412	.000
	Within Groups	88.416	20	4.421		
	Total	3172.591	24			
PAFAH	Between Groups	428.057	4	107.014	51.711	.000
	Within Groups	41.390	20	2.069		
	Total	469.447	24			
CD4CD25TGFb	Between Groups	3084.175	4	771.044	174.412	.000
	Within Groups	88.416	20	4.421		
	Total	3172.591	24			
CD4CD25Foxp3	Between Groups	3338.655	4	834.664	22.417	.000
	Within Groups	744.677	20	37.234		
	Total	4083.333	24			
CD4CD25IL10	Between Groups	474.074	4	118.518	30.612	.000
	Within Groups	77.432	20	3.872		
	Total	551.506	24			

5. Post Hoc Tukey HSD

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CD4IL17	1	2	-1.72000	.51120	.023	-3.2497	-.1903
		3	.75000	.51120	.594	-.7797	2.2797
		4	-1.85200	.51120	.013	-3.3817	-.3223
		5	-.87000	.51120	.455	-2.3997	.6597
	2	1	1.72000	.51120	.023	.1903	3.2497
		3	2.47000	.51120	.001	.9403	3.9997
		4	-.13200	.51120	.999	-1.6617	1.3977
		5	.85000	.51120	.477	-.6797	2.3797
	3	1	-.75000	.51120	.594	-2.2797	.7797
		2	-2.47000	.51120	.001	-3.9997	-.9403
		4	-2.60200	.51120	.000	-4.1317	-1.0723
		5	-1.62000	.51120	.035	-3.1497	-.0903
	4	1	1.85200	.51120	.013	.3223	3.3817
		2	.13200	.51120	.999	-1.3977	1.6617
		3	2.60200	.51120	.000	1.0723	4.1317
		5	.98200	.51120	.339	-.5477	2.5117
	5	1	.87000	.51120	.455	-.6597	2.3997
		2	-.85000	.51120	.477	-2.3797	.6797
		3	1.62000	.51120	.035	.0903	3.1497
		4	-.98200	.51120	.339	-2.5117	.5477
	CD8IL17	1	-12.25400	1.32978	.000	-16.2332	-8.2748
		3	-28.72000	1.32978	.000	-32.6992	-24.7408
		4	-4.33000	1.32978	.029	-8.3092	-.3508
		5	-24.37400	1.32978	.000	-28.3532	-20.3948
		2	12.25400	1.32978	.000	8.2748	16.2332
		3	-16.46600	1.32978	.000	-20.4452	-12.4868
		4	7.92400	1.32978	.000	3.9448	11.9032
		5	-12.12000	1.32978	.000	-16.0992	-8.1408
		3	28.72000	1.32978	.000	24.7408	32.6992
		2	16.46600	1.32978	.000	12.4868	20.4452
		4	24.39000	1.32978	.000	20.4108	28.3692
		5	4.34600	1.32978	.028	.3668	8.3252
		4	4.33000	1.32978	.029	.3508	8.3092
		2	-7.92400	1.32978	.000	-11.9032	-3.9448
		3	-24.39000	1.32978	.000	-28.3692	-20.4108
		5	-20.04400	1.32978	.000	-24.0232	-16.0648
		5	1	24.37400	1.32978	.000	20.3948

		2	12.12000	1.32978	.000	8.1408	16.0992
		3	-4.34600	1.32978	.028	-8.3252	-.3668
		4	20.04400	1.32978	.000	16.0648	24.0232
PAFAH	1	2	-12.60200	.90983	.000	-15.3246	-9.8794
		3	-6.47200	.90983	.000	-9.1946	-3.7494
		4	-6.68800	.90983	.000	-9.4106	-3.9654
		5	-3.67800	.90983	.005	-6.4006	-.9554
	2	1	12.60200	.90983	.000	9.8794	15.3246
		3	6.13000	.90983	.000	3.4074	8.8526
		4	5.91400	.90983	.000	3.1914	8.6366
		5	8.92400	.90983	.000	6.2014	11.6466
	3	1	6.47200	.90983	.000	3.7494	9.1946
		2	-6.13000	.90983	.000	-8.8526	-3.4074
		4	-.21600	.90983	.999	-2.9386	2.5066
		5	2.79400	.90983	.043	.0714	5.5166
	4	1	6.68800	.90983	.000	3.9654	9.4106
		2	-5.91400	.90983	.000	-8.6366	-3.1914
		3	.21600	.90983	.999	-2.5066	2.9386
		5	3.01000	.90983	.026	.2874	5.7326
	5	1	3.67800	.90983	.005	.9554	6.4006
		2	-8.92400	.90983	.000	-11.6466	-6.2014
		3	-2.79400	.90983	.043	-5.5166	-.0714
		4	-3.01000	.90983	.026	-5.7326	-.2874
CD4CD25TGFb	1	2	-12.25400	1.32978	.000	-16.2332	-8.2748
		3	-28.72000	1.32978	.000	-32.6992	-24.7408
		4	-4.33000	1.32978	.029	-8.3092	-.3508
		5	-24.37400	1.32978	.000	-28.3532	-20.3948
	2	1	12.25400	1.32978	.000	8.2748	16.2332
		3	-16.46600	1.32978	.000	-20.4452	-12.4868
		4	7.92400	1.32978	.000	3.9448	11.9032
		5	-12.12000	1.32978	.000	-16.0992	-8.1408
	3	1	28.72000	1.32978	.000	24.7408	32.6992
		2	16.46600	1.32978	.000	12.4868	20.4452
		4	24.39000	1.32978	.000	20.4108	28.3692
		5	4.34600	1.32978	.028	.3668	8.3252
	4	1	4.33000	1.32978	.029	.3508	8.3092
		2	-7.92400	1.32978	.000	-11.9032	-3.9448
		3	-24.39000	1.32978	.000	-28.3692	-20.4108
		5	-20.04400	1.32978	.000	-24.0232	-16.0648
	5	1	24.37400	1.32978	.000	20.3948	28.3532
		2	12.12000	1.32978	.000	8.1408	16.0992
		3	-4.34600	1.32978	.028	-8.3252	-.3668
		4	20.04400	1.32978	.000	16.0648	24.0232
CD4CD25Foxp3	1	2	19.70800	3.85922	.000	8.1598	31.2562
		3	3.64800	3.85922	.876	-7.9002	15.1962

		4	26.00200	3.85922	.000	14.4538	37.5502
		5	28.11000	3.85922	.000	16.5618	39.6582
	2	1	-19.70800	3.85922	.000	-31.2562	-8.1598
		3	-16.06000	3.85922	.004	-27.6082	-4.5118
		4	6.29400	3.85922	.496	-5.2542	17.8422
		5	8.40200	3.85922	.228	-3.1462	19.9502
	3	1	-3.64800	3.85922	.876	-15.1962	7.9002
		2	16.06000	3.85922	.004	4.5118	27.6082
		4	22.35400	3.85922	.000	10.8058	33.9022
		5	24.46200	3.85922	.000	12.9138	36.0102
	4	1	-26.00200	3.85922	.000	-37.5502	-14.4538
		2	-6.29400	3.85922	.496	-17.8422	5.2542
		3	-22.35400	3.85922	.000	-33.9022	-10.8058
		5	2.10800	3.85922	.981	-9.4402	13.6562
	5	1	-28.11000	3.85922	.000	-39.6582	-16.5618
		2	-8.40200	3.85922	.228	-19.9502	3.1462
		3	-24.46200	3.85922	.000	-36.0102	-12.9138
		4	-2.10800	3.85922	.981	-13.6562	9.4402
CD4CD25IL10	1	2	6.15000	1.24444	.001	2.4262	9.8738
		3	12.26600	1.24444	.000	8.5422	15.9898
		4	11.23800	1.24444	.000	7.5142	14.9618
		5	7.08800	1.24444	.000	3.3642	10.8118
	2	1	-6.15000	1.24444	.001	-9.8738	-2.4262
		3	6.11600	1.24444	.001	2.3922	9.8398
		4	5.08800	1.24444	.005	1.3642	8.8118
		5	.93800	1.24444	.941	-2.7858	4.6618
	3	1	-12.26600	1.24444	.000	-15.9898	-8.5422
		2	-6.11600	1.24444	.001	-9.8398	-2.3922
		4	-1.02800	1.24444	.919	-4.7518	2.6958
		5	-5.17800	1.24444	.004	-8.9018	-1.4542
	4	1	-11.23800	1.24444	.000	-14.9618	-7.5142
		2	-5.08800	1.24444	.005	-8.8118	-1.3642
		3	1.02800	1.24444	.919	-2.6958	4.7518
		5	-4.15000	1.24444	.024	-7.8738	-.4262
	5	1	-7.08800	1.24444	.000	-10.8118	-3.3642
		2	-.93800	1.24444	.941	-4.6618	2.7858
		3	5.17800	1.24444	.004	1.4542	8.9018
		4	4.15000	1.24444	.024	.4262	7.8738

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



6. Homogenous subset

CD4IL17

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	5	2.3780		
1	5	3.1280	3.1280	
5	5		3.9980	3.9980
2	5			4.8480
4	5			4.9800
Sig.		.594	.455	.339

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

CD8IL17

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1	5	10.2680				
4	5		14.5980			
2	5			22.5220		
5	5				34.6420	
3	5	1.000	1.000	1.000	1.000	38.9880
Sig.						1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

PAFAH

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	5	5.4400			
5	5		9.1180		
3	5			11.9120	
4	5			12.1280	
2	5	1.000	1.000	.999	18.0420
Sig.					1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

CD4CD25TGF β

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1	5	10.2680				
4	5		14.5980			
2	5			22.5220		
5	5				34.6420	
3	5					38.9880
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

CD4CD25Foxp3

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5	5	16.7000	
4	5	18.8080	
2	5	25.1020	
3	5		41.1620
1	5		44.8100
Sig.		.228	.876

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

CD4CD25IL10

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	5	12.3820		
4	5	13.4100		
5	5		17.5600	
2	5		18.4980	
1	5			24.6480
Sig.		.919	.941	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dependent Variable: PAF_AH

Model Summary and Parameter Estimates

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.477	11.868	1	13	.004	13.415	-.010		
Logarithmic	.389	8.260	1	13	.013	21.717	-2.013		
Inverse	.284	5.168	1	13	.041	9.230	312.571		
Quadratic	.562	7.702	2	12	.007	10.540	.019	-5.750E-5	
Cubic	.562	7.702	2	12	.007	11.651	.000	3.975E-5	-1.389E-7
Compound	.491	12.542	1	13	.004	13.676	.999		
Power	.401	8.715	1	13	.011	30.487	-.194		
S	.295	5.449	1	13	.036	2.212	30.242		
Growth	.491	12.542	1	13	.004	2.616	-.001		
Exponential	.491	12.542	1	13	.004	13.676	-.001		
Logistic	.491	12.542	1	13	.004	.073	1.001		

The independent variable is Dosis.



Lampiran 4. Hasil Analisis Path

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.786 ^a	.618	.563	8.13610

a. Predictors: (Constant), TGF_B, TH_17, IL_10

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	41.937	11.938		.002
	TH_17	-7.727	1.574	-.696	.000
	IL_10	1.097	.386	.427	.010
	TGF_B	.073	.166	.069	.664

a. Dependent Variable: T_Reg

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.594 ^a	.353	.294	4.02689

a. Predictors: (Constant), T_Req, TH_17

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients			Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	-.987	5.747		-.172	.865
	TH_17	-2.477	.963	-.573	-2.572	.017
	T_Reg	.298	.087	.765	3.430	.002

a. Dependent Variable: IL_10

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.435 ^a	.189	.115	10.97966

a. Predictors: (Constant), T_Reg, TH_17

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	58.228	15.669	3.716	.001
	TH_17	-5.915	2.626	-.562	.035
	T_Reg	.382	.237	.403	.121

a. Dependent Variable: TGF- β

Lampiran 5. Hasil MANOVA

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	D1	2.3400	.20716	5
	D2	4.9800	.52960	5
	D3	4.0000	.43739	5
	HFD	4.8500	.62222	5
	Kontrol	3.1300	.33634	5
	Total	3.8600	1.10956	25
IL_10	D1	12.3800	1.43708	5
	D2	13.4100	1.35493	5
	D3	17.5600	2.21799	5
	HFD	18.5000	2.20949	5
	Kontrol	24.6500	2.36261	5
	Total	17.3000	4.79357	25
TGF_B	D1	38.9900	4.14929	5
	D2	14.6000	1.60446	5
	D3	34.6400	4.14393	5
	HFD	22.5200	2.90513	5
	Kontrol	10.2700	1.07195	5
	Total	24.2040	11.67267	25
T_Reg	D1	41.1600	5.53562	5
	D2	18.8100	2.22590	5
	D3	16.7000	1.54861	5
	HFD	25.1000	2.93705	5
	Kontrol	44.8100	5.34090	5
	Total	29.3160	12.31341	25

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.990	429.880 ^b	4.000	17.000	.000
	Wilks' Lambda	.010	429.880 ^b	4.000	17.000	.000
	Hotelling's Trace	101.148	429.880 ^b	4.000	17.000	.000
	Roy's Largest Root	101.148	429.880 ^b	4.000	17.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	3.069	16.494	16.000	80.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	162.250	16.000	52.573	.000
	Hotelling's Trace	188.233	182.351	16.000	62.000	.000
	Roy's Largest Root	102.339	511.695 ^c	4.000	20.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Tests of Between-Subjects Effects

Analisis Regresi Linier Sederhana						
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	25.487 ^a	4	6.372	31.389	.000
	IL_10	474.343 ^b	4	118.586	30.747	.000
	TGF_B	3083.825 ^c	4	770.956	82.806	.000
	T_Reg	3338.293 ^d	4	834.573	55.529	.000
Intercept	TH_17	372.490	1	372.490	1834.976	.000
	IL_10	7482.250	1	7482.250	1939.984	.000
	TGF_B	14645.840	1	14645.840	1573.066	.000
	T_Reg	21485.696	1	21485.696	1429.571	.000
Perlakuan	TH_17	25.487	4	6.372	31.389	.000
	IL_10	474.343	4	118.586	30.747	.000
	TGF_B	3083.825	4	770.956	82.806	.000
	T_Reg	3338.293	4	834.573	55.529	.000
Error	TH_17	4.060	20	.203		
	IL_10	77.137	20	3.857		
	TGF_B	186.208	20	9.310		
	T_Reg	300.589	20	15.029		
Total	TH_17	402.037	25			
	IL_10	8033.730	25			
	TGF_B	17915.873	25			
	T_Reg	25124.578	25			
Corrected Total	TH_17	29.547	24			
	IL_10	551.480	24			
	TGF_B	3270.032	24			
	T_Reg	3638.882	24			

a. R Squared = .863 (Adjusted R Squared = .835)

b. R Squared = .860 (Adjusted R Squared = .832)

c. R Squared = .843 (Adjusted R Squared = .832)

c. R squared = .943 (Adjusted R squared = .932)

Kontras 1: HFD vs ND

Universitas Brawijaya

Descriptive Statistics

Contrast1		Mean	Std. Deviation	N
TH_17	ND	3.1300	.33634	5
	HFD	4.8500	.62222	5
	Total	3.9900	1.02182	10
IL_10	ND	24.6500	2.36261	5
	HFD	18.5000	2.20949	5
	Total	21.5750	3.89318	10
TGF_B	ND	10.2700	1.07195	5
	HFD	22.5200	2.90513	5
	Total	16.3950	6.77833	10
T_Reg	ND	44.8100	5.34090	5
	HFD	25.1000	2.93705	5
	Total	34.9550	11.15455	10

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.992	146.072 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.008	146.072 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	116.857	146.072 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	116.857	146.072 ^b	4.000	5.000	.000
Contrast1	Pillai's Trace	.988	105.258 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.012	105.258 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	84.206	105.258 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	84.206	105.258 ^b	4.000	5.000	.000

a. Design: Intercept + Contrast1

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	7.396 ^a	1	7.396	29.568	.001
	IL_10	94.556 ^b	1	94.556	18.073	.003
	TGF_B	375.156 ^c	1	375.156	78.249	.000
	T_Reg	971.210 ^d	1	971.210	52.284	.000
Intercept	TH_17	159.201	1	159.201	636.452	.000
	IL_10	4654.806	1	4654.806	889.700	.000
	TGF_B	2687.960	1	2687.960	560.644	.000
	T_Reg	12218.520	1	12218.520	657.768	.000
Contrast1	TH_17	7.396	1	7.396	29.568	.001
	IL_10	94.556	1	94.556	18.073	.003
	TGF_B	375.156	1	375.156	78.249	.000
	T_Reg	971.210	1	971.210	52.284	.000
Error	TH_17	2.001	8	.250		
	IL_10	41.855	8	5.232		
	TGF_B	38.355	8	4.794		
	T_Reg	148.606	8	18.576		
Total	TH_17	168.598	10			
	IL_10	4791.218	10			
	TGF_B	3101.472	10			
	T_Reg	13338.336	10			
Corrected Total	TH_17	9.397	9			
	IL_10	136.411	9			
	TGF_B	413.512	9			
	T_Reg	1119.816	9			

a. R Squared = .787 (Adjusted R Squared = .760)

b. R Squared = .693 (Adjusted R Squared = .655)

c. R Squared = .907 (Adjusted R Squared = .896)

d. R Squared = .867 (Adjusted R Squared = .851)

Universitas Brawijaya

151

Kontras 2: HFD vs Dosis**Descriptive Statistics**

	Contrast2	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	HFD	4.8500	.62222	5
	Dosis	3.7733	1.19128	15
	Total	4.0425	1.16447	20
IL_10	HFD	18.5000	2.20949	5
	Dosis	14.4500	2.80911	15
	Total	15.4625	3.17483	20
TGF_B	HFD	22.5200	2.90513	5
	Dosis	29.4100	11.46479	15
	Total	27.6875	10.39220	20
T_Reg	HFD	25.1000	2.93705	5
	Dosis	25.5567	11.91965	15
	Total	25.4425	10.32213	20

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.987	292.296 ^b	4.000	15.000	.000
	Wilks' Lambda	.013	292.296 ^b	4.000	15.000	.000
	Hotelling's Trace	77.946	292.296 ^b	4.000	15.000	.000
	Roy's Largest Root	77.946	292.296 ^b	4.000	15.000	.000
Contrast2	Pillai's Trace	.903	34.742 ^b	4.000	15.000	.000
	Wilks' Lambda	.097	34.742 ^b	4.000	15.000	.000
	Hotelling's Trace	9.264	34.742 ^b	4.000	15.000	.000
	Roy's Largest Root	9.264	34.742 ^b	4.000	15.000	.000

a. Design: Intercept + Contrast2

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	4.347 ^a	1	4.347	3.654	.072
	IL_10	61.509 ^b	1	61.509	8.517	.009
	TGF_B	178.020 ^c	1	178.020	1.710	.207
	T_Reg	.782 ^d	1	.782	.007	.934
Intercept	TH_17	278.857	1	278.857	234.369	.000
	IL_10	4071.384	1	4071.384	563.719	.000
	TGF_B	10112.718	1	10112.718	97.137	.000
	T_Reg	9622.867	1	9622.867	85.596	.000
Contrast2	TH_17	4.347	1	4.347	3.654	.072
	IL_10	61.509	1	61.509	8.517	.009
	TGF_B	178.020	1	178.020	1.710	.207
	T_Reg	.782	1	.782	.007	.934
Error	TH_17	21.417	18	1.190		
	IL_10	130.003	18	7.222		
	TGF_B	1873.938	18	104.108		
	T_Reg	2023.599	18	112.422		
Total	TH_17	352.600	20			
	IL_10	4973.290	20			
	TGF_B	17383.912	20			
	T_Reg	14970.797	20			
Corrected Total	TH_17	25.764	19			
	IL_10	191.512	19			
	TGF_B	2051.959	19			
	T_Reg	2024.381	19			

a. R Squared = .169 (Adjusted R Squared = .123)

b. R Squared = .321 (Adjusted R Squared = .283)

c. R Squared = .087 (Adjusted R Squared = .036)

d. R Squared = .000 (Adjusted R Squared = -.055)

Kontras 3: Dosis vs ND

Descriptive Statistics

	Contrast3	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	ND	3.1300	.33634	5
	Dosis	3.7733	1.19128	15
	Total	3.6125	1.07294	20
IL_10	ND	24.6500	2.36261	5
	Dosis	14.4500	2.80911	15
	Total	17.0000	5.24632	20
TGF_B	ND	10.2700	1.07195	5
	Dosis	29.4100	11.46479	15
	Total	24.6250	13.01527	20
T_Reg	ND	44.8100	5.34090	5
	Dosis	25.5567	11.91965	15
	Total	30.3700	13.55939	20

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.991	397.363 ^b	4.000	15.000	.000
	Wilks' Lambda	.009	397.363 ^b	4.000	15.000	.000
	Hotelling's Trace	105.964	397.363 ^b	4.000	15.000	.000
	Roy's Largest Root	105.964	397.363 ^b	4.000	15.000	.000
Contrast3	Pillai's Trace	.991	410.640 ^b	4.000	15.000	.000
	Wilks' Lambda	.009	410.640 ^b	4.000	15.000	.000
	Hotelling's Trace	109.504	410.640 ^b	4.000	15.000	.000
	Roy's Largest Root	109.504	410.640 ^b	4.000	15.000	.000

a. Design: Intercept + Contrast3

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	1.552 ^a	1	1.552	1.375	.250
	IL_10	390.150 ^b	1	390.150	52.881	.000
	TGF_B	1373.773 ^c	1	1373.773	13.404	.000
	T_Reg	1390.091 ^d	1	1390.091	11.897	.000
Intercept	TH_17	178.710	1	178.710	158.301	.000
	IL_10	5733.037	1	5733.037	777.052	.000
	TGF_B	5904.384	1	5904.384	57.611	.000
	T_Reg	18568.004	1	18568.004	158.913	.000
Contrast3	TH_17	1.552	1	1.552	1.375	.250
	IL_10	390.150	1	390.150	52.881	.000
	TGF_B	1373.773	1	1373.773	13.404	.000
	T_Reg	1390.091	1	1390.091	11.897	.000
Error	TH_17	20.321	18	1.129		
	IL_10	132.803	18	7.378		
	TGF_B	1844.776	18	102.488		
	T_Reg	2103.195	18	116.844		
Total	TH_17	282.876	20			
	IL_10	6302.953	20			
	TGF_B	15346.362	20			
	T_Reg	21940.023	20			
Corrected Total	TH_17	21.873	19			
	IL_10	522.953	19			
	TGF_B	3218.549	19			
	T_Reg	3493.285	19			

a. R Squared = .071 (Adjusted R Squared = .019)

b. R Squared = .746 (Adjusted R Squared = .732)

c. R Squared = .427 (Adjusted R Squared = .395)

d. R Squared = .398 (Adjusted R Squared = .364)

Kontras 4: D1 vs ND ya**Descriptive Statistics**

	Contrast4	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	ND	3.1300	.33634	5
	Dosis 50%	2.3400	.20716	5
	Total	2.7350	.49266	10
IL_10	ND	24.6500	2.36261	5
	Dosis 50%	12.3800	1.43708	5
	Total	18.5150	6.72451	10
TGF_B	ND	10.2700	1.07195	5
	Dosis 50%	38.9900	4.14929	5
	Total	24.6300	15.40404	10
T_Reg	ND	44.8100	5.34090	5
	Dosis 50%	41.1600	5.53562	5
	Total	42.9850	5.47702	10

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.996	280.276 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.004	280.276 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	224.221	280.276 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	224.221	280.276 ^b	4.000	5.000	.000
Contrast4	Pillai's Trace	.997	429.014 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.003	429.014 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	343.211	429.014 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	343.211	429.014 ^b	4.000	5.000	.000

a. Design: Intercept + Contrast4

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	1.560 ^a	1	1.560	19.998	.002
	IL_10	376.382 ^b	1	376.382	98.437	.000
	TGF_B	2062.096 ^c	1	2062.096	224.560	.000
	T_Reg	33.306 ^d	1	33.306	1.126	.320
Intercept	TH_17	74.802	1	74.802	958.769	.000
	IL_10	3428.052	1	3428.052	896.558	.000
	TGF_B	6066.369	1	6066.369	660.620	.000
	T_Reg	18477.102	1	18477.102	624.561	.000
Contrast4	TH_17	1.560	1	1.560	19.998	.002
	IL_10	376.382	1	376.382	98.437	.000
	TGF_B	2062.096	1	2062.096	224.560	.000
	T_Reg	33.306	1	33.306	1.126	.320
Error	TH_17	.624	8	.078		
	IL_10	30.589	8	3.824		
	TGF_B	73.463	8	9.183		
	T_Reg	236.673	8	29.584		
Total	TH_17	76.987	10			
	IL_10	3835.023	10			
	TGF_B	8201.928	10			
	T_Reg	18747.082	10			
Corrected Total	TH_17	2.184	9			
	IL_10	406.971	9			
	TGF_B	2135.559	9			
	T_Reg	269.979	9			

a. R Squared = .714 (Adjusted R Squared = .679)

b. R Squared = .925 (Adjusted R Squared = .915)

c. R Squared = .966 (Adjusted R Squared = .961)

d. R Squared = .123 (Adjusted R Squared = .014)

Universitas Brawijaya

Kontras 5: D2 vs ND ya**Descriptive Statistics**

	Contrast5	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	ND	3.1300	.33634	5
	Dosis 100%	4.9800	.52960	5
	Total	4.0550	1.06095	10
IL_10	ND	24.6500	2.36261	5
	Dosis 100%	13.4100	1.35493	5
	Total	19.0300	6.19601	10
TGF_B	ND	10.2700	1.07195	5
	Dosis 100%	14.6000	1.60446	5
	Total	12.4350	2.61971	10
T_Reg	ND	44.8100	5.34090	5
	Dosis 100%	18.8100	2.22590	5
	Total	31.8100	14.23579	10

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.993	171.530 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.007	171.530 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	137.224	171.530 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	137.224	171.530 ^b	4.000	5.000	.000
Contrast5	Pillai's Trace	.990	128.130 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.010	128.130 ^b	4.000	5.000	.000
	Hotelling's Trace	102.504	128.130 ^b	4.000	5.000	.000
	Roy's Largest Root	102.504	128.130 ^b	4.000	5.000	.000

a. Design: Intercept + Contrast5

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	8.556 ^a	1	8.556	43.478	.000
	IL_10	315.844 ^b	1	315.844	85.159	.000
	TGF_B	46.872 ^c	1	46.872	25.177	.001
	T_Reg	1690.000 ^d	1	1690.000	100.956	.000
Intercept	TH_17	164.430	1	164.430	835.532	.000
	IL_10	3621.409	1	3621.409	976.415	.000
	TGF_B	1546.292	1	1546.292	830.587	.000
	T_Reg	10118.761	1	10118.761	604.470	.000
Contrast5	TH_17	8.556	1	8.556	43.478	.000
	IL_10	315.844	1	315.844	85.159	.000
	TGF_B	46.872	1	46.872	25.177	.001
	T_Reg	1690.000	1	1690.000	100.956	.000
Error	TH_17	1.574	8	.197		
	IL_10	29.671	8	3.709		
	TGF_B	14.893	8	1.862		
	T_Reg	133.919	8	16.740		
Total	TH_17	174.561	10			
	IL_10	3966.924	10			
	TGF_B	1608.058	10			
	T_Reg	11942.680	10			
Corrected Total	TH_17	10.131	9			
	IL_10	345.515	9			
	TGF_B	61.766	9			
	T_Reg	1823.919	9			

a. R Squared = .845 (Adjusted R Squared = .825)

b. R Squared = .914 (Adjusted R Squared = .903)

c. R Squared = .759 (Adjusted R Squared = .729)

d. R Squared = .927 (Adjusted R Squared = .917)

Kontras 6: D3 vs ND**Descriptive Statistics**

	Contrast6	Mean	Std. Deviation	N
TH_17	ND	3.1300	.33634	5
	Dosis 200%	4.0000	.43739	5
	Total	3.5650	.58784	10
IL_10	ND	24.6500	2.36261	5
	Dosis 200%	17.5600	2.21799	5
	Total	21.1050	4.31632	10
TGF_B	ND	10.2700	1.07195	5
	Dosis 200%	34.6400	4.14393	5
	Total	22.4550	13.15728	10
T_Reg	ND	44.8100	5.34090	5
	Dosis 200%	16.7000	1.54861	5
	Total	30.7550	15.27206	10

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.991	137.274 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.009	137.274 ^b			
	Hotelling's Trace	109.819	137.274 ^b			
	Roy's Largest Root	109.819	137.274 ^b			
Contrast6	Pillai's Trace	.993	168.125 ^b	4.000	5.000	.000
	Wilks' Lambda	.007	168.125 ^b			
	Hotelling's Trace	134.500	168.125 ^b			
	Roy's Largest Root	134.500	168.125 ^b			

a. Design: Intercept + Contrast6

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TH_17	1.892 ^a	1	1.892	12.431	.008
	IL_10	125.670 ^b	1	125.670	23.934	.001
	TGF_B	1484.742 ^c	1	1484.742	162.079	.000
	T_Reg	1975.430 ^d	1	1975.430	127.763	.000
Intercept	TH_17	127.092	1	127.092	834.949	.000
	IL_10	4454.210	1	4454.210	848.307	.000
	TGF_B	5042.270	1	5042.270	550.429	.000
	T_Reg	9458.700	1	9458.700	611.751	.000
Contrast6	TH_17	1.892	1	1.892	12.431	.008
	IL_10	125.670	1	125.670	23.934	.001
	TGF_B	1484.742	1	1484.742	162.079	.000
	T_Reg	1975.430	1	1975.430	127.763	.000
Error	TH_17	1.218	8	.152		
	IL_10	42.006	8	5.251		
	TGF_B	73.285	8	9.161		
	T_Reg	123.693	8	15.462		
Total	TH_17	130.202	10			
	IL_10	4621.886	10			
	TGF_B	6600.297	10			
	T_Reg	11557.824	10			
Corrected Total	TH_17	3.110	9			
	IL_10	167.676	9			
	TGF_B	1558.027	9			
	T_Reg	2099.124	9			

a. R Squared = .608 (Adjusted R Squared = .560)

b. R Squared = .749 (Adjusted R Squared = .718)

c. R Squared = .953 (Adjusted R Squared = .947)

d. R Squared = .941 (Adjusted R Squared = .934)

Component Matrix^a

	Component
	1
TH_17	.813
IL_10	-.402
TGF_B	-.043
T_Reg	-.945

Extraction Method:

Principal Component Analysis.

a. 1 components extracted.

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: FAC1_1

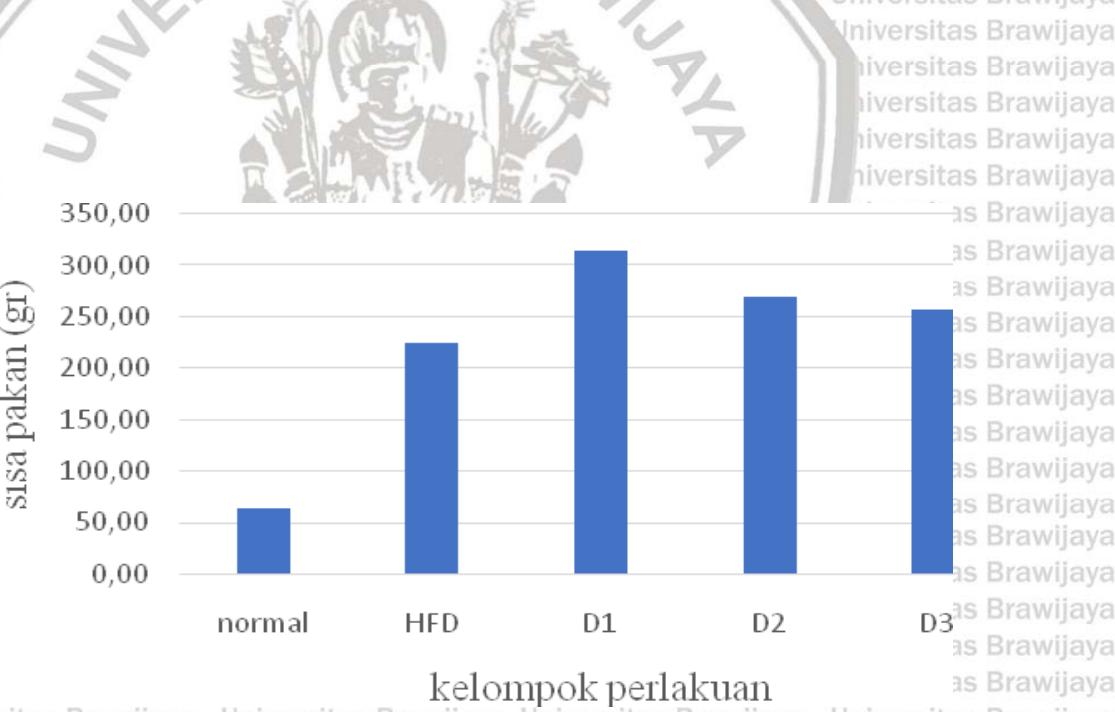
Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.308	5.781	1	13	.032	.684	-.004		
Logarithmic	.489	12.464	1	13	.004	5.693	-1.123		
Inverse	.671	26.526	1	13	.000	-1.652	238.769		
Quadratic	.979	276.567	2	12	.000	4.704	-.045	8.040E-5	
Cubic	.979	276.567	2	12	.000	4.704	-.045	8.040E-5	.000
Compound ^a
Power ^a
S ^a
Growth ^a
Exponential ^a
Logistic ^a

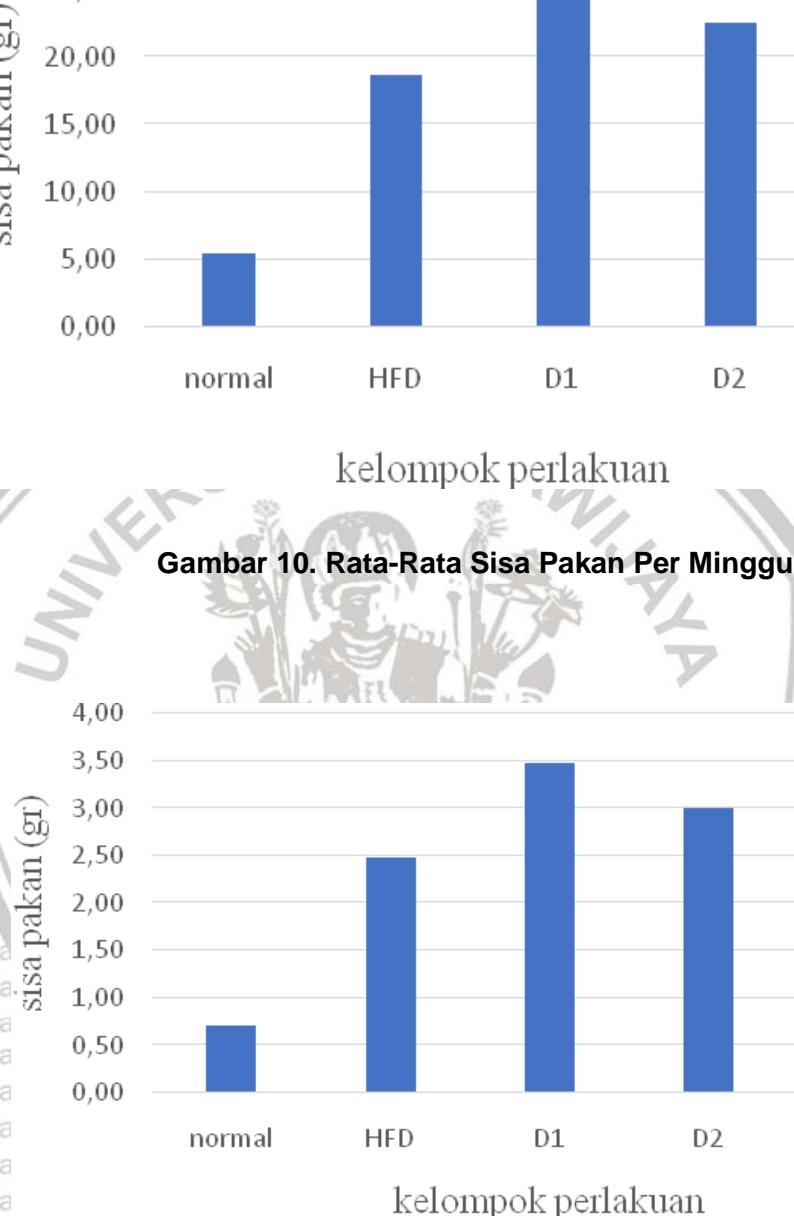
The independent variable is Dosis.

- a. The dependent variable (FAC1_1) contains non-positive values. The minimum value is -1.26885. Log transform cannot be applied. The Compound, Power, S, Growth, Exponential, and Logistic models cannot be calculated for this variable.

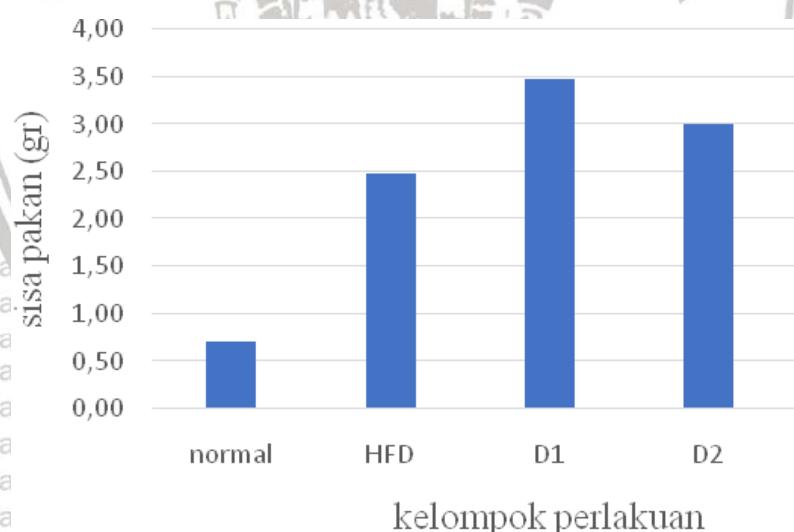
Lampiran 6. Data Sisa Pakan**Tabel 9. Data Sisa Pakan**

Perlakuan	Rata "(g)"		
	Selama Perlakuan	Per Minggu	Per Hari
normal	63.83	5.32	0.71
HFD	224.00	18.67	2.49
D1	313.67	26.14	3.49
D2	270.00	22.50	3.00
D3	257.17	21.43	2.86

**Gambar 9. Rata-Rata Sisa Pakan Selama Perlakuan**



Gambar 10. Rata-Rata Sisa Pakan Per Minggu



Gambar 3. Rata-Rata Sisa Pakan Per Hari