

**POTENSI VAKSIN
ATEROSKLEROSIS VIA INDUKSI
PROTEIN LECTIN-LIKE OXIDIZED
LDL RECEPTOR 1 (LOX-1)
TERHADAP AKTIVASI NF- κ B,
EKSPRESI eNOS DAN KADAR CRP
PADA TIKUS DENGAN DIET
ATEROGENIK**

**Thoha Muhajir Albaar¹⁾, Fredo Tamara¹⁾,
Oktavia Rahayu A²⁾, Ardina Pramesti Putri²⁾,
Angi Nurkhairina²⁾, Valentina Yurina²⁾**

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas
Kedokteran Universitas Brawijaya
email: tmalbaar@gmail.com
email: fredotamara@yahoo.com

²Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya
oktavia.rahayu_adianingsih@rocketmail.com
email: ardina3011@gmail.com
email: nurkhairinaangi@gmail.com
email: v_yurina@yahoo.com

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammation condition as a response to the lipoproteins deposition in the artery wall. Oxidized low density lipoprotein (OxLDL) the major of atherosclerosis development. Lectin-like oxidized low density lipoprotein 1 (LOX-1) is primary receptor for OxLDL in endothelial cells. Recent studies have shown that LOX-1 might be potential for the atherosclerosis drugs development. This study was designed to investigate the response of LOX-1 vaccination with alum as adjuvant for atherogenesis to prevent increasing of NF- κ B, CRP, and decrease of eNOS. This study was experimental laboratory with post test only control group design for 56 days using 28 male Wistar rats. Rats were divided into 7 groups which were negative control with normal diet AIN 93 M, positive control with atherogenic diet AIN 93 M, atherogenic diet AIN 93 M and LOX-1 protein treatment with dosage 1 ng + alum (P1), 10 ng + alum (P2), 100 ng + alum (P3), 1 μ g + alum (P4) and alum only (P5). On the 57th day, the rats were sacrificed and taken its serum spesimen to measure CRP level with enzyme immunoassay method and aorta tissues to measure NF- κ B activation and expression

eNOS with immunohistochemical method. Statistical analysis showed that the administration of LOX-1 protein in the treatment groups is significant to prevent NF- κ B activation ($p=0,00$) and prevent decreased expression of eNOS ($p=0,00$), but not significant to prevent increased CRP level ($p=0,83$). The conclusion of this study is that the LOX-1 protein vaccination have potency to prevent atherosclerosis with decreasing NF- κ B activation and prevent decreasing eNOS expression.

Keywords: *Atherosclerosis vaccine, LOX-1, NF- κ B, eNOS, CRP*

1. PENDAHULUAN

Salah satu penyakit yang berhubungan dengan terjadinya aterosklerosis adalah penyakit kardiovaskuler, yang diketahui menyebabkan kematian terbesar di negara maju. Di Indonesia sendiri mulai terjadi pergeseran angka kematian dari penyakit infeksi kepada penyakit metabolik dan degeneratif termasuk juga penyakit jantung koroner dan penyumbatan pembuluh darah otak yang diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis (Rastini *et al*, 2010). Aterosklerosis merupakan penyebab kematian nomor satu di dunia termasuk Indonesia. Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2010), Indonesia memiliki angka kematian akibat aterosklerosis hampir sebanyak 50%. Pada tahun 2030, diperkirakan hampir 23,6 juta orang akan meninggal karena aterosklerosis (WHO, 2011).

Aterosklerosis merupakan respon inflamasi kronik terhadap deposisi kolesterol pada dinding pembuluh darah arteri. Oksidasi kolesterol jenis *low density lipoprotein* (LDL) memegang peranan penting dalam proses atherogenesis. LDL yang telah teroksidasi (OxLDL) difagosit oleh makrofag yang diekspresi oleh *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) di dalam subendotel pembuluh darah dan menjadi sel busa yang dapat menyebabkan sekresi sitokin proinflamasi serta menginduksi apoptosis sel (Hansson, 2005). *Lectin like oxidized LDL receptor 1* (LOX-1) merupakan salah satu *scavenger receptor* OxLDL pada sel endotel, yang secara aktif berkontribusi terhadap semua tahap dari

aterogenesis. LOX-1 memediasi *uptake* OxLDL ke dalam tunika intima sehingga terjadi disfungsi sel endotel yang menyebabkan rangkaian peristiwa dalam fase awal aterogenesis. *C-reactive protein* (CRP) merupakan salah satu mediator inflamasi yang meningkat jumlahnya dalam fase awal ini sehingga menyebabkan penurunan *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) yang meningkatkan adesi monosit pada sel endotel sebagai tahap awal pemhinggabentukan sel busa (Osman, 2006).

Hingga saat ini, terapi untuk ateriosklerosis berupa obat anti inflamasi dan anti hiperlipidemia, hanya menghambat progresivitas dari plak ateriosklerosis yang telah ada, bukan mencegah pembentukannya (Curtiss, 2009). Oleh karena itu, diperlukan tindakan preventif lainnya selain pola hidup sehat, konsumsi obat anti hiperlipidemia, serta antioksidan dan vitamin dalam pencegahan kejadian ateriosklerosis untuk meminimalisasi terjadinya penyakit kardiovaskuler yaitu dengan mengidentifikasi sistem imun yang berperan pada ateriosklerosis sebagai target preventif yang menjanjikan. Dari beberapa hasil penelitian yang ada membentuk cara berpikir kami untuk menemukan pencegahan ateriosklerosis terbaru dengan metode vaksinasi. Penelitian terkini telah menunjukkan bahwa pembentukan antibodi terhadap suatu target tertentu memiliki potensi yang besar sebagai strategi pencegahan penyakit-penyakit degeneratif. Berdasarkan data-data yang ada, kami membuat suatu vaksin ateriosklerosis menggunakan protein LOX-1, dan menguji potensinya terhadap aktivasi NF- κ B, ekspresi eNOS dan kadar CRP pada model tikus yang diberi diet aterogenik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk (a) mengetahui potensi vaksin ateriosklerosis via induksi protein LOX-1 terhadap pencegahan peningkatan kadar CRP pada model tikus yang diberi diet aterogenik, (b) mengetahui potensi vaksin ateriosklerosis via induksi protein LOX-1 terhadap pencegahan penurunan ekspresi eNOS pada pada model tikus yang diberi diet aterogenik, (c) mengetahui potensi vaksin ateriosklerosis via induksi protein LOX-1 terhadap pencegahan aktivasi NF- κ B pada model tikus yang diberi diet aterogenik.

2. METODE

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kandidat vaksin ateriosklerosis dengan menggunakan berbagai bahan yaitu antigen LOX-1 dan adjuvan (alum) yang dibagi dalam 7 kelompok penelitian: kontrol negatif yang diberi diet normal AIN-93M, kontrol positif yang diberi diet aterogenik AIN-93M, kelompok perlakuan yang diberi aterogenik AIN-93M dan protein LOX-1 dengan dosis 1 ng+alum 100 μ L secara subkutan (sc) (P1), 10 ng+alum 100 μ L secara subkutan (sc)(P2), 100 ng+alum 100 μ L secara subkutan (sc) (P3), 1 μ g+alum 100 μ L secara subkutan (sc)(P4), dan alum 100 μ L secara subkutan (sc)(P5).

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah: (a) kadar CRP; (b) aktivasi NF- κ B; (c) ekspresi Enos.

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus novvergicus*) strain Wistar jantan usia 6 – 8 minggu dengan berat 120 – 160 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing kelompok dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1955) $(t-1) (r-1) \geq 15$ dengan $t =$ jumlah perlakuan dan $r =$ jumlah replikasi atau ulangan, sehingga didapatkan 4 kali (pembulatan dari 3,5) untuk masing-masing kelompok, sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini secara keseluruhan adalah sejumlah 28 ekor tikus.

Perawatan Hewan Coba

Tikus Wistar sebanyak 28 ekor dirawat dalam kandang masing-masing satu tikus satu kandang dan dilakukan adaptasi satu minggu. Makan dan minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti satu minggu sekali dan tikus ditimbang setiap minggunya.

Pembuatan Ransum Diet Aterogenik

Induksi aterosklerosis dilakukan dengan pemberian diet aterogenik sebanyak 30 gram setiap harinya yang diberikan selama 56 hari. Diet normal dan diet aterogenik yang digunakan pada penelitian ini merupakan modifikasi dari diet *American Institute of Nutrition-93M* (AIN-93M) dengan komposisi seperti pada Tabel 1 (Handayani *et al.*, 2012).

Tabel 3.1. Komposisi Diet

Nama Bahan	Bobot (g/kg)	
	Normal	Aterogenik
Tepung jagung	620	210
Sukrosa	100	175
Minyak kedelai	40	50
Gelatin	65	50
Kasein	80	128
CMC	50	51
Mineral dan vitamin	5 butir	10 butir
Korvet	-	105
Minyak kelapa	-	105
Asam kolat	-	3
Kolesterol	-	10
Propiltiourasil	-	2

Preparasi dan Injeksi Vaksin

Preparasi vaksin dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) menggunakan metode sterilisasi akhir berupa filtrasi (*sterile milipore filter 0,22 micron*). Vaksin mengandung 100µl protein LOX-1 (*Rat OLR1 Fc Tag*) dalam PBS (sesuai dosis kelompok perlakuan) dan 100µl alum sebagai adjuvan. Vaksin diinjeksikan pada hari ke-0, 21 dan 35 melalui rute subkutan.

Pengecekan Aktivasi NF-κB dan Ekspresi eNos

Pembuatan Slide Preparat

Slide aorta dibuat dengan dibekukan dalam mesin *frozen section/fries coupe* pada suhu -20°C yang akan dipotong setebal 3-5µm. Kemudian ditempelkan pada slide glass yang difiksasi dengan aseton selama 2-3 menit dan disimpan pada suhu 4°C.

Pengecatan Slide Preparat

Pengecatan slide preparat dilakukan dengan menfiksasi *slide glass* dengan metanol dan didiamkan selama 5 menit, kemudian dikeringkan, diangin-anginkan dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan. Ditambahkan H₂O₂ selama 10 menit dan dicuci dengan PBS

selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan. Lalu ditambahkan serum FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang untuk proses *bloking*. Dicuci dengan PBS selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan. Ditetesi dengan antibodi primer dan diinkubasi 24 jam dan dicuci dengan PBS selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan. Lalu ditetesi dengan antibodi sekunder dan diinkubasi selama satu jam dan dicuci dengan PBS selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan.

Ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit. Dicuci dengan PBS selama 5 menit dengan tiga kali pengulangan, ditetesi DAB dan diinkubasi 5-30 menit. Selanjutnya dilakukan counterstain dengan Mayer's hematoxylin selama 10 menit, lalu dibilas dan dicuci dengan akuades selama 10 menit, dikeringkan dan ditutup coverglass (Rastini *et al.*, 2010).

Pengamatan aktivasi NF-κB dan ekspresi eNOS

Adanya aktivasi NF-κβ ditunjukkan dengan penampakan inti sel berwarna coklat yang terdapat pada sel endotel pembuluh darah aorta. Sedangkan pada ekspresi eNOS ditunjukkan adanya imunoreaksi positif dengan penampakan sitoplasma sel yang tercatat berwarna coklat yang terdapat pada sel endotel pembuluh darah aorta. Penghitungan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000x pada 10 lapangan pandang dan diambil reratanya.

Pengecekan kadar C-Reactive Protein

Pembuatan Supernatant

Supernatant dibuat dengan sentrifugasi pada 2000 x g selama 10 menit untuk menghilangkan kontaminan dan disimpan pada suhu -20oC. Dihindari dari siklus freeze-thaw.

Perhitungan kadar CRP

CRP diukur menggunakan sampel supernatant diencerkan 500 kali lipat dengan sampel pengencer sebelum analisis. Kemudian sampel seratus mikroliter kalibrator, kontrol, dan tidak diketahui ditambahkan ke sumur mikrotiter dilapisi

dengan antibodi anti-CRP monoklonal dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dengan vibrasi pada mixer horizontal. Lalu dicuci dengan 250 ml PBS yang ditambahkan ke setiap sumur, dibilas total sebanyak lima kali. Selanjutnya ditambahkan 100 ml peroksidase berlabel antibodi anti-CRP monoklonal dan plate diguncang pada suhu kamar selama 1 jam yang ditambahkan 100 ml substrat (tetramethylbenzidine) ke setiap sumur.

Reaksi dihentikan 10-20 menit kemudian dengan penambahan 50 ml H₂SO₄ (*stop solution*). Densitas optik masing-masing sumur ditentukan pada 450 nm. Kurva kalibrasi yang dihasilkan, dan konsentrasi sampel tidak diketahui ditentukan langsung dari kurva kalibrasi. Hasil itu dikalikan dengan faktor pengenceran (500) dan dinyatakan dalam miligram per liter. Pengujian menggunakan partikel *immunonephelometry* untuk menduga jumlah CRP dalam sampel serum. Partikel polistiren dilapisi dengan antibodi anti-CRP monoklonal menjadi gumpalan bila dicampur

dengan sampel yang mengandung CRP. Intensitas hamburan cahaya karena reaksi aglutinasi diukur dengan nephelometer dan secara langsung berkaitan dengan konsentrasi CRP. Sampel secara otomatis diencerkan 20 kali lipat oleh instrumen sebelum analisis.

Prosedur Pengumpulan dan Analisa Data

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *IBM SPSS Statistics 20* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test*, dan uji korelasi Pearson (Dahlan, 2004).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh data rerata asupan pakan, rerata kenaikan berat badan, rerata aktivasi NF- κ B, rerata ekspresi eNOS, dan rerata kadar CRP.

Tabel 1. Data Hasil Penelitian dari Masing-Masing Kelompok [rerata (SD)]

Kelompok Penelitian	Jumlah sampel (ekor)	Asupan Pakan (gram)	Kenaikan BB (gram)	Aktivasi NF- κ B (%)	Ekspresi eNOS (%)	Kadar CRP (mg/dL)
K _n	4	15.00 (1.15)	28.25 (20.53)	26.05 (0.18)	70.20 (0.05)	0.015 (0.01)
K _p	4	8.25 (0.96)	14.25 (6.40)	67.80 (0.37)	18.60 (0.06)	0.028 (0.01)
P ₁	4	7.75 (0.96)	19.75 (16.09)	45.10 (0.15)	38.70 (0.10)	0.025 (0.01)
P ₂	4	8.25 (0.50)	23.25 (18.28)	44.15 (0.03)	40.80 (0.05)	0.023 (0.02)
P ₃	4	7.50 (0.58)	13.5 (2.08)	38.62 (0.05)	56.30 (0.03)	0.023 (0.01)
P ₄	4	8.50 (1.29)	23.25 (2.22)	33.18 (0.02)	66.80 (0.10)	0.015 (0.01)
P ₅	4	7.00 (0.82)	19.25 (7.50)	43.50 (0.05)	30.80 (0.15)	0.023 (0.02)

K_n (diet normal, tidak diberi perlakuan); K_p (diet aterogenik, tidak diberi perlakuan); P₁ (diet aterogenik, diberi protein LOX-1 1 ng/100 μ l + alum 100 μ l); P₂ (diet aterogenik, diberi protein LOX-1 10 ng/100 μ l + alum 100 μ l); P₃ (diet

P₄ (diet aterogenik, diberi protein LOX-1 1 μ g/100 μ l + alum 100 μ l); P₅ (diet aterogenik, alum 100 μ l).

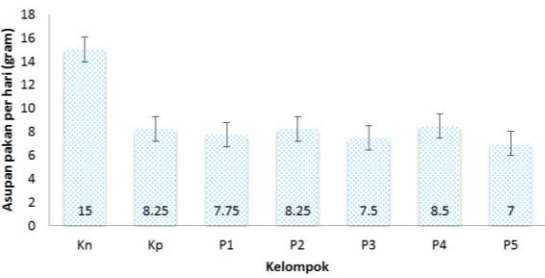
Asupan Pakan Tikus dan Kenaikan Berat Badan

Pada Gambar 1A, terlihat bahwa rerata asupan pakan terendah terdapat pada kelompok P₅ yaitu 7,00 gram/hari, sedangkan rerata asupan pakan tertinggi terdapat pada kelompok K_n yaitu 15,00 gram/hari.

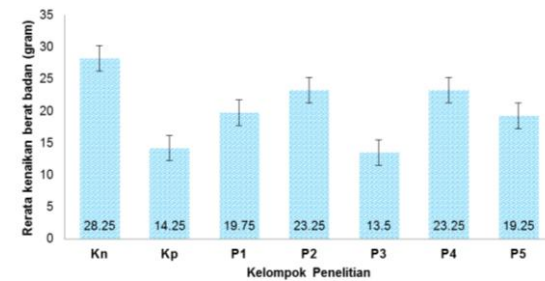
Dari hasil uji *Kruskal-Wallis*, didapatkan nilai p sebesar 0,017 ($p < 0,05$) yang artinya bahwa terdapat pengaruh perbedaan kelompok penelitian terhadap asupan pakan tikus yang berbeda secara

bermakna. Sedangkan rerata kenaikan berat badan terendah terdapat pada kelompok P₃ yaitu 13,5 (2,08) gram, sedangkan rerata asupan pakan tertinggi terdapat pada kelompok Kn yaitu 28,25 (20,53) gram.

Dari hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai p sebesar 0,610 ($p > 0,05$) yang artinya bahwa bahwa tidak terdapat pengaruh perbedaan kelompok penelitian terhadap kenaikan berat badan tikus yang berbeda secara bermakna ($p=0,610$) (Gambar 1B).



A

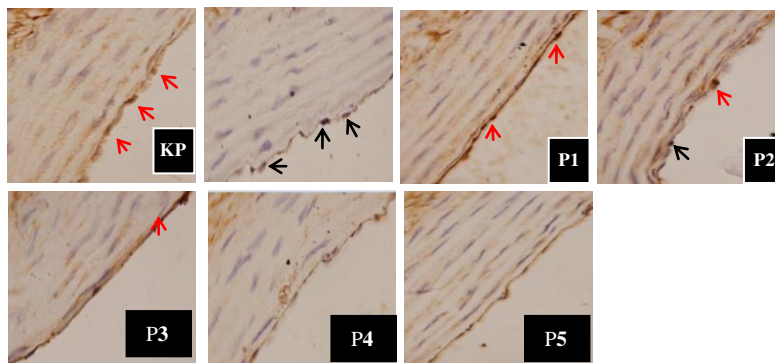


B

Gambar 1. Grafik Perbandingan Rerata Hasil antar Masing-Masing Kelompok Penelitian. A. Rerata Asupan Pakan per Hari, B. Kenaikan Berat Badan

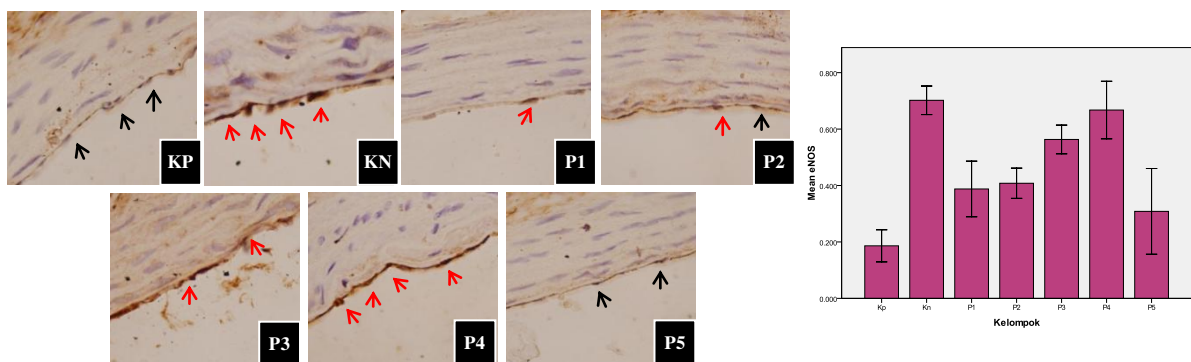
PerhitunganAktivasiNF-κB

Hasil penelitian aktivasi NF-κB pada masing-masing kelompok penelitian disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Gambaran Histopatologi Jaringan Aorta dengan Pengecatan Imunohistokimia NF-κB dengan pembesaran 1000 X.

Keterangan: panah merah menunjukkan aktivasi NF-κB pada inti sel endotel, panah hitam menunjukkan NF-κB yang tidak teraktivasi pada inti sel endotel.



Gambar 3. Gambaran Histopatologi Jaringan Aorta dengan Pengecatan Imunohistokimia eNOS dengan pembesaran 1000 X (Kiri) dan GrafikPerbandingan Rerata Aktivasi eNOS antar Masing-Masing Kelompok Penelitian (Kanan).

Keterangan: panah merah menunjukkan ekspresi eNOS pada sitoplasma sel endotel, panah hitam menunjukkan eNOS yang tidak terekspresi pada sitoplasma sel endotel

Uji ANOVA terhadap aktivasi NF- κ B pada sel endotel jaringan aorta tikus menunjukkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Oleh karena itu perlu dilanjutkan dengan uji *post hoc multiple comparison Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *post hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif ($p=0.000$), dan seluruh kelompok perlakuan (P1 ($p=0.000$), P2 ($p=0.000$), P3 ($p=0.000$), P4 ($p=0.000$), dan P5($p=0.000$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin LOX-1 + alum mampu mencegah peningkatan aktivasi NF- κ B pada tikus yang diinduksi aterosklerosis secara signifikan.

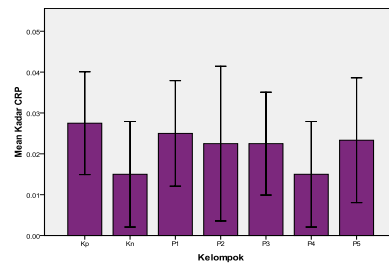
Pengukuran Ekspresi eNOS

Hasil penelitian tentang ekspresi eNOS pada masing-masing kelompok penelitian disajikan pada Gambar 3. Uji ANOVA terhadap ekspresi eNOS pada sel endotel jaringan aorta tikus menunjukkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Oleh karena itu perlu dilanjutkan dengan uji *post hoc multiple comparison Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Hasil uji *post hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif ($p=0.000$), perlakuan 1 ($p=0.038$), 2 ($p=0.018$), 3 ($p=0.000$), dan 4 ($p=0.000$), namun tidak signifikan pada perlakuan 5 ($p=0.497$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin LOX-1 + alum mampu mencegah penurunan ekspresi eNOS pada tikus yang diinduksi aterosklerosis secara signifikan.

Pengukuran CRP

Hasil penelitian kadar CRP pada masing-masing kelompok penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Perbandingan rerata kadar CRP antar masing-masing kelompok penelitian

Uji ANOVA terhadap aktivasi NF- κ B pada sel endotel jaringan aorta tikus menunjukkan nilai $p=0,830$ ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan.

Efektivitas Vaksin Via Induksi LOX-1 dalam Mencegah Peningkatan Aktivasi NF- κ B Pada Model Tikus Dengan Diet Aterogenik.

Pada tikus yang diberikan diet aterogenik dapat meningkatkan LDL sehingga dapat mengaktifasi NF- κ B pada proksimal aorta yang memicu kondisi aterosklerosis (Hajra *et al.*, 2000). Pada tikus yang diberikan diet aterogenik, dapat mengaktifasi NF- κ B sehingga memicu disfungsi endotel, dimana merupakan proses awal dalam aterosklerosis (Gareus *et al.*, 2008). Diet aterogenik memicu terjadinya respon inflamatori yang ditandai dengan peningkatan aktivasi NF- κ B (Maharani, 2012).

NF- κ B berperan penting dalam berbagai aspek pada patogenesis aterosklerosis. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang meregulasi produksi sitokin – sitokin yang berperan dalam respon inflamatori seperti TNF- α , IL-1, IL-6 . Selain itu, NF- κ B meregulasi ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, E-selectin sehingga menyebabkan adhesi monosit pada endotel pembuluh darah dan bermigrasi ke subendotel pembuluh darah yang mengakibatkan pembentukan sel busa (Gareus *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini vaksinasi via induksi LOX-1 dapat mencegah peningkatan aktivasi NF- κ B secara signifikan ($p<0,05$).

Hal ini dikarenakan vaksinasi tersebut dapat menghambat respon inflamatori pada pembuluh darah. Hal tersebut sejalan dengan penelitian ini yang menunjukkan bahwa pemberian vaksin via induksi LOX-1 dapat mencegah peningkatan aktivasi NF- κ B sehingga menghambat respon inflamatori pada pembuluh darah.

Apabila respon inflamatori dapat dicegah maka proses aterosklerosis dapat dihindari. Dengan demikian, pemberian vaksin protein LOX-1 dapat memberikan efek protektif terhadap aterosklerosis.

Potensi Vaksin Aterosklerosis via Induksi LOX-1 dalam Mencegah Penurunan Ekspresi eNOS pada Model Tikus dengan Diet Aterogenik

Diet aterogenik menyebabkan perubahan LDL menjadi OxLDL dikarenakan adanya stress oksidatif sehingga OxLDL masuk ke dalam sel endotel pembuluh darah, dan menyebabkan terjadinya fase awal aterosclerosis yang melibatkan banyak ekspresi dari beberapa gen seperti eNOS yang berfungsi dalam sintesis *Nitric Oxide* (NO) sebagai vasodilator, *cyclo-oxygenase* (COX), *growth factor* dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1).

Upregulasi ekspresi gen pada sel endotel dapat menginduksi proses awal aterosclerosis melibatkan migrasi sel inflamatori ke sisi sel endotel yang teraktivasi (Hajra *et al.*, 2000, Tate, 2007). Pada penelitian ini pemberian vaksin via induksi protein LOX-1 dapat mencegah penurunan ekspresi eNOS secara signifikan ($p < 0,05$). Hal ini dikarenakan vaksinasi tersebut dapat menghambat uptake OxLDL ke dalam sel endotel dan mencegah penurunan kadar NO intraseluler akibat pencegahan aktivasi NF- κ B sehingga tidak terjadi disfungsi dan apoptosis sel endotel yang berfungsi sebagai barier dinding pembuluh darah. Hal tersebut sejalan dengan penelitian ini yang menunjukkan bahwa pemberian vaksin via induksi LOX-1 dapat mencegah penurunan ekspresi eNOS sehingga menghambat proses aterosclerosis.

Efektivitas Via Induksi LOX-1 dalam Mencegah Peningkatan Kadar CRP Pada Model Tikus Dengan Diet Aterogenik

CRP adalah marker resiko yang kuat pada penyakit kardiovaskular (Manolov, 2003). CRP dapat meningkatkan regulasi molekul molekul adhesi untuk adhesi monosit melalui upregulasi NF- κ B (Osman, 2006). Peningkatan CRP juga mengakibatkan disfungsi endotel dengan mencegah peningkatan produksi NO (Szmitko, 2003) sehingga CRP berkontribusi dalam patogenesis aterosclerosis.

Konsentrasi CRP dalam darah akan meningkat pada 4-6 jam pertama sebagai respon terhadap suatu faktor resiko yang menyebabkan terjadinya inflamasi dan akan mencapai puncaknya antara 36-50 jam (Schmitz, 2008). Hal ini menyebabkan CRP tidak akan meningkat secara signifikan pada proses inflamasi kronik seperti aterosclerosis dimana hal ini sesuai dengan penelitian ini dimana pemberian vaksin via induksi LOX-1 tidak mempengaruhi kadar CRP dalam darah pada proses aterosclerosis.

4. KESIMPULAN

1. Pemberian vaksin protein LOX-1 dapat mencegah peningkatan aktivasi NF- κ B dan penurunan ekspresi eNOS setelah pemberian vaksin secara signifikan.
2. Pemberian vaksin protein LOX-1 tidak mempengaruhi kadar CRP dalam darah secara signifikan.

5. REFERENSI

- Curtiss, L.K. 2009. Reversing Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, No. 360:11.
- Dahlan, SM. 2004. *Seri Statistik: Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan; Uji Hipotesis dengan Menggunakan SPSS Program 12 Jam*. Jakarta: Arkans. Hal. 4-26; 90-101
- Federer WT. 1955. *Experimental Design: Theory and Application*. Oxford & IBH .London, Publishing Company.
- Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthousa, S., Made, I., Kardakaris, R., Polykratis, A et al. 2008. *Endothelial Cell-Specific NF- κ B*

- Inhibition Protects Mice from Atherosclerosis*. *Cell Metabolism* 8, 372–383.
- Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, and Cybulsky MI. 2000. *The NF- κ B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9052–9057
- Handayani, D., and J. Chen. 2011. Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus Edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed A High-Fat Diet. *Journal of Obesity*, p.1-8
- Hansson, G. K. 2005. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, No. 352:1685-95
- Kliegman, R.M., Behrman, R.E., Jenson, H.B., Stanton, B.F. 2007. *Nelson Textbook of Pediatric* (18th Edition). New York: Saunders.
- Maharani, Tri, Sargowo, Djanggan. 2012. *Anthocyanin Effect From Purple Ipomoea Batatas Decrease Formation CD40, TRAF-2 Complex, NF- κ B, and MDA in Inflammation Atherogenesis*.
- Manolov, D.E., W. Koenig, V. Hombach, J. Torzewski. 2003. C-reactive protein and atherosclerosis. is there any causal link?. *Histology and Histopathology*, 18: 1189-1193
- Nisson, Kitahara, M., Kanaki., Ishii, I., and Saito, Y. 2009. Atherosclerosis Induced by Chronic Inhibition of The Synthesis of Nitric Oxide in Moderately Hypercholesterolaemic Rabbits is Suppressed by Pitavastatin. *Br J Pharmacol*, Vol. 159(7): 1418–1428.
- Osman, R., L'Aller, P., Elgharib, N., and Tardif, J. 2006. Critical Appraisal of C-Reactive Protein Throughout The Spectrum of Cardiovascular Disease. *Vascular Health and Risk Management*, Vol. 2(3): 221–237.
- Pirillo A., Norata G. D., Catapano A. L. 2013. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis: Mediators of Inflammation. Hindawi Publishing Corporation, Vol. 2013, Article ID 152786, 12 pages
- Rastini, E.K., Widodo, M.A., dan Rohman, M.S. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) terhadap Ekspresi NF- κ B dan Ekspresi Protein (TNF- α , ICAM-1) pada Kultur Sel Endotel (HUVECs) Dipapar OxLDL. *J.Exp. Life Sci*, Vol. 1 No. 1. Universitas Brawijaya
- Schmit, X, J.L. Vincent. 2008. The Time Course of Blood C-reactive Protein Concentrations in Relation to the Response to Initial Antimicrobial Therapy in Patients with Sepsis. *Infection*, Vol 36(3): 213-219
- Steinbrecher, U.P., 1999. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 279-298
- Szmitko, P.E., Chao-Hung W., Richard D.W., John R. de A., Todd J. A. 2003. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation*, 108: 1917-1923
- Tate S. 2007. Oxidized low-density lipoprotein receptor, LOX-1, on the endothelial cell – The receptor structure and functions of LOX-1 in atherogenesis. *J.Biol.Macromol.*, 7(2):12-20
- WHO. 2011. Cardiovascular Diseases (CVDs), (Online), (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>)