

**ATHEROVAX: VAKSIN ATHEROSKLEROSIS
MENGUNAKAN BAKTERI
*Salmonella Typhimurium***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh :
Fredo Tamara
NIM 0910710077**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

SK



SK



SK



SERTIFIKAT



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

ATHEROVAX : VAKSIN ATHEROSKLEROSIS MENGGUNAKAN

BAKTERI *Salmonella* Typhimurium

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum

Oleh :

Fredo Tamara

NIM : 0910710077

Pembimbing

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt. MSi.
NIP. 19540823 198103 2 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardiono, DTM&H, MSc, SpPark
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. wb.

Segala puji bagi Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul "ATHEROVAX : Vaksin Atherosklerosis Menggunakan Bakteri *Salmonella Typhimurium*". Penelitian ini merupakan tugas akhir yang dibuat sebagai persyaratan untuk memenuhi gelar sarjana kedokteran umum.

Pada penelitian ini penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

1. Papa, Mama, Kakak serta keluarga besar penulis yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa dalam menghadapi kendala teknis dan psikologis dalam menyelesaikan penelitian ini
2. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan FKUB atas bimbingan dan arahan selama proses penelitian dan presentasi PIMNAS
3. Alm. dr. M. Hanafi, MPH selaku Pembantu Dekan III FKUB atas bimbingan dan arahan selama proses penelitian, persiapan, karantina, dan presentasi PIMNAS
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt. MSi. selaku dosen pembimbing atas bimbingan intensif selama penelitian, solusi permasalahan, pelatihan presentasi, pendampingan saat monev dan PIMNAS, serta dukungan yang telah diberikan
5. DIKTI selaku penyelenggara PIMNAS 2011 dan penyedia dana penelitian
6. Teman – teman tim peneliti Adit, Mas Rivo, Mas Mirza, dan Mbak Tita atas kerja kerasnya selama penelitian

7. Pihak Laboratorium Biokimia – Biomolekuler, Mbak Fitri yang selalu membantu dalam urusan pemeliharaan hewan coba penelitian dan pembedahan
8. Pihak Laboratorium Biomedik, Mas Ali, Mas Yudha, Mbak Fitri, Mbak Heni, dan Mbak Bunga yang membimbing dalam proses pembuatan vaksin, pembuatan slide sel busa, dan penghitungan sel busa dan ketebalan dinding pembuluh darah
9. Pihak Laboratorium Farmakologi, Mas Memed yang telah membantu menemani dan mengajari saat pembedahan dan pengecekan kolesterol
10. Pihak Laboratorium Patologi Anatomi RSSA, dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA yang telah membantu dalam pembuatan slide histo patologi
11. Pihak Laboratorium Mikrobiologi, Mas Slamet yang telah membantu kultur dan identifikasi bakteri
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, penulis memerlukan saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga penelitian ini dapat menambah wawasan dan memberi manfaat.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Malang, 28 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Tamara, Fredo. 2011. **ATHEROVAX : Vaksin Atherosklerosis Menggunakan Heat – Killed Salmonella Typhimurium**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : Dr. dr. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

Atherosklerosis adalah penyakit inflamasi kronik terhadap deposisi materi lemak pada dinding arteri. Penggunaan vaksinasi dalam pencegahan atherosklerosis merupakan hal yang potensial untuk dikembangkan. *Salmonella Typhimurium* dapat menyintesa *phosphorylcholine* (PC) yang juga terdapat pada *oxidized low density lipoprotein* (oxLDL). Pemberian vaksin *S. Typhimurium* dimungkinkan dapat menginduksi antibodi yang protektif terhadap atherosklerosis. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek pemberian bakteri *S. Typhimurium* dalam menghambat pembentukan sel busa dan penebalan dinding aorta. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *posttest only controlled group design*. Vaksin yang digunakan berupa *heat killed S. Typhimurium* sebanyak 10^8 bakteri tiap $100\mu\text{L}$. Dua puluh tikus wistar sebagai hewan coba dibagi ke dalam satu kelompok kontrol negatif (diet normal) dan empat kelompok perlakuan yang diberi diet atherogenik yang terdiri dari kontrol positif, *S. Typhimurium* $100\mu\text{L}$ +CFA-IFA $100\mu\text{L}$, *S. Typhimurium* $100\mu\text{L}$, dan CFA-IFA $100\mu\text{L}$. Vaksin diinjeksikan dua minggu sekali sebanyak lima kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata asupan pakan tiap kelompok adalah sama ($p>0,05$). Pemberian *S. Typhimurium*+CFA-IFA, *S. Typhimurium*, dan CFA-IFA menurunkan jumlah ketebalan dinding aorta secara signifikan dibanding kelompok kontrol positif ($p<0,05$). Dalam penelitian ini didapatkan data tambahan bahwa *S. Typhimurium* saja dapat menurunkan berat badan dan penumpukan *abdominal visceral fat* secara signifikan terhadap kelompok kontrol positif ($p<0,05$). Kesimpulan penelitian adalah pemberian *S. Typhimurium* menurunkan pembentukan sel busa kembali seperti normal. Selain itu, didapatkan bahwa *S. Typhimurium* menurunkan berat badan dan penumpukan *abdominal visceral fat*. Dengan demikian, *heat killed S. Typhimurium* berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin atherosklerosis.

Kata kunci : vaksin, *Salmonella Typhimurium*, ketebalan dinding aorta

ABSTRACT

Nugraha, Rivo Yudhinata Brian. 2011. **ATHEROVAX : Atherosclerosis Vaccination Using Heat – Killed Salmonella Typhimurium**. Final Assignment, Medical Study Program. Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors : Dr. dr. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease caused by lipid deposition in arterial wall. The development of atherosclerosis vaccine is a potential innovation. *Salmonella Typhimurium* can synthesize *phosphorylcholine* (PC) which also expressed on *oxidized low density lipoprotein* (oxLDL). Administration of *S. Typhimurium* vaccine probably induce protective antibody for atherosclerosis. The objective of this research was to prove the effect of *S. Typhimurium* administration on the inhibiting foam cell formation and thickening of arterial wall. This research was an experimental laboratory research with posttest only controlled group design. The vaccine used in this research was 10^8 *heat-killed S. Typhimurium* every 100 μ L. Twenty wistar rats as animal models were divided into one negative control group (normal diet) and four treatment groups which were given atherogenic diet consisted of positive control, *S. Typhimurium* 100 μ L+CFA-IFA 100 μ L, *S. Typhimurium* 100 μ L, and CFA-IFA 100 μ L. Vaccine were injected five times at two-week interval. Results showed there was no difference in the average of diet intake among groups ($p>0.05$). The administration of *S. Typhimurium*+CFA-IFA, *S. typhimurium*, and CFA-IFA could decrease thickening of aorta compared to positive control group ($p<0.05$). In this research, there were some additional data in which administration of *S. typhimurium* alone could significantly decrease body weight and abdominal visceral fat deposition compared to positive control group ($p<0.05$). Therefore, the administration of *S. Typhimurium* can decrease thickening of aorta, body weight, and abdominal visceral fat deposition. So, *heat-killed S. Typhimurium* is a potential antigen to be developed as atherosclerosis vaccine.

Key words : vaccine, *Salmonella Typhimurium*, thickening of aorta

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
KATA PENGANTAR	vii
ABSTRAK.....	iiix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Atherosklerosis.....	5
2.2 Respon Imun terhadap Atherosklerosis	9
2.3 Oksidasi LDL (OxLDL).....	12
2.4 Phosphorylcholine (PC)	13
2.5 Bakteri <i>Salmonella</i> Typhimurium	14
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis Penelitian	18



BAB 4 METODE PENELITIAN	19
4.1 Rancangan Penelitian.....	19
4.2 Populasi dan Sampel	19
4.3 Variabel Penelitian	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	21
4.5 Bahan dan Alat.....	21
4.6 Definisi Operasional.....	23
4.7 Prosedur Penelitian.....	24
4.8 Pengumpulan dan Analisis Data	29
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	311
5.1 Hasil Identifikasi Bakteri <i>S. Typhimurium</i>	311
5.2 Rerata Asupan Pakan Tiap Hari.....	322
5.3 Peningkatan Berat Badan dan <i>Abdominal Visceral Fat</i>	333
5.4 Ketebalan Pembuluh Darah Aorta	Error! Bookmark not defined. 6
BAB 6 PEMBAHASAN	39
6.1 Mekanisme Kerja Vaksin <i>Heat-Killed Salmonella</i> Typhimurium terhadap Penurunan Sel Busa.....	39
6.2 Mekanisme <i>S. Typhimurium</i> terhadap Penurunan Berat Badan dan <i>Abdominal Visceral Fat</i>	44
6.3 Potensi Penggunaan Vaksin Atherosklerosis pada Manusia	46
BAB 7 PENUTUP	49
7.1 Kesimpulan	49
7.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	50
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	55





DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal (Mutiyani, 2005)24
Tabel 4.2 Komposisi Diet Atherogenik (Mutiyani, 2005)25
Tabel 4.3 Pemberian Vaksin (Thatte *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 2003)27
Tabel 5.1 Hasil Tes Biokimia Bakteri32
Tabel 5.2 Tebal Dinding Pembuluh Aorta36



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patogenesis Athrosklerosis6

Gambar 2.2 Perkembangan plak atherosklerosis9

Gambar 2.3 Metabolisme OxLDL Oleh Makrofag dan Pembentukan Sel busa ...11

Gambar 2.4 Bakteri *S. Typhimurium* 15

Gambar 4.1 Rancangan Penelitian.....30

Gambar 5.1 Pengecatan Gram *S. Typhimurium*.....31

Gambar 5.2 Tes Gula – Gula31

Gambar 5.3 Grafik Perbandingan Rerata Intake Pakan Tikus Tiap Hari.....33

Gambar 5.4 Grafik Perbandingan Peningkatan Berat Badan34

Gambar 5.5 Grafik Perbandingan *Abdominal Visceral Fat*.....35

Gambar 5.6 Grafik Regresi Linier Peningkatan Berat Badan dan *Abdominal Visceral Fat*.....36

Gambar 5.7 Grafik Perbandingan Ketebalan Pembuluh Aorta37

Gambar 5.8 Ketebalan Dinding Pembuluh Darah Aorta Tikus38

Gambar 6.1 Proses pembentukan antibody anti-PC secara *T cell independent* dan *T cell dependent*.....40

Gambar 6.2 *Uptake OxLDL* oleh makrofag dan mekanisme proteksi antibodi anti-PC.....42

Gambar 6.3 Proses atheroproteksi adjuvan CFA – IFA.....43

Gambar 6.4 Mekanisme hambatan peningkatan berat badan dan *abdominal visceral fat* oleh antibodi anti-PC45

Gambar 6.5 Mekanisme induksi penyimpanan trigliserida dan hipertrofi adiposit oleh adjuvan CFA-IFA.....46



DAFTAR SINGKATAN

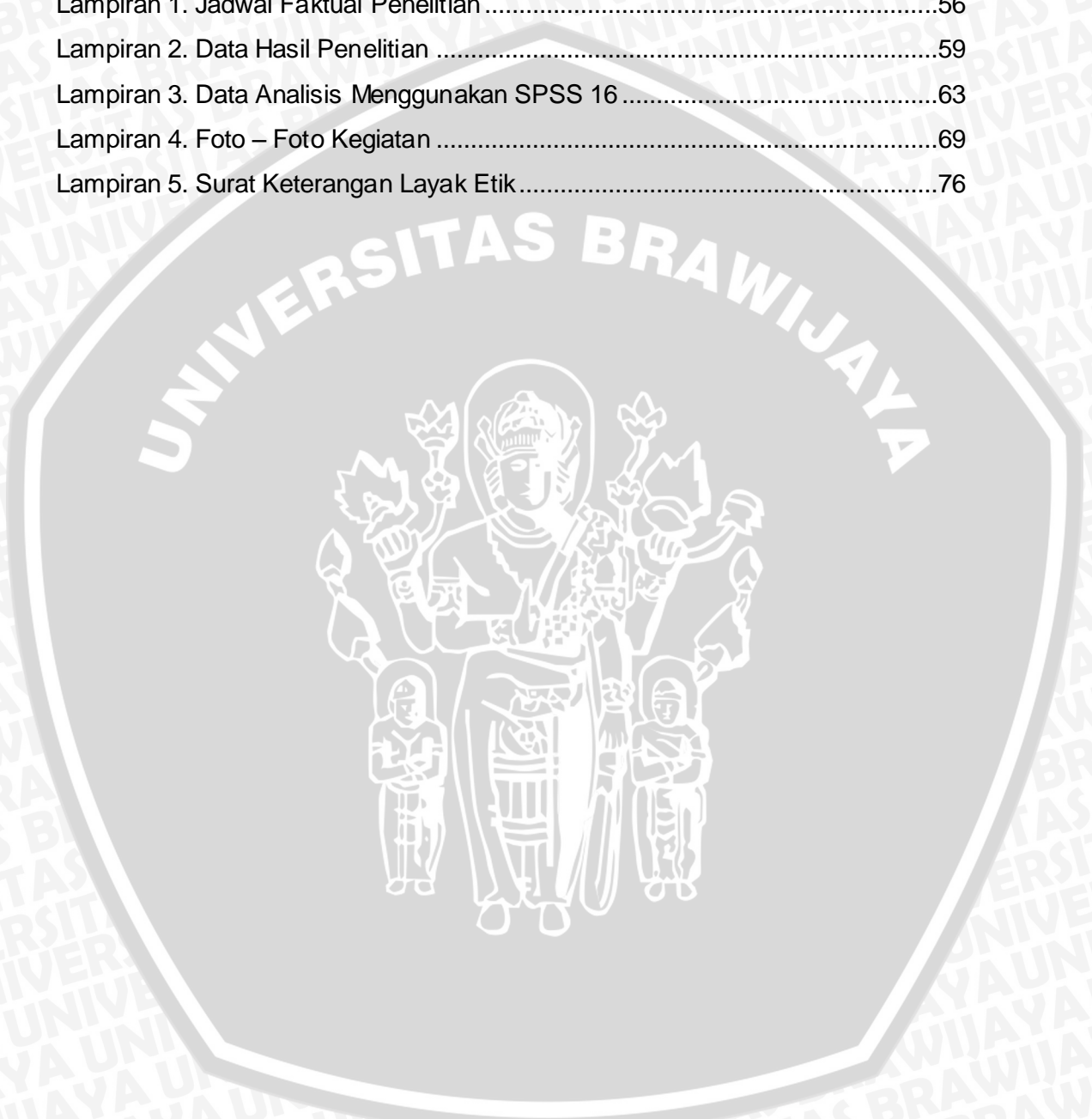
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
OxLDL	<i>Oxidized Low Density Lipoprotein</i>
PC	<i>Phosphorylcholine</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
MDA	<i>Malondealdehyde</i>
POVPC	<i>1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-3-phosphorylcholine</i>
ApoB	<i>Apolipoprotein B</i>
SR	<i>Scavenger Receptor</i>
FC	<i>Free Cholesterol</i>
CE	<i>Cholesterol Ester</i>
NCEH	<i>Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase</i>
LCAT	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
TG	<i>Trigliserida</i>
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfer Protein</i>
ACAT	<i>Acyl Coenzyme Aracylcholesterol Trasferase</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
HE	<i>Hematoksilin Eosin</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
BCR	<i>B Cell Receptor</i>

HNE *Hydroxynonenal*
ATGL *Adipose Tissue Triglyceride Lipase*
HSL *Hormone Sensitive Lipase*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Faktual Penelitian	56
Lampiran 2. Data Hasil Penelitian	59
Lampiran 3. Data Analisis Menggunakan SPSS 16	63
Lampiran 4. Foto – Foto Kegiatan	69
Lampiran 5. Surat Keterangan Layak Etik	76



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Atherosklerosis merupakan salah satu penyakit kardiovaskuler yang menjadi permasalahan terbesar yang dihadapi baik bagi negara maju maupun negara berkembang. Penyakit ini terkait erat dengan timbulnya berbagai masalah kesehatan seperti stroke, penyakit jantung koroner, atau penyakit pembuluh darah perifer (Boudi, 2010). Menurut survey WHO tahun 2004, penyakit kardiovaskuler menempati peringkat pertama penyebab kematian di dunia dengan angka kematian sebesar 29,34% dari seluruh penyebab kematian (*American Heart Association*, 2010). Pada tahun 2004, tercatat dari sekitar 230 juta penduduk di Indonesia 400 ribu diantaranya mengalami penyakit atherosclerosis (*US Cencus Bureau*, 2004). Hasil survey kesehatan nasional tahun 2007 (Riskesmas) menunjukkan penyakit kardiovaskuler menempati peringkat pertama dari penyakit tidak menular di Indonesia (Boudi, 2010). Bahkan, angka kematian akibat atherosklerosis diprediksi akan meningkat sebesar 137% pada laki-laki dan 120% pada wanita pada tahun 2020 (ANTARA News, 2010).

Atherosklerosis merupakan inflamasi kronik terhadap deposisi kolesterol pada dinding pembuluh darah. Oksidasi kolesterol jenis *low density lipoprotein* (LDL) memegang peranan penting dalam proses pembentukan plak atherosklerosis. LDL yang telah teroksidasi (oxLDL) akan mengekspresikan *phosphorylcholine* (PC) yang akan di-uptake oleh makrofag di dalam subendotel

dan menjadi sel busa. Sel busa dapat menyekresikan sitokin proinflamasi, faktor pertumbuhan, dan menginduksi kematian sel. Selanjutnya plak atherosklerosis akan terus berkembang menjadi lesi yang progresif karena proses inflamasi (Hansson, 2005).

Hingga saat ini, terapi untuk atherosklerosis meliputi obat-obat yang hanya bekerja menghambat progresivitas dari plak atherosklerosis yang telah ada bukan mencegah pembentukannya (Curtiss, 2009). Atherosklerosis merupakan “*silent killer*” dan manifestasinya baru muncul ketika telah terjadi komplikasi. Oleh karena itu, tindakan preventif seperti pola hidup sehat, antioksidan, dan vitamin penting dalam pencegahan kejadian atherosklerosis (Brown *et al.*, 2001). Namun, tindakan preventif yang dilakukan sering kali terlambat. Penelitian terbaru telah mencoba mengembangkan vaksin untuk menginduksi imun protektif terhadap atherosklerosis dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap *phosphorylcholine* (PC) pada OxLDL (Caligiuri *et al.*, 2007). Penelitian tentang pengembangan vaksin sebagai metode pencegahan atherosklerosis masih jarang dilakukan. Hal ini dikarenakan selama ini konsep vaksinasi hanya digunakan sebagai metode pencegahan penyakit infeksi bukan penyakit degeneratif seperti atherosklerosis (Kliegman *et.al*, 2007).

Bakteri merupakan bahan dasar yang sering digunakan sebagai vaksin. *Salmonella Typhimurium* merupakan bakteri tersering yang menjadi penyebab demam typhoid pada manusia. *Salmonella Typhimurium* tersebut dapat menyintesa PC (Pecquet, 1992). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa terdapat respon antibodi yang bereaksi silang antara bakteri yang mengekspresikan PC dengan PC yang diekspresikan pada membran OxLDL karena terdapat mimikri molekuler pada kedua antigen tersebut (Schenkein *et al.*,

2001). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tentang peran pemberian *Salmonella* Typhimurium dalam mencegah progresivitas atherosklerosis.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

- 1.2.1 Apakah pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan bakteri *Salmonella* Typhimurium mampu menurunkan ketebalan dinding pembuluh darah aorta akibat atherosklerosis pada model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Umum

Memperoleh bukti bahwa bakteri *Salmonella* Typhimurium dapat bermanfaat dalam mencegah terjadinya atherosklerosis sehingga dapat digunakan sebagai vaksin atherosklerosis

1.3.2 Khusus

1.3.2.1 Mengetahui penurunan ekspresi sel busa pada model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik setelah pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan bakteri *Salmonella* Typhimurium

1.3.2.2 Mengetahui penurunan ketebalan dinding pembuluh darah aorta akibat atherosklerosis pada model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik setelah pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan bakteri *Salmonella* Typhimurium

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya tentang pencegahan atherosklerosis menggunakan vaksin.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan perusahaan industri obat untuk menciptakan suatu alternatif baru dalam pencegahan terhadap atherosklerosis, khususnya vaksin atherosklerosis menggunakan bakteri *Salmonella Typhimurium*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Atherosklerosis

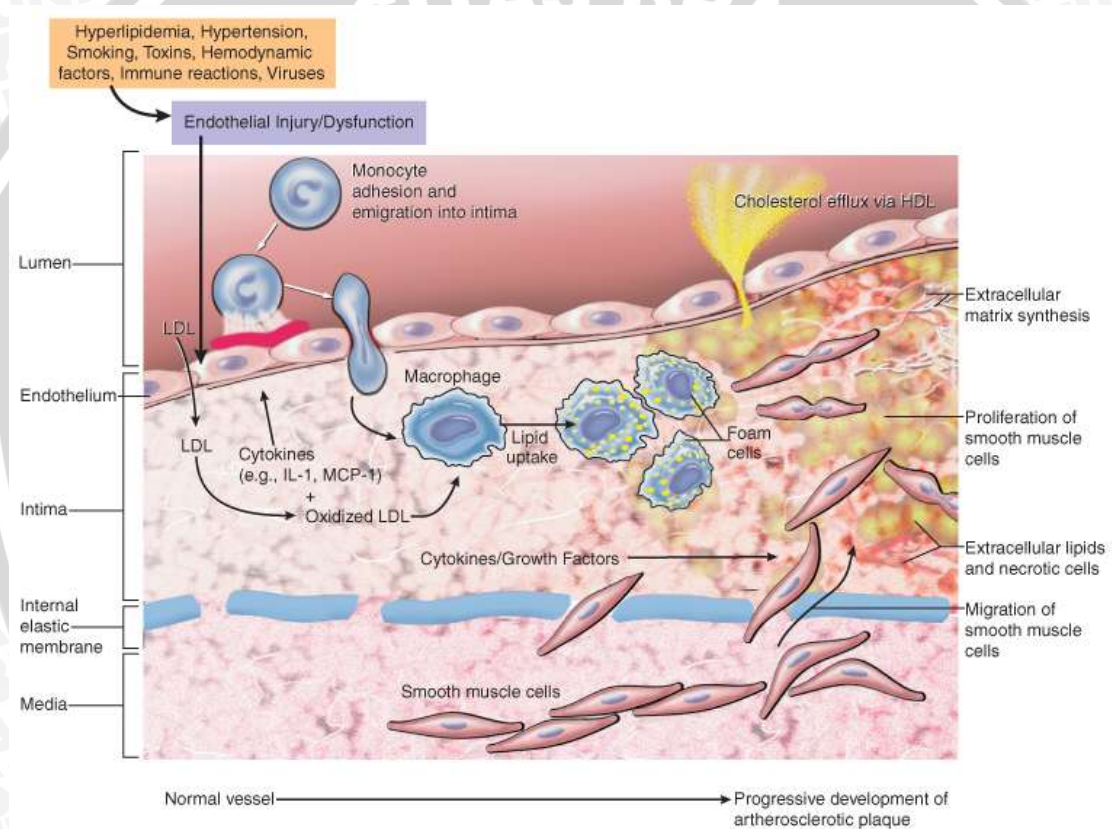
2.1.1 Definisi Atherosklerosis

Atherosklerosis adalah penyakit progresif yang merupakan suatu respon inflamasi kronik terhadap deposisi lipoprotein pada dinding arteri. Adanya plak atherosklerosis pada intima arteri akan menyebabkan dinding arteri menjadi kaku dan mengeras (Hansson, 2005). Plak atherosklerosis terdiri dari dua bagian, *lipid core* yaitu bagian tengah yang halus, kuning, berisi lemak terutama kolesterol, debris sel dan bagian *fibrous cap* yang terdiri dari sel otot polos, makrofag, sel busa, serat kolagen, elastin, proteoglikan, dan juga neovaskularisasi. Plak akan mengalami perubahan dan meluas secara progresif karena kematian sel, degenerasi, sintesis dan degradasi dari matriks ekstraselular, serta pembentukan thrombus karena erosi, ulkus, atau ruptur nya *fibrous cap* (Kumar, *et al*, 2003). Karakteristik distribusi plak atherosklerosis pada manusia lebih sering pada pembuluh darah besar, seperti aorta, aorta abdominalis bagian bawah, aorta thoracalis descendens. Plak juga sering terjadi di pembuluh darah sedang seperti arteri coronary, arteri carotis interna, sirkulasi Willis, dan arteri popliteal (McGill, *et al*, 2000).

Atherosklerosis mulai terjadi pada awal masa kehidupan, semakin progresif dan asimtomatis hingga dewasa. Selanjutnya manifestasi klinis muncul dalam bentuk penyakit jantung iskemik, jantung coroner, infark miokardium, stroke, dilatasi aneurismal, gangren, dan penyakit arteri perifer lainnya (Jonasson, *et al*, 1988). Faktor hemodinamika, struktur, dan juga sifat

metabolik pembuluh darah berperan penting pada kecenderungan perkembangan lesi (Young, I.S., *et al*, 2001). Banyak faktor resiko yang dapat memicu terbentuknya plak atherosklerosis, antara lain hiperkolesterolemia, hipertensi, DM, merokok, riwayat keluarga, jenis kelamin laki-laki, dan semakin bertambahnya usia (Kumar, *et al*, 2003).

2.1.2 Patogenesis Atherosklerosis



Gambar 2.1 Patogenesis Atherosklerosis

Keterangan : Pembentukan plak atherosklerosis dimulai dengan terjadinya disfungsi endotel yang menyebabkan masuknya LDL ke intima pembuluh darah. Hal ini diikuti migrasi makrofag ke dalam intima dan pelepasan sitokin proinflamasi yang menyebabkan LDL teroksidasi (OxLDL). OxLDL akan difagosit oleh makrofag dan terbentuklah sel busa. Semakin lama sel akan mati dan nekrosis.

Adanya migrasi dan proliferasi otot polos dapat menambah ketebalan pembuluh darah dan terbentuklah plak atherosklerosis.

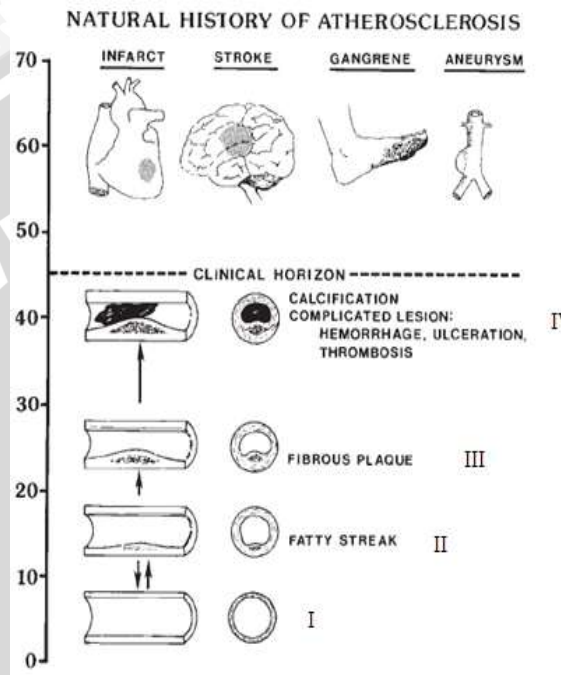
Patogenesis atherosclerosis, seperti pada gambar 2.1, diawali oleh oksidasi lipoprotein jenis LDL (*Low Density Lipoprotein*). Mekanisme oksidasi LDL diperantarai oleh enzim-enzim *NADPH oxidase*, *myeloperoxidase*, *cytochrome P450*, *mitochondrial electron transport chain*, *peroxynitrite*, *xanthine oxidase*, *caeruloplasmin*, *lipoxigenase*, dan ROS yang dihasilkan oleh makrofag, sel otot polos, dan sel endotel di dalam lesi atherosclerosis (Anitra *et al.*, 2000). Oksidasi LDL oleh enzim-enzim tersebut menyebabkan LDL mengalami proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid ini berawal dari modifikasi *polyunsaturated fatty acids* (PUFA), bagian dari fosfolipid LDL menjadi *lipid hydroperoxide*. Lipid hydroperoxide ini mengalami degradasi menjadi fragmen-fragmen seperti *malondialdehyde* (MDA) dan *1-palmitoyl-2-(5-oxoaleroyl)-sn-3-phosphorylcholine* (POVPC) yang lebih dikenal sebagai PC (*phosphorylcholine*). Selanjutnya, PC akan berinteraksi dengan derivat lysine dari degradasi Apolipoprotein B (ApoB) yang merupakan komponen protein utama dari LDL. Interaksi inilah yang membentuk *epitope* pada ApoB yang dapat dikenali oleh *scavenger receptors* (SR) makrofag dan sel-sel imun lainnya (Tsimikas *et al.*, 2005). *Uptake* oxLDL oleh makrofag dapat melalui beberapa cara yaitu, melalui *scavenger receptor* (SR), makropinocytosis, kompleks oxLDL-Ig dan reseptor Fc (FcR), serta *aggregated* LDL dan LDLR. Sekitar 75% - 90% uptake oxLDL oleh makrofag melalui SR (CD-36). OxLDL dibawa ke lisosom dalam bentuk *cholesteryl ester* (CE) kemudian CE dihidrolisis menjadi *free cholesterol* (FC) oleh *Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase* (NCEH). Sebagian FC dibawa dari lisosom untuk struktural elemen ke membran sel. Sisa dari FC akan dibawa oleh ABCA 1 dari sel ke aseptor *High Density Lipoprotein* (HDL) yaitu Apolipoprotein A1 (Apo A1). Ketika FC telah diikat oleh HDL, FC diesterifikasi menjadi CE lagi

oleh *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT). HDL akan membawa CE ke liver untuk diekskresikan, sintesis asam empedu, hormone steroid, dan vitamin D di kulit. HDL juga dapat meleakukan pertukaran CE dengan TG yang dibawa oleh lipoprotein lain dengan enzim *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP). Ketika jumlah acceptor sedikit dan jumlah FC meningkat, kelebihan FC akan diubah lagi menjadi CE oleh *Acyl Coenzyme Aracylcholesterol Trasferase* (ACAT) menjadi lipid droplet di dalam makrofag yang nantinya berkembang menjadi sel busa. Terbentuknya sel busa menyebabkan upregulasi dari SR, ekspresi faktor jaringan, sekresi ROS, sekresi sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6), kematian sel, sekresi molekul adhesi, sekresi kemokin, inhibisi NO, sekresi *growth factor*, dan penurunan hidrolisis CE (Su, 2009; Kearney, 2000).

2.1.3 Perkembangan Plak Atherosklerosis

Proses pembentukan plak atherosklerosis mulai terjadi pada masa awal kehidupan. Berawal dari terbentuknya lesi berupa bintik lemak yang terlihat secara mikroskopis atau lesi tipe I, lesi ini sering ditemukan pada bayi dan anak-anak usia < 3 tahun dan juga diidentifikasi pada orang dewasa yang tidak memiliki faktor resiko atherosklerosis. Selanjutnya, lesi I akan berkembang menjadi garis lemak berwarna kuning yang disebut juga *fatty streak* atau lesi tipe II. Pada anak usia 5 sampai 15 tahun hampir 99% ditemukan lesi tipe II ini. Meskipun terus berkembang, lesi ini tidak selalu menjadi atherosklerosis, ada kalanya tidak menimbulkan gejala apapun hingga akhir hayat. Lesi tipe III terdiri dari kolesterol, makrofag, dan sel busa yang membentuk inti lipid atau *lipid core*. Inti lipid dilapisi oleh sel-sel otot polos dan matriks ekstraselular yang menebal disebut *fibrous cap*. Lesi ini mulai terjadi kira-kira umur 23-29 tahun. Selanjutnya, plak berkembang menjadi semakin progresif menjadi *atheroma* atau lesi tipe IV

yang dapat menyebabkan komplikasi berupa penyumbatan pembuluh darah dan infark jaringan. Manifestasi klinis muncul dalam bentuk penyakit jantung iskemik, jantung koroner, infark miokardium, stroke, gangren, dan penyakit arteri perifer lainnya (McGill *et al.*, 2000).



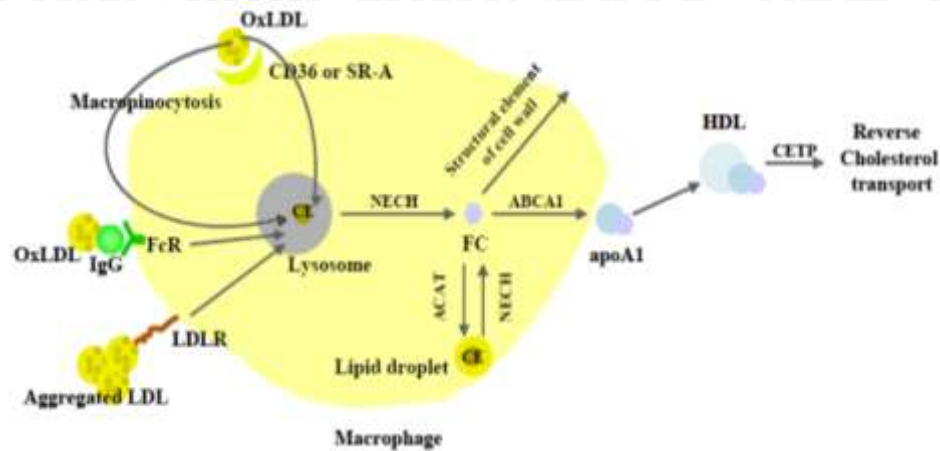
Gambar 2.2 Perkembangan plak aterosklerosis

Keterangan : Perkembangan plak aterosklerosis dimulai sejak usia muda. Plak tipe I adalah plak yang belum terdapat penumpukan sel busa pada intima pembuluh darah. Terdapat pada usia < 3 tahun. Plak tipe II adalah plak dengan penumpukan sedikit sel busa yang disebut dengan *fatty streak*. Terjadi pada usia 5 – 15 tahun. Plak tipe III adalah plak dengan penumpukan lebih banyak sel busa, jaringan ikat fibrous, dan penebalan dinding pembuluh darah. Terjadi pada usia 23 – 29 tahun. Perkembangan plak tergantung dari faktor risiko yang mempengaruhi. Jika perkembangan plak terus berlanjut, dapat terjadi komplikasi berupa penyumbatan pembuluh darah, thrombus, kerusakan organ, stroke, IMA, dan penyakit lainnya.

2.2 Respon Imun terhadap Aterosklerosis

Makrofag merupakan pusat mediator dari imunitas *innate* seluler yang berfungsi melindungi tubuh dari infeksi. Dengan mekanisme yang sama, makrofag menginisiasi oksidasi LDL, uptake OxLDL oleh makrofag, dan membentuk sel busa. Hal ini merupakan peristiwa penting dalam proses

pembentukan plak atherosklerosis. Uptake OxLDL dapat melalui beberapa cara yaitu, melalui *scavenger receptor* (SR), *makropinocytosis*, kompleks OxLDL-Ig dan reseptor Fc (FcR), serta *aggregated LDL* dan LDLR. Sekitar 75% - 90% uptake OxLDL oleh makrofag melalui SR (CD-36) (Avila-Compos, *et al*, 2000). OxLDL dibawa ke lisosom dalam bentuk *cholesteryl ester* (CE), kemudian CE dihidrolisis menjadi *Free Cholesterol* (FC) oleh *Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase* (NCEH) (Achmad, 2004). Sebagian FC dibawa dari lisosom untuk struktural elemen ke membrane sel. Sisa FC dibawa dari sel ke *acceptor High Density Lipoprotein* (HDL) yaitu Apolipoprotein A1 (Apo A1). Ketika FC telah diikat oleh HDL, FC diesterifikasi menjadi CE lagi oleh *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT). HDL akan membawa CE ke liver untuk diekskresikan, sintesis asam empedu, hormon steroid, dan vitamin D di kulit. HDL juga dapat melakukan pertukaran CE dengan TG yang dibawa oleh lipoprotein lain dengan enzim *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP). Ketika jumlah *acceptor* sedikit dan jumlah FC meningkat, kelebihan FC akan diubah lagi menjadi CE oleh *Acyl Coenzyme Aracylcholesterol Trasferase* (ACAT), menjadi lipid droplet di dalam makrofag yang nantinya berkembang menjadi sel busa (Kliegman, *et al*, 2007). Makrofag yang penuh dengan lipid droplet ini akan memicu kematian sel dan terbentuknya jaringan nekrotik. Selanjutnya, kumpulan kolesterol dan debris sel ini akan tertutup oleh *fibrous cap* yang terdiri dari protein matriks ekstraselular yang disekresikan oleh sel otot polos.



Gambar 2.3 Metabolisme OxLDL Oleh Makrofag dan Pembentukan Sel busa (Jun Su, 2004)

Keterangan : OxLDL akan di-uptake oleh makrofag melalui mikropinositosis, reseptor SR, FcR, atau LDLR. Di dalam lisosom makrofag *Cholesteryl Ester* (CE) akan diubah oleh *Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase* (NCEH) menjadi *Free Cholesterol* (FC). FC dapat diubah menjadi CE kembali dengan enzim *Acyl Coenzyme Aracylcholesterol Trasferase* (ACAT) yang disimpan sebagai droplet lipid sel busa. FC akan ditransfer ke HDL melalui reseptor ApoA1 dengan bantuan ABCA1.

Metabolisme OxLDL di dalam makrofag hingga terbentuknya sel busa ini menyebabkan *upregulasi* dari SR, ekspresi faktor jaringan, sekresi ROS, sekresi sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6), kematian sel, sekresi molekul adhesi, sekresi chemokine, inhibisi NO, sekresi *growth factor*, dan penurunan hidrolisis CE (Abbas dan Andrew, 2004). Infiltrasi sel T selalu ada pada lesi atherosclerosis, terutama sel T CD4+, yang mengenali protein antigen yang dipresentasikan sebagai fragmen yang terikat pada molekul *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC kelas II). Sel T CD4+ reaktif terhadap antigen bakteri patogen, OxLDL, dan sel terapoptosis (Why Conjugate, 1996). Antigen yang terikat dengan MHC kelas I yang terlibat dalam proses atherosclerosis akan menyebabkan aktivasi CD8+ dan mempercepat perkembangan lesi atherosclerosis (National Cancer Institute, 2000). Sel *Natural*

Killer (NK cell) juga mengenali antigen lipid, muncul pada lesi awal, dan memperparah perjalanan lesi (Weeratna, *et al*, 2000).

Sel B, walaupun jumlahnya tidak terlalu banyak di dalam lesi atherosklerosis, namun memiliki fungsi atheroprotektif. Sel B merupakan inhibitor yang efektif dalam proses pembentukan plak atherosclerosis (Krieg, 2002). Peran dari natural antibodi yang dihasilkan oleh sel B antara lain, pertama, dapat mengikat fosfolipid yang teroksidasi yang ada pada OxLDL atau sel apoptosis dan menetralkan *proinflammatory properties* (Khallou-Laschet, *et al*, 2005). Kedua, natural antibodi menghambat uptake OxLDL oleh makrofag sehingga menghambat pembentukan sel busa (Schenkein, *et al*, 2000). Ketiga, pembentukan imun kompleks, yang nantinya mengalami eliminasi melalui FcR atau aktivasi komplemen (ThermoScientific, 2010; Khallou-Laschet, *et al*, 2005).

2.3 Oksidasi LDL (OxLDL)

Atherosklerosis merupakan respon inflamasi kronik karena deposisi lemak pada dinding arteri. Kolesterol dan triglyserida tidak beredar dalam darah sebagai lemak bebas melainkan dalam bentuk kompleks lipoprotein. Lipoprotein terdiri dari lapisan luar berupa fosfolipid, kolesterol bebas, dan apolipoprotein. *Polyunsaturated fatty acid* (PUVA) dari fosfolipid lipoprotein ini merupakan target dari sebagian besar oksidasi. Bagian inti terdiri dari *Cholesteryl Ester* (CE) dan *Triglyserida* (TG) (Bhatia, 2007). Jenis lipoprotein yang berperan dalam atherogenesis adalah *Low Density Lipoprotein* (LDL). Konsentrasi LDL dalam plasma yang tinggi merupakan faktor resiko utama untuk penyakit atherosclerosis (Kumar, *et al*, 2003).

Oksidasi LDL pertama kali diobservasi oleh Brown dan Goldstein, menemukan bahwa inkubasi native LDL oleh makrofag tidak menyebabkan

terbentuk nya sel busa kecuali jika LDL telah dimodifikasi melalui proses asetilasi (Achmad, 2004). Proses oksidasi LDL terjadi di dalam subendotelial arteri, dimana terdapat proteoglikan dan matriks ekstraselular lain yang berfungsi meretensi LDL dan melindungi LDL dari plasma antioksidan (Collins, *et al*, 2009). Oksidasi LDL tidak terjadi di dalam sirkulasi karena adanya konsentrasi antioksidant yang tinggi dan akan dengan cepat dibersihkan oleh *reticuloendotelial* (RE), proses ini dipercepat dengan pengikatan LDL oleh autoantibodi (Sinha, 2005). Mekanisme oksidasi LDL diperantarai oleh enzim-enzim *NADPH oxidase*, *myeloperoxidase*, *cytochrome P450*, *mitochondrial electron transport chain*, *peroxynitrite*, *xanthine oxidase*, *caeruloplasmin*, *lipoxigenase*, ROS yang dihasilkan oleh makrofag, sel otot polos, dan sel endotel di dalam lesi atherosclerosis (Chang, *et al*, 2004). Oksidasi LDL oleh enzim-enzim tersebut menyebabkan LDL mengalami proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid ini berawal dari modifikasi *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) pada fosfolipid LDL menjadi *lipid hydroperoxide*. Lipid hydroperoxide ini mengalami degradasi menjadi fragmen-fragmen seperti *malondialdehyde* (MDA), *1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-3-phosphorylcholine* (POVPC) yang selanjutnya berinteraksi dengan derivat lysine dari degradasi Apolipoprotein B (ApoB), yang merupakan komponen protein utama dari LDL. Interaksi inilah yang membentuk *epitope* pada ApoB yang dapat dikenali oleh *scavenger receptors* (SR) makrofag dan respon imun adaptif, baik melalui *T cell independen* maupun *T cell dependent*.

2.4 Phosphorylcholine (PC)

PC dideteksi pertama kali tahun 1967 pada bakteri gram positif *Streptococcus pneumoniae*, dimana PC merupakan komponen yang ditemukan

pada dinding sel bakteri. Selanjutnya, PC ditemukan pada berbagai bakteri gram positif seperti *Clostridium* spp., *Lactococcus* spp., *Bacillus* spp. PC berfungsi untuk mempertahankan bentuk, ukuran, dan fisiologi sel normal. PC juga berfungsi dalam pertumbuhan dan pembelahan sel (Abbas dan Andrew, 2004).

Modifikasi oksidatif dari fosfolipid pada membran LDL menyebabkan perubahan yang nantinya membentuk *phosphorylcholine* (PC) pada membran LDL yang teroksidasi (OxLDL) (Abbas dan Andrew, 2004). Mimikri molekuler secara *in vivo* antara PC pada dinding sel bakteri dan PC pada fosfolipid yang teroksidasi terdapat pada OxLDL dan sel terapoptosis. Oleh karena itu, antibodi yang ditujukan pada PC dari bakteri akan dapat memberikan efek terhadap atherosklerosis karena sifat mimikri molekuler dari PC tersebut (Jerry, 1993).

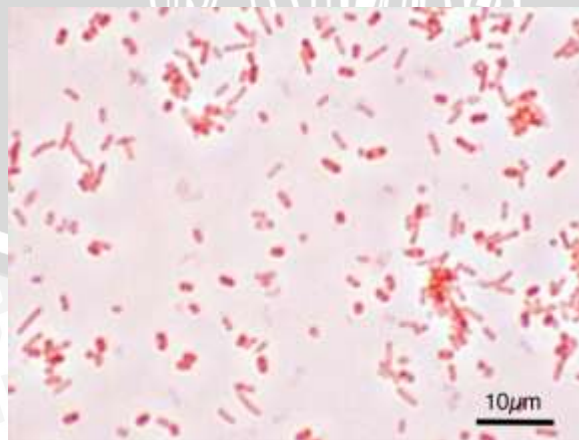
2.5 Bakteri *Salmonella* Typhimurium

Bakteri *Salmonella* Typhimurium merupakan bakteri penyebab gastroenteritis akut pada manusia, dengan gejala diare, demam, dan nyeri abdomen yang umumnya sembuh dengan spontan (*self limited*). Bakteri ini juga ditemukan hidup di lingkungan seperti air, tanah, dan tanaman yang terkontaminasi kotoran manusia atau hewan. Namun bakteri ini tidak dapat bermultiplikasi maksimali ketika berada di lingkungan luar. Dulunya bakteri ini diklasifikasikan ke dalam spesies *Salmonella enterica*. Namun, setelah ditemukan analisis serologi oleh Kauffmaa-White, spesies ini dibagi lagi ke dalam beberapa subspecies, dimana masing-masing subspecies memiliki beberapa serotipe yang dibedakan berdasarkan karakteristik formula antigen nya. Bakteri *S. Typhimurium* merupakan salah satu serotipe dari *Salmonella* subspecies *enterica*. Berikut ini klasifikasi bakteri *S. Typhimurium* (Todar, 2011):

Kingdom : *Bacteria*

- Phylum : *Proteobacteria*
- Class : *Gamma Proteobacteria*
- Order : *Enterobacteriales*
- Family : *Enterobacteriaceae*
- Genus : *Salmonella*
- Spesies : *Salmonella enterica*
- Subspesies : *Salmonella subspesies enterica*
- Serotipe : *Salmonella subspesies enterica* seroipe Typhimurium
atau disingkat menjadi *S. Typhimurium*

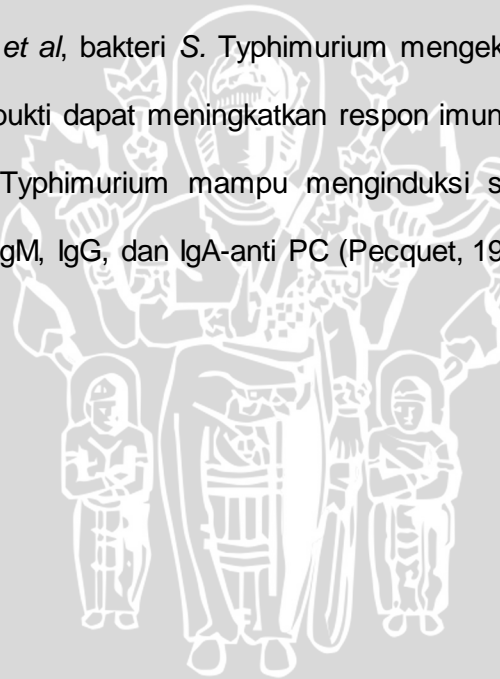
Bakteri *S. Typhimurium* merupakan bakteri batang gram negatif fakultatif anaerob dengan ukuran panjang 1 – 1,5 mikrometer. Bakteri tersebut tidak membentuk spora, mempunyai bentuk nonmotil dan motil yang bergerak dengan *peritrichious flagella*. Ciri – ciri morfologi lainnya sangat erat hubungannya dengan genus lain dalam family *Enterobacteriaceae*. Bakteri *S. Typhimurium* memiliki tiga jenis antigen utama yaitu antigen somatik (antigen O) atau dinding sel, antigen permukaan atau *envelope*, dan antigen flagella (antigen H) (Dzen, *et al*, 2003).



Gambar 2.4 Bakteri *S. Typhimurium* dengan pewarnaan gram, perbesaran 1000 kali (Todar, 2011)

Media kultur selektif yang sering digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri *S. Typhimurium* adalah *bismuth sulfite agar*, *Salmonella-Shigella agar* (*SS agar*), *Hectoen enteric*, dan *xylose-lisine-deoksicholate agar*. Bakteri *S. Typhimurium* dapat memfermentasi glukosa, maltose, mannitol, dan sorbitol, tetapi tidak memfermentasikan laktosa, sukrosa, atau salicin. Bakteri ini tidak membentuk indol, susu koagulat, atau gelatin cair. Bakteri *S. Typhimurium* juga memproduksi H_2S yang membantu dalam proses identifikasi (Damianus, 2000; (Todar, 2011).

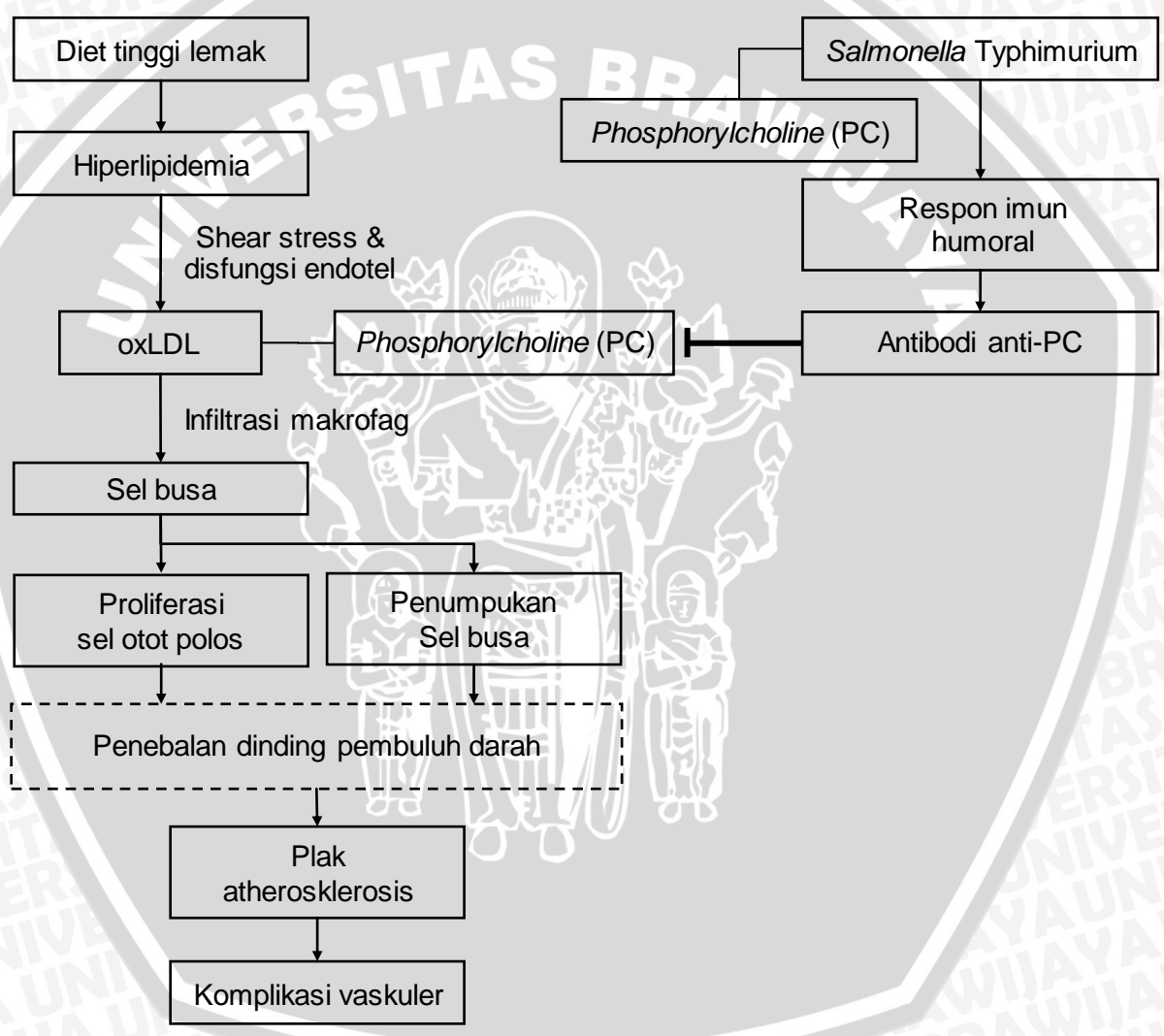
Menurut Gmur, *et al*, bakteri *S. Typhimurium* mengekspresikan PC pada dinding selnya dan terbukti dapat meningkatkan respon imun humoral (Gmur, *et al*, 2009). Bakteri *S. Typhimurium* mampu menginduksi sel limfosit B untuk memproduksi antibodi IgM, IgG, dan IgA-anti PC (Pecquet, 1992).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel yang diukur

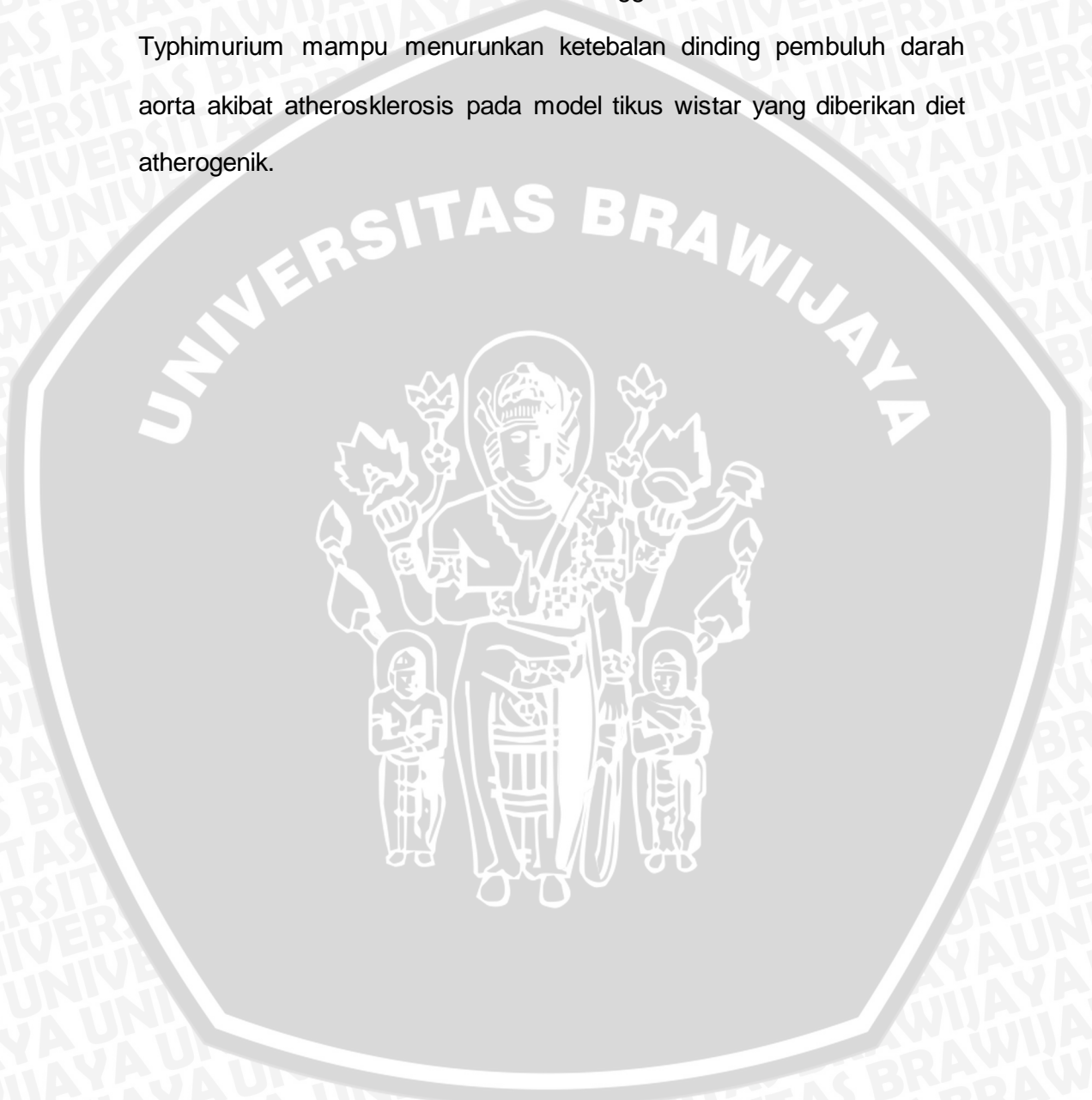
Variabel yang tidak diukur



3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- 3.2.1 Pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan bakteri *Salmonella* Typhimurium mampu menurunkan ketebalan dinding pembuluh darah aorta akibat atherosklerosis pada model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus novergicus* strain wistar). Tikus wistar dipilih sebagai hewan model karena rentan mengalami atherosklerosis.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus novergicus* strain wistar jantan usia 6 – 8 minggu dengan berat 120 – 160 gram. Tikus wistar dipilih sebagai hewan coba karena merupakan hewan coba yang rentan terhadap atherosklerosis. Jenis kelamin yang dipilih adalah jantan karena tidak ada pengaruh dari factor hormonal seperti pada tikus betina. Tikus yang dipilih masuk ke dalam kriteria inklusi sebagai berikut :

- a. Hewan coba yang digunakan tikus putih *Rattus novergicus* strain wistar jantan
- b. Usia 6 – 8 minggu
- c. Berat 120 – 160 gram
- d. Bulu putih dan bersih
- e. Dalam kondisi sehat dan aktif

Kriteria eksklusi adalah sebagai berikut :

- a. Tikus yang sakit dan asupan makanan kurang pada saat penelitian

b. Tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu : kelompok A (S. Typhimurium + CFA – IFA), kelompok B (S. Typhimurium), kelompok C (CFA – IFA), kelompok D (kontrol negatif), dan kelompok E (kontrol positif). Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut (Indra, 1999) :

$$n(p - 1) \geq 15$$

p : jumlah perlakuan (lima (5) : kelompok A,B,C,D,E)

n : jumlah ulangan

$$n(5 - 1) \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 3,75$$

Diperoleh hasil perhitungan 3,75 sehingga dibulatkan ke atas menjadi 4 pengulangan. Hewan coba yang dibutuhkan adalah 4 ekor untuk setiap kelompok atau secara keseluruhan dibutuhkan 20 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin atherosklerosis dengan menggunakan bahan yang dibagi dalam kelompok :

- Kelompok A : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet atherogenik dan diinjeksi dengan vaksin yang berisi S.Typhimurium 100 μ L ditambah adjuvan CFA – IFA (*complete freund's adjuvant* - *incomplete freund's adjuvant*) 100 μ L/injeksi

- Kelompok B : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet atherogenik dan diinjeksi dengan vaksin yang berisi *S. Typhimurium* 100
- Kelompok C : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet atherogenik dan diinjeksi CFA – IFA 100 µl/ injeksi
- Kelompok D : merupakan kontrol negatif yang diberikan diet normal dan tanpa diinjeksi vaksin
- Kelompok E : merupakan kelompok kontrol positif yang diberikan diet atherogenik dan tanpa diinjeksi vaksin.

4.3.2 Variabel tergantung terdiri ketebalan dinding aorta pada subendotel aorta dan berat *Abdominal Visceral Fat*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu : Laboratorium Biokimia Biomolekuler untuk tempat pemeliharaan hewan coba dan pembedahan, Laboratorium Biomedik untuk tempat pembuatan vaksin, Laboratorium Mikrobiologi untuk tempat kultur dan identifikasi bakteri, dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dokter Saiful Anwar Malang untuk tempat pembuatan slide ketebalan aorta. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, Februari – Mei 2011.

4.5 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

a. Perawatan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah : kandang berupa baskom dengan ukuran 20x30 cm dengan penutup kandang berupa jaring – jaring kawat sebanyak 30

buah, botol minum tikus 30 buah, timbangan analitik, handscun, dan pembersih kandang. Bahan yang digunakan berupa sekam dan air minum untuk tikus.

b. Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

Alat yang digunakan adalah : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, penggiling pakan, dan nampan. Bahan untuk diet normal adalah : susu-PAP 64 %, terigu 35 %, dan air 1 % (Hrotkiewick K, 2007).

c. Pembuatan Ransum Makanan Diet Atherogenik

Alat yang digunakan adalah : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan. Bahan diet atherogenik adalah : susu-PAP dan terigu 75 %, minyak babi 8,05 %, minyak kambing 10 %, minyak kelapa 1 %, asam cholat 0,125 %, kuning telur bebek 5 %, dan air 0,825 % (Hrotkiewick K, 2007).

d. Isolasi dan Kultur Bakteri

Bahan dan alat yang digunakan adalah : vortex, microbact, tempat fermentasi gula, incubator, Brain Heart Infusion medium (BHI), Bismuth Sulfite Agar (BSA), osse, plate agar, bunsen, tabung reaksi, dan pipet.

e. Pembuatan Vaksin

Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1,4 ml, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 5 ml, mikropipet, eppendorf, dan vortex.

f. Penyuntikan Vaksin

Alat yang dibutuhkan berupa spuit insulin 1 cc, handscun, kain lap, vortex, eppendorf. Bahan yang dibutuhkan adalah vaksin untuk masing – masing kelompok perlakuan dan alkohol 70%.

g. Pembedahan Mencit

Alat yang digunakan adalah : gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, dan vacuotainer 25 buah. Bahan yang digunakan adalah : kloroform 20 ml, formalin 10 % 200 ml, alkohol, dan es untuk menyimpan sampel.

h. Pengecekan ketebalan aorta

Alat yang digunakan adalah: incubator, object glass, cover glass, mikrotom, pinset, dan *Automatic Tissue Processing*. Bahan yang digunakan adalah : formalin 10 %, etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 %, etanol 95 %, etanol absolut, xylol, parafin, alkohol 70 %, dan Hematoksin-Eosin (HE).

i. Penimbangan *Abdominal Visceral Fat*

Alat yang digunakan berupa timbangan analitik, pinset, dan aluminium foil.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

- Tikus wistar : merupakan hewan coba dengan jenis *Rattus norvegicus* strain wistar berjenis kelamin jantan. Tikus wistar dibeli dari peternak tikus local di Kota Malang. Tikus berusia 6 – 8 minggu dengan berat 160 – 180 gram
- Diet atherogenik : pemberian diet atherogenik dimaksudkan untuk menginduksi pembentukan plak atherosklerosis pada subendotel aorta tikus
- Diet normal : merupakan diet/pakan biasa tanpa tambahan bahan atherogenik
- Salmonella Typhimurium* : kultur bakteri dibeli dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya yang berasal dari isolat manusia
- Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) : CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama, sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA yang digunakan

merupakan produk dari *Sigma* dan didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

- f. Ketebalan dinding aorta : merupakan tebal tunika intima dan media aorta tikus. Pengecekan dilakukan dengan pengecatan *Hematoksin Eosin* (HE) pada slide parafin potongan melintang aorta
- g. *Abdominal visceral fat* : merupakan lemak perut tikus yang berada baik di intraperitoneum maupun retroperitoneum.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang digunakan adalah :

a. Perawatan Hewan Coba

Tikus wistar sebanyak 30 ekor dirawat dalam kandang masing – masing satu tikus satu kandang. Makan dan minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti satu minggu sekali dan tikus ditimbang setiap minggunya.

b. Pembuatan Diet Normal

Diet normal merupakan diet yang diberikan untuk kelompok D (kontrol negatif). Diet normal merupakan asupan normal tikus dan tidak menimbulkan efek atherogenik. Diet normal dibuat dengan mencampur bahan – bahan dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal (Mutiyani, 2005)

PAR-S	Tepung terigu	Air
25,6 gram	14 gram	0,4 gram
Total diet normal = 40 gram/tikus/hari		

Semua bahan di atas dicampur di dalam baskom. Setelah itu, ditimbang dan dibulatkan dengan berat 40 gram untuk satu tikus. Makanan diberikan 40 gram/tikus tiap harinya. Diet diberikan selama 50 hari. Sisa makanan hari

sebelumnya juga ditimbang tiap harinya untuk mengetahui rerata asupan makanan setiap tikus.

c. Pembuatan Diet Atherogenik

Diet athergenik merupakan diet yang diberikan kepada kelompok perlakuan A, B, C dan kelompok E (kontrol positif). Diet diberikan dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 4.2 Komposisi Diet Atherogenik (Mutiyani, 2005)

PAR-S + Tepung Terigu	Asam Cholat	Minyak babi	Minyak Kambing	Minyak Kelapa	Kuning Telur	Air
30 gr	0,05 gr	3,22 ml	4 ml	0,4 ml	2 gr	0.33 gr
Total diet atherogenik = 40 gram/tikus/hari						

Bahan – bahan di atas dicampur di dalam baskom. Bahan ditimbang dengan timbangan digital dan dibulatkan dengan berat masing – masing 40 gram. Diet diberikan seberat 40 gram untuk setiap tikus. Diet diberikan selama 50 hari dan sisa pakan ditimbang setiap harinya (Hrotkiewick K, 2007). Penambahan bahan penambah rasa seperti makanan ringan juga diberikan jika asupan makanan berkurang.

d. Identifikasi dan Kultur Bakteri

Isolat bakteri *S. Typhimurium* diperoleh dari sampel manusia yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri *S. Typhimurium* dikultur pada medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA). Dilakukan peremajaan bakteri setelah penyimpanan lama di laboratorium dengan mengulturnya kembali pada medium BSA dan disimpan dalam inkubator 37°C. Hasil kultur selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri menggunakan pewarnaan Gram, bentukan kultur bakteri, tes gula – gula, tes motilitas, dan tes oksidase. Selanjutnya, hasil tes dimasukan ke dalam software *Microbact* dan diperoleh

probalitas identifikasi bakteri. Bakteri selanjutnya dipindahkan ke medium *Brain Heart Infusion* (BHI) untuk perbanyakkan bakteri. Medium BHI selanjutnya disimpan dalam inkubator 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan Vaksin

S. Typhimurium yang dikultur dalam medium BHI selama 24 jam selanjutnya dipisahkan dengan mencucinya dalam *phosphate-buffered saline* (PBS; pH 7,2). Bakteri sebanyak 10^8 sel dihitung dengan spektrofotometri dan dilarutkan ke dalam *phosphate buffer saline* (PBS) 100 μ L. Bakteri dibunuh dengan *boiling method* 100°C selama 45 menit (Thatte *et al.*, 1995). Selanjutnya, dilakukan pengecatan Gram untuk melihat bakteri setelah dibunuh. Vaksin kelompok A, yaitu *S. Typhimurium* ditambah dengan adjuvan, dibuat dengan mencampur 10^8 bakteri dalam 100 μ L PBS dengan 100 μ L adjuvan CFA atau IFA. *Vortexing* dilakukan sampai kedua bahan tersebut bercampur. Sedangkan, kelompok B diberikan 10^8 bakteri dalam 100 μ L PBS dan kelompok C diberikan 100 μ L adjuvan CFA atau IFA.

f. Penyuntikan Vaksin

Kelompok perlakuan diberikan bahan vaksin yang berbeda. Kelompok A diberikan 200 μ L vaksin yang terdiri dari 10^8 bakteri dalam 100 μ L PBS ditambah dengan 100 μ L adjuvan CFA atau IFA. Kelompok B diberikan 10^8 bakteri dalam 100 μ L PBS dan kelompok C diberikan 100 μ L adjuvan CFA atau IFA. Vaksin diberikan sebanyak lima kali. Pada tabel 4.3, vaksin kedua diberikan dengan jarak satu minggu setelah vaksin pertama dan vaksin ketiga sampai kelima diberikan setiap dua minggu. Vaksin pertama diberikan dengan menggunakan adjuvan CFA dan disuntikan secara subkutan (sc). Vaksin kedua sampai kelima

menggunakan adjuvan IFA dan disuntikan secara intraperitoneal (ip) (Thatte *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 2003).

Tabel 4.3 Pemberian Vaksin (Thatte *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 2003)

Hari Pemberian Vaksin	Kelompok A	Kelompok B	Kelompok C
Hari ke-0	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS + CFA 100 µL (total 200 µL)	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS	CFA 100 µL
Hari ke-7	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS + IFA 100 µL (total 200 µL)	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS	IFA 100 µL
Hari ke-21	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS + IFA 100 µL (total 200 µL)	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS	IFA 100 µL
Hari ke-35	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS + IFA 100 µL (total 200 µL)	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS	IFA 100 µL
Hari ke-49	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS + IFA 100 µL (total 200 µL)	10 ⁸ <i>S. Typhimurium</i> dalam 100 µL PBS	IFA 100 µL

g. Pembedahan Tikus

Setelah pemberian diet selama 50 hari dan penyuntikan vaksin sebanyak lima kali seperti yang sudah dijelaskan di atas, dilakukan pembedahan tikus untuk pengambilan darah, pembuluh darah aorta, organ – organ, dan *abdominal visceral fat*. Sebelum dibedah, diperlukan pengecekan kadar kolesterol total tikus kontrol positif dan negatif. Jika terdapat perbedaan yang signifikan antarkelompok tersebut, maka tikus siap dibedah (Wijaya, *et al.*, 2010).

Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan thorax. Pertama, darah diambil dengan spuit 3 cc melalui jantung. Aorta dipotong

mulai dari arcus aorta, aorta thoracalis, dan aorta abdominalis. Selanjutnya aorta dipotong menjadi tiga bagian, bagian arcus aorta dan aorta abdominal digunakan untuk pembuatan preparat sel busa sehingga harus disimpan dalam gelas plastik pada suhu 4°C. Sedangkan, aorta thoracalis digunakan untuk pembuatan preparat histoPA penampang aorta sehingga harus disimpan dalam formalin 10%. Organ lain seperti ginjal dan hepar juga diambil dan disimpan dalam formalin 10%. *Abdominal visceral fat* diambil dari lemak intraperitoneal dan retroperitoneal.

h. Pembuatan Slide Histo Patologi Penampang Aorta

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan aorta tikus dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam melted paraffin : xylen = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. Melted paraffin dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk kubus lalu ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam paraffin tersebut kemudian disiram lagi dengan melted paraffin secukupnya.

Blok paraffin dibiarkan sampai dingin dan dikeluarkan dari cetakannya. Bagian blok yang dibelakang dilekatkan pada kayu pemegang blok pada mikrotom kemudian posisi indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan (6-8 mikrometer) diatur. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita, ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan diatas permukaan air

hangat (30-40°C) secara lembut dan tanpa lipatan. Gelas objek dilapisi dengan lapisan putih telur : gliserol = 1:1 sebagai lapisan tipis dan biarkan kering (untuk merekatkan sediaan). Pita paraffin dan pita tersebut diangkat dengan gelas objek. Gelas objek diletakkan di atas steamer hangat (agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan) kemudian dibiarkan kering dan sediaan melekat erat (1 hari). Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan ke dalam xylol selama 3 x 5 menit lalu dikeringkan. Preparat siap untuk diamati dibawah mikroskop.

i. Pengukuran Ketebalan Aorta

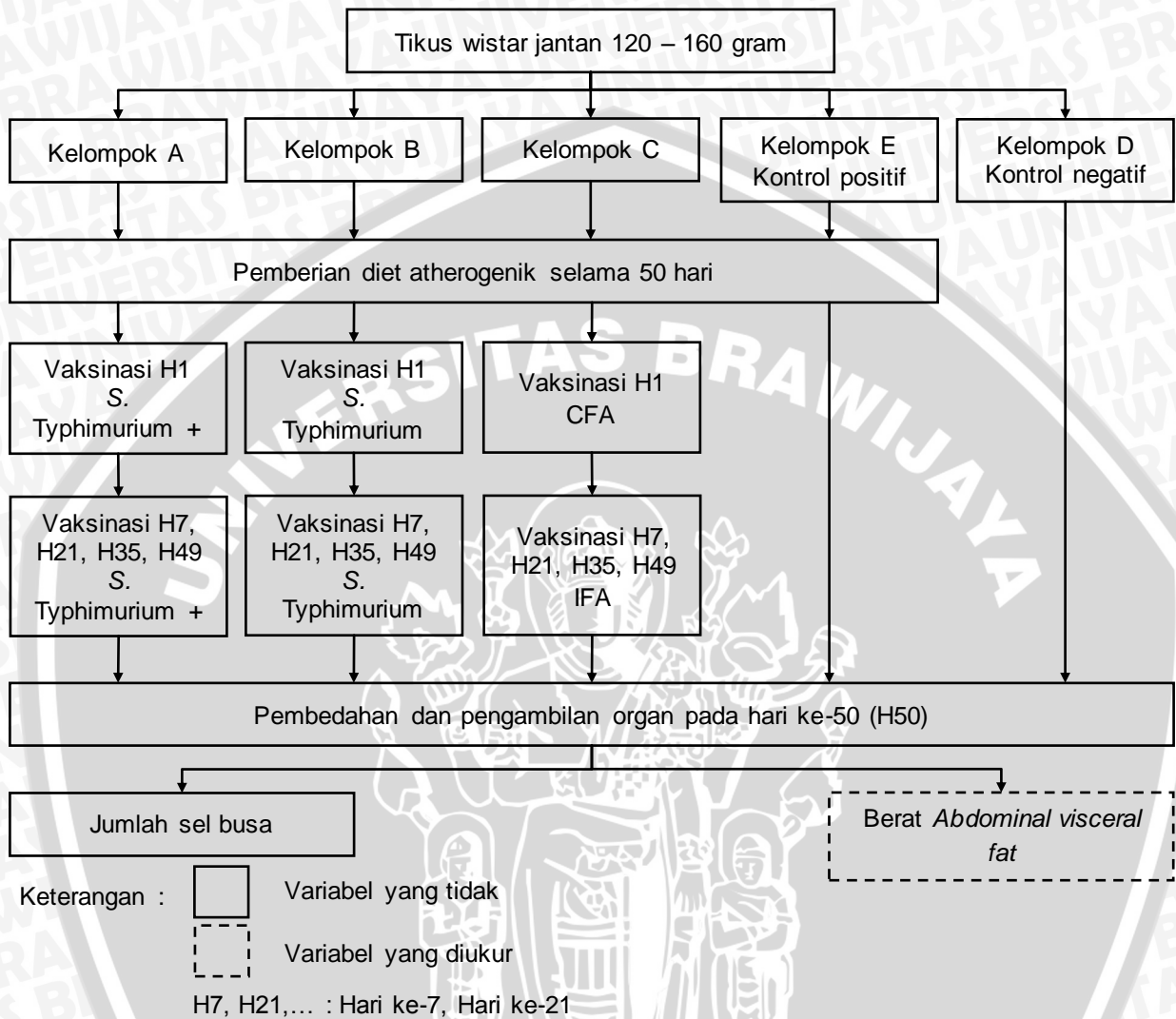
Penampang aorta diukur di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan mikrometer dan diukur sebanyak 8 titik pada potongan melintang lumen aorta lalu dihitung reratanya.

j. Penimbangan *Abdominal Visceral Fat*

Abdominal visceral fat diambil dari lemak intraperitoneal dan retroperitoneal. Lemak ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik, aluminium foil dan pinset. Dilakukan pencatatan hasil.

4.8 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diambil adalah asupan pakan setiap hari, berat badan setiap minggu, berat *abdominal visceral fat*, jumlah sel busa, dan ketebalan dinding aorta. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *One way Anova*. Sedangkan, jika varian tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *One way Anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Dilakukan juga uji korelasi dan uji regresi. Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik dilakukan dengan SPSS 16 dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

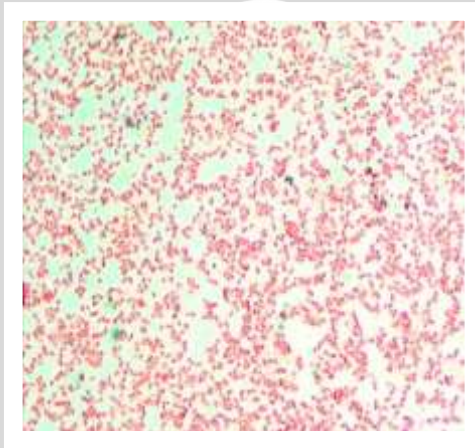
Keterangan : Tikus wistar dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan (A, B, dan C) dan kelompok kontrol (D dan E). Diet atherogenik diberikan pada kelompok A, B, C, dan E selama 50 hari. Vaksin dengan adjuvan CFA diberikan pada hari ke-1 (H1) dan vaksin dengan adjuvan IFA diberikan pada H7, H21, H35, dan H49. Pada hari ke-50 dilakukan pembedahan dan pengambilan organ. Selanjutnya, dilakukan pengecekan terhadap ketebalan aorta dan berat *abdominal visceral fat*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Bakteri *S. Typhimurium*

Identifikasi bakteri *S. Typhimurium* dilakukan dengan pewarnaan Gram dan tes biokimia yang selanjutnya dimasukkan dalam *software Microbact*. Hasil identifikasi bakteri *S. Typhimurium*, seperti pada gambar 5.1, ditemukan bakteri batang gram negatif yang berwarna merah pada pengecatan Gram.



Gambar 5.1 Pengecatan Gram *S. Typhimurium*

Keterangan : bakteri batang Gram negatif (berwarna merah)



Gambar 5.2 Tes Gula – Gula

Keterangan : Hasil positif fermentasi akan memberikan warna kuning atau oranye.

Tes biokimia dilakukan dengan tes gula – gula, seperti pada gambar 5.2, memberikan hasil seperti pada tabel 5.1. Hasil positif akan memberikan warna kuning atau oranye, yaitu pada fermentasi glukosa, VR, VP, mannose, xylose, dan TDA.

Tabel 5.1 Hasil Tes Biokimia Bakteri

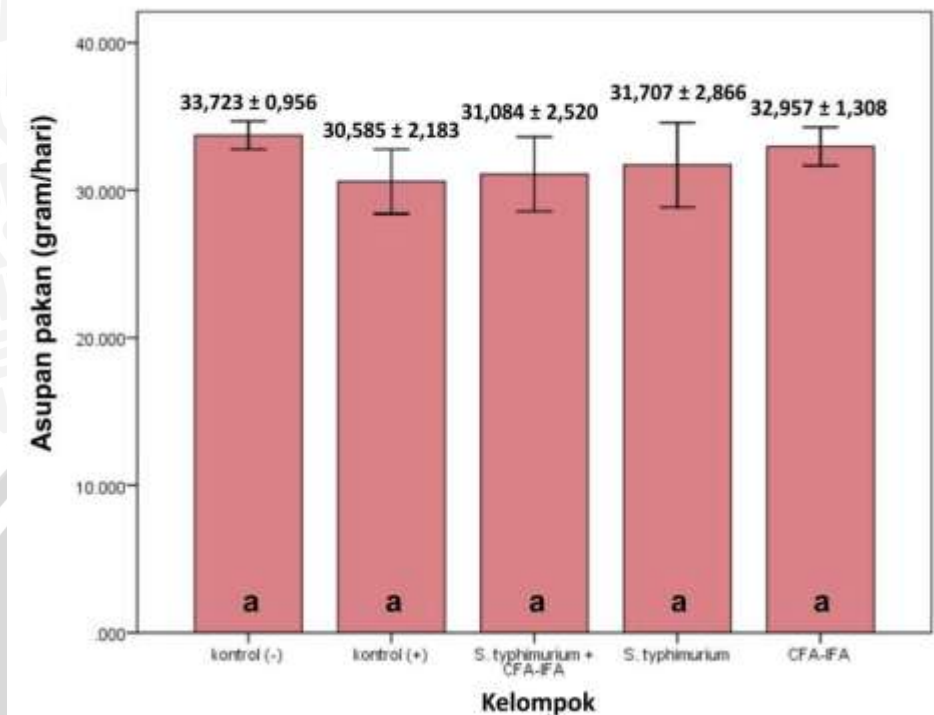
Nama Gula	Hasil	Nama Gula	Hasil	Nama Gula	Hasil
LYS	Biru	ONPG	Merah ungu	MAN	oranye
ORN	Biru	IND	kuning putih	XYL	oranye
H ₂ S	Coklat	VR	Kuning	CIT	Biru
GLU	Oranye	V.P.	Kuning	TDA	Kuning

Keterangan : LYS : Lysine; ORN : Ornithine; GLU : Glukose; IND : Indole; MAN : Mannitol; XYL : Xylose; CIT : Citrate; V.P. : Voges Proskauer

Hasil pengujian tes biokimia dimasukkan pada *software Microbact* dan menunjukkan bakteri tersebut merupakan bakteri *S. Typhimurium* dengan probabilitas 98%.

5.2 Rerata Asupan Pakan Tiap Hari

Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan $p=0,169$ ($p>0,05$) yang berarti bahwa tidak adanya perbedaan yang bermakna pada tiap tikus dalam memperoleh pakan tiap harinya. Dengan kata lain, semua tikus memperoleh asupan pakan yang sama tiap harinya. Hal tersebut dijelaskan dalam gambar 5.3, yaitu grafik perbandingan rerata asupan pakan tikus tiap harinya.



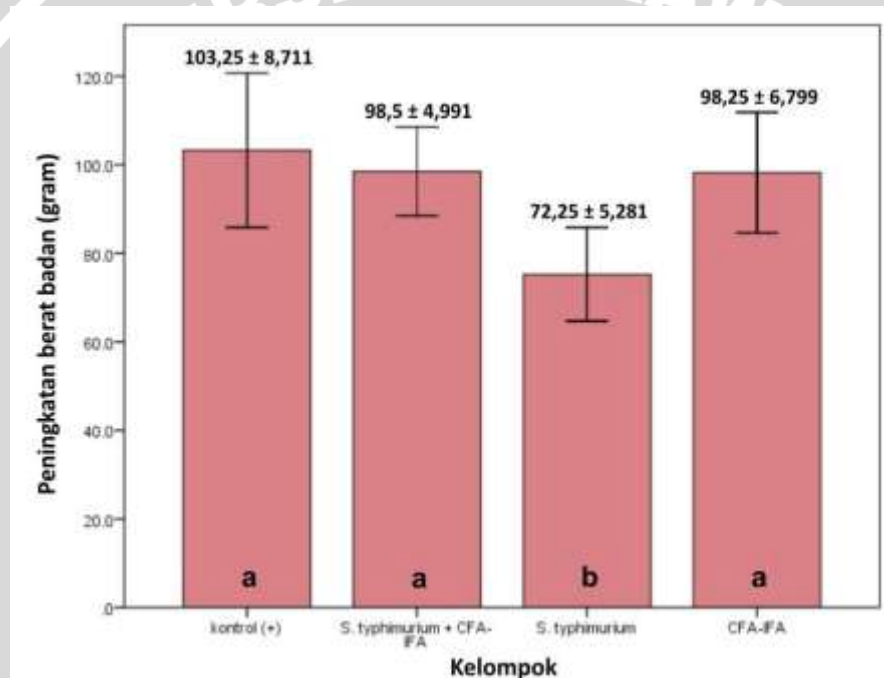
Gambar 5.3 Grafik Perbandingan Rerata Intake Pakan Tikus Tiap Hari

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada grafik batang di atas dari uji *Kruskal - Wallis* didapat perbedaan yang tidak signifikan antarkelompok ($p = 0,169$; $p > 0,05$) yang ditunjukkan dengan notasi yang sama (a). Berat rerata asupan makanan dan standar deviasi masing – masing kelompok terdapat pada bagian atas grafik batang masing – masing kelompok.

5.3 Peningkatan Berat Badan dan *Abdominal Visceral Fat*

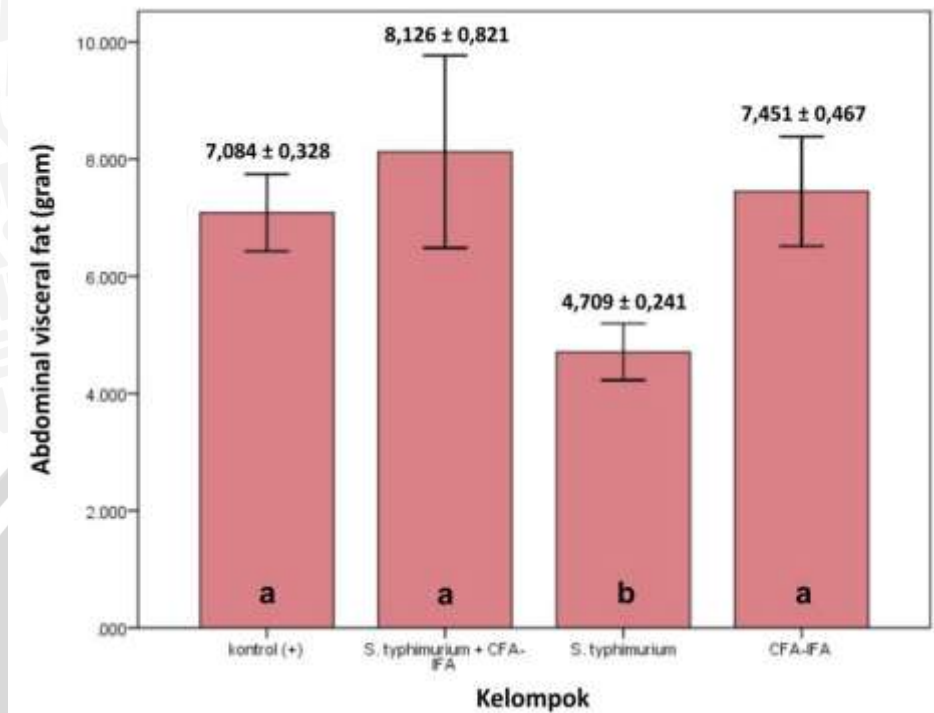
Uji normalitas dan homogenitas pada data berat badan tikus didapatkan $p > 0,05$ yang berarti menunjukkan persebaran data normal dan homogen. Uji *One way Anova* didapatkan nilai $p = 0,045$ ($p < 0,05$) pada data peningkatan berat badan yang ditunjukkan pada gambar 5.4. Uji normalitas dan homogenitas pada data berat *abdominal visceral fat* didapatkan $p > 0,05$ yang berarti menunjukkan persebaran data normal dan homogen. Uji *One way Anova* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) pada berat *abdominal visceral fat* yang ditunjukkan pada gambar 5.5.

Setelah dilakukan uji *post hoc tukey*, didapatkan pemberian *S. Typhimurium* tanpa ditambahkan adjuvan mampu menurunkan peningkatan berat badan dan penumpukan *abdominal visceral fat* secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan, pemberian *S. Typhimurium* ditambah adjuvan CFA atau IFA atau pemberian CFA atau IFA saja tidak mampu menurunkan peningkatan berat badan dan penumpukan *abdominal visceral fat* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.



Gambar 5.4 Grafik Perbandingan Peningkatan Berat Badan

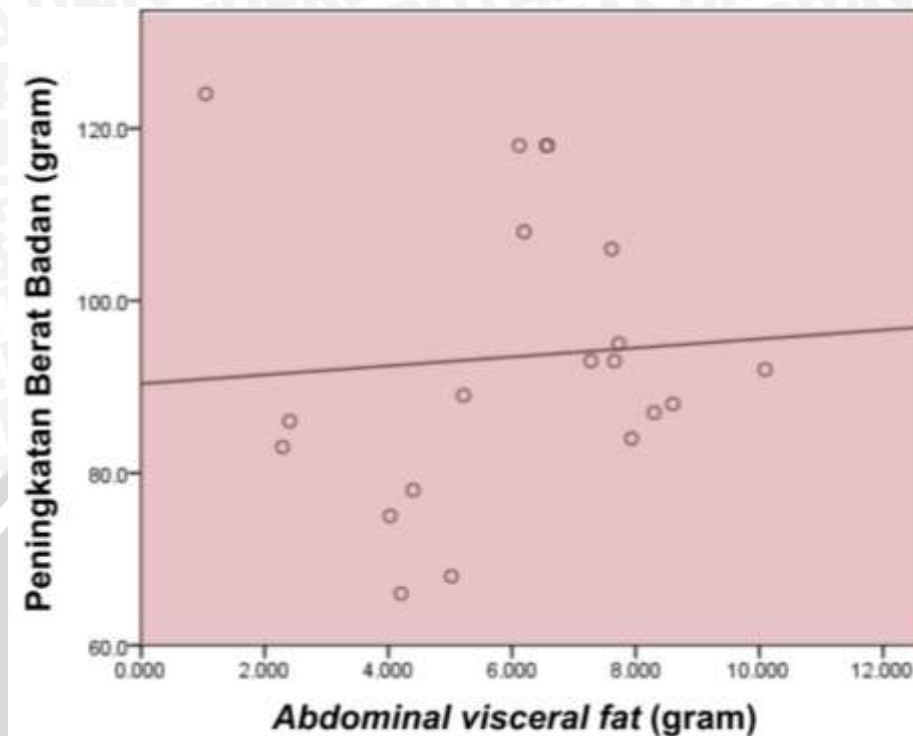
Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Kelompok *S. Typhimurium* (kelompok B) menunjukkan notasi b yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok lainnya dalam peningkatan berat badan. Kelompok kontrol negatif tidak dimasukkan dalam perbandingan grafik di atas karena perbedaan jenis diet yang diberikan sehingga tidak bisa dibandingkan dengan kelompok lainnya dalam hal peningkatan berat badan.



Gambar 5.5 Grafik Perbandingan *Abdominal Visceral Fat*

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Kelompok S. Typhimurium (kelompok B) menunjukkan notasi b yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok lainnya dalam hal berat *abdominal visceral fat*.

Uji korelasi *pearson* antara peningkatan berat badan dengan penumpukan abdominal visceral fat, seperti pada gambar 5.6, didapatkan nilai $p = 0,348$ ($p > 0,01$).



Gambar 5.6 Grafik Regresi Linier Peningkatan Berat Badan dan *Abdominal Visceral Fat* ($p=0,348$)

5.4 Ketebalan Dinding Pembuluh Darah

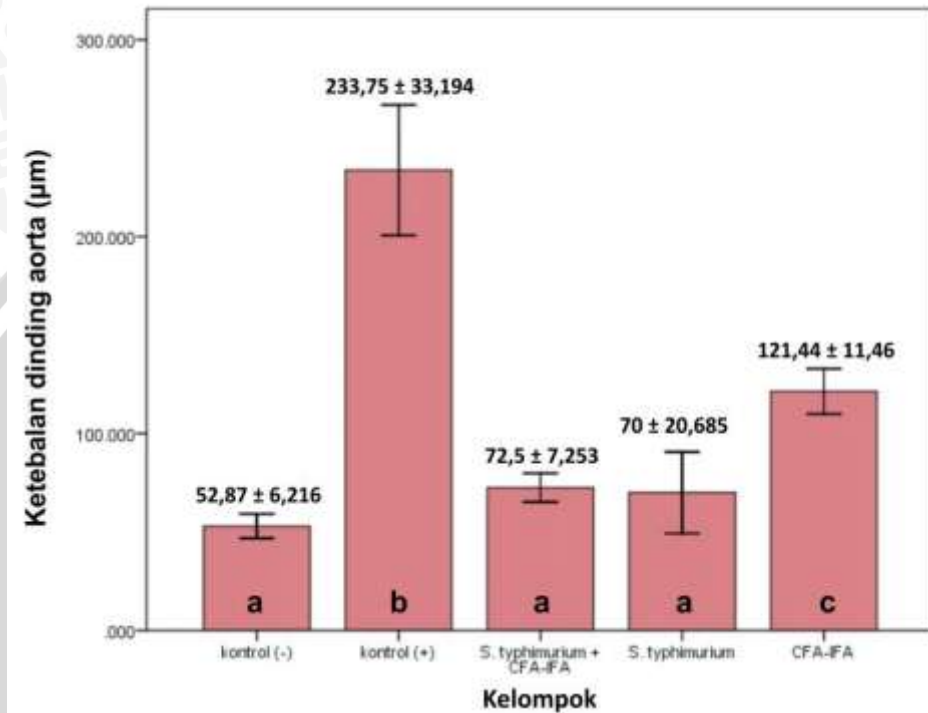
Uji ANOVA didapatkan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$) pada data ketebalan dinding pembuluh darah tikus. Uji *post hoc tukey* membuktikan bahwa pemberian *S. typhymurium* baik yang ditambahkan CFA-IFA maupun tidak dan CFA-IFA mampu menurunkan ketebalan dinding pembuluh darah secara signifikan ($p<0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Meskipun demikian, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diberikan *S. typhymurium*+CFA-IFA maupun tidak dengan CFA-IFA saja ($p<0,05$). Selain itu, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diberikan *S. typhymurium*+CFA-IFA maupun tidak ($p>0,05$)(grafik 6, tabel 3).

Tabel 5.2 Tebal Dinding Pembuluh Aorta

No	Kelompok (n=4)	Tebal Pembuluh Aorta (μm) (Rerata \pm SD)
1	Kontrol negatif	52,87 \pm 6,216 ^a

2	Kontrol positif	233,75 ± 33,194 ^b
3	S. Typhimurium + CFA-IFA	72,5 ± 7,253 ^a
4	S. Typhimurium	70 ± 20,685 ^a
5	CFA-IFA	121,44 ± 11,46 ^c

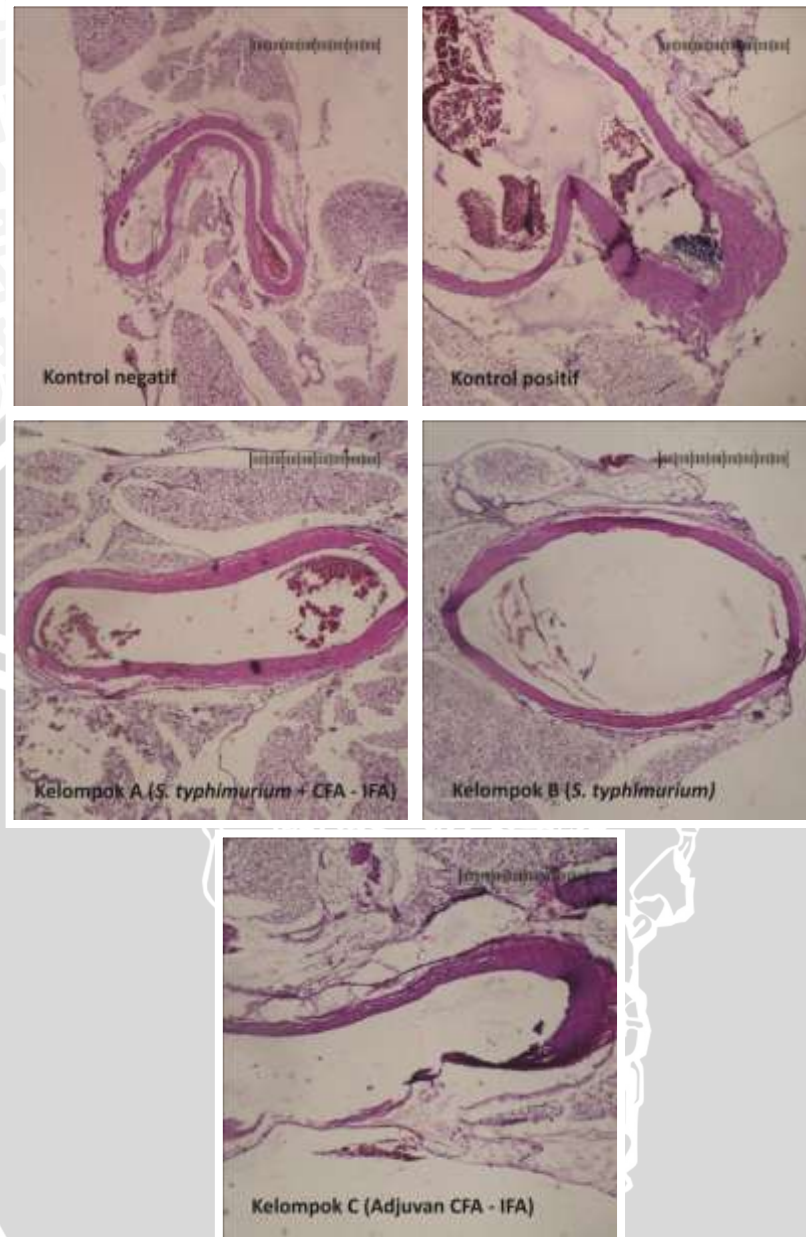
Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0,05)



Gambar 5.7 Grafik Perbandingan Ketebalan Pembuluh Aorta

Keterangan : Notasi yang berbeda (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0,05). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok A (vaksin S.Typhimurium + CFA – IFA) dan kelompok B (vaksin S. Typhimurium) dibandingkan dengan kontrol positif (notasi a dan b). Demikian juga kelompok C (vaksin adjuvan CFA – IFA) berbeda signifikan dengan kontrol positif (notasi b dan c). Terdapat perbedaan yang signifikan juga antara kelompok C dibandingkan kelompok A dan B (notasi a dan c).

Pengukuran ketebalan dinding pembuluh darah aorta dilakukan dengan membuat slide dengan metode blok parafin dengan pengecatan *Hematoksilin – Eosin* (HE). Hasil pengamatan ditunjukkan pada gambar 5.10.



Gambar 5.8 Ketebalan Dinding Pembuluh Darah Aorta Tikus

Keterangan : Slide ketebalan dinding pembuluh darah aorta dibuat dengan metode blok parafin dengan pengecatan *Hematoxylen –Eosin* (HE). Slide diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Ketebalan dinding pembuluh darah aorta diukur dengan micrometer (μm). Terlihat pada pengamatan, terdapat penebalan dinding pembuluh darah aorta pada kontrol positif dan kelompok C (adjuvan CFA – IFA). Sedangkan, ketebalan dinding pembuluh darah aorta pada kontrol negatif dibanding kelompok A (*S. Typhimurium* + CFA – IFA) dan kelompok B (*S. Typhimurium* saja) hampir sama.

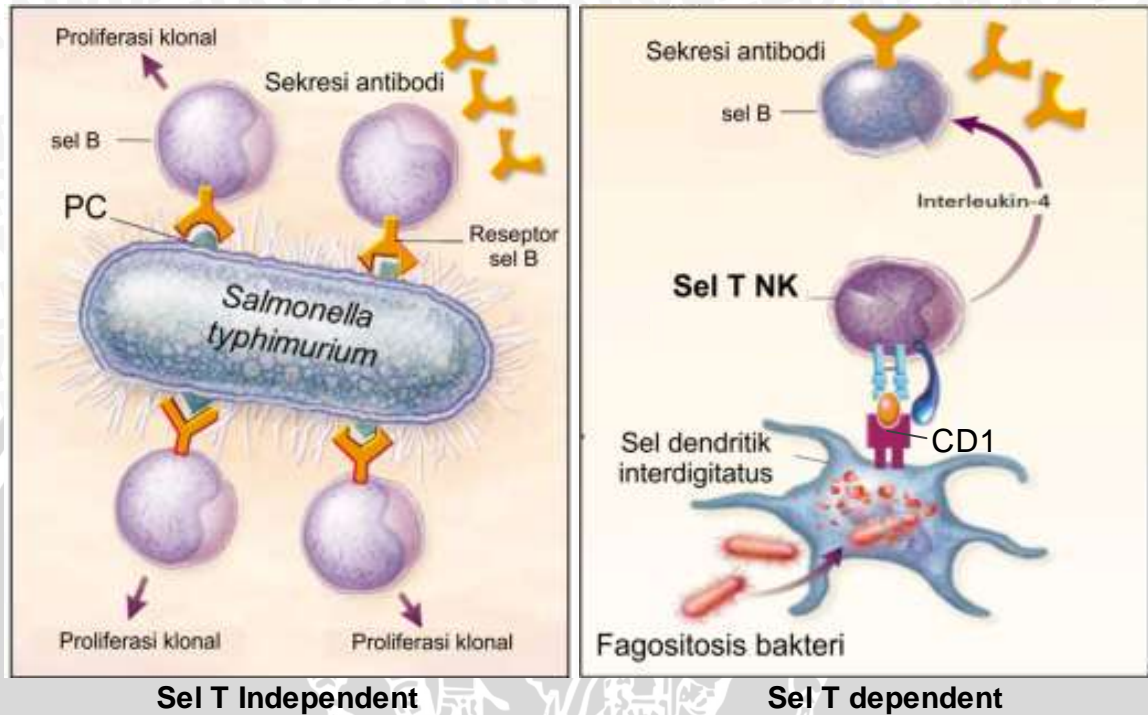
BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Mekanisme Kerja Vaksin *Heat-Killed Salmonella Typhimurium* terhadap Ketebalan Dinding Aorta

Salmonella Typhimurium merupakan bakteri yang bersifat gram negatif. Bakteri tersebut memiliki endotoksin yang dapat membahayakan jika masuk ke dalam tubuh manusia. Didapatkan bahwa pemberian *life attenuated S. Typhimurium* pada hewan coba dapat meningkatkan respon proinflamasi dibandingkan dengan pemberian *heat-killed S. Typhimurium*. Oleh karena itu, pemberian *heat-killed S. Typhimurium* lebih aman. PC merupakan molekul lemak yang diekspresikan pada membran luar *S. Typhimurium* sehingga dengan proses pemanasan/*heat-killed* tidak akan merusak PC. PC, sebagai epitope imunogenik dominan, saat diadministrasikan akan dikenali oleh sel imun tubuh dan terjadi pembentukan antibodi secara *T cell dependent* dan *T cell independent* seperti yang ditunjukkan pada gambar 6.1.

Pada jalur *T cell independent*, PC sebagai antigen akan dikenali oleh sel B melalui *B cell reseptor* (BCR). Sel B akan memproduksi antibodi humoral yang spesifik terhadap PC (Mackay, 2000). Sedangkan pada jalur *T cell dependent*, diperlukan keterlibatan sel T sebagai mediator pembentukan antibodi yang dapat bertahan lama. *S. Typhimurium* atau fragmen yang masuk akan difagosit oleh makrofag/sel dendritik. Sel tersebut berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) yang akan mempresentasikan PC kepada sel T. PC sebagai molekul lipid akan dipresentasikan melalui CD1 kepada sel T NK. Sel T NK akan

menghasilkan *interleukin-4* (IL-4) yang dapat merangsang sel B untuk menyekresikan antibodi spesifik terhadap PC (Zajonc, 2011).



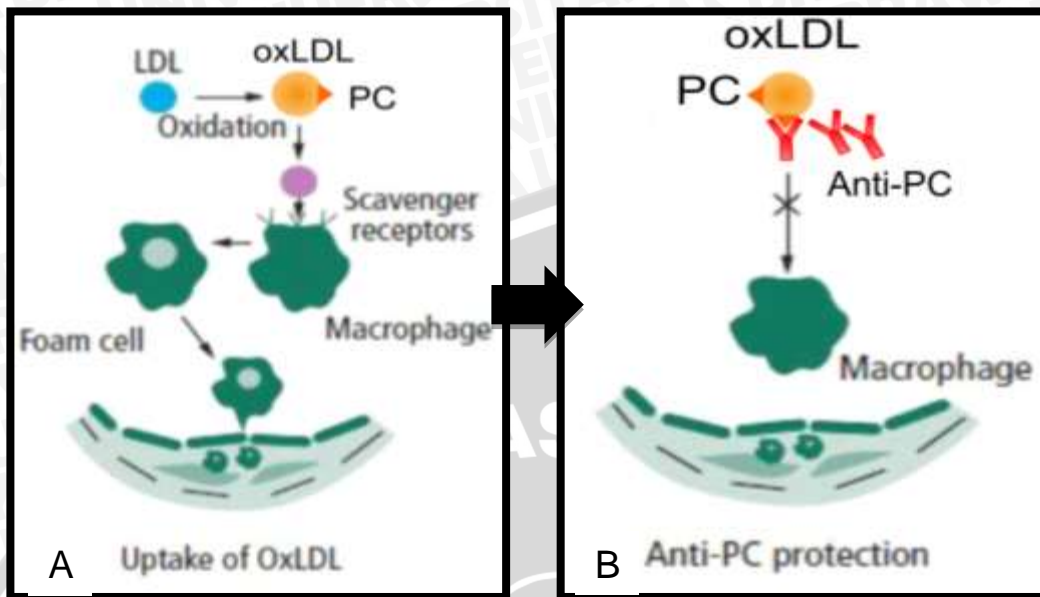
Gambar 6.1 Proses pembentukan antibody anti-PC secara *T cell independent* dan *T cell dependent* (Mackay, 2000; Zajonc, 2011)

Keterangan : Pada jalur *T cell independent*, antigen PC akan dikenali oleh sel B melalui reseptor sel B dan selanjutnya sel B akan memproduksi antibodi anti-PC. Sedangkan pada jalur *T cell dependent*, antigen PC akan dipresentasikan pada sel T NK melalui CD1 dan sel T NK akan menyekresikan IL-4 yang dapat merangsang sel B untuk memproduksi antibodi anti-PC.

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa PC merupakan faktor penting dalam pathogenesis atherosklerosis. PC merupakan *epitope* yang diekspresikan OxLDL yang dapat dikenali oleh SR pada makrofag dan sel-sel imun lainnya (Tsimikas *et al.*, 2005). OxLDL selanjutnya akan mengalami *uptake* oleh makrofag dan menjadi sel busa. Sel busa yang teraktivasi akan menyebabkan upregulasi dari reseptor makrofag, molekul adhesi, ekspresi faktor jaringan, produksi *growth factor*, produksi radikal bebas dan mediator inflamasi.

Keseluruhan proses tersebut dapat menyebabkan terjadi penebalan dinding pembuluh darah pada atherosklerosis (Su, 2009; Kearney, 2000).

Pada penelitian ini, pemberian *heat-killed* *S. Typhimurium* 100 μ L dapat menurunkan jumlah sel busa secara signifikan ($p=0,000$). Hal ini dapat terjadi karena antibodi anti-PC yang terbentuk dapat mengikat OxLDL sehingga *uptake* OxLDL oleh makrofag dapat dicegah. Kompleks imun ini juga akan menghambat adhesi OxLDL pada endotel pembuluh darah sehingga mengurangi jumlah OxLDL yang berada di dalam intima (Kearney, 2000). Hal ini dapat dijelaskan seperti pada gambar 6.2. Bakteri *Salmonella* Typhimurium merupakan bakteri gram negatif yang mengekspresikan PC pada dinding sel bakteri tersebut. Pemberian *heat-killed Salmonella* Typhimurium terbukti dapat menginduksi pembentukan antibodi anti-PC berupa peningkatan kadar IgG, IgA, dan IgM (Allaoui-Attarki, K., 1997). Pemberian PC-KLH dapat menginduksi antibodi anti-PC yang dapat mencegah terbentuknya plak atherosklerosis. Hal ini disebabkan karena antibodi anti-PC yang terbentuk dapat bereaksi silang dengan PC yang diekspresikan pada OxLDL (Caligiuri, 2007). Dengan demikian pemberian *heat-killed S. Typhimurium* dimungkinkan dapat memberikan efek protektif terhadap atherosklerosis.

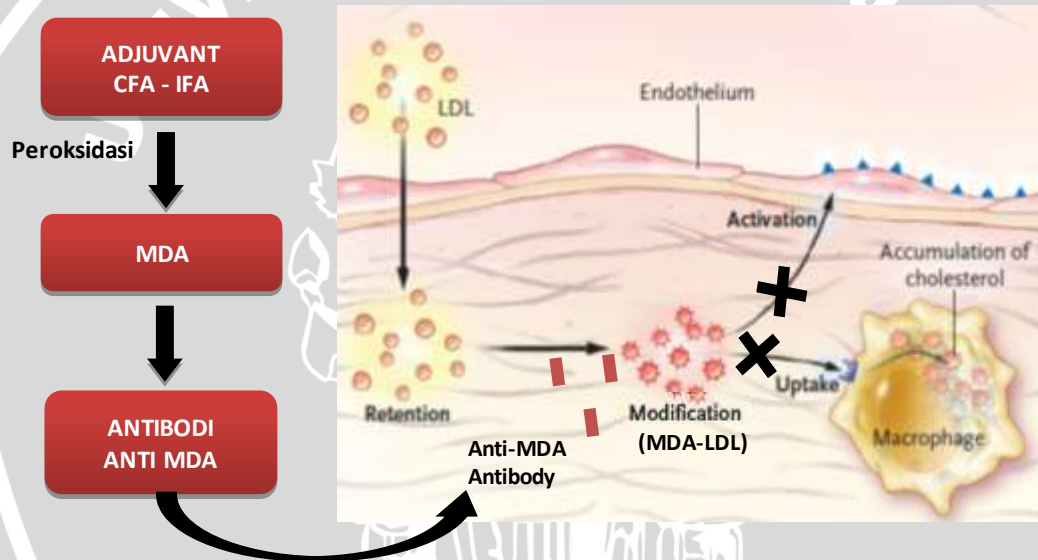


Gambar 6.2 Uptake OxLDL oleh makrofag (A) dan mekanisme proteksi antibodi anti-PC (B) (Caliguiri, 2007)

Keterangan : Gambar A menunjukkan proses pembentukan sel busa. LDL yang mengalami proses oksidasi menjadi OxLDL. OxLDL tersebut mengekspresikan PC. Uptake OxLDL oleh makrofag terjadi akibat ikatan reseptor scavenger pada makrofag dengan PC sehingga terbentuk sel busa. Gambar B menunjukkan antibodi anti-PC yang terbentuk dapat berikatan dengan PC pada OxLDL sehingga mencegah uptake OxLDL oleh makrofag dan sel busa tidak dapat terbentuk.

Adjuvan adalah suatu bahan vaksin yang digunakan untuk menjaga integritas antigen, meningkatkan respon imun terhadap antigen, dan mencegah terjadinya toleransi terhadap suatu antigen vaksin (Abbas dan Andrew, 2004). CFA-IFA merupakan adjuvan berbahan lemak yang bersifat protektif terhadap atherosklerosis (Hansen *et al.*, 2001). Pada penelitian ini, terbukti bahwa pemberian adjuvan CFA-IFA mampu menurunkan jumlah sel busa dan ketebalan dinding pembuluh darah ($p < 0,05$). Hal ini dikarenakan adjuvan yang berbahan lemak mampu untuk menginduksi terjadinya respon inflamasi lokal yang dapat mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid dan menghasilkan MDA. Selain itu, CFA sendiri merupakan adjuvan yang memiliki epitop MDA yang telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya. MDA yang dihasilkan oleh CFA-IFA tersebut

mampu mengoksidasi LDL menjadi MDA-LDL dan proses ini akan mengakibatkan terbentuknya antibodi terhadap MDA-LDL (Binder *et al.*, 2003). Berbagai penelitian menyebutkan bahwa vaksinasi menggunakan MDA-LDL mampu bersifat atheroprotektif. Hal tersebut dikarenakan uptake MDA-LDL oleh makrofag akan mengakibatkan terbentuknya sel busa sehingga antibodi terhadap MDA-LDL akan menghambat *uptake* MDA-LDL dan mencegah terbentuknya sel busa dan penebalan dinding pembuluh darah (Kametsu *et al.*, 2005). Proses di atas dijelaskan pada gambar 6.3.



Gambar 6.3 Proses atheroproteksi adjuvan CFA – IFA (Kametsu, 2005)

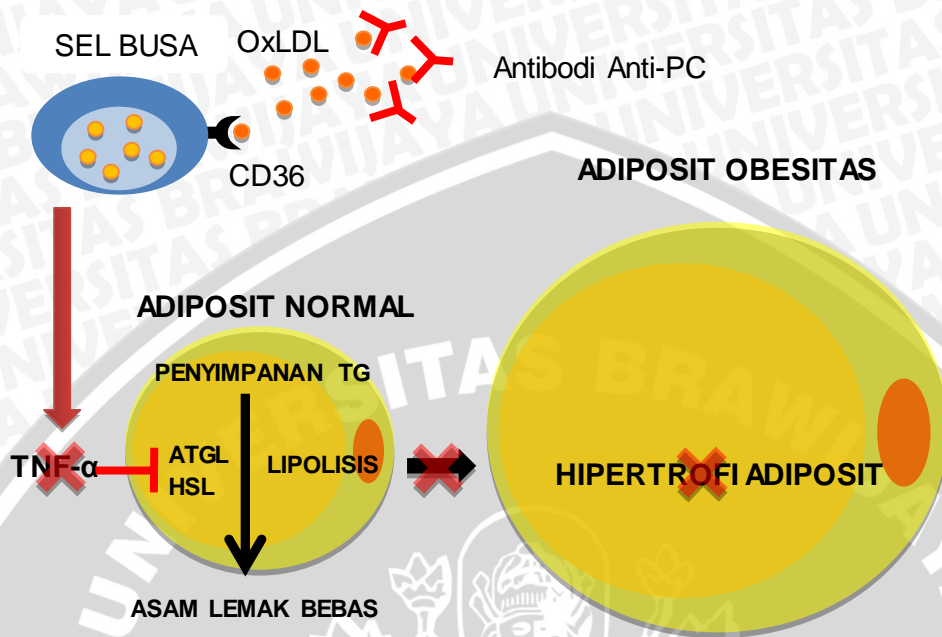
Keterangan : Adjuvan CFA – IFA dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang menghasilkan *malodealdehyde* (MDA). MDA dapat mengoksidasi LDL menjadi MDA-LDL. MDA-LDL dapat menginduksi pembentukan antibodi anti-MDA-LDL. Antibodi tersebut dapat menghambat *uptake* MDA-LDL oleh makrofag sehingga pembentukan sel busa dapat dicegah.

Induksi antibodi anti-PC dan anti-MDA-LDL merupakan target poten dalam mencegah terjadinya atherosklerosis. Oleh karena itu, pemberian *S. Typhimurium* ditambahkan dengan CFA-IFA mampu menurunkan jumlah sel busa secara signifikan dibandingkan dengan kontrol positif dan pemberian CFA-

IFA saja ($p < 0,05$). Selain itu, pemberian *S. Typhimurium* ditambahkan CFA-IFA mampu mengembalikan jumlah sel busa ke kondisi normal yaitu seperti kontrol negatif ($p > 0,05$). Meskipun demikian, tidak didapatkan perbedaan signifikan antara pemberian *S. Typhimurium* baik yang ditambahkan CFA-IFA maupun tidak yang artinya kedua kelompok perlakuan tersebut sama-sama mampu mencegah atherosklerosis seperti kondisi normal ($p > 0,05$).

6.2 Mekanisme *S. Typhimurium* terhadap Penurunan Berat Badan dan *Abdominal Visceral Fat*

Obesitas merupakan suatu kondisi dimana ditandai dengan terjadinya peningkatan berat badan dan penumpukan lemak yang berlebihan di dalam tubuh (*abdominal visceral fat*). Adanya peningkatan kadar OxLDL pada kondisi atherosklerosis mampu mengakibatkan peningkatan risiko terjadinya obesitas. Hal tersebut dikarenakan berbagai macam mekanisme antara lain, OxLDL akan mengakibatkan peningkatan proliferasi dan maturasi sel adiposit, meningkatkan produksi *trigliserida* (TG) dengan cara menginduksi lipoprotein lipase, dan menginduksi penumpukan asam lemak pada adiposa. Pemberian *S. Typhimurium* mampu menurunkan berat badan dan *abdominal visceral fat* secara signifikan ($p < 0,05$). OxLDL dapat menginduksi terjadinya obesitas dengan cara berikatan dengan reseptor CD36 pada sel adiposit. *S. Typhimurium* dapat menginduksi terbentuknya antibodi anti-OxLDL yang dapat berikatan dengan OxLDL sehingga *uptake* melalui CD36 dapat dicegah seperti yang dijelaskan pada gambar 6.4 (Masella, *et. al*, 2006; Stengel, *et. al*, 1998; Merkel, 2002).

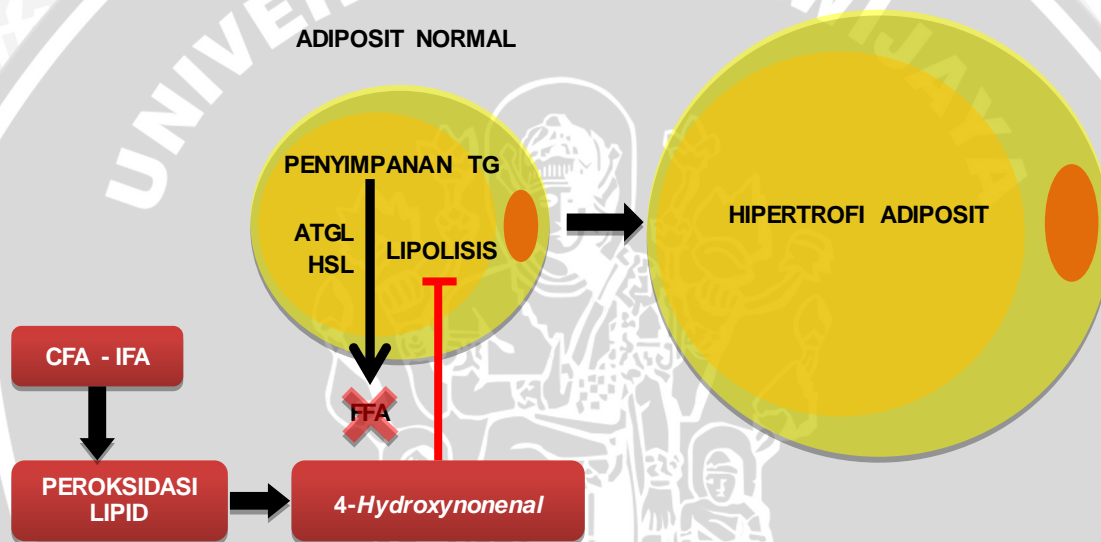


Gambar 6.4 Mekanisme hambatan peningkatan berat badan dan *abdominal visceral fat* oleh antibodi anti-PC (Masella, et. al, 2006; Stengel, et. al, 1998; Merkel, 2002)

Keterangan : OxLDL yang terbentuk dapat berikatan dengan CD36 pada makrofag sehingga terbentuk sel busa. Hal tersebut juga akan menginduksi sekresi TNF- α . TNF- α dapat menyebabkan inhibisi enzim *Adipose Tissue Triglyceride Lipase* (ATGL) dan *Hormone Sensitive Lipase* (HSL) yang berperan pada proses lipolisis. Hambatan tersebut menyebabkan lipolisis terhambat dan terjadi penimbunan trigliserida (TG). Penimbunan tersebut menyebabkan hipertrofi sel adiposit dan peningkatan berat badan. Administrasi *S. Typhimurium* dapat menginduksi pembentukan antibodi anti-PC yang dapat berikatan dengan PC pada OxLDL. Ikatan tersebut dapat menghambat ikatan OxLDL dengan CD36 makrofag dan menghambat sekresi TNF- α . Pada akhirnya penimbunan TG dapat dicegah.

Pada uji *pearson* antara berat badan dan *abdominal visceral fat* ditemukan bahwa tidak terdapat hubungan antara kedua variable tersebut $p=0,348$ ($p>0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan berat badan tidak mencerminkan kondisi obesitas yang berasal dari penumpukan lemak di dalam tubuh. Peningkatan berat badan dapat juga disebabkan karena peningkatan massa otot, tulang, dan jaringan tubuh lainnya.

Pemberian CFA-IFA ternyata tidak dapat menurunkan berat badan dan *abdominal visceral fat* secara signifikan ($p>0,05$). Penambahan adjuvan berbahan lemak mampu mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid tersebut akan menghasilkan *4-Hidroksynonenal* (4-HNE). 4-HNE dapat menimbulkan gangguan anabolisme lipid, induksi sintesis asam lemak, dan menekan proses β -oksidase sehingga tetap terjadi penumpukan TG pada jaringan adiposa (Mattson, 2009).



Gambar 6.5 Mekanisme induksi penyimpanan trigliserida dan hipertrofi adiposit oleh adjuvan CFA-IFA (Mattson, 2009)

Keterangan : Adjuvan CFA-IFA dapat menyebabkan peroksidasi lipid yang menghasilkan *4-Hydroxynonenal* (4-HNE). 4-HNE dapat menghambat terjadinya lipolisis sehingga menyebabkan peningkatan penyimpanan TG dan hipertrofi adiposit.

6.3 Potensi Penggunaan Vaksin Atherosklerosis pada Manusia

Penelitian ini membuktikan vaksin *Heat-Killed S. Typhimurium* dapat menurunkan jumlah sel busa, ketebalan pembuluh darah akibat proses atherosklerosis, dan mencegah penumpukan *abdominal visceral fat* pada hewan coba secara signifikan. Oleh karena itu, vaksin ini berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut. Rencana jangka panjang dari penelitian ini adalah

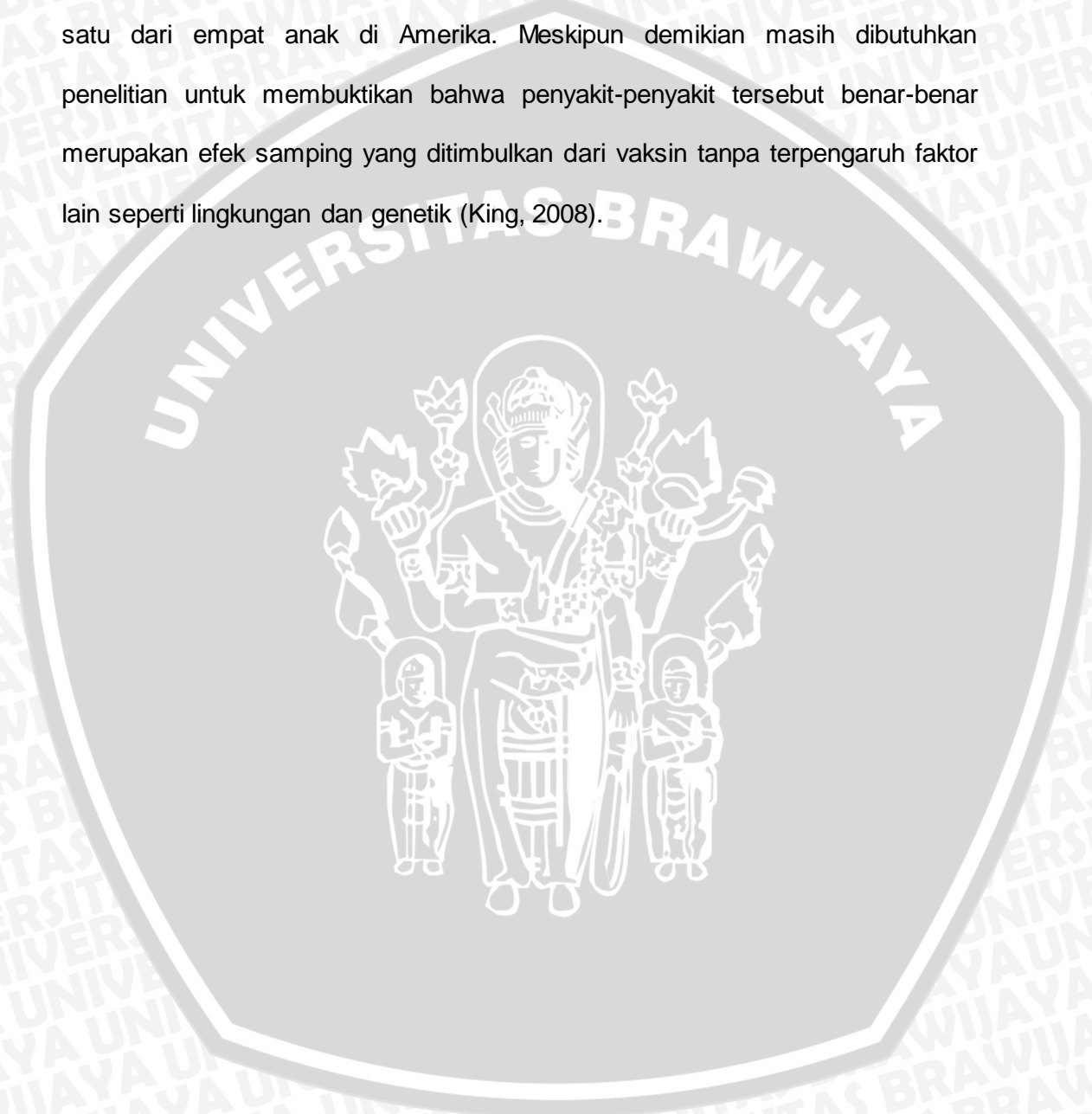
vaksin *Heat-Killed Salmonella* Typhimurium dapat diujikan pada manusia dan diproduksi luas. Untuk mencapai pada tingkat pengujian pada manusia, perlu dilakukan penelitian mengenai keefektifan vaksin dan efek samping yang ditimbulkan. Dari ketiga kelompok perlakuan yang ada penelitian ini, pemberian vaksin *Heat-Killed S. Typhimurium* tanpa menggunakan adjuvan memberikan hasil yang paling efektif dalam mencegah atherosklerosis dan obesitas. Sehingga bahan inilah yang direkomendasikan menjadi kandidat vaksin atherosklerosis.

Metode pemberian vaksin pada manusia sama dengan metode pada hewan coba. Setelah program vaksinasi selesai, diharapkan tubuh telah memproduksi sel memori yang selanjutnya memproduksi antibodi protektif terhadap atherosklerosis. Target pemberian vaksin atherosklerosis ini adalah anak usia 5-15 tahun. Pemilihan potensial target ini berdasarkan mulai terbentuknya akumulasi lemak yang disebut *fatty streak* pada pembuluh darah pada rentang usia tersebut (McGill, *et al*, 2000). Selain itu pada anak usia 5-15 tahun, respon imun tubuh baik respon imun selular maupun humoral sedang dalam proses perkembangan. Diharapkan dengan pemberian vaksin atherosklerosis ini, dapat menginduksi respon imun yang memiliki efek atheroprotektif (Delves P.J., *et al*, 2010)

6.4 Efek Samping Pemberian Vaksin Atherosklerosis

Efek samping yang mungkin terjadi karena pemberian vaksin *heat-killed Salmonella* Typhimurium antara lain adalah terjadinya demam setelah pemberian vaksin. Selain itu juga sering terjadi pembengkakan pada tempat injeksi. Selain efek samping jangka pendek tersebut, berdasarkan studi epidemiologi oleh King (2008) terdapat hubungan efek samping jangka panjang antara pemberian vaksin secara umum dengan penyakit-penyakit kronis pada anak. Penyakit-penyakit

seperti asma, *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), diabetes, gangguan perkembangan otak dan perilaku termasuk autisme. Berdasarkan data NHANES *cohort of children* tahun 2006, penyakit-penyakit tersebut terjadi pada satu dari empat anak di Amerika. Meskipun demikian masih dibutuhkan penelitian untuk membuktikan bahwa penyakit-penyakit tersebut benar-benar merupakan efek samping yang ditimbulkan dari vaksin tanpa terpengaruh faktor lain seperti lingkungan dan genetik (King, 2008).



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan *heat-killed Salmonella* Typhimurium ditambah adjuvan CFA – IFA, *heat-killed Salmonella* Typhimurium tanpa adjuvan, dan adjuvan CFA – IFA mampu menurunkan ketebalan dinding aorta pada model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik
2. Pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan *heat-killed Salmonella* Typhimurium mampu menurunkan berat badan dan *abdominal visceral fat*
3. Pemberian vaksin atherosklerosis menggunakan *heat-killed Salmonella* Typhimurium ditambah adjuvan CFA – IFA dan adjuvan CFA – IFA tidak mampu menurunkan berat badan dan *abdominal visceral fat*

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian tentang efek samping dan toksisitas pemberian vaksin *S. Typhimurium*
2. Pada penelitian ini perlu dilakukan pengecekan variable proses untuk melihat kadar antibodi spesifik yang terbentuk

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. dan H.L., Andrew. 2004. *Basic Immunology: Function and Disorder of The Immune System* 2nd Edition. Philadelphia: Elsevier Inc.
- Achmad, T.H. 2004. *Biomolecular Mechanism of Antioxidant Activity on Aging Process*. Bandung.
- Allaoui-Attarki, K., 1997. Protective Immunity against *Salmonella* Typhimurium Elicited in Mice by Oral Vaccination with Phosphorylcholine Encapsulated in Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres. *Infection and Immunity*. p. 853–857.
- American Heart Association. 2010. *Cardiovascular Disease Statistics*, (online) (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4591>, diakses 18 Agustus 2010).
- Anitra C, McCall, Frei B. 2000. Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species : Reaction Pathways and Antioxidant Protection. *American Heart Association*, Vol. 20:1716-1723.
- ANTARA News. 21 Maret, 2010. *Death Rate Caused by Cardiovascular Disease Up*, (online) (<http://www.antarane.ws.com/en/news/1280144052/death-rate-caused-by-cardiovascular-disease-up>, diakses 12 Agustus 2010).
- Avila-Campos, M.J., Simionato, M.R.L., Cai, S., Mayer, M.P.A., De Lorenzo, J.L., Zelante, F. 2000. Virulence Factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Other Putative Factors. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 14(1): 5-11.
- Bhatia V.K., Yun, S., Leung, V., Grimsditch, D.C., Benson, G.M., Botto, M.B., Boyle, J.J., Haskard, D.O. 2007. Complement C1q Reduces Early Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Deficient Mice. *The American Journal of Pathology*, Vol. 170 No. 1.
- Binder CJ, Horkko, S., Dewan, A., Chang, M.K., Kieu, E.P., Goodyear, C.S., Shaw, P.X., Palinski, W., Witztum, J.L., Silverman, G.J. 2003. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nature Medicine* : *Nature Publishing Group* 2003, 9:736-43.
- Boudi, F.B. 2010. Medscape. *Atherosclerosis*, (online) (<http://emedicine.medscape.com/cardiology#atherosclerosis>, diakses 18 Agustus 2010).
- Brown, B.G., Zhao, X.Q., Chait, A., Fisher, L.D., Cheung, M.C., Morse, J.S., et al. 2001. Simvastatin and Niacin, Antioxidant Vitamins, or The Combination For

The Prevention of Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*, Vol. 345 No. 22.

Caligiuri, G., Khallou-Laschet, J., Vandaele, M., Gaston, A., Delignat, S., Mandet, C. 2007. Phosphorylcholine-Targeting Immunization Reduces Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(6): 540-546.

Chang, M.K., Binder, C.J., Miller, Y.I., Subbanagounder, G., Silverman, G.J., Wiltzum, J.L., Berliner, J.A. 2004. Apoptotic Cells with Oxidation-Specific Epitopes are Immunogenic and Proinflammatory. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(11): 1359-1370.

Collins, A.R., Lyon, C.J., Xia, X., Tangirala, R.K., Yin, F., Boyadjian, R., et al. 2009. Age-Related Atherosclerosis Correlates with Failure to Upregulate Antioxidant Genes. *Circ Res*, 104(6): 42-54.

Curtiss, L.K. 2009. Reversing Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, No. 360:11.

Damianus, L.E. 2000. *Salmonella Typhimurium, Sang jawara penginfeksi dari Genus Salmonella*. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma: Yogyakarta.

Delves P.J., Roitt, I.M. 2010. Advances Immunology : The Immune System. *New England journal of Medicine*, Vol. 343 No.1.

Dzen, S.M., Roekistiningsih, Santoso, S., Winarsih, S. 2003. Enterobacteriaceae. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia Publishing

Engels, Eric A., Falagas, Matthew E., Lau, Joseph., et al. 1998. Typhoid Fever Vaccines: a Meta-Analysis of Studies on Efficacy and Toxicity. *BMJ* (1998) 316 : 110.

Frostegard, J., Tao, W., Georgiades, A., Rastam, L., Lindblad, U., Lindeberg, S. 2007. Atheroprotective natural anti-phosphorylcholine antibodies of IgM subclass are decreased in Swedish controls as compared to non-westernized individuals from New Guinea. *Journal of Nutrition & Metabolism*, Vol. 4 No. 7.

Gmur R., Thumheer T., Guggenheim. 1999. Dominant Cross-reactive Antibodies Generated during the Response to a Variety of Oral Bacterial. *Journal of Dental Research*, 78: 77

Hansen, P.R., Chew, M., Zhou, J., Daugherty, A., Heegaard, N., Jensen, P., Mouritsen, S., Falk, E. 2001. Freund's adjuvant alone is antiatherogenic in apoE-deficient mice and specific immunization against TNF- α confers no additional benefit. *Atherosclerosis*, 158(2001): 87-94.

- Hansson, G. K. 2005. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, No. 352:1685-95.
- Jerry, D.J., 1993. Monitoring Coupling of Peptides to Carrier Protein using Biotinylated Peptide. *Biotechniques*, 14(3): 464-469.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., Hansson, G.K. 1988. Regional Accumulations of T cells, Macrophages, and Smooth Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque. *Arteriosclerosis*, No. 6:131-138.
- Kametsu, Y., Kitagawa, Y., Sekiyama, S., Takagi, S. 2005. Increase in plasma Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in patients with atherothrombotic cerebral infarction. *Tokai J Exp Clin Med*, 30(3): 171-176.
- Karlina, R. 2008. *Perbandingan Pemberian Cornmeal dan Cornmeal Soy terhadap Jumlah Foam Cell Pada Tunika Intima Tikus Wistar yang Diberi Diet Atherogenik*. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Kearney, J.F. 2000. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.105 No.12.
- Khallou-Laschet, J., Tupin, E., Caligiuri, G. 2005. Atheroprotective Effect of Adjuvants in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Atherosclerosis*.
- King, Paul G. 2008. Vaccines and Autism – The Wrong Argument. <http://www.whale.to/v/king12.pdf> diakses tanggal 29 Mei 2011.
- Kliegman, R.M., Behrman, R.E., Jenson, H.B., Stanton, B.F. 2007. *Nelson Textbook of Pediatric* (18th Edition). New York: Saunders.
- Krieg, A.M., 2002. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annual Review of Immunology*, 20: 709-760.
- Ludewig. B., Krebs, P., Scandella, E. 2004. Immunopathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of Leucocyte Bio*, Vol. 76.
- Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., et al. 2006. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBSS lett*, 580(10):2621-2329
- Mattson, M.P. 2009. Roles of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynanoneal in Obesity, the Metabolic Syndrome, and Associated Vascular and Neurodegeneratif Disorders. *Exp Gerontol*, 44(10): 625-633.
- McGill H.C., McMahan, C.A., Herderick, E., Malcom, G.T., Tracy, R.E., Strong, P.J. 2000. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 72 : 1307-1315.
- Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W. 2002. Inactive Lipoprotein Lipase (LPL) Alone Increases Selective Cholesterol Ester Uptake *in Vivo*, Whereas in the

Presence of Active LPL It Also Increases Triglyceride Hydrolysis and Whole Particle Lipoprotein Uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(9):7405-7411.

National Cancer Institute. 2000. *Definition of Adjuvant*, (online) (http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?CdrID=43987, diakses 12 Agustus 2010).

Pecquet, S.S., Ehrat, C., Ernst, P.B. 1992. Enhancement of Mucosal Antibody Response to *Salmonella* Typhimurium and the Microbacterial Hapten Phosphorylcholine in Mice with X-Linked Immunodeficiency by B-Cell Precursors from Peritoneal Cavity. *Infection and Immunity*, 60(2): 503-509.

Kumar, V., Fausto, N., Abbas, A. 2003. *Robbins & Cotran Basic Pathology 7th Edition*. USA : Saunder.

Schenkein, H.A., Barbour, S.E., Berry, C.R., Kipps, B., Tew, J.G. 2000. Invasion of Human Vascular Endothelial Cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Via the Receptor for Platelet-Activating Factor. *Infection and Immunity*, 68(9): 5416-5419.

Shenckel, H.A., Berry, C.R., Purkall, D., Burmeister, J.A., Brooks, C.N., Tew, J.G. 2001. Phosphorylcholine Dependent Cross-Reactivity between Dental Plaque Bacteria and OxLDL. *Infection and Immunity*, 69(11). 6612-6617.

Sinha, S. 2005. Anti-oxidant Gene Expression Imbalance, Aging and Down Syndrome. *Life Science*, 76(12): 1407-1426.

Stengel, D., Antonucci, M., Gaoua, W. 1998. Inhibition of LPL Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages is Dependent on LDL Oxidation State : A Key Role for Lysophosphatidylcholine. *Journal of the American Heart Association*, 18:1172-1180.

Su, Jun. 2009. *Natural Antibodies Against Phosphorylcholine as Potential Protective Factors in Atherosclerosis, Cardiovascular Disease and Systemic Lupus Erythematosus*. Stockholm.

Thatte, J., Rath, S., Bal, V. 1995. Analysis of Immunization Route-Related Variation in the Immune Response to Heat Killed *Salmonella* Typhimurium in Mice. *Infection and Immunity*, 63(1): 99-103.

ThermoScientific. 2010. *Imject KLH Carrier Protein and EDC Conjugation Kit*, (online) (<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=5E02914D-DE91-4324-AE2A-79BA730D30C5>, diakses 12 Agustus 2010).

Todar, K. 2011. *Salmonella and Salmonellosis, Text Book Of Bacteriology*, (Online) (http://textbookofbacteriology.net/salmonella_5.html) , diakses tanggal 5 Desember 2011

Tsimikas, S., Brilakis, E.S., Miller, E.R., McConnell, J.P., Lennon, R.J., Kornman, K.S., *et al.* Oxidized Phospholipid, Lp(a) Lipoprotein, And Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 2005. Vol. 353:46-57.

US Census Bureau. 2004. *Statistics by Country for Atherosclerosis*, (online) (<http://www.cureresearch.com/statistics.htm>, diakses 12 Agustus 2010).

Weeratna, R.D., McCluskie, M.J., Xu, J., Davis, H.L. 2000. CpG DNA Induces Stronger Immune Responses with Less Toxicity than other Adjuvants. *Vaccine*, 18: 1755.

Why Conjugate. 1996. *Conjugation of Peptides to Protein Carriers*, (online) (<http://www.jenobiotech.com/techsupport/AbDesign/ABI-Ch4.htm#WhyConjugate?>, diakses 12 Agustus 2010).

Young I.S., McEneny, J. 2001. *Lipoprotein oxidation and atherosclerosis*. Northern Ireland, U.K.



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fredo Tamara

NIM : 0910710077

Program Studi : Program Studi Kedokteran Umum

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

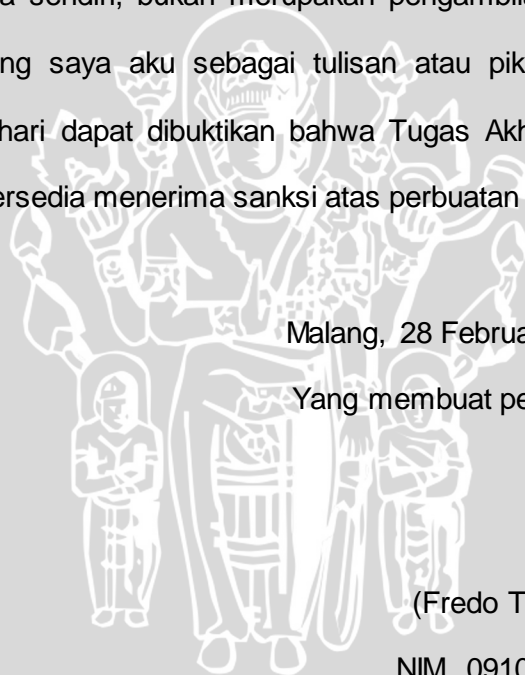
menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

(Fredo Tamara)

NIM. 0910710077



LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Faktual Penelitian

No	Tanggal	Kegiatan
1.	10 Feb 2011	Mengurus ethical clearance, survey laboratorium, mencari bahan penelitian
2.	18 Feb 2011	Mengurus ethical clearance, survey lab. Biokimia, konsultasi dosen pembimbing
3.	19 – 20 Feb 2011	Melengkapi bahan penelitian dan sumber - sumber
4.	21 Feb 2011	Mengurus perijinan laboratorium, konsultasi dosen pembimbing, cek etik
5.	22 Feb 2011	Mencari bahan untuk media kultur dan isolasi <i>A. actinomicetemcomitans</i>
7.	25 Feb 2011	Survey bahan penelitian di lab. biomed dan lab. mikro
8.	27 Feb 2011	Revisi ethical clearance
9.	1 Mar 2011	Perijinan ke Rumah Sakit dr. Saiful Anwar (RSSA)
10.	2 – 3 Mar 2011	Persiapan metode dan media kultur, perijinan lab. mikro
11.	4 Mar 2011	Mengecek perijinan di lab. mikro, lab. biomed, lab. biokim, dan RSSA
12.	7 Mar 2011	Persiapan isolasi bakteri, mengurus surat ijin di RSSA (lab. gigi dan mulut)
13.	8 Mar 2011	Isolasi bakteri di lab. gigi dan mulut, persiapan media kultur
14.	9 Mar 2011	Isolasi bakteri di lab. gigi dan mulut, kultur di lab. mikro, pembelian hewan coba (tikus)
15.	11 Mar 2011	Isolasi bakteri di lab.gigi dan mulut, mencari bahan diet, pemberian makan tikus
16.	14 Mar 2011	Isolasi bakteri di lab.gigi dan mulut, mencari bakteri di FKG UNAIR, Tropical Disease Center Surabaya, dan Biotech UGM, Pemberian makan tikus, kultur bakteri
17.	15 Mar 2011	Cek kultur bakteri, konsultasi dosen pembimbing, rencana kedua jika bakteri tidak ditemukan di hasil kultur yaitu mengganti <i>A.</i>

		<i>actinomicetemcomitans</i> dengan <i>Salmonella</i> Typhimurium, pemberian makan tikus
18.	16 – 17 Mar 2011	Pencarian bahan diet, pengecekan kultur bakteri, pemberian makan tikus
19.	18 Mar 2011	Identifikasi <i>A. actinomicetemcomitans</i> , peremajaan <i>S. Typhimurium</i> , penghitungan jumlah bakteri
20.	22 – 25 Mar 2011	Hasil identifikasi : 75,2 % <i>Moraxella</i> sp, konsultasi dosen pembimbing dan disarankan untuk mengganti bakteri dengan <i>S. Typhimurium</i> , kultur <i>microbact</i> didapat 98% <i>S. Typhimurium</i> , pembuatan vaksin <i>heat – killed</i> di lab.biomed, pemberian makan tikus
21.	26 Mar 2011	Pembagian kelompok dan pelabelan tikus, penyuntikan vaksin yang pertama secara subkutan, dimulainya pemberian diet atherogenik, penimbangan berat badan tikus
22.	27 – 30 Mar 2011	pemberian diet atherogenik
23.	31 Mar 2011	pemberian diet atherogenik, konsultasi dosen pembimbing
24.	1 Apr 2011	pemberian diet atherogenik
25.	2 Apr 2011	pemberian diet atherogenik, penyuntikan vaksin yang kedua secara intraperitoneal, penimbangan berat badan tikus
26.	3 – 5 Apr 2011	pemberian diet atherogenik
27.	6 Apr 2011	pemberian diet atherogenik, diskusi konsep
28.	7 – 8 Apr 2011	pemberian diet atherogenik
29.	9 Apr 2011	Pembagian tugas persiapan monev internal FKUB, pemberian diet atherogenik, penimbangan berat badan tikus
30.	10 – 11 Apr 2011	pemberian diet atherogenik
31.	12 Apr 2011	Persiapan monev internal FKUB, pemberian diet atherogenik
32.	13 – 14 Apr 2011	pemberian diet atherogenik
33.	15 Apr 2011	Persiapan monev internal FKUB, pemberian diet atherogenik

34.	16 Apr 2011	Pembuatan dan penyuntikan vaksin, pemberian diet atherogenik, penimbangan berat badan tikus
35.	17 Apr 2011	Monev internal FKUB, pemberian diet atherogenik
36.	18 Apr 2011	Strukturisasi jadwal piket, pemberian diet atherogenik
37.	19 – 29 Apr 2011	pemberian diet atherogenik, penimbangan berat badan tikus (23 Apr 2011)
38.	30 Apr 2011	Pembuatan dan penyuntikan vaksin, pemberian diet atherogenik, penimbangan berat badan tikus
39.	1 – 6 Mei 2011	pemberian diet atherogenik
40.	7 Mei 2011	Penimbangan berat badan tikus, pemberian diet atherogenik
41.	8 Mei 2011	Persiapan monev internal UB, pemberian diet atherogenik
42.	9 – 10 Mei 2011	pemberian diet atherogenik
43.	11 Mei 2011	Penyuntikan vaksin, pemberian diet atherogenik, pengecekan kolesterol
44.	12 – 13 Mei 2011	pemberian diet atherogenik
45.	14 Mei 2011	Monev internal UB, pemberian diet atherogenik
46.	15 Mei 2011	Pembedahan tikus, pengambilan dan penyimpanan organ, pemotongan frozen section aorta
47.	16 Mei 2011	Pengecatan oil red O sel busa, pengerjaan blok paraffin aorta
48.	17 Mei 2011	Penghitungan sel busa, Pengecetan HE ketebalan aorta, penghitungan kasar ketebalan aorta
49.	19 Mei 2011	Konsultasi dosen pembimbing, persiapan monev dikti
50.	20 Mei 2011	Monev dikti
51.	23 – 26 Mei 2011	Ujian
52.	27 Mei 2011	Penghitungan ulang ketebalan arteri
53.	28 – 29 Mei 2011	Konsultasi dosen pembimbing, penulisan laporan akhir

Lampiran 2. Data Hasil Penelitian

No	Kelompok	Tikus	Intake pakan (gr)	Penambahan Berat badan (gr)	Visceral Fat (gr)	Jumlah Sel Busa
1	S. Typhimurium + adjuvan CFA – IFA	A1	29.829	108.0	6.196	2
2		A2	28.167	106.0	7.611	1
3		A3	33.531	88.0	8.602	2
4		A4	32.808	92.0	10.095	3
5	S. Typhimurium	B1	33.957	89.0	5.215	3
6		B2	34.276	68.0	5.018	5
7		B3	30.127	66.0	4.204	5
8		B4	28.468	78.0	4.401	1
9	Adjuvan CFA – IFA	C1	33.808	87.0	8.298	14
10		C2	31.872	93.0	7.658	11
11		C3	34.34	95.0	7.728	19
12		C4	31.808	118.0	6.118	15
13	Kontrol negatif	D1	33.914	86.0	2.401	6
14		D2	34.297	124.0	1.045	4
15		D3	34.361	75.0	4.026	5
16		D4	32.319	83.0	2.288	5
17	Kontrol Positif	E1	28.872	84.0	7.934	41
18		E2	33.765	93.0	7.275	49
19		E3	29.553	118.0	6.573	48
20		E4	30.148	118.0	6.556	22

Data Sisa Pakan Tikus Tiap Hari

TGL	SISA PAKAN (gram)																	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
27/3	0	12	5	0	5	10	0	1	11	9	7	17	0	0	7	0	0	0
28/3	0	1	0	8	0	17	0	0	0	11	0	12	0	0	10	0	0	0
29/3	0	0	4	2	0	17	0	0	8	13	14	0	0	0	0	0	0	0
30/3	5	2	0	2	2	6	0	0	5	13	0	1	0	0	0	0	0	0
31/3	0	0	7	0	0	6	0	15	0	9	17	6	0	0	0	0	0	0

1/4	0	7	8	3	0	7	0	0	0	13	7	0	0	0	0	2	0	0
2/4	9	7	8	0	0	11	0	1	0	8	12	0	0	0	0	0	0	0
3/4	6	19	19	2	25	1	0	0	12	22	10	1	10	0	1	4	0	0
4/4	0	15	21	0	15	14	0	0	12	18	8	11	20	0	0	0	0	0
5/4	2	7	18	0	3	13	0	0	6	14	14	10	0	0	0	4	0	0
6/4	0	0	2	0	2	1	0	0	9	5	0	1	1	2	0	0	0	0
7/4	13	0	11	4	12	15	0	0	10	17	16	0	1	1	13	2	0	0
8/4	16	9	12	0	17	16	0	0	13	3	13	18	9	0	10	13	0	0
9/4	13	13	5	0	0	7	0	0	14	10	8	22	0	0	8	5	0	0
10/4	0	6	10	3	0	15	0	0	10	0	5	3	0	0	6	0	0	0
11/4	0	7	15	0	0	9	0	0	10	5	8	26	0	0	3	3	0	0
12/4	0	12	14	0	0	16	0	0	15	6	0	23	0	0	14	8	0	0
13/4	0	6	0	1	1	8	0	3	3	0	9	9	0	0	0	0	0	0
14/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
15/4	0	8	0	1	0	17	0	1	8	0	0	18	0	0	0	3	0	0
16/4	0	0	0	0	0	7	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
17/4	28	11	0	0	0	29	0	0	1	0	0	8	0	0	0	0	0	0
18/4	14	11	1	0	0	22	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0
19/4	21	9	3	0	0	17	0	0	0	0	0	13	0	0	2	0	0	0
20/4	9	7	0	0	0	12	0	0	6	0	0	19	0	0	0	0	0	0
21/4	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
22/4	6	17	1	0	0	14	0	0	1	0	0	22	0	0	0	0	0	0
23/4	8	15	9	0	0	6	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
24/4	5	18	0	0	0	9	0	0	4	0	1	24	0	0	3	0	0	0
25/4	16	25	21	0	0	17	0	0	20	0	23	16	5	0	15	6	0	0
26/4	0	23	0	0	0	15	0	0	0	0	12	20	0	0	9	9	0	0
27/4	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
28/4	1	10	7	0	0	22	0	0	1	1	0	15	0	0	0	0	0	0
29/4	0	8	15	0	0	10	0	0	0	0	7	7	0	0	0	7	0	0
30/4	7	18	24	0	0	21	0	0	0	0	18	25	0	0	0	24	0	0
1/5	20	14	11	0	0	16	0	10	16	26	7	30	0	0	0	8	0	2
2/5	0	10	0	0	0	18	0	0	0	0	4	23	0	0	0	9	0	0
3/5	1	25	14	0	0	15	0	0	0	5	10	25	0	0	0	10	0	0
4/5	15	22	0	0	1	22	0	0	0	0	0	28	0	0	8	5	0	0
5/5	0	25	0	0	0	15	0	0	0	13	12	0	0	0	2	0	0	0
6/5	0	26	0	0	2	15	3	0	0	16	0	42	1	0	0	0	0	0
7/5	8	14	0	0	0	0	20	0	0	0	0	14	18	0	0	23	17	0
8/5	0	18	0	0	0	2	10	0	19	18	0	28	0	0	10	0	25	0
9/5	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0
10/5	0	18	0	0	0	12	0	0	0	0	6	28	0	0	0	0	0	0
11/5	14	26	22	17	0	24	0	2	0	18	9	30	6	0	0	0	0	0



12/5	9	29	2	25	17	26	35	0	3	31	28	29	0	0	0	0	5	0
13/5	10	20	10	0	4	26	16	4	4	4	0	20	0	0	0	17	0	0
14/5	0	11	16	0	17	20	20	1	15	19	43	36	2	0	0	12	0	0
15/5	0	31	1	2	27	10	0	16	20	30	31	3	0	1	24	0	0	0
TGL	SISA PAKAN (gram)																	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	E1	E2	E3	E4	E5	E6						
27/3	0	0	0	4	0	0	0	2	8	8	1	7						
28/3	0	0	0	0	0	0	3	7	8	0	0	0						
29/3	0	0	0	0	0	0	0	5	9	8	6	7						
30/3	0	0	0	0	0	0	0	7	9	2	0	0						
31/3	0	0	0	0	0	0	3	6	19	4	20	9						
1/4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	8	4						
2/4	0	0	0	0	0	0	4	18	2	4	8	10						
3/4	0	1	0	0	0	0	0	0	14	10	0	0						
4/4	0	0	0	0	0	0	0	8	0	9	10	0						
5/4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	8	10	10						
6/4	0	10	0	0	1	0	0	6	17	0	2	10						
7/4	0	7	0	0	0	0	0	13	13	8	12	21						
8/4	0	0	0	5	0	0	0	12	11	17	16	17						
9/4	0	0	0	3	0	0	0	14	13	13	10	7						
10/4	0	0	1	0	0	0	0	3	2	5	2	0						
11/4	0	0	0	0	0	0	0	0	8	11	11	13						
12/4	0	1	0	17	4	0	3	15	14	23	14	15						
13/4	0	0	22	0	0	0	0	2	0	0	0	0						
14/4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
15/4	0	0	0	0	0	0	0	0	13	4	9	1						
16/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0						
17/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
18/4	0	4	0	0	0	0	0	0	6	4	2	0						
19/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
20/4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0						
21/4	0	0	0	26	0	1	0	0	0	17	0	0						
22/4	0	2	0	13	2	0	0	0	13	0	0	0						
23/4	0	0	0	0	0	1	0	0	11	14	0	0						
24/4	0	0	0	15	1	0	0	0	10	15	4	8						
25/4	0	3	0	10	7	12	0	17	15	23	20	20						
26/4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	3	0						
27/4	0	0	0	23	0	0	0	0	0	6	7	0						
28/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0						
29/4	0	0	27	0	0	9	0	0	5	11	0	0						
30/4	0	0	0	0	0	0	0	15	6	19	20	30						

1/5	0	4	0	3	0	0	0	14	13	16	10	24
2/5	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0
3/5	0	0	0	0	8	0	1	0	2	11	2	0
4/5	0	0	0	0	0	0	0	4	0	10	11	0
5/5	0	2	0	4	8	3	0	14	14	18	0	0
6/5	0	0	0	2	0	0	0	18	19	0	8	0
7/5	0	0	0	0	0	1	0	0	8	8	12	0
8/5	0	0	0	0	0	0	28	15	10	7	0	0
9/5	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
10/5	0	0	0	0	0	0	0	10	13	0	0	0
11/5	0	0	0	0	0	0	0	13	0	25	4	2
12/5	0	0	0	0	0	0	41	18	36	26	18	0
13/5	3	0	0	0	0	0	2	20	8	29	30	0
14/5	2	1	9	0	4	3	0	2	23	28	0	11
15/5	2	2	0	7	0	0	29	21	21	2	1	0

Data Berat Badan Tikus Tiap Minggu

TGL	BERAT BADAN TIKUS (gram)																	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
26/3	159	155	149	141	133	127	153	154	142	142	131	124	154	161	145	145	131	175
2/4	188	174	181	157	159	151	174	173	156	160	145	132	171	183	166	160	149	198
9/4	202	180	195	170	162	169	189	189	164	168	160	150	185	198	181	177	164	228
16/4	233	199	204	190	184	192	216	202	176	194	170	169	205	219	202	194	185	268
23/4	225	201	215	198	193	197	234	216	190	211	174	182	222	233	213	211	199	277
30/4	252	221	236	215	221	223	248	234	203	227	187	188	239	256	230	218	214	324
7/5	267	228	255	233	221	242	269	243	210	239	197	202	251	279	232	238	226	353
15/5	289	239	264	240	236	258	281	256	216	246	218	206	269	302	250	239	233	373

TGL	BERAT BADAN TIKUS (gram)											
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	E1	E2	E3	E4	E5	E6
26/3	152	150	148	147	138	136	171	139	152	152	136	128
2/4	155	149	173	158	149	190	192	147	172	155	176	170
9/4	170	162	195	172	168	213	205	167	185	174	188	185
16/4	192	178	205	188	184	233	220	185	195	187	200	209
23/4	205	185	234	204	193	253	223	204	204	195	216	217
30/4	223	203	254	213	213	268	243	226	218	209	228	211
7/5	238	215	272	222	221	292	255	232	221	226	254	246
15/5	250	225	284	236	240	304	264	238	227	237	260	255



Lampiran 3. Data Analisis Menggunakan SPSS 16

Intake pakan

Tests of Normality

nama_kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
intake_pakan kontrol -	.329	4	.	.784	4	.077
kontrol +	.329	4	.	.838	4	.189
perlakuan 1	.253	4	.	.918	4	.528
perlakuan 2	.284	4	.	.869	4	.294
perlakuan 3	.297	4	.	.828	4	.163

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
intake_pakan Based on Mean	3.541	4	15	.032
Based on Median	2.170	4	15	.122
Based on Median and with adjusted df	2.170	4	7.212	.172
Based on trimmed mean	3.336	4	15	.038

Ranks

nama_kelompok	N	Mean Rank
intake_pakan kontrol -	4	15.75
kontrol +	4	6.75
perlakuan 1	4	7.25
perlakuan 2	4	10.25
perlakuan 3	4	12.50
Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	intake_pakan
Chi-Square	6.429
Df	4
Asymp. Sig.	.169

a. Kruskal Wallis Test



Berat Badan

Tests of Normality^a

nama_kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
berat_badan kontrol +	.301	4	.	.832	4	.173
perlakuan 1	.274	4	.	.864	4	.275
perlakuan 2	.254	4	.	.912	4	.492
perlakuan 3	.344	4	.	.844	4	.207

a. Lilliefors Significance Correction

b. There are no valid cases for berat_badan when nama_kelompok = 1,000. Statistics cannot be computed for this level.

Test of Homogeneity of Variances

berat_badan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.580	3	12	.246

ANOVA

berat_badan	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1901.188	3	633.729	3.623	.045
Within Groups	2099.250	12	174.938		
Total	4000.438	15			

Multiple Comparisons

berat_badan

Tukey HSD

(I) nama_kelompok	(J) nama_kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol +	perlakuan 1	4.7500	9.3525	.956	-23.017	32.517
	perlakuan 2	28.0000*	9.3525	.048	.233	55.767
	perlakuan 3	5.0000	9.3525	.949	-22.767	32.767
perlakuan 1	kontrol +	-4.7500	9.3525	.956	-32.517	23.017
	perlakuan 2	23.2500	9.3525	.113	-4.517	51.017
	perlakuan 3	.2500	9.3525	1.000	-27.517	28.017
perlakuan 2	kontrol +	-28.0000*	9.3525	.048	-55.767	-.233
	perlakuan 1	-23.2500	9.3525	.113	-51.017	4.517
	perlakuan 3	-23.0000	9.3525	.118	-50.767	4.767
perlakuan 3	kontrol +	-5.0000	9.3525	.949	-32.767	22.767



perlakuan 1	-.2500	9.3525	1.000	-28.017	27.517
perlakuan 2	23.0000	9.3525	.118	-4.767	50.767

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

Visceral Fat

Tests of Normality

nama_kelo mpok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
visceral_fat kontrol -	.263	4	.	.953	4	.734
kontrol +	.282	4	.	.871	4	.303
perlakuan 1	.136	4	.	1.000	4	.999
perlakuan 2	.238	4	.	.907	4	.465
perlakuan 3	.338	4	.	.872	4	.306

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

visceral_fat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.154	4	15	.370

ANOVA

visceral_fat	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	88.527	4	22.132	19.308	.000
Within Groups	17.194	15	1.146		
Total	105.721	19			

Multiple Comparisons

visceral_fat

Tukey HSD

(I) nama_kelo mpok	(J) nama_kelo mpok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol -	kontrol +	-4.644500*	.757053	.000	-6.98222	-2.30678
	perlakuan 1	-5.686000*	.757053	.000	-8.02372	-3.34828
	perlakuan 2	-2.269500	.757053	.059	-4.60722	.06822
	perlakuan 3	-5.010500*	.757053	.000	-7.34822	-2.67278
kontrol +	kontrol -	4.644500*	.757053	.000	2.30678	6.98222
	perlakuan 1	-1.041500	.757053	.651	-3.37922	1.29622
	perlakuan 2	2.375000*	.757053	.046	.03728	4.71272



	perlakuan 3	-.366000	.757053	.988	-2.70372	1.97172
perlakuan 1	kontrol -	5.686000*	.757053	.000	3.34828	8.02372
	kontrol +	1.041500	.757053	.651	-1.29622	3.37922
	perlakuan 2	3.416500*	.757053	.003	1.07878	5.75422
	perlakuan 3	.675500	.757053	.895	-1.66222	3.01322
perlakuan 2	kontrol -	2.269500	.757053	.059	-.06822	4.60722
	kontrol +	-2.375000*	.757053	.046	-4.71272	-.03728
	perlakuan 1	-3.416500*	.757053	.003	-5.75422	-1.07878
	perlakuan 3	-2.741000*	.757053	.018	-5.07872	-.40328
perlakuan 3	kontrol -	5.010500*	.757053	.000	2.67278	7.34822
	kontrol +	.366000	.757053	.988	-1.97172	2.70372
	perlakuan 1	-.675500	.757053	.895	-3.01322	1.66222
	perlakuan 2	2.741000*	.757053	.018	.40328	5.07872

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

Korelasi Berat Badan dan Visceral Fat

Correlations

		berat_badan	visceral_fat
berat_badan	Pearson Correlation	1	.251
	Sig. (2-tailed)		.348
	N	16	16
visceral_fat	Pearson Correlation	.251	1
	Sig. (2-tailed)	.348	
	N	16	16

Jumlah Sel Busa

Tests of Normality

nama_kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
sel_busa	kontrol -	.250	4	.945	4	.683
	kontrol +	.282	4	.827	4	.161
	perlakuan 1	.250	4	.945	4	.683
	perlakuan 2	.283	4	.863	4	.272
	perlakuan 3	.220	4	.980	4	.900



Tests of Normality

nama_kelo mpok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
sel_busa kontrol -	.250	4	.	.945	4	.683
kontrol +	.282	4	.	.827	4	.161
perlakuan 1	.250	4	.	.945	4	.683
perlakuan 2	.283	4	.	.863	4	.272
perlakuan 3	.220	4	.	.980	4	.900

a. Lilliefors Significance Correction

Ketebalan Dinding Pembuluh Darah Aorta

Tests of Normality

nama_kelo mpok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ketebalan_arteri kontrol -	.165	4	.	.990	4	.956
kontrol +	.280	4	.	.883	4	.351
perlakuan 1	.216	4	.	.981	4	.908
perlakuan 2	.274	4	.	.889	4	.377
perlakuan 3	.266	4	.	.869	4	.293

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

trans_tebal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.154	4	15	.124

ANOVA

trans_tebal	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.031	4	.258	55.754	.000
Within Groups	.069	15	.005		
Total	1.100	19			

Multiple Comparisons

trans_tebal
Tukey HSD

(I) nama_kelo mpok	(J) nama_kelo mpok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound



kontrol -	kontrol +	-.64378*	.04808	.000	-.7922	-.4953
	perlakuan 1	-.13692	.04808	.078	-.2854	.0115
	perlakuan 2	-.11033	.04808	.200	-.2588	.0381
	perlakuan 3	-.33920*	.04808	.000	-.4877	-.1907
kontrol +	kontrol -	.64378*	.04808	.000	.4953	.7922
	perlakuan 1	.50686*	.04808	.000	.3584	.6553
	perlakuan 2	.53345*	.04808	.000	.3850	.6819
	perlakuan 3	.30458*	.04808	.000	.1561	.4530
perlakuan 1	kontrol -	.13692	.04808	.078	-.0115	.2854
	kontrol +	-.50686*	.04808	.000	-.6553	-.3584
	perlakuan 2	.02659	.04808	.980	-.1219	.1750
	perlakuan 3	-.20228*	.04808	.006	-.3507	-.0538
perlakuan 2	kontrol -	.11033	.04808	.200	-.0381	.2588
	kontrol +	-.53345*	.04808	.000	-.6819	-.3850
	perlakuan 1	-.02659	.04808	.980	-.1750	.1219
	perlakuan 3	-.22887*	.04808	.002	-.3773	-.0804
perlakuan 3	kontrol -	.33920*	.04808	.000	.1907	.4877
	kontrol +	-.30458*	.04808	.000	-.4530	-.1561
	perlakuan 1	.20228*	.04808	.006	.0538	.3507
	perlakuan 2	.22887*	.04808	.002	.0804	.3773

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



Lampiran 4. Foto – Foto Kegiatan

1. Tempat Penelitian



Gambar tempat penelitian: laboratorium biokimia, laboratorium farmako, laboratorium biomedik, dan laboraotorium farmakologi FKUB

2. Isolasi, Kultur, dan Idetifikasi Bakteri



Uji fermentasi gula – gula dan sedian mikroskopis bakteri dengan pengecatan gram

3. Perawatan dan Penimbangan Hewan Coba



Perawatan hewan coba: penempatan tikus dalam kandang, pembersihan kandang, penggantian sekam, dan penimbangan berat badan tikus secara berkala

4. Pembuatan dan Penyutikan Vaksin



Proses pembuatan vaksin: *heat-killing* bakteri, pencampuran vaksin, dan vaksin jadi

5. Pembuatan Diet Normal dan Atherogenik



Bahan – bahan diet, proses buatan, dan penimbangan diet tikus

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ





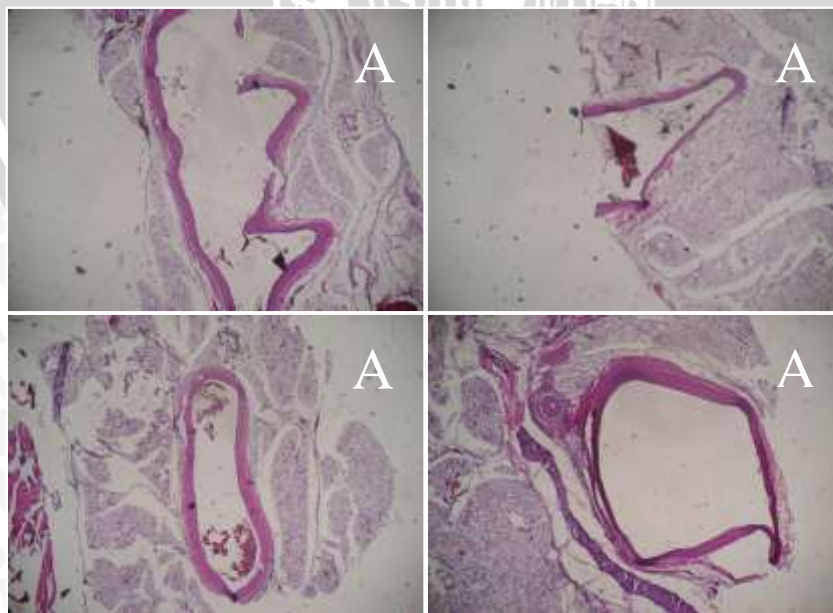
Proses pembedahan yang dimulai dengan anestesi tikus, pembedahan tikus, pengambilan dan penyimpanan organ, dan penimbangan *abdominal visceral fat*

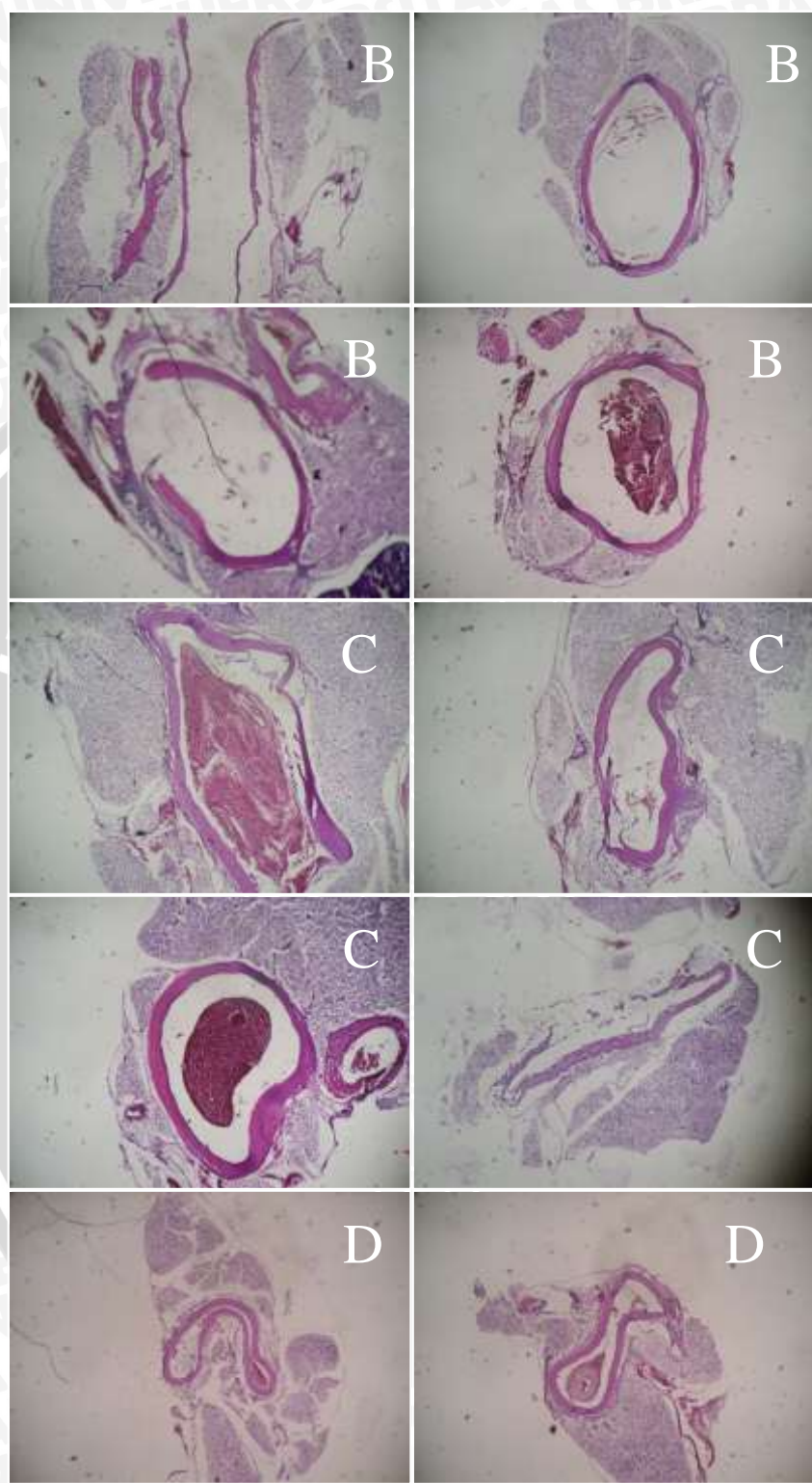
7. Pembuatan Slide Ketebalan Aorta

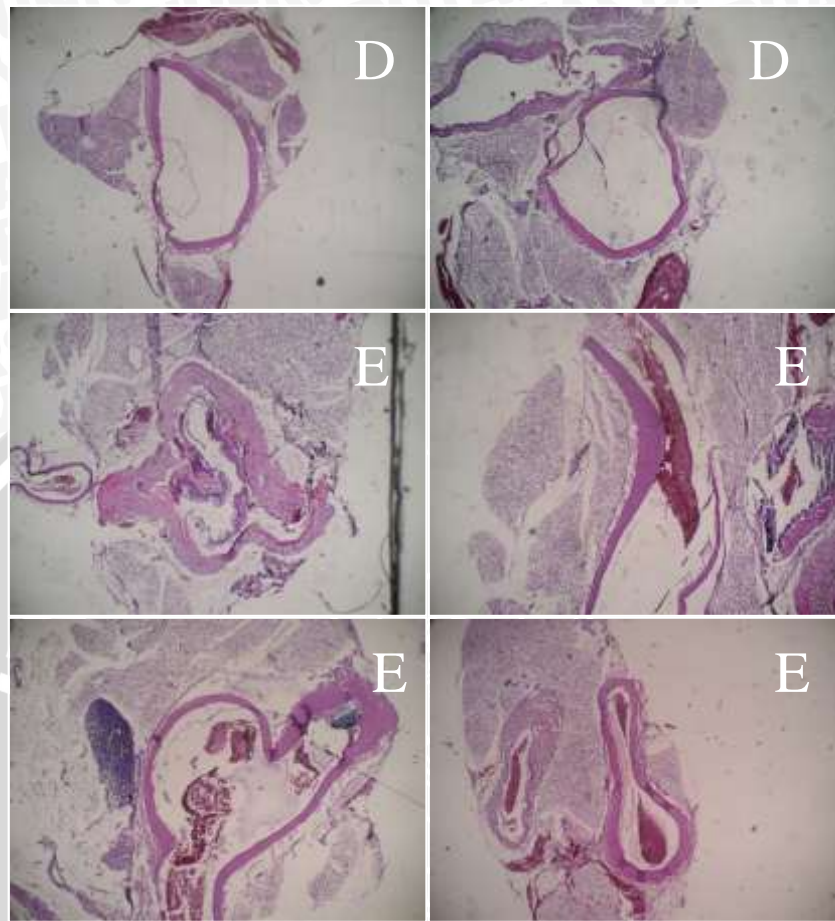


Pemotongan dan proses pembuatan sediaan slide dengan *Automatic Tissue Processing*

8. Preparat Ketebalan Aorta







Gambar preparat ketebalan penampang aorta dengan pengecatan *Hematoksilin-Eosin* (HE) dan perbesaran 100x. Gambar A: perlakuan 1 (*S. Typhimurium*+CFA-IFA), gambar B: perlakuan 2 (*S. Typhimurium*), gambar C: perlakuan 3 (CFA-IFA), gambar D: kontrol negatif, dan gambar E: kontrol positif



MONEV DAN PIMNAS UNHAS 2011

Lampiran 5. Surat Keterangan Layak Etik

