

**ANTIINFLAMASI NANOPARTIKEL BUAH ANDALIMAN (*ZANTHOXYLUM ACANTHOPODIUM DC.*)
PADA ATEROSKLEROSIS : INTERAKSI ENDOTELIAL HSP70**

¹DIWA AULIA AHMAD, ²IBNU AFIF ARMADI, ³KHAIRATUL FITHRIYAH, ⁴HUMAIRAH MEDINA LIZA LUBIS
^{1,2,3,4}UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
¹diwaahmad53@gmail.com, ⁴humairahmedina@umsu.ac.id

ABSTRACT

This study aims to determine the effect and potential mechanism with the treatment of nanoparticles from andaliman fruit (*Zanthoxylum acanthopodium DC.*) As an anti-inflammatory in atherosclerosis through the HSP70 route. Method, andaliman fruit dried in an oven at a temperature of 40°C and powdered with nano technology using a High Energy Ballmill. This study used 27 rat samples which were divided into 3 groups. The examination was carried out by routine histopathological examination procedures for the assessment of atherosclerosis and immunohistochemistry HSP70. Assessment of HSP70 immunoreactive cells is indicated by the expression of cells that appear reddish brown in the intima and endothelial media of blood vessels. The result, of the total 27 samples found 8 atherosclerosis (29.7%) and 19 did not experience atherosclerosis (70.3%). The difference in HSP70 expression in the positive control group and the treatment group was statistically tested with Chi Square and the result was $p = 0.007$ ($p < 0.05$). Conclusion, the administration of Andaliman fruit nanoparticles has an effect on the repair of blood vessel endothelium in atherosclerosis which is assessed by an increase in HSP70 expression.

Keywords : Atherosclerosis, HSP70, Nanoparticles, Andaliman, *Zanthoxylum Acanthopodium DC*

PENDAHULUAN

Aterosklerosis (AS) merupakan penyakit dinding arteri yang terjadi di lokasi yang rentan di saluran utama arteri. AS sekarang dianggap sebagai salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas terkait penyakit kardiovaskular di seluruh dunia (Chakraborty *et al.*, 2019). Patogenesis aterosklerosis saat ini didasarkan pada teori hipotesis respons terhadap cedera, yang menjelaskan bahwa aterosklerosis merupakan suatu respons radang kronik dinding arteri yang dicetuskan oleh adanya cedera atau disfungsi endotel (Frederick, 2005; Kumar *et al.*, 2007). Proses aterosklerosis terjadi ketika sel endotel mengalami stress oleh karena faktor risiko klasik seperti merokok, hipertensi, peningkatan kadar lipid, diabetes mellitus dan infeksi kronis (Wick *et al.*, 2014). Mekanisme aterosklerosis juga melibatkan sistem imun. Diantara mekanisme ini adalah reaksi autoimun terhadap protein heat shock *Heat Shock Protein (HSP)*. Salah satu *family* dari *HSP* adalah *HSP70*. *HSP70* berfungsi sebagai pendamping seluler untuk protein lain dan sebagai sitokin dengan sifat proinflamasi. Overekspresi *HSP70* ditunjukkan pada sel dendritik *plaque-resident CD1a +* dan *CD1d +* (Bobryshev *et al.*, 2002). Presentasi lipid oleh sel dendritik ke sel T memicu peristiwa inflamasi yang mengarah pada perkembangan penyakit. Kampinga *et al.* (2009) melaporkan bahwa *HSP70* terdeteksi pada plak aterosklerotik fibrotik dan nekrotik. Namun, penelitian lain menunjukkan bahwa *HSP70* memiliki peran protektif dalam penyakit kardiovaskular. Zhu *et al.* (2003) melaporkan kadar *HSP70* serum yang lebih tinggi terdeteksi pada individu tanpa penyakit arteri koroner dibandingkan pada pasien dengan penyakit ini, dan kadar *HSP70* yang larut berkorelasi terbalik dengan tingkat keparahan penyakit (jumlah pembuluh yang terkena). Penelitian titer antibodi terhadap *HSP70* tidak berkorelasi dengan keberadaan penyakit arteri koroner. Hubungan biologis pasti antara *HSP70* dan aterosklerosis belum dapat dijelaskan karena adanya perbedaan pendapat antara para ahli dan memerlukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini berpegangan pada *expert opinion* Bilecka-Dabrowa *et al.* (2009) yang menyimpulkan bahwa *HSP 70* memiliki aksi positif terhadap perkembangan aterosklerosis melalui efek anti-inflamasi dan perlindungannya. Hingga saat ini, terapi aterosklerosis berupa obat antiinflamasi dan anti

hiperlipidemia. Obat antiinflamasi yang biasa digunakan yaitu antiinflamasi steroid dan non steroid sering menimbulkan komplikasi sehingga antiinflamasi yang berasal dari bahan alam sedang dikembangkan terutama pada tanaman (Ramadhani *et al.*, 2017). Beberapa tanaman yang dipercaya masyarakat dapat mengobati inflamasi diantaranya adalah tanaman andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium DC*) yang merupakan salah satu tumbuhan rempah yang banyak dijumpai di Kabupaten Toba Samosir dan Tapanuli Utara, Sumatera Utara, pada daerah berketinggian 1,500m dpl (Asbur dan Khairunnisyah, 2018). Tumbuhan dari genus *Zanthoxylum* banyak mengandung senyawa seperti fenol hidrokuinon, flavonoid, steroid/triterpenoid, tanin, glikosida, minyak atsiri, alkaloid, coumarines, lignan, amida (Harahap *et al.*, 2018). Namun, tidak ada bukti ilmiah tentang aktivitas aktual buah andaliman untuk pengobatan penyakit terkait peradangan termasuk peradangan aterosklerosis. Dengan ini, teknologi nano partikel dapat membantu mekanisme farmakologis dari buah andaliman dengan pemberian dosis yang lebih kecil (Martien *et al.*, 2014).

Tujuan dari penelitian ini adalah (1) membuktikan pengaruh pengobatan nanopartikel ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium DC.*) sebagai antiinflamasi, (2) membuktikan terjadinya perbaikan pembuluh darah aterosklerosis pada tikus putih setelah pemberian nanopartikel ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium DC.*), (3) mengetahui peran dari buah andaliman dalam meningkatkan ekspresi *HSP70* yang disebabkan oleh infeksi aterosklerosis secara *in vivo*.

METODE

Sebelum penelitian diminta persetujuan komisi etik tentang pelaksanaan penelitian dari Health Research Ethics Committee Faculty of Medicine University of Muhammadiyah Sumatera Utara dengan No. 248/KEPK/FKUMSU/2019.

Buah Andaliman dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Bahan kering diserbukkan dengan teknologi nano menggunakan alat *High Energy Ballmill* yaitu 250 gr buah andaliman dimasukkan kedalam *ballmill* selama 7 jam dengan kecepatan 300 rpm. Penelitian *true experimental post test control study* dengan jumlah sampel yang dihitung berdasarkan rumus Federer didapatkan 27 sampel tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan, sehat dengan berat badan 150-200 gr, umur 2 bulan, dan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (K0), kontrol positif (K1) dan perlakuan (P) dan setiap kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yaitu :

1. Kelompok I (K0): terdiri dari 9 ekor tikus sebagai kontrol negatif yang hanya diberikan makan pelet biasa dan air minum.
2. Kelompok II (K1): terdiri dari 9 ekor tikus sebagai kontrol positif yang diberikan kuning telur yang dicampur minyak kelapa 3 ml selama 9 hari.
3. Kelompok III (P): terdiri dari 9 ekor sebagai kelompok perlakuan diberikan kuning telur yang dicampur minyak kelapa 3 ml selama 9 hari dilanjutkan dengan pemberian nanopartikel ekstrak buah andaliman 4,5 ml selama 9 hari.

Pemeriksaan histopatologi aorta jantung tikus dengan pewarnaan rutin Hematoksilin Eosin dinilai dengan ditemukannya gambaran sel busa pada tunika intima dan media dinding pembuluh darah aorta untuk penentuan aterosklerosis. Preparat tikus aterosklerosis maupun tidak aterosklerosis dilakukan pemeriksaan imunohistokimia *HSP70* dan dinilai gambaran coklat pada tunika intima dan media dinding pembuluh darah dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Prosedur pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia dilakukan sesuai standar prosedur laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan. Data dianalisis secara inferensial untuk melihat perbedaan antara K0, K1 dan P dan dinyatakan signifikan dengan nilai $p < 0,05$. Perbedaan ekspresi *HSP70* antara K1 dan P diuji statistik dengan *Chi Square* dan dinyatakan signifikan dengan nilai $p < 0,05$.

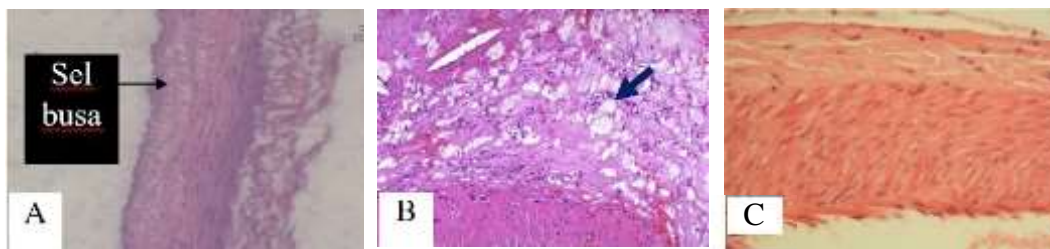
HASIL DAN PEMBAHASAN

Frekuensi histologis aorta jantung tikus setelah diinduksi kuning telur dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Frekuensi Histopatologi Aterosklerosis

Kelompok	Aterosklerosis	Tidak Aterosklerosis	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
K0	1 (3,7)	8 (29,6)	9 (33,33)
K1	6 (22,2)	3 (11,1)	9 (33,33)
P	1 (3,7)	8 (29,6)	9 (33,33)
Total	8 (29,6)	19 (70,4)	27 (100)

Gambaran mikroskopik aorta tikus Wistar dapat dilihat pada gambar dibawah in :

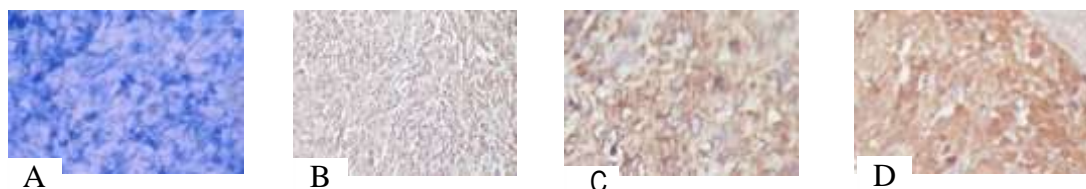


Gambar 1. Histologi aorta tikus Wistar; A dan B. Kelompok kontrol negatif dan positif menunjukkan adanya sel busa pada lapisan tunika intima dan tunika media, C. Kelompok perlakuan tidak dijumpai sel busa pada lapisan tunika intima dan tunika media (H&E, 40x)

Untuk membedakan aorta jantung tikus yang mengalami aterosklerosis dan tidak aterosklerosis dilakukan uji *Chi Square*. Terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok K0 dan K1 dengan hasil $p=0,016$ ($p<0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok K0 dan P dengan hasil $p=1,000$ ($p>0,05$). Terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok K1 dan P dengan hasil $p=0,016$ ($p<0,05$). Dapat ditarik kesimpulan bahwa buah andaliman dapat digunakan untuk perbaikan jaringan dinding pembuluh darah arteri yang dinilai secara histopatologi menggunakan pewarnaan rutin Hematoxyllin Eosin (kecuali pada kelompok K0 dan P). Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia *HSP70* pada sampel tersebut. Ekspresi imunohistokimia *HSP70* pada aorta jantung tikus tiap kelompok dapat dilihat pada table 2 dan gambar dibawah ini :

Tabel 2. Ekspresi Imunohistokimia HSP70 Pada Kelompok K0, K1 Dan P

Kelompok	HSP70				Total
	Negatif n (%)	Positif Lemah n (%)	Positif Sedang n (%)	Positif Kuat n (%)	
K0	0 (0)	4 (14,8)	5 (18,5)	0 (0)	9 (33,33)
K1	4 (14,8)	4 (14,8)	1 (3,7)	0 (0)	9 (33,33)
P	0 (0)	1 (3,7)	2 (7,4)	6 (22,3)	9 (33,33)
Total	4 (14,8)	9 (33,3)	8 (29,6)	6 (22,3)	27 (100)



Gambar 2. Ekspresi HSP70; A. Sel yang tidak mengekspresikan HSP70 (negatif) pada kelompok yang tidak diterapi buah andaliman, B. Sel yang mengekspresikan HSP70 (positif lemah) pada kelompok yang tidak diterapi buah andaliman, C. Sel yang mengekspresikan HSP70 (positif sedang) pada kelompok yang tidak diterapi buah andaliman, D. Sel yang mengekspresikan HSP70 (positif kuat) setelah pemberian terapi buah andaliman (IHK HSP70, 400x)

Perbedaan ekspresi *HSP70* pada kelompok K1 dan P diuji statistik dengan *Chi Square* dan didapatkan hasil $p=0,007$ ($p<0,05$) artinya nanopartikel buah andaliman berpengaruh terhadap perbaikan jaringan aterosklerosis. Gangguan metabolisme lipid dan peradangan memainkan peran penting dalam perkembangan aterosklerosis. *Fatty streak* yang merupakan akumulasi dari sel busa sarat lipid yang bertumpuk di tunika intima arteri. Retensi lipid adalah langkah pertama dalam patogenesis aterosklerosis yang diikuti oleh peradangan kronis pada dinding arteri utama yang menyebabkan *fatty streak*, yang kemudian berkembang menjadi fibroateroma (Aziz dan Yadaf, 2016). Lapisan lemak terbentuk setelah 11-12

tahun dan plak fibrosa pada 15-30 tahun setelah proses awal perlekatan lemak dan sel T pada dinding pembuluh darah. Timbulnya plak dapat menyebabkan kematian jantung mendadak (Aziz dan Yadaf, 2016). Lesi aterosklerosis secara mikroskopis menunjukkan adanya plak aterosklerosis dan sel busa pada lapisan intima hingga media. Pada tahap lanjut serabut elastik pada dinding arteri mengalami degradasi dan digantikan jaringan ikat dan otot polos, sehingga kemampuan kontraksi dan relaksasi arteri akan berkurang. Sel-sel busa dan sel-sel otot polos mengalami nekrosis sampai pembentukan kalsifikasi yang meningkatkan potensi kerapuhan jaringan arteri (Laila *et al.*, 2018). Sel busa berasal dari monosit akan berubah menjadi makrofag yang akan menangkap *Ox-LDL* yang akhirnya nanti akan menjadi inti lemak (*lipid core*) dan mempunyai pelindung fibrosa (*fibrouse cap*) (Chakraborty *et al.*, 2019). Pada studi ini secara histopatologi dengan pewarnaan Hematoxyllin Eosin diagnosis aterosklerosis ditegakkan berdasarkan gambaran sel busa pada lapisan intima lumen pembuluh darah. Dinding aorta jantung normal dari kelompok kontrol negatif diidentifikasi dan dijadikan *guiding* untuk menilai ketebalan dinding pembuluh darah dan ada atau tidak ditemukan sel busa. Aterosklerosis ditemukan pada 8 sampel (29,6%) dan lebih banyak ditemukan pada tikus (kontrol positif) yang mendapat induksi diet atherogenik dengan pemberian kuning telur dan campuran minyak kelapa yang dapat menimbulkan dislipidemia (22,2%).

Studi ini juga menjelaskan tikus yang mendapat terapi dengan nanopartikel buah andaliman mengalami perbaikan dinding pembuluh darah yang dijumpai pada 8 sampel (29,6%). Buah andaliman terbukti dapat dipakai sebagai antiinflamasi untuk aterosklerosis. Studi ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yanti *et al.* (2011) pada eksperimen kultur sel *lipopolysaccharide (LPS) induced macrophages* dan menyimpulkan bahwa buah andaliman memiliki efek terhadap biomarker inflamasi dengan penilaian pada ekspresi *mRNA TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 dan MMP-9*. Satria *et al.* (2019) melaporkan aktivitas sitotoksik yang terkandung dalam *Zanthoxylum acanthopodium fruit* yaitu *ethyl acetate fraction* berpengaruh terhadap sel kanker payudara *T47D* dengan melihat akumulasi sel pada G0/G1 (60,48%) dan sel kontrol (51,69%) serta terjadi penurunan ekspresi *cyclin D1* dan peningkatan ekspresi p53. Saat ini penelitian dan minat dalam mempelajari peran beberapa jenis *HSP* pada penyakit kardiovaskular telah berkembang (Korytowski, 2015; Zininga, 2018). Beberapa penelitian membuktikan bahwa kadar *HSP* berhubungan positif dengan penyakit kardiovaskular misalnya level *HSP70, HSP65 dan HSP27* (Ghayour-Mobarhan *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2013). *HSP70* mempercepat perkembangan aterosklerosis (Dulin *et al.*, 2010; Galovic *et al.*, 2015). Yang menarik dari penelitian ini adalah kami menemukan peran *down regulation* dari *HSP70*. Dari 6 sampel tikus kontrol positif yang mengalami aterosklerosis, 2 sampel (7,4%) ekspresi *HSP70* tidak ditemukan dan 4 sampel menunjukkan ekspresi lemah (14,8%). Tetapi pada kelompok perlakuan yang diberikan nanopartikel andaliman terlihat perubahan signifikan dengan ditemukannya 2 sampel (7,4%) dengan ekspresi sedang dan 6 sampel (22,3%) dengan ekspresi kuat dari 8 sampel yang mengalami perbaikan pada lapisan intima lumen pembuluh darah. Penelitian ini berpendapat sama dengan yang ditemukan aterosklerosis Zhu *et al.* (2002) bahwa *HSP70* tidak berkorelasi dengan keberadaan penyakit arteri koroner.

Kandungan alkaloid dan asam lemak tak jenuh, yang memiliki aktivitas antioksidan menjelaskan beberapa aktivitas biologis yang terkait dengan genus *Zanthoxylu*, seperti antiinflamasi, analgesik, antinosiseptif, antioksidan, antibiotik, hepatoprotektif, antiplasmodial, sitotoksik, antiproliferatif, anthelminthik, larvisidal, antivirus dan antijamur (Wijaya *et al.*, 2019).

Kerja dari buah andaliman yang mengandung *flavonoid, alkaloid terpene, alkaloid benzophenthidine, pyranoquinoline alkaloid, kwarter isoquinoline alkaloid, alkaloid aporphyrine* dan beberapa jenis *lignin* adalah sebagai antiaterosklerosis dan memiliki efek menstabilkan plak terbukti pada penelitian ini secara histopatologi. Tetapi mekanisme molekuler *HSP70* yang bertentangan dengan penelitian-penelitian terdahulu perlu dieksplorasi lebih rinci.

Berdasarkan hasil penelitian sementara dapat disimpulkan bahwa nanopartikel buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium DC.*) memiliki aktivitas antiinflamasi dan protektor melalui peningkatan ekspresi *HSP70*. Nanopartikel buah andaliman ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antiinflamasi untuk terapi aterosklerosis.

KESIMPULAN

Pemberian buah andaliman dalam bentuk nanopartikel dapat digunakan untuk perbaikan jaringan dinding pembuluh darah arteri dan dapat meningkatkan ekspresi *HSP70* yang mengindikasikan terjadinya perbaikan terhadap aterosklerosis.

Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel buah andaliman dapat digunakan sebagai antiinflamasi pada radang aterosklerosis dan dapat dipertimbangkan sebagai obat alternatif pengganti steroid.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh Direktorat Jenderal Pembelajaran dan Kemahasiswaan Kementerian Riset dan Teknologi Pendidikan Tinggi melalui Hibah Program Kreativitas Mahasiswa 2018 pendanaan tahun 2019.

REFERENSI

Asbur, Y. dan Khairunnisyah 2018. Pemanfaatan andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium DC*) sebagai tanaman penghasil minyak atsiri. *Jurnal Kultivasi*, vol. 17(1). pp: 537–543.

Aziz, S. and Yadaf, K. S. 2016. Pathogenesis of atherosclerosis. *Medical & Clinical Reviews*, vol. 2(3):22. pp: 1-6.

Bielecka-Dabrowa, A., Barylski, M. and Mikhailidis, D. P 2009. HSP 70 and atherosclerosis – protector or activator ? *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 13(3). pp: 307–317.

Bobryshev, Y. V., and Lord, R. S. A. 2002. Expression of heat shock protein–70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis. *Journal of Vascular Surgery*, Vol. 35(2). pp: 368-375.

Chakraborty, R., Ankri, R., Leshem-Lev, D. et al. 2019. Hyperlipidemic mice as a model for a real-time in vivo detection of atherosclerosis by gold nanorods-based diffusion reflection technique. *Journal of Biophotonics*. 12:e201800218.

Dulin, E., García-Barreno, P., and Guisasola, M. C. 2010. Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 15. pp: 929–937.

Frederick, S. J. 2005. Blood Vessels. In: Kumar, Abbas, Fausto. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. 7th ed. Elsevier Saunders, p: 516524.3.

Galovi'c, R., Flegar-Meštri'c, Z., Vidjak, V., Matokanovi'c, M., and Bari'si'c, K. 2015. Heat shock protein 70 and antibodies to heat shock protein 60 are associated with cerebrovascular atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.006

Ghayour-Mobarhan, M., Rahsepar, A. A., Tavallaie, S., Rahsepar, S., and Ferns, G. A. 2009. The potential role of heat shock proteins in cardiovascular disease: evidence from in vitro and in vivo studies. , *Adv Clin Chem*. vol. 48. pp: 27-72.

Harahap, U., Hasibuan, P.A.Z., Sitorus, P., Arfian, N. and Satria, D. 2018. Antimigration activity of an ethylacetate fraction of *Zanthoxylum acanthopodium DC*. Fruits in 4T1 breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 19 (2). pp: 565-569.

Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B and Hightower, L. E. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 14. pp:105–111.

Korytowski, W., Wawak, K., Pabisz, P., Schmitt, J. C., Chadwick, A. C., Sahoo, D., and Girotti, A. W. 2015. Impairment of macrophage cholesterol efflux by cholesterol hydroperoxide trafficking: Implications for atherogenesis under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. vol. 35(10). pp: 2104–2113.

Kumar., Abbas., Fausto., Mitcheel. 2007. Robbins Basic Pathology. 8th edition. Elsevier. pp: 343-353. 2.

Laila, S, R., Astuti, D, A., Suparto, I, H., Handharyani, E. 2018. Kajian lesio aterosklerosis arteri perifer kaitannya dengan faktor risiko pada hewan model macaca fascicularis yang diberi diet aterogenik IPB-1. *IPB Scientific Repository*.

Martien, R., Adhyatmika, I. D. K., Farida, V. and Sari, D. P. 2012. Technology developments nanoparticles as drug. *Maj*.

Farm., vol. 8(1). pp: 133–144.

Ramadhani, N., dan Sumiwi, S.A. 2017. Aktivitas antiinflamasi berbagai tanaman diduga berasal dari flavonoid, *Farmaka*. vol. 14. pp: 111–123.

Satria, D., Silalahi, J., Haro, G., Ilyas, S., Hasibuan, P. A. Z. 2019. Cell cycle inhibition of ethylacetate fraction of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. fruit against T47D cells. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 7(5). pp: 726-729.

Wick, G., Jakic, B., Buszko, M., Wick, M. C. and Grundtman, C. 2014. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. pp: 1-14.

Wijaya, C. H., Napitupulu, F. I., Karnady, V. and Indariani, S. 2019. A review of the bioactivity and flavor properties of the exotic spice “andaliman” (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.). *Food Reviews International*, vol. 35(1). pp: 1–19.

Yadav, A. K., Kumar, V., and Jha, V. 2013. Heat Shock Proteins 60 and 70 specific proinflammatory and cytotoxic response of CD4+CD28null cells in chronic kidney disease. *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, pp: 1-9.

Yanti, T, E, P., Nuriasari, N., and Juliana, K. 2011. Lemon pepper fruit extract (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) suppresses the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced macrophages in vitro. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 7(4). pp: 190-195.

Zhu, J., Quyyumi, . A., Wu, H., Csako, G., Rott, D., Zalles-Ganley, A., Ogunmakinwa, J., Halcox, J. and Epstein, S. E. 2003. Increased serum levels of Heat Shock Protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. pp: 1055-1059.

Zininga, T., Ramatsui, L., and Shonhai, A. 2018. Heat Shock Proteins as immunomodulants. *Molecules*, vol. 23, 2846. pp: 1-17.