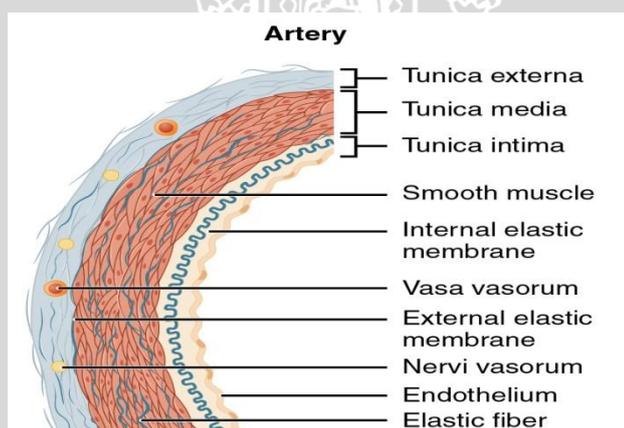


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Pada bagian ini dipaparkan teori-teori serta pustaka yang digunakan pada waktu penelitian. Teori yang dibahas meliputi definisi, etiologi, patogenesis, faktor risiko aterosklerosis, darapladib sebagai penghambat Lp-PLA₂, Intima-media aorta serta pembuatan model dislipidemia.

2.1 Struktur Dinding Pembuluh Darah Arteri



Gambar 2.1 Struktur pembuluh darah arteri (OpenStax College, 2013).

Dinding arteri terdiri atas lapisan tempat sel-sel endotel, sel-sel otot polos dan matriks ekstrasel dengan serabut elastis dan kolagen yang dapat terlihat jelas. Ketiga lapisan ini adalah intima, media, dan adventisia. Lapisan intima terdiri atas sel-sel endotel yang membatasi arteri dan merupakan dinding yang berinteraksi dengan komponen darah. Endotel mengandung reseptor untuk kolesterol LDL dan bekerja sebagai sawar dengan permeabilitas yang sangat selektif, mensekresi oksida nitrat (suatu vasodilator kuat) dan berinteraksi

dengan trombosit, monosit, makrofag, limfosit T dan sel-sel otot polos melalui berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan. Pada aterosklerosis terjadi gangguan integritas lapisan intima dan media, sehingga menyebabkan terbentuknya ateroma. Hipotesis terhadap respon cedera memperkirakan bahwa langkah awal yang kemudian menyebabkan disfungsi endotel arteri yaitu dengan meningkatnya permeabilitas terhadap monosit dan lipid darah (Padmastrimaya A., 2013).

Tunika intima merupakan lapisan paling dalam yang terpapar lumen, terdiri atas endotel yang membatasi pembuluh darah. Lapisan tengah atau tunika media terdiri atas serat otot polos dan elastin. Otot polos berperan dalam proses vasokonstriksi dan vasodilatasi. Tunika adventisia merupakan lapisan terluar yang tersusun sebagian besar oleh jaringan ikat kolagen longgar. Lapisan ini melindungi dan menguatkan pembuluh darah serta memfiksasinya terhadap struktur sekitar. Pada pembuluh darah besar, lapisan ini mengandung vasa vasorum yang menyuplai lapisan pembuluh darah terluar hingga tunika media (Fathah, 2012).

2.2 Aterosklerosis

Untuk memahami konsep aterosklerosis diperlukan wawasan mengenai definisi, etiologi, faktor risiko, manifestasi klinis dan penyakit yang dapat ditimbulkan akibat aterosklerosis.

2.2.1 Definisi, Etiologi dan Faktor Risiko

Aterosklerosis berasal dari bahasa Yunani, yang berarti penebalan lapisan intima arteri dan akumulasi lemak. Bahan lemak terletak di inti pusat dari plak yang ditutupi oleh *fibrous cap*. Istilah aterosklerosis terdiri dari dua bagian

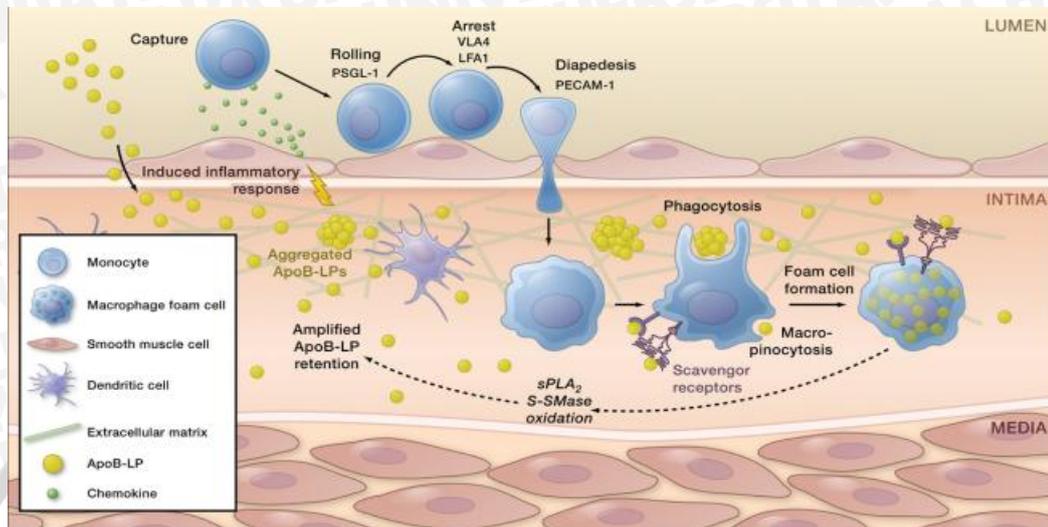
yaitu *atherosis* yang berarti akumulasi lemak disertai oleh beberapa makrofag dan *sclerosis* yang berarti lapisan fibrosis yang terdiri dari sel-sel otot polos, leukosit dan jaringan ikat (Rafieian-Kopaei, Mahmoud et al.,2014). Lesi aterosklerosis dapat menyebabkan stenosis dengan berpotensi mematkan iskemia distal atau dapat memicu oklusi trombotik saluran arteri major ke jantung, otak, kaki dan organ lainya. Lesi dimulai pada lapisan dalam arteri-intima dan semakin mempengaruhi seluruh dinding arteri termasuk media dan adventitia (Insull, 2009).

Ada beberapa faktor yang berkontribusi terhadap perkembangan plak aterosklerosis. Faktor tersebut meliputi faktor genetik dan faktor yang didapat (Ladich et al, 2015). Kebanyakan faktor risiko termasuk kolesterol tinggi dan LDL, rendahnya tingkat *high density lipoprotein* (HDL) dalam darah, hipertensi, asap tembakau, diabetes mellitus, obesitas, gaya hidup tidak aktif dan usia (Rafieian-Kopaei M et al, 2014) .

2.2.2 Patogenesis

Penyakit aterosklerosis atau pengerasan arteri adalah proses patologis khas penebalan dengan pengerasan arteri besar dan medium yang ditandai dengan penimbunan endapan lemak, trombosit, neutrofil, monosit, dan makrofag di seluruh kedalaman tunika intima sampai ke tunika media, arteri yang sering terkena adalah arteri koroner, aorta dan serebral (Baniar,Vita.,et.al.,2015). Kalsifikasi arteri memainkan peran utama dalam perkembangan aterosklerosis. Kebanyakan lipid mengendap pada lesi aterosklerotik yang berasal dari *Low-Density Lipoprotein* (LDL) yang masuk dinding pembuluh melalui luka atau endotel yang mengalami disfungsi. Lesi aterosklerosis dan kalsifikasi pertama muncul dan berkembang dalam lapisan terdalam dari arteri (pada intima)

(Erzengin and Burşuk 2015).



Gambar 2.2 Lipoprotein masuk ke dalam intima, monosit kemudian bermigrasi melalui endotel masuk kedalam intima dinding arteri dan berubah menjadi makrofag. Makrofag mengoksidasi molekul lipoprotein dan berubah menjadi sel busa. Sel busa melepaskan zat-zat yang menimbulkan inflamasi dan pertumbuhan lapisan intima (Moore dan Tabas, 2011).

Saat partikel LDL meninggalkan darah dan memasuki intima arteri, di mana, jika kadar LDL meningkat, maka LDL menumpuk. LDL kemudian dimodifikasi oleh enzim dan dioksidasi menjadi partikel proinflamasi, yang memprovokasi reaksi dari sistem kekebalan bawaan dalam intima. Sel endotel menjadi teraktivasi dan mensekresi molekul adesi. Sel otot polos mensekresi *chemokines* dan *chemoattractants* yang mana bersama-sama menarik monosit, limfosit, sel mast dan neutrofil masuk ke dinding arteri. Ketika monosit masuk, lalu monosit berubah menjadi makrofag, mengambil lipid dan berubah menjadi sel busa atau *foam cells* (Insull 2009). Dengan pasokan lipoprotein aterogenik, makrofag memakannya sampai mereka mati. Kematian makrofag oleh apoptosis dan nekrosis berkontribusi untuk pembentukan plak ringan dan destabilisasi inti yang kaya lipid di dalam plak (Falk,2006). Sel-sel inflamasi seperti monosit, makrofag, sel T dan sel mast akan menyekresikan Lp-PLA₂ yang kemudian akan

berikatan dengan LDL teroksidasi. Kemudian, di dalam plak aterosklerosis, Lp-PLA₂ akan menghidrolisa partikel LDL teroksidasi untuk membentuk LysoPC dan OxNEFA. LysoPC dan OxNEFA menyebabkan plak menjadi tidak stabil melalui pembentukan proses inflamasi terus menerus dan berkontribusi terhadap disfungsi endotel, nekrosis dan apoptosis (Steen, et al., 2014). Proses selanjutnya terjadi pembentukan matriks ekstraseluler dengan migrasi dan proliferasi sel otot polos serta sintesis kolagen yang menyebabkan pembentukan kapsul fibrosa yang membatasi lesi dengan lumen (Immanuel et al. 2010).

Sel busa yang terakumulasi akan menjadi fatty streak seiring berjalannya waktu, fatty streak tersebut menjadi lebih besar dan bersatu, jaringan otot polos dan jaringan fibrosa disekitarnya berproliferasi untuk membentuk plak yang makin lama makin besar. Makrofag juga melepaskan zat yang menimbulkan inflamasi dan proliferasi lebih lanjut dari jaringan fibrosa dan otot polos pada permukaan dinding arteri. Penimbunan lipid ditambah proliferasi sel dapat menjadi sangat besar sehingga plak menonjol ke dalam lumen arteri dan menghambat aliran darah yang kadang menyumbat seluruh pembuluh darah. Bahkan tanpa penyumbatan, fibroblast plak akhirnya menimbun sejumlah jaringan ikat padat, sklerosis menjadi sangat besar dan arteri menjadi kaku. Kemudian, garam kalsium sering kali mengendap bersama dengan kolesterol lipid yang lain dari plak, yang menimbulkan kalsifikasi sekeras tulang yang dapat membuat arteri seperti saluran kaku (Guyton dan Hall, 2006).

Terbentuknya sejumlah sel busa pada lapisan intima dan bertambahnya jumlah monosit atau makrofag di intima menyebabkan penebalan adaptif dinding pembuluh arteri. Sel busa yang terakumulasi dan bergabung dengan sel monosit membentuk garis lemak atau *fatty streak*. Akumulasi lipid ekstra sel yang massif

menyebabkan penebalan dinding arteri secara nyata (Nasution, 2013).

2.2.2.1 Disfungsi Endotel

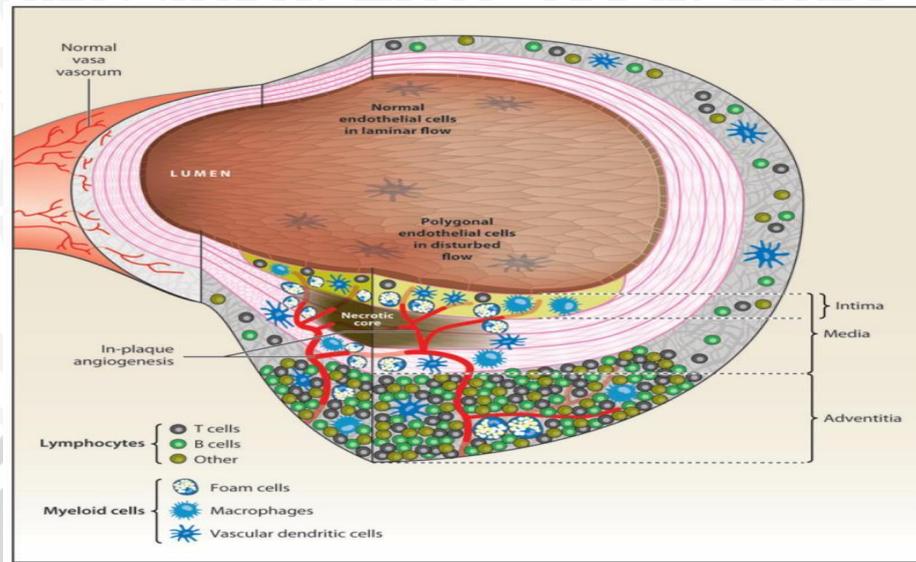
Endotelium berperan aktif dalam regulasi fisiologis tonus pembuluh darah, adhesi selular, migrasi otot polos pembuluh darah dan resistensi terhadap trombosis. Disfungsi endotel mengacu pada kegagalan untuk melakukan fungsi-fungsi fisiologis, sering sebagai respon maladaptif terhadap rangsangan patologis. Fitur fenotipik dari disfungsi endotel termasuk peningkatan regulasi ekspresi molekul adhesi selular, terganggunya fungsi penghalang yang mengarah ke peningkatan diapedesis leukosit, peningkatan vaskular tonus otot polos sekunder untuk gangguan pengolahan zat vasodilator seperti *nitric oxide* dan prostasiklin serta peningkatan produksi zat vasokonstriktor termasuk endothelin, dan mengurangi resistensi terhadap trombosis (Steyers and Miller 2014).

Hiperlipidemia merupakan peningkatan lipid termasuk kolesterol dan trigliserida, keadaan yang dapat menyebabkan rentan terhadap disfungsi endotel. Modifikasi kolesterol LDL oleh radikal bebas membentuk LDL teroksidasi (ox-LDL), yang mana memainkan peran dalam aktivasi endotel dan aterogenesis. Ox-LDL telah dilaporkan mempromosikan produksi endothelin-1, ekspresi molekul adesi dan *chemoattractants*, serta migrasi sel otot polos dan proliferasi. Selanjutnya ox-LDL ditelan oleh makrofag membentuk sel busa yang kemudian menempel pada dinding pembuluh darah dan berkontribusi terhadap inisiasi dari plak aterosklerosis (Mudau, Mashudu et al., 2012).

2.2.2.2 Inflamasi

Inflamasi adalah reaksi biologis yang mengganggu homeostasis jaringan. Pada level dasar merupakan proses *tissue-destroying* yang melibatkan perekrutan produk *blood-derived* seperti proein plasma dan leukosit ke dalam jaringan yang terganggu. Migrasi ini difasilitasi oleh perubahan dalam pembuluh darah lokal yang mengarah pada vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler dan meningkatnya aliran darah (Ashley et al.,2012).

Aterosklerosis adalah penyakit inflamatory dari dinding arteri berukuran besar dan sedang yang disebabkan oleh meningkatnya low-density lipoprotein (LDL) kolesterol di darah. Makrofag, sel dendritik, sel busa, limfosit dan sel inflamasi lain ditemukan pada lesi aterosklerotik intima (Galkina,E., and Ley, K., 2009). Rangsangan pro-inflamasi seperti *high fat diet*, hiperkolesterolemia, obesitas, hiperglikemia, resisten insulin, hipertensi dan merokok memicu ekspresi endotel molekul adesi seperti *P-selectin* dan *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* yang mana memediasi *attachment* dari monosit dan limfosit sirkulasi (Packard and Libby 2007).Di dalam intima, monosit berubah menjadi makrofag dibawah pengaruh *colony-stimulating factor* yang di ekspresikan di dalam intima yang inflamasi. *Macrophage colony-stimulating factor* juga meningkatkan ekspresi makrofag reseptor *scavenger* yang mana memakan ox-LDL sehingga terbentuk sel busa. Makrofag berproliferasi dan memperkuat respon inflamasi dengan mensekresikan berbagai *growth factor* dan sitokin, termasuk α tumor necrosis factor dan interleukin (IL) -1 β (Packard and Libby 2007).



Gambar 2.3 Sel-sel Imun dan Inflamasi pada aterosklerosis. Lesi aterosklerotik dan daerah yang relatif tidak berpengaruh. Intima normal sangat tipis dan tak terlihat pada tingkat resolusi ini. Daerah lesi mengandung sel-sel vascular dendritik, makrofag, sel-sel busa serta limfosit T. Sel-sel busa mengelilingi inti-inti nekrotik yang diduga terdiri dari sel-sel busa yang telah mengalami nekrosis (Galkina, E., and Ley, K., 2009).

Sel T yang mewakili respon imun adaptif, juga berperan penting dalam aterogenesis, memasuki lesi merespon kemokin diinduksi protein-10, monokin diinduksi oleh *interferon (IFN)- γ* , dan *IFN-inducible T cell attractant*. CD4+ subtype, yang mengenali antigen yang dipresentasikan sebagai fragmen terikat dengan molekul kompleks kelas II histocompatibility utama, menonjol di dalam lesi. Lesi manusia mengandung sel-sel CD4+ T reaktif terhadap antigen terkait penyakit yang berhubungan dengan LDL teroksidasi. Lesi aterosklerotik berisi sitokin yang mempromosikan respon T-helper 1, menginduksi sel-sel T diaktivasi untuk berdiferensiasi menjadi sel efektor T-helper 1. Sel-sel ini memperkuat aktivasi inflamasi lokal dengan memproduksi sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan CD40 ligand (CD40L, CD154), yang memberikan kontribusi penting untuk perkembangan plak (Packard and

Libby 2007).

2.2.2.3 Migrasi Sel Otot Polos

Salah satu peran utama dari sel otot polos adalah untuk menghasilkan matriks ekstraseluler, yang terakumulasi selama perkembangan lesi. Meskipun sel sel endotel dan makrofag berkontribusi dalam memproduksi matriks ekstraseluler, sel-sel otot polos dikenal sebagai produsen utama dari jaringan ikat baik pada pembuluh darah sehat dan pembuluh yang mengalami aterosklerosis. Sebagian besar matriks ekstraseluler dalam arteri yang sehat adalah tipe I dan tipe III kolagen fibrillar, lesi aterosklerotik cenderung mengandung sebagian besar proteoglikan dengan jenis kolagen tipe I fibrils dan fibronectin. Transisi ini dapat mengubah tidak hanya arsitektur pembuluh darah tetapi juga kadar lemak dan indeks proliferasi (Doran, A.C. et.al., 2008).

Akumulasi lipid, aktivasi endotel dan respon inflamasi dalam perkembangan lesi aterosklerotik mengakibatkan "*activation*" atau "*phenotypic switching*" dari sel-sel otot polos (Tabas, García-Cardeña, and Owens 2015). Sel-sel otot polos bisa beralih fenotip antara *contractile* dan *synthetic* dalam menanggapi berbagai rangsangan aterogenik. Selain itu "*phenotypic switching*" berhubungan dengan kemampuan sel-sel otot polos untuk melakukan berbagai fungsi. Pada keadaan *synthetic* sel-sel otot polos bermigrasi dan berproliferasi lebih mudah daripada *contractile* dan dapat mensintesis hingga 25-46 kali lebih banyak kolagen. Selain itu, mereka mengekspresikan proporsi dari VLDL, LDL dan reseptor scavenger lebih besar yang memungkinkan penyerapan lipid dan pembentukan sel busa lebih efisien. Oleh karena itu transisi ke kondisi

synthetic memfasilitasi banyak peran patogenik dari sel-sel otot polos (Doran, A.C. et.al., 2008). Pada saat sel-sel otot polos dalam keadaan sepenuhnya *contractile*, yang mana meregulasi ekspresi dari gen penanda diferensiasi seperti *encoding smooth muscle α -actin (Acta2)* dan *smooth muscle myosin heavy chain (Myh11)*. Sebagai konsekuensinya, sel-sel otot polos mengalami proliferasi sel dan migrasi, serta meningkatkan produksi dari matriks ekstraseluler, proteoglikan dan protein lainnya yang diyakini berperan dalam remodeling pembuluh darah dan stabilisasi plak (Tabas, García-Cardena, and Owens 2015).

Interaksi monosit dengan sel-sel dinding pembuluh darah memungkinkan sel-sel monosit berpindah dari aliran darah menuju intima selanjutnya berdiferensiasi menjadi makrofag. Selain sel endotel, sel-sel otot polos juga mampu berinteraksi dengan makrofag. Proses interaksi tersebut dimediasi oleh variasi molekul adesi yang berada di sel endotel dan sel otot polos yang meliputi *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, *vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)* dan *fractalkine (CX3CL1)* (Doran, A.C. et.al., 2008).

2.2.3 Manifestasi Klinis dan Penyakit Akibat Aterosklerosis

Aterosklerosis menyebabkan obstruksi arteri, embolisasi bahan plak, lemah dan pecahnya pembuluh darah. Obstruksi dengan atau tanpa embolisasi menyebabkan iskemia sirkulasi (Ladich et.al., 2016). Disrupsi plak aterosklerotik dalam arteri koronary, baik yang disebabkan oleh erosi atau ruptur plak memegang peran dalam perkembangan *Artery Coronary Syndrome (ACS)*. *Artery Coronary Syndrome* secara klinis tidak terdeteksi, sampai timbulnya stenosis atau thrombosis, yang melanjut terjadinya gangguan aliran darah dan

iskemia miokardial. Secara klinis nampak sebagai *angina pectoris*, *acute myocardial infarction* dan *sudden cardiac death* (Muwarni et.al.,2006)

2.3 Dislipidemia

Untuk memahami konsep dislipidemia diperlukan wawasan mengenai definisi, etiologi, dan faktor risiko.

2.3.1 Definisi dan Etiologi

Dislipidemia adalah peningkatan dari kolesterol plasma, trigliserida atau keduanya atau rendahnya high-density lipoprotein level yang berkontribusi terhadap perkembangan dari aterosklerosis (Berglund et al.,2012) Tubuh membutuhkan kolesterol untuk fungsi normal, namun peningkatan kolesterol dapat membuat seseorang memiliki risiko untuk penyakit kardiovaskular (Lethbridge, 2006).

LDL Cholesterol

<100	Optimal
100 – 129	Near or above optimal
130 – 159	Borderline high
160 – 189	High
≥ 190	Very high

Total Cholesterol

<200	Desirable
200 – 239	Borderline high
≥ 240	High

HDL Cholesterol*

<40	Low
≥ 60	High

Triglycerides

<150	Normal
150 – 199	Borderline high
200 – 499	High
≥ 500	Very high

Tabel 2.1 Klasifikasi dislipidemia yang dibuat oleh NCEP ATP 3. Semua konsentrasi diekspresikan

sebagai mg/dl (Nelson, R.H., 2013).

LDL (*Low Density Lipoprotein*) adalah lipoprotein pada manusia yang berguna sebagai pengangkut kolesterol ke jaringan perifer dan berguna untuk sintesis membran dan hormon steroid. LDL mengandung 10% trigliserida serta 50% kolesterol, dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah kadar kolesterol dalam makanan, kandungan lemak jenuh (Adipratama, 2014). LDL diketahui sebagai kolesterol buruk karena berkontribusi terhadap pembentukan plak dalam arteri (Sorace, et al., 2006). Ukuran partikel LDL bervariasi dari besar, kecil dan padat. LDL kecil (*small*) dan padat (*dense*) yang sangat kaya akan ester dan kolesterol dikaitkan dengan gangguan metabolisme seperti hipertrigliseridemia, resistensi insulin dan khususnya aterogenik. VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) mengandung apoprotein B-100 (apo B), disintesis di hati, dan mengangkut TG dan kolesterol untuk jaringan perifer. Sintesis VLDL meningkat dengan kenaikan FFA (*Free Fatty Acid*) intrahepatik seperti yang terjadi pada diet tinggi lemak. HDL (*High Density Lipoprotein*) merupakan lipoprotein bebas kolesterol yang disintesis di enterosit dan hati (Berglund et al., 2012). HDL memiliki efek antiaterogenik seperti menghambat oksidasi LDL, meningkatkan produksi nitrit oksida dalam endotel, menghambat inflamasi dalam endotel, meningkatkan bioavailabilitas prostasiklin, menghambat koagulasi serta agregasi platelet (Adipratama, 2014). TGs (*Tryglicerides*) adalah lemak yang dibawa dari aliran darah menuju ke jaringan. Sebagian besar jaringan lemak tubuh adalah bentuk dari trigliserid dan disimpan untuk digunakan sebagai energi. TG diperoleh dari lemak yang terkandung dalam makanan (Sorace, et al., 2006).

LDL, VLDL, sisa-sisa *chylomicron*, *small dense* LDL (sdLDL), Lp (a), dan

LDL teroksidasi adalah pro-aterogenik dan HDL adalah lipoprotein anti-aterogenik. LDL yang modifikasi menyebabkan pembentukan sel busa. Di antara partikel LDL, *small dense* LDL lebih rentan terhadap oksidasi, dan memiliki waktu tinggal lebih lama dan afinitas yang lebih tinggi untuk matriks ekstraselular. HDL berperan penting dalam transportasi kolesterol serta memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan. Disfungsi HDL merupakan faktor pro-aterogenik independen (Koba S dan Hirano T, 2011). Dislipidemia meningkatkan pengendapan lemak di arteri, sehingga mempersempit lumen, menghalangi suplai darah, menyebabkan episode thrombo-emboli seperti stroke, *transient ischemic attack* (TIA), penyakit jantung iskemik, emboli paru, dll. Pasien dengan penyakit kardiovaskuler memiliki plak aterosklerosis atau peningkatan ketebalan intima-medial (IMT) sebelum kejadian peristiwa thrombo-emboli (Garg R et al, 2015).

Etiologi dari dislipidemia terdiri dari penyebab primer (genetik) dan penyebab sekunder (gaya hidup dan lainnya). Penyebab primer atau genetik terjadi karena adanya mutasi gen tunggal atau ganda yang menghasilkan produksi berlebih atau rusaknya *clearance* dari TG dan kolesterol LDL, atau kekurangan produksi atau *clearance* berlebihan dari HDL. Sedangkan pada penyebab sekunder, berkontribusi pada banyak kasus dari dislipidemia pada orang dewasa. Penyebab tersering dan yang paling penting di negara berkembang adalah gaya hidup sedentary dengan berlebihnya diet tinggi lemak, kolesterol dan *trans fat*. Penyebab sekunder lain termasuk Diabetes mellitus, Alkohol, penyakit ginjal kronis, hipotiroid, sirosis biliary primer dan penyakit hati lain, obat-obatan seperti tiazid dll. Penyebab sekunder dari turunnya level kolesterol HDL meliputi merokok, *anabolic steroids*, infeksi HIV dan sindrom nefrotik (Berglund et al.,2012).

2.3.2 Faktor Risiko

Faktor risiko dari dislipidemia terdiri dari faktor risiko yang dapat diubah dan tidak dapat diubah. Faktor risiko yang tidak dapat diubah adalah kelainan genetik serta hiperkolesterolemia familial dimana metabolisme lipoprotein menyebabkan kadar lemak dalam darah sangat tinggi. Selain kelainan genetik terdapat faktor yang tak dapat diubah lain seperti umur, jenis kelamin dan menopause bagi wanita. Sedangkan Faktor risiko yang dapat diubah terdiri dari kebiasaan merokok, kurang aktivitas fisik, makan-makanan tinggi lemak jenuh, obesitas dan diabetes melitus (Sorace, et al., 2006).

2.4 Dislipidemia sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis

Dislipidemia secara langsung dapat merangsang terjadinya disfungsi endotel. Apabila dislipidemia terjadi kronis akan menyebabkan akumulasi lipoprotein pada tempat jejas yaitu pada lokasi terjadinya disfungsi endotel (Baniar et al., 2015). Akumulasi lipid menghasilkan reactive oxygen species (ROS) yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sehingga dapat mendorong migrasi lipoprotein lebih banyak (Wang, et al., 2012). LDL menjadi teroksidasi yang akan merangsang terjadinya aterosklerosis (Baniar et al., 2015). Pembentukan oxLDL akan memicu respon inflamasi dan menghasilkan sitokin proinflamasi yang menyebabkan ekspresi molekul adhesi. Molekul adhesi tersebut akan menarik monosit dan limfosit T ke dalam tunika intima. Monosit berdiferensiasi menjadi makrofag dan berikatan dengan oxLDL sehingga terbentuk sel busa. Selanjutnya terbentuk matriks ekstraseluler dengan migrasi dan proliferasi sel otot polos yang di stimulasi oleh *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor-2* dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) serta sintesis kolagen oleh otot polos yang menyebabkan pembentukan kerak

lemak. Proses ini terus berlanjut menjadi plak fibrosa dengan pembentukan kapsul fibrosa yang membatasi lesi dengan lumen. Pada tahap ini plak aterosklerosis yang stabil berubah menjadi labil dan ruptur oleh karena oxLDL mempunyai efek sitotoksik pada sel busa makrofag dan sel otot polos yang menyebabkan terbentuknya inti nekrotik, Lp-PLA₂ berperan pada toksisitas oxLDL (Immanuel et al. 2010).

Lp-PLA₂ diproduksi oleh makrofag, limfosit dan sel mast. Reseptor Lp-PLA₂ ditemukan dalam oxLDL dan Lp-PLA₂ akan berikatan dengan reseptornya dan menghidrolisis gugusan asil pendek dari oxLDL membentuk 2 mediator lipid yang bioaktif yaitu lysophosphatidylcholine (Lyso PC) dan asam lemak teroksidasi (oxFA) yang berperan penting dalam proses aterosklerosis (Immanuel et al. 2010).

2.5 Ketebalan Intima-media Pembuluh Darah Aorta pada Dislipidemia

Untuk memahami ketebalan intima-media diperlukan wawasan mengenai definisi, patogenesis dan perhitungan.

2.5.1 Definisi

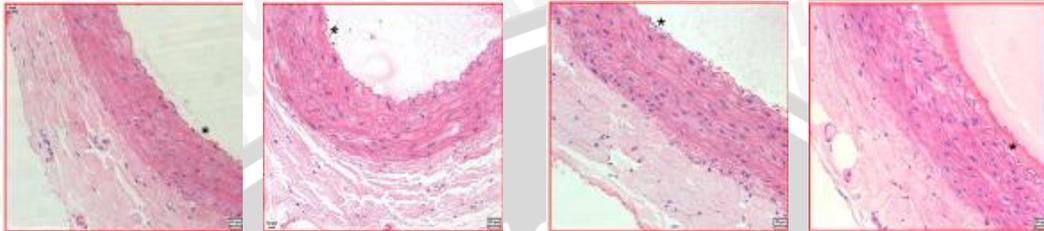
Penebalan adaptif dinding pembuluh darah arteri akibat terbentuknya sejumlah sel busa pada lapisan intima-media dan bertambahnya jumlah monosit atau makrofag. Perubahan ini merupakan perubahan paling dini yang dapat dideteksi secara mikroskopik (Nasution, 2013). Sedangkan menurut Iana Simova (2015) Intima-media thickness merupakan marker dari aterosklerosis subklinis (kerusakan organ asimtomatik) dan harus dievaluasi pada setiap pasien hipertensi pada resiko moderate untuk penyakit kardiovaskular (Simova, Iana., 2015). Di bawah mikroskop, menebalnya dinding arteri ditunjukkan oleh

ketebalan tunika intima dan media. Pada penelitian post mortem dijumpai bahwa penebalan dinding aorta terjadi secara difus dan terutama terjadi di lapisan intima. Secara histologis, dinding intima yang menebal secara difus terdiri dari matriks protein, *collagen*, *glycosaminoglican* dan sel otot polos vaskuler (VSMCs). Otot polos vaskuler di tunika intima yang menua diduga berasal dari tunika media yang kemudian bermigrasi ke intima, terjadi peningkatan ekspresi dari molekul-molekul adesi yang di lapisan intima aorta dan peningkatan *adherence* dari *monocyt* ke permukaan sel endote (Pinatih, 2011).

2.5.2 Patogenesis

LDL rentan ter oksidasi karena hampir separuh komponen lipidnya terdiri dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), yang bila bertemu dengan ROS akan membentuk LDL teroksidasi. LDL teroksidasi mudah menempel dan menumpuk pada dinding pembuluh darah dan akan direspons sebagai suatu benda asing. Sel endotel yang mengalami disfungsi akan menampilkan molekul adesi tertentu, yang akan mengadesi lekosit, monosit dan limfosit. Permeabilitas endotel meningkat dan menjadi bersifat prokoagulan. Setelah monosit, lekosit dan limfosit melekat pada endotel, kemudian akan menembus ke dalam intima dengan bantuan *monosit chemoattractant protein-1* (MCP-1) dan *T-cell chemoattractant*. Monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag dan mengalami aktivasi. Makrofag teraktivasi mensekresi berbagai sitokin pro-inflamasi, kemokin (*chemoattractant cytokine*), faktor-faktor pertumbuhan, enzim proteolitik, dan enzim-enzim hidrolitik yang lain. Sel T teraktivasi juga mensekresikan sitokin yang dapat kembali menstimulasi makrofag, sel endotel dan sel otot polos, sehingga semakin memperkuat respons inflamasi. Selain itu, makrofag dan sel T juga memproduksi faktor-faktor *sitotoksik*, yang berperan dalam apoptosis.

(Nasution, 2013).



Gambar 2.4 Pewarnaan H&E dari aorta (lensa objektif 20x) pada aorta tikus dengan pemberian high-fat diet selama 12 minggu dan 16 minggu menunjukkan penebalan intima ringan dan hypertrophy seluler pada intima dan media aorta Wu, Jing et al., 2016).

Terbentuknya sejumlah sel busa pada lapisan sub-intima dan bertambahnya jumlah monosit/makrofag di intima menyebabkan penebalan adaptif dinding pembuluh arteri, yang dikenal sebagai lesi tipe 1 (lesi inisial), dan merupakan perubahan paling dini yang dapat dideteksi secara mikroskopik dan kimiawi. Selanjutnya, sel busa akan terakumulasi dan bergabung dengan sel miosit membentuk garis lemak (*fatty streak*). Lebih lanjut terjadi akumulasi lipid ekstra sel yang massif, sehingga menyebabkan penebalan dinding arteri secara nyata, disorganisasi dan deformitas dinding pembuluh darah, hingga menimbulkan berbagai komplikasi (Nasution, 2013).

Studi ultrasound menggunakan pengukuran dari ketebalan intima-media yang telah digunakan untuk mendeteksi proses aterosklerosis sebelum perkembangan dari stenosis pembuluh darah (Davis, Patricia H. et al., 2010). *American Heart Association* merekomendasikan pengukuran intima-media sebagai metode paling baik untuk mengidentifikasi aterosklerosis pada penyakit kardiovaskular. Keadaan dinding arteri karotis mencerminkan keadaan dinding

arteri koroner (Mirna Muis et al, 2011).

2.6 Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂)

Untuk memahami *Lipoprotein-associated phospholipase A₂* (Lp-PLA₂) diperlukan wawasan mengenai definisi serta mekanisme kerja Lp-PLA₂.

2.6.1 Definisi

Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) adalah kalsium-independen fosfolipase A₂ yang beredar dalam plasma berhubungan dengan partikel lipoprotein. Hal ini juga ditemukan pada plak aterosklerotik yang terkait dengan makrofag. Lp-PLA₂ menghasilkan dua mediator pro-inflamasi, *lysophosphatidylcholine* dan asam lemak non-esterifikasi teroksidasi. Ini memainkan peran dalam perkembangan lesi aterosklerosis dan pembentukan inti nekrotik namun mekanisme kerja belum sepenuhnya dipahami (Zhao Tian,2014).

Lipoprotein terkait fosfolipase A₂ (Lp-PLA₂) diekspresikan berlimpah dalam inti nekrotik lesi koroner, dan produk dari aktivitas enzimatik yang dapat menyebabkan peradangan dan kematian sel, plak rentan terhadap *rupture* (Serruys et al. 2008). *Lipoprotein-associated phospholipase A₂* (Lp-PLA₂) adalah enzim yang beredar diproduksi dan disekresikan oleh sel-sel inflamasi yang terlibat dalam aterosklerosis, terikat terutama untuk apolipoprotein B yang mengandung lipoprotein, dan disajikan dalam inti nekrotik lesi aterosklerotik. Lp-PLA₂ cepat mendegradasi fosfolipid oksidatif yang dimodifikasi dalam LDL-C, yang menyebabkan pembentukan proinflamasi dan produk sitotoksik (Mohler et al. 2008).

2.6.2 Mekanisme Kerja Lp-PLA₂

Lipoprotein-Associated phospholipase A2 akan berikatan dengan apo-B dari LDL dan sdLDL. Lp-PLA₂ bersama dengan LDL dan sdLDL, masuk tunika intima arteri yang mengalami disfungsi endotel. *Low density lipoprotein* akan mengalami oksidasi menjadi oxLDL. Reseptor Lp-PLA₂ ditemukan dalam oxLDL dan Lp-PLA₂ akan berikatan dengan reseptornya dan menghidrolisis gugusan asil pendek pada posisi *sn-2* fosfolipid dari oxLDL membentuk 2 mediator lipid yang bioaktif yaitu *lysophosphatidylcholine* (LysoPC) dan asam lemak teroksidasi (oxFA) yang berperan penting dalam proses aterosklerosis. Kedua produk tersebut memiliki efek proinflamasi yaitu berperan dalam inisiasi dan perkembangan ateroma.

LysoPC merupakan faktor kemotaktik yang kuat dan menyebabkan penarikan monosit-makrofag ke dalam endotel dan menginduksi ekspresi molekul adhesi mononuklear di sel endotel yang berakibat inisiasi lesi meningkat. LysoPC juga menyebabkan disfungsi endotel dengan menghambat kerja *endothelial nitric oxide synthase* (eNOs) sehingga menurunkan kadar *nitric oxide* (NO) dan menginduksi apoptosis sel otot polos dan makrofag. OxFA juga dapat menyebabkan penarikan dan aktivasi monosit makrofag dan apoptosis makrofag. Apoptosis ini menyebabkan perluasan inti nekrotik lesi aterosklerosis, penipisan kapsul fibrosa, dan destabilisasi plak yang berakibat rupturnya plak aterosklerotik (Immanuel et al. 2010).

2.7 Darapladib

Untuk memahami *Darapladib* diperlukan wawasan mengenai definisi serta mekanisme kerja *Darapladib*.

2.7.1 Definisi dan Mekanisme Kerja *Darapladib*

Darapladib adalah *inhibitor* selektif *lipoprotein-terkait fosfolipase A2* (Lp-PLA₂) yang sedang diselidiki potensinya untuk menstabilkan risiko tinggi plak aterosklerotik dan berpotensi mengurangi kejadian kardiovaskuler (Berger et al. 2011). Pada suatu penelitian menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA₂ dengan *darapladib* mencegah ekspansi inti nekrotik, penentu utama dari kerentanan plak. Temuan ini menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA₂ mungkin merupakan pendekatan terapi baru (Serruys et al. 2008).

Darapladib telah berulang kali terbukti menghambat hidrolisis Lp-PLA₂ substrat (yaitu, PAF, 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl) suksinil) PC, dan lain-lain). *Darapladib* menghambat Lp-PLA₂ -dimediasi hidrolisis substrat eksogen dalam plasma dan LDL in vitro. *Darapladib* memiliki beberapa efek anti-inflamasi dan anti-aterogenik pada tikus yang diberi diet aterogenik di diabetes dan hiperkolesterolemia babi, dan pada manusia. Hal ini menunjukkan bahwa *darapladib* mungkin memiliki efek penting mengurangi jalur utama pro-inflamasi yang terkait dengan aterosklerosis (Rosenson and Stafforini 2012).

2.8 Pengamatan dan Pengukuran Ketebalan Intima-media (*Intima-media thickness*)

Pengamatan slide menggunakan mikroskop *scan dot slide* dikembangkan oleh *Soft Imaging System GmbH, Hamburg Germany*). Software khusus analisa hasil foto histo yakni *OlyVia*, software ini dipilih karena merupakan software

khusus hasil pemotretan khusus scan dot slide. Hasil gambar yang diperoleh dibaca menggunakan *OlyVia* dengan perbesaran 400x (Puspitarini dyah,2014).

Pengukuran ketebalan aorta ditentukan dengan cara yaitu pemrosesan jaringan dan pembuatan parafin blok,sesuai standar pemeriksaan histopologi, prosedur pengecatan HE (Hematoksilin eosin), mengukur ketebalan penampang lintang aorta pada 8 zona (Maliya Arina, 2006).

2.8.1 Parafin Blok

Setiap jaringan harus menjadi *smear* atau *section* terlebih dahulu sebelum dilihat di bawah mikroskop karena identifikasi hubungan suatu penyakit dan perubahan terhadap histopatologi dilakukan dengan melihat sediaan jaringan dibawah mikroskop. *Section* merupakan pemotongan jaringan menjadi berukuran mikro kemudian diwarnai untuk bisa di lihat di bawah mikroskop (Rolls,2011).

Parafin blok merupakan proses awal pembuatan sediaan. Untuk membersihkan dari kontaminan, jaringan dicuci dengan PBS 3-5x. Lalu difiksasi pada formalin 10%. Kemudian dehidrasi masing-masing selama 60 menit menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut). *Clearing* menggunakan xilol 2x masing-masing selama 60 menit. Setelah itu dilakukan infiltrasi selama 60 menit dengan parafin lunak pada suhu 48 derajat *celcius*. Lakukan block dalam parafin keras, pada cetakan, didiamkan selama 1 hari. Lalu keesokan hari ditempelkan pada holder dan dipotong setebal 4-6 μm dengan rotary microtome. Dilakukan mounting dengan gelatin 5% pada gelas objek. Selanjutnya dilakukan proses deparafinasi. Gelas obyek dari Parafin Block direndam di dalam Xilol 2x masing-masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi masing-masing selama 5 menit menggunakan alkohol berseri (Absolut,

96%, 80%, 70%, 50% dan 30%). Pada tahap terakhir slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Lalu diwarnai dengan Hematoxilen selama 10 menit. Kemudian selama 10 menit direndam di dalam *tap water* lalu dibilas dengan H₂O. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri (30% dan 50%) masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya selama 3 menit diwarnai dengan larutan eosin. Selanjutnya dibilas dengan alkohol 30%. Dicuci dengan H₂O selama 5 menit dan dikering anginkan. Setelah itu dilakukan mounting dan tutup dengan *cover glass* (Yosef et al, 2013).

2.9 Pembuatan Model Dislipidemia

Pembuatan model dislipidemia dalam penelitian ini menggunakan tikus Sprague-Dawley dan pemberian High Fat Diet (HFD) yang akan dijelaskan lebih lanjut pada sub bab berikut ini.

2.9.1 Tikus Sprague-Dawley sebagai Model Dislipidemia

Tikus adalah model yang digunakan untuk memahami dan mempelajari keadaan patologis kompleks seperti diabetes mellitus dan hipertensi. Tikus *Sprague-Dawley* merupakan tikus albino serbaguna yang digunakan secara luas dalam penelitian. Keuntungan dari tikus *Sprague-Dawley* ini adalah ketenangan dan kemudahan dalam penanganannya. Ukuran rata-rata dari tikus SD adalah 10.5. Berat badan dewasa 250-300 g untuk wanita dan 450-520 g untuk laki-laki. Memiliki masa hidup 2.5-3.5 tahun. Tikus SD ideal untuk model umum serbaguna, keamanan dan kemanjuran pengujian, penuaan, nutrisi, *diet-induced obesity*, onkologi serta mode bedah (Charles River, 2016).

2.9.2 Pemberian High Fat Diet (HFD)

80% kondisi dislipidemia disebabkan oleh beberapa faktor yaitu obesitas, usia tua, genetik, kolesterol dan High Fat Diet (Sorace, et al., 2006). Menurut penelitian Muwarni 2006, pemberian komposisi pakan aterogenik selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar kolesterol darah dan menginduksi terbentuknya sel busa secara bermakna. Komposisi pakan aterogenik yang diberikan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2.2 Komposisi pakan HFD (Muwarni, et al., 2006)

Bahan Pakan	Pakan				
	Normal	I	II	III	IV
Confeed PAR-S	225 gr	200 gr	200 gr	200 gr	200 gr
Terigu	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr
Kolesterol	-	4 gr	8 gr	8 gr	8 gr
Asam kolat	-	0,4 gr	0,4 gr	0,8 gr	0,8 gr
Minyak babi	-	10 ml	10 ml	10 ml	40 ml
Air	100 ml	85,6 ml	81,6 ml	81,2 ml	51,2 ml

Pemberian HFD pada durasi 8 minggu secara signifikan meningkatkan kadar TG, LDL, dan penurunan kadar HDL tikus putih strain wistar jantan (Heriansyah, 2013).

2.9.3 Kriteria Dislipidemia Tikus Sprague-dawley

Profil lipid Tikus Sprague-dawley memiliki perbedaan kriteria dengan manusia. Pengukuran profil lipid berdasarkan konsentrasi kolesterol total, HDL, LDL dan Trigliserida pada serum tikus. Berikut data kriteria hiperkolesterol tikus Sprague-dawley pada minggu 4.

Tabel 2.3 Kriteria Hiperkolesterol pada Tikus SD (Krisnansari, Diah et al., 2012)

Profil Lipid	Rata-rata
Kolesterol Total (mg/dl)	116,3
LDL (mg/dl)	44,6
HDL (mg/dl)	34,5
Trigliserida (mg/dl)	186