

ARTIKEL PENELITIAN

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

THE EFFECT OF HSP65 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ON THE VACCINATION TOWARDS AORTIC THICKNESS OF MICE THAT HAVE BEEN INDUCED ATHEROSCLEROSIS

Dian Amelia Sari*

*Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2017.003.02.1> • MNJ.2017;3(2):47-54
• Received 7 April 2017 • Reviewed 23 May 2017 • Accepted 15 June 2017

ABSTRAK

Latar belakang. Atherosklerosis merupakan proses inflamasi pembuluh darah yang disertai aktivitas imun yang ditandai dengan peningkatan ketebalan aorta pada histopatologi. Salah satu protein protektif di dinding arteri manusia yang terekspresi saat terdapat stress endotel adalah HSP60. HSP65 merupakan protein homolog HSP60 yang terdapat pada bakteri, seperti *Mycobacterium tuberculosis*.

Tujuan. Mengetahui pengaruh HSP65 terhadap aorta mencit yang diinduksi atherosklerosis.

Metode. Penelitian eksperimental menggunakan *post test control group design* terbagi dalam 5 kelompok dengan masing-masing terdiri dari 6 mencit. Kelompok I mencit diberi diet normokolesterolemia (kontrol negatif), kelompok II mencit diberi diet atherogenik tanpa vaksinasi (kontrol positif), kelompok III mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi 0,5µg, kelompok IV mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi, sedangkan kelompok V mencit diberi diet atherogenik dan vaksinasi 1µg.

Hasil. Terdapat perbedaan antara mencit dengan diet atherogenik dengan vaksinasi ($p > 0,05$). Didapatkan penurunan signifikan pada ketebalan aorta mencit dengan vaksinasi HSP65 0,75µg ($r = -0,449$, $p = 0,024$).

Simpulan. Vaksinasi dengan HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dapat menurunkan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis dengan dosis efektif 0,75 µg.

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

ABSTRACT

Background. Atherosclerosis is an inflammatory process of the blood vessels accompanied by immune activity which is signed by the enhancement of histopathologic. One of the protective proteins in the human artery wall expressed when there is endothelial stress is HSP60. HSP65 is an HSP60 homologous protein found in bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*.

Objective. To determine the effect of HSP65 through aorta thickness of mice.

Methods. This research applied experimental study using post-test control group design in which subjects were divided into 5 groups. Each group consisted of 5 mice. Group I mice fed a diet normokolesterolemia (negative control), group II mice given atherogenic diet without vaccine (positive control), group III mice given atherogenic diet and 0,5µg accination, group IV mice were given atherogenic diet and 0,75µg vaccination, group V mice were given atherogenic diet and 1µg vaccination.

Results. There was a difference between the atherogenic diet and vaccination group ($p < 0.05$). There was a significant decrease in aortic thickness of atherosclerosis mice with HSP65 vaccination dose 0,75µg ($r = -0,449$, $p = 0,024$).

Conclusion. HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* vaccination can reduce the thickness of the aorta in mice induced atherosclerosis and the effective dose is 0.75 mg dose.

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

Korespondensi: dianamelina@gmail.com

PENDAHULUAN

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

Atherosklerosis merupakan proses inflamasi kronis yang berkembang akibat akumulasi kolesterol pada *arterial intima* yang berlanjut dengan pembentukan plak atau lesi atherosklerotik, umumnya terjadi pada arteri dengan ukuran sedang hingga besar. Faktor risiko yang berperan dalam atherosklerosis adalah hipertensi, *hyperglycemia*, dan *hypercholesterolemia*. Pembentukan plak pada atherosklerosis ini melibatkan *exogenous* antigen dan *endogenous* antigen. Antigen yang berperan penting saat proses pembentukan plak pada pasien dengan *hypercholesterolemia* adalah LDL yang mengalami oksidasi (oxLDL). Namun, studi menunjukkan bahwa antigen HSP60, protein yang berfungsi melindungi protein yang belum matur selama proses maturasi intraseluler, memiliki peran penting dalam perjalanan atherosklerosis. Protein ini dilepaskan dari sel yang mengalami *injury* saat inflamasi dan protein ini mampu memicu respon autoimun. Pada atherosklerosis, sel endothel yang mengalami kerusakan akan mengekspresikan HSP60 yang memicu respon autoimun yang

kemudian berkembang menjadi atherosklerosis. Antigen HSP60 manusia ternyata memiliki kemiripan dengan HSP65 yang teresekresi dalam jumlah besar pada *Mycobacterium tuberculosis*.

Hingga saat ini, terapi atherosklerosis terus mengalami perkembangan pesat di era kedokteran yang sudah semakin modern. Namun, pada kenyataannya perkembangan terapi baru seperti statin hanya mampu mengurangi risiko kematian tidak lebih dari 40% dan dua per tiga penyakit jantung masih muncul meskipun sudah mendapatkan terapi. Hal ini disebabkan oleh mekanisme kerja statin yang hanya menurunkan kadar kolesterol di dalam darah. Selain terapi yang bekerja secara spesifik pada lesi atherosklerosis, kesadaran masyarakat terhadap risiko terjadinya penyakit jantung dan pembuluh darah juga memegang peran yang besar dalam mengatasi atherosklerosis. Studi menunjukkan, proses terjadinya atherosklerosis juga dipengaruhi oleh respon imun. Hal ini menjadikan respon imun sebagai target potensial dalam pengembangan obat atau vaksin untuk mencegah atherosklerosis. Vaksin atherosklerosis diharapkan dapat secara spesifik bekerja pada lesi atherosklerosis serta dapat berpengaruh pada setiap faktor resiko yang memicu munculnya atherosklerosis. Dengan upaya pembentukan respon imun sejak awal melalui metode vaksinasi, diharapkan komplikasi yang lebih berbahaya dapat dicegah.¹

Vaksinasi adalah tindakan preventif bertujuan mencegah terjadinya penyakit melalui regulasi sistem imun. Secara umum, sistem imun manusia dapat mengalami dua hal besar dalam menghadapi benda asing yaitu imunitas (kekebalan) dan toleransi (tidak reaktif). Vaksinasi pada penyakit infeksi diperoleh melalui peningkatan respon imun, namun pada penyakit autoimun dimana imunitas menyerang antigen dalam tubuh sendiri, peningkatan imunitas hanya akan memperburuk lesi. Induksi toleransi pada penyakit autoimun seperti atherosklerosis berpotensi mencegah terjadinya penyakit. Toleransi sistem imun dapat dicapai dengan induksi antigen melalui mukosa.

Pemberian antigen dalam dosis rendah dan paparan berulang akan membentuk toleransi mukosa yang spesifik terhadap antigen tertentu. Toleransi mukosa ini juga memengaruhi toleransi sistemik melalui peran dari sel T regulator (Treg). Sel Treg berperan dalam mensupresi sistem imun, sehingga toleransi spesifik antigen akan menurunkan respon imun terhadap antigen tersebut. Penurunan respon imun terhadap antigen pembentuk plak atherosklerosis pada akhirnya dapat menurunkan ketebalan aorta. Sel Treg adalah target yang potensial dalam meregulasi autoimun terhadap HSP60 pada atherosklerosis. Selanjutnya, antigen HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* yang memiliki kemiripan dengan HSP60 manusia diduga dapat menjadi target potensial dalam pengembangan terapi atherosklerosis melalui metode vaksinasi.^{2,4,6}

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

Tujuan Penelitian. Memperoleh bukti serta mengetahui pengaruh peptida HSP65 dari *Mycobacterium tuberculosis* berperan dalam progresivitas lesi atherosklerosis pada model atherogenik sehingga dapat menjadi target baru dalam pengembangan vaksin untuk pencegahan atherosklerosis, mengetahui penurunan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis setelah pemberian vaksin *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis*, mengetahui dosis vaksin *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam menurunkan ketebalan aorta pada mencit model atherosklerosis.

Manfaat Penelitian. Menambah wawasan ilmu pengetahuan mengenai upaya pencegahan atherosklerosis menggunakan vaksinasi, menjadi dasar teori untuk penelitian selanjutnya tentang penggunaan *heat shock protein 65 Mycobacterium*

tuberculosis sebagai vaksin pencegah atherosklerosis pada manusia, menambah wawasan masyarakat luas tentang metode pencegahan atherosklerosis dengan vaksin atherosklerosis dari *heat shock protein 65 Mycobacterium tuberculosis*, serta sebagai bahan pertimbangan perusahaan industri obat untuk menciptakan metode vaksinasi yang baru dalam menghambat progresivitas lesi atherosklerosis melalui pemberian *peptida HSP65 Mycobacterium tuberculosis*.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan Randomized Post Test Only Controlled Group Design.

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

Variabel Penelitian. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dengan adjuvant Phosphate Buffered Saline (PBS) yang dibagi dalam beberapa kelompok. Kelompok I yaitu kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan diet atherogenik dan tanpa diberikan vaksinasi). Kelompok II yaitu kelompok kontrol positif (mencit yang diberi diet atherogenik tanpa diberikan vaksinasi). Kelompok III yaitu mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 0,5 µg/ oral. Kelompok IV yaitu mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 0,75 µg/ oral. Kelompok V yaitu mencit yang diberi diet atherogenik dengan diberikan vaksinasi peptida HSP65 1 µg/ oral

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: ketebalan aorta. Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek

homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi : jenis mencit, umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan awal, kondisi lingkungan kandang, pemberian vaksin HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* intranasal, komposisi dan ukuran diet atherogenik serta diet normokolesterolemia.

Perawatan mencit. Proses adaptasi mencit dilakukan selama 14 hari. Setiap hari mencit diberi makan diet normokolesterolemia dan minum air matang sekali dalam sehari dengan komposisi yang sesuai. Kandang berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 5 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 5 buah, botol air 10 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius.¹

Pembuatan Diet Normokolesterolemia. Komposisi dari diet normokolesterolemia pada makanan mencit adalah tepung terigu, tepung beras, dedak gandum, kasein, putih telur.¹

Pembuatan Vaksin Atherosklerosis. Pembuatan vaksin atherosklerosis dilakukan dengan mencampurkan antigen peptide HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* dengan phosphate buffered saline (PBS). Preparasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* merupakan 100 µg HSP65 dalam volume sebesar 50 µL. Kemudian dilakukan penghitungan dengan rumus $V_1.M_1 = V_2.M_2$. Karena jumlah antigen yang masuk dalam satu kali injeksi intranasal pada perlakuan penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan

1, 2, dan 3 berturut-turut adalah 0,5 µg, 0,75 µg, dan 1 µg, maka pemberian PBS sebagai pelarut disesuaikan dengan volume yang dibutuhkan.

Pemberian Vaksin Atherosklerosis. Vaksinasi dilakukan dengan cara subyek penelitian difiksasi pada bagian leher menggunakan tangan agar lubang hidung mencit dapat diinjeksikan vaksin. Injeksi vaksin terbagi menjadi tiga dosis 0,5µg/0,5µL, 0,75µg/0,5µL, dan 1 µg/0,5 µL. Vaksinasi dilakukan sebanyak 3 kali seminggu dengan selang 2 hari, yaitu pada hari ke 1, 3, dan 5, dan dilanjutkan pada minggu kedua sebanyak 2 kali yaitu pada hari ke 7 dan 9. Vaksinasi tidak diberikan pada mencit kontrol positif dan kontrol negatif.^{4,5,9}

Pemberian diet atherogenik. Kelompok kontrol negatif diberi diet normokolesterolemia sejak adaptasi sampai pembedahan, sedangkan kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 setelah diberi vaksin HSP65 mulai diberi diet atherogenik setiap hari selama 5 minggu. Kebutuhan makan mencit umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 15g/100 gBB sehingga komposisi untuk tiap mencit perlakuan adalah 5 gram yang terdiri dari campuran chow, 15% lemak dari minyak kelapa, 1.25% kolesterol, dan 0.5% asam kolat.⁷

Pembedahan mencit. Mencit dibedah pada minggu ke 12. Sebelum di bedah, mencit di anastesi dengan dimasukkan ke dalam toples berisi kloroform. Mencit yang telah di anastesi diletakkan diatas alas dari sterofoam dalam posisi telentang. Keempat kaki mencit difiksasi dengan jarum pentul di alas sterofoam. Pembedahan diawali dengan menggunting kulit di bagian perut mencit. Lalu darah dari jantung diambil dengan spuit 1ml secara cepat sebelum mencit mati. Aorta mencit dipotong dan diletakkan ke dalam wadah plastik berisi formalin 10%, di tutup, dan disimpan dalam freezer -20°C. Tiap wadah plastik yang berisi aorta diberi label sesuai kelompok mencit.⁷

Pembuatan preparat. Jaringan aorta dipotong melintang setebal 3-5µm, ditempelkan pada slide glass dan difiksasi dengan aseton 2-3 menit. Kemudian dilakukan pengecatan sampel menggunakan hematoxillin eosin (HE). Dilakukan mounting dengan gelatin kemudian ketebalan aorta diukur dengan software dari foto scan preparat.⁷

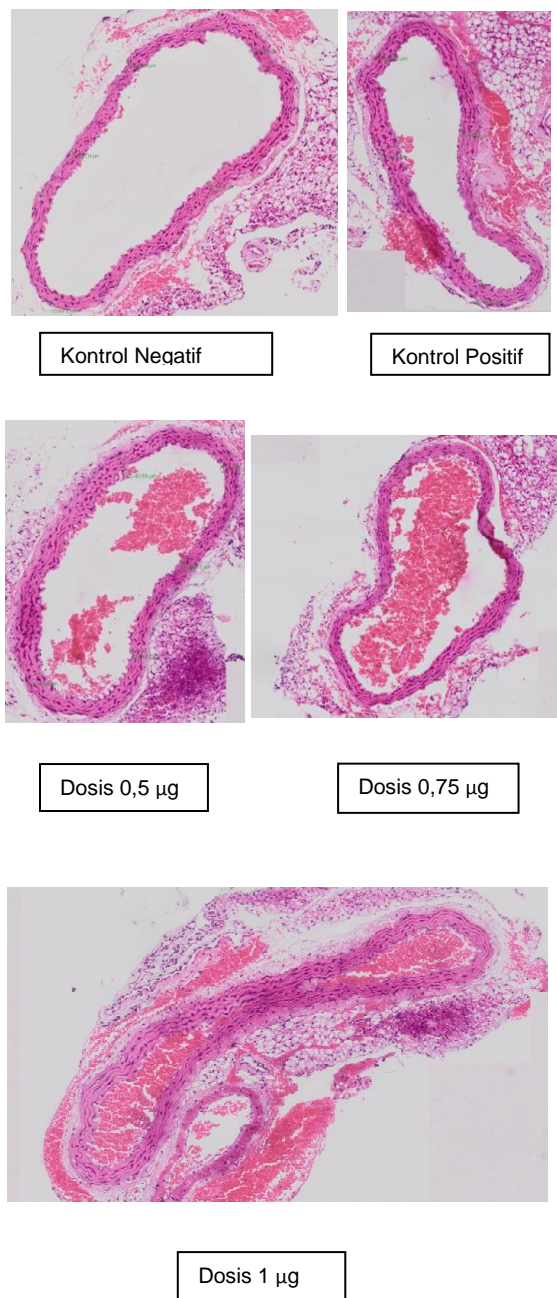
Pengukuran ketebalan aorta. Foto scan preparat dibuka dengan software khusus untuk mengukur ketebalan aorta yaitu Olympus. Data ketebalan aorta diperoleh dari hasil pengukuran masing-masing sampel mencit pada 5 kali lapangan pandang dengan perbesaran 40X, lalu diambil reratanya. Hasil masing-masing sampel kembali dikelompokkan sesuai kelompok perlakuan mencit.⁷

Analisa Data. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16

dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Uji yang dilakukan adalah uji normalitas, uji homogenitas varian, uji *One Way ANOVA*, uji Post Hoc test (uji Tuckey HSD) dengan tingkat kemaknaan 95% ($p<0,05$), uji homogenous subsets, dan uji korelasi Pearson.^{3,7}

HASIL PENELITIAN

Dari hasil pengukuran ketebalan aorta pada 5 kelompok perlakuan, ditemukan bahwa rata-rata ketebalan aorta masing-masing perlakuan memiliki perbedaan. Aorta mencit perlakuan I atau kontrol negatif memiliki rerata 35,67 μm . Pada mencit perlakuan II atau kontrol positif didapatkan ukuran rerata ketebalan aorta 45,02 μm . Mencit kontrol positif diberi makan diet atherogenik yang dapat berpengaruh pada ketebalan aorta mencit dibandingkan diet normokolesterolemia yang diterima oleh mencit kontrol negatif. Aorta mencit perlakuan III menunjukkan ukuran rerata 39,87 μm . Mencit perlakuan III ini diberi perlakuan berupa diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis 0,5 μg sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5. Mencit perlakuan IV yang diberi diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis 0,75 μg sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5 menunjukkan angka rerata ketebalan aorta 37,36 μm . Rerata ketebalan aorta kelompok perlakuan IV ternyata lebih rendah dibandingkan rerata ketebalan aorta kelompok perlakuan III. Sedangkan pada kelompok perlakuan V yang diberi diet atherogenik dan diinduksi vaksin atherosklerosis dengan dosis 1 μg sebanyak 3 kali pada hari ke 1, 3 dan 5 didapatkan rerata ketebalan aorta sebesar 32,59 μm . Rerata kelompok perlakuan V ini paling rendah dibandingkan kedua kelompok perlakuan vaksinasi yang lain. Angka ketebalan aorta pada kelompok perlakuan V ini bahkan lebih rendah jika dibandingkan ketebalan aorta pada mencit kontrol negatif. Hasil pengukuran ketebalan aorta juga dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Gambaran histopatologis aorta masing-masing kelompok perlakuan

Dari gambaran histopatologi didapatkan perbedaan gambaran ketebalan aorta dari masing-masing kelompok perlakuan mencit. Tampak gambaran aorta kontrol negatif tipis, sedangkan pada kontrol positif tampak tebal. Perlakuan III ketebalan aorta pada gambaran histopatologi tampak tebal hampir menyerupai perlakuan II. Sedangkan perlakuan IV atau dosis 0,75 μg menunjukkan gambaran aorta dengan ketebal yang hampir menyerupai kontrol negatif. Pada perlakuan

V ketebalan aorta di lapangan pandang tertentu bahkan lebih tipis dibandingkan kontrol negatif.

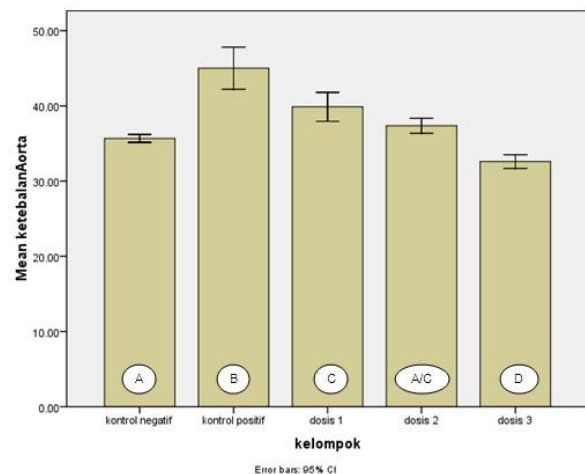
Hasil penelitian ini diuji normalitas distribusi data dengan menggunakan Shapiro Wilk dan Kolmogorov Smirnov. Didapatkan bahwa data hasil penelitian ini adalah normal ($p > 0,05$). Setelah hasilnya diketahui normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian dengan menggunakan *Levene test* untuk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

Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) yang terlampir pada lampiran digunakan untuk menguji signifikansi dan mengambil kesimpulan setelah data terbukti homogen. Uji ini tergolong analisis komparatif lebih dari dua variabel atau lebih dari dua rata-rata. Tujuannya ialah untuk membandingkan lebih dari dua rata-rata. Dari hasil uji ANOVA didapatkan angka ketebalan aorta pada kelima kelompok mencit memang berbeda ($p = 0,000$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

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

yang diperoleh dari percobaan ini adalah berbeda secara signifikan.

Pada data homogenous subsets dari uji Tukey HSD didapatkan angka 32,5940 untuk dosis 3 yaitu dosis 1 μ g dan diwakili dengan D. Kontrol negatif yaitu perlakuan normal menunjukkan angka 35,6720, bersama dengan dosis 2 yaitu dosis 0,75 μ g menunjukkan angka 37,3600 dan diwakili dengan A. Dosis 2 yaitu dosis 0,75 μ g menunjukkan angka 37,3600 bersama dengan dosis 1 yaitu dosis 0,5 μ g menunjukkan angka 39,8720 dan diwakili dengan C. Sedangkan kontrol positif yaitu perlakuan diet atherogenik menunjukkan angka 45,0160 dan diwakili dengan B. Data homogenous subsets kemudian diaplikasikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Ketebalan aorta terhadap perlakuan

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

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

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

Dari penelitian ini didapatkan bahwa pemberian diet atherogenik berhasil menciptakan kondisi atherosklerotik pada mencit. Hal ini dibuktikan dengan rerata ketebalan aorta mencit perlakuan II atau kontrol positif (45,02 µm) yang meningkat

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

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

SIMPULAN

Vaksinasi dengan HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* pada mencit model atherosklerosis dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta.

Dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* yang efektif dalam penelitian ini untuk menurunkan ketebalan aorta adalah 0,75 μ g.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* optimal yang dapat menurunkan ukuran ketebalan aorta secara lebih signifikan.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan dosis vaksinasi HSP65 *Mycobacterium tuberculosis* supaya mengetahui jumlah dosis toksik dari kombinasi tersebut.

Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan sampel yang lebih banyak untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dengan menghindari terjadinya variasi normal yang mengganggu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hansson, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. Journal of American Heart Association, Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2001; 21: 1876 - 1890 doi: 10.1161/hq1201.100220.

2. Hansson, G.K. and Libby, P. The Immune Response in Atherosclerosis: A Double-edged Sword. Nature Reviews Immunology 2006. Vol.6:508-519.
3. Lumongga, Fitriani. Atherosclerosis. USU Repository. 2007.
4. Maron R., Sukhova G., Faria A.M., Hoffman E., Mach F., Libby P., et al. Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. Circulation: 2002. 106:1708-1715.
5. Marker T., Sell H., Zilleßen P., Glode A., Kriebel J., Ouwens D.M., et. al. Heat Shock Protein 60 as a Mediator of Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. Diabetes; 2012. Vol. 61.
6. Puijvelde G.H.M.van, Es T. van, Wanrooij E.J.A. van, Habets K.L.L., Vos P. de, Zee van der, et al. 2007. Induction of Oral Tolerance to HSP60 or an HSP-60 Peptide Activates T Cell Regulation and Reduces Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:2677-2683.
7. Rosamond W., Flegal K., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation: 2008 117:E25-E146.
8. Sherer Y and Shoenfeld Y. Mechanisms of Disease: Atherosclerosis in Autoimmune Disease. Nature Clinical Practice Rheumatology. 2006. Vol.2 No.2.
9. Xu Q., Metzler B., Jahangiri M., and Mandal K. Molecular Chaperones and Heat Shock Proteins in Atherosclerosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 2011. 302: H506 - H514.