

Pengaruh Pemberian Darapladib Terhadap Penurunan Jumlah Vasa Vasorum Pada Aorta Tikus *Sprague-Dawley* Model Aterosklerosis Dengan Diabetes Melitus Tipe 2

Titin Andri Wihastuti*, Teuku Heriansyah**, Kenty Wantri Anita***, Sari Kushardianti****

*Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

**Departemen Kardiologi and Kedokteran Vaskular, Fakultas Kedokteran, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

***Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

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

ABSTRAK

Diabetes melitus tipe 2 merupakan salah satu faktor risiko penyebab terjadinya aterosklerosis. Plak aterosklerosis mudah terbentuk akibat resistensi insulin yang menyebabkan disfungsi endotel dan terjadi inflamasi pada dinding endotel. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan stress oksidatif menyebabkan LDL teroksidasi menjadi Ox-LDL. Disfungsi endotel akan menurunkan kemampuan endotel melepaskan *nitric oxide* (NO), O₂, dan zat lain. Penebalan dinding arteri yang terjadi pada aterosklerosis menyebabkan hipoksia. Media terluar arteri besar yaitu tunika adventitia dan tunika media mendapatkan vaskularisasi dari vasa vasorum yang menyuplai oksigen dan nutrisi. Hipoksia menyebabkan terjadi peningkatan neovaskularisasi vasa vasorum pada adventitia. Lp-PLA₂ adalah enzim yang memecah Ox-LDL menjadi produk pro-aterosklerosis. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui efek dari darapladib terhadap penurunan jumlah vasa vasorum. Penelitian ini menggunakan Studi eksperimental menggunakan *post test with control group* secara *in vivo* terhadap tikus *Sprague-Dawley* berusia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram. Total sampel sebanyak 30 ekor tikus. Masing-masing dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok normal (N) dengan diet standar, kelompok diabetes melitus tipe 2 (DM) dengan diet tinggi lemak, dan kelompok diabetes melitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan darapladib (DMDP) dosis 20 mg/Kg/BB dalam dua serial waktu 8 minggu dan 16 minggu. Pada uji *One-way Anova* menunjukkan bahwa pengaruh pemberian darapladib memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap penurunan jumlah vasa vasorum ($p = 0,000$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian Darapladib memiliki pengaruh terhadap penurunan jumlah vasa vasorum pada tikus DM tipe 2. Peneliti menyarankan agar diadakan penelitian untuk mengetahui dosis optimum dan efek samping dari pemberian darapladib.

Kata Kunci : Aterosklerosis, Darapladib, Vasa vasorum, Diabetes melitus tipe 2

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 is one of the risk factors associated with atherosclerosis. The atherosclerotic plaque is formed as a result of insulin resistance causes endothelial dysfunction and inflammation in endothelial wall. Reactive Oxygen Species (ROS) generated by oxidative stress causes the LDL is oxidized to Ox-LDL. Endothelial dysfunction will reduce the ability of the endothelium to release nitric oxide (NO), O₂, and other substances. The thickening of the arterial wall that occurs in atherosclerosis causing hypoxia. Media outermost large artery that is the tunica adventitia and tunica media to get the vascularity of the vasa vasorum that supply oxygen and nutrients. Hypoxia leads to increased neovascularization vasa vasorum in the adventitia. Lp-PLA₂ is an enzyme that breaks down into products Ox-LDL pro-atherosclerosis. The purpose of this study was to determine the effects of darapladib to decrease the number of vasa vasorum. This research uses experimental studies using post-test with control group *in vivo* against *Sprague-Dawley* rats aged 6-8 weeks with a weight of 150-200 grams. Total sample of 30 rats. Each divided into three groups: normal group (N) with a standard diet, group type 2 diabetes mellitus (DM) with a high-fat diet, and group 2 diabetes mellitus with high-fat diet and darapladib (DMDP) dose of 20 mg / kg / BB in two series of 8 weeks and 16 weeks. In *One-way ANOVA* test showed that the effect of darapladib had a significant difference ($p < 0.05$) decrease in the number of vasa vasorum ($p = 0.000$). The conclusion of this research was the Darapladib has an influence on decreasing the number of vasa vasorum in rats with type 2 diabetes is suggested that conducted a study to determine the optimum dosage and side effects of darapladib.

Keywords: Atherosclerosis, Darapladib, Vasa vasorum, Type 2 Diabetes Mellitus

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskular atau *cardiovascular disease* (CVD) menyebabkan 31% dari seluruh kematian diseluruh dunia, lebih dari 75% kematian CVD terjadi di negara berpenghasilan rendah hingga menengah, dan juga 80% dari semua kematian CVD dikarenakan serangan jantung dan stroke (22). Selama beberapa dekade ini, kematian akibat Penyakit Jantung Koroner (PJK) atherosklerosis baik dinegara industri maupun negara berkembang meningkat secara tajam (13).

Penyakit kardiovaskular berkaitan erat dengan aterosklerosis. Adanya kebiasaan, keadaan, atau abnormalitas dalam dinding pembuluh darah (endothelium) yang dihubungkan dengan aterosklerosis merupakan faktor risiko terjadinya aterosklerosis yang multifaktoral. Faktor-faktor tercatat yang dapat meningkatkan terjadinya penyakit kardiovaskular antara lain hipertensi, merokok, obesitas, stress, kurangnya aktivitas fisik, tinggi kolesterol dan dislipidemia (4). Beberapa penyakit seperti diabetes melitus atau miksedema (kekurangan hormon tiroid) juga menjadi faktor yang menginduksi berkembangnya aterosklerosis (16).

Teori utama yang mendasari proses terbentuknya plak aterosklerosis yaitu stress oksidatif. Antioxidant dalam tubuh yang kurang menyebabkan tubuh tidak mampu mengeradikasi *Reactive*

Oxygen Species (ROS). Awal mula plak aterosklerosis adalah disfungsi endotel vascular. Akibat dari disfungsi endotel terjadi peningkatan paparan molekul adhesi pada sel endotel dan peningkatan perlekatan molekul-molekul pada dinding pembuluh darah yang disebabkan oleh penurunan kemampuan endotel melepaskan *nitric oxide* (NO), O₂, dan zat lain. Media terluar arteri besar yaitu tunika adventitia dan tunika media mendapatkan vaskularisasi dari vasa vasorum yang menyuplai oksigen dan nutrisi. Penebalan dinding arteri yang terjadi pada aterosklerosis menyebabkan hipoksia. Dilaporkan, terjadi neovaskularisasi vasa vasorum pada hewan model aterosklerosis, yang merupakan hasil dari peran HIF-1 α yang kadarnya diatur melalui mekanisme *oxygen dependent proteolysis* HIF-1 α (20).

Pada DM tipe 2, terdapat aterogenik padat *Low Density Lipoprotein* (dLDL) dan OxLDL yang dominan. Lp-PLA₂ menghidrolisis fosfolipid yang teroksidasi dari OxLDL untuk menghasilkan *Lysophosphatidylcholine* (LysoPC) dan *oxidized Non Esterified Fatty Acids* (oxNEFA). Kedua produk ini memiliki sifat proinflamasi dan aterogenik yang merupakan kontributor penting untuk terjadinya aterosklerosis pada diabetes (5).

Darapladib sebagai inhibitor Lp-PLA₂ adalah sebuah novel, selektif, inhibitor oral aktif Lp-PLA₂ dan pengembangan klinis sebagai agen anti

atherosklerotik yang potensial bila diberikan dalam kombinasi standar saat perawatan pengobatan pasien dengan sindrom koroner akut atau penyakit jantung koroner (11) (14). Beberapa penelitian terdahulu menyatakan bahwa darapladib menunjukkan hasil signifikan dalam menghambat proses atherosclerosis. (18). Baik pada uji in vitro (19) maupun in vivo (7) . Dari beberapa studi ini menunjukkan bahwa darapladib aman dan dapat menurunkan kemungkinan kejadian kardiovaskular. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari darapladib terhadap kadar Ox-LDL dan jumlah vasa vasorum.

METODE

Darapladib

Darapladib diperoleh dari Glaxo Smith Kline dalam bentuk bubuk. Dosis pemberian darapladib 20mg/Kg/BB setiap hari secara oral selama 8 minggu dan 16 minggu. Diet tinggi lemak (HFD) diberikan kepada tikus selama perlakuan.

Study Group

Total keseluruhan sampel yang digunakan dalam penelitian sebanyak 30 ekor tikus *Sprague Dawley* berbobot 150-200 gram, usia 6-8 minggu, diperoleh dari Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia. Masing-masing dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok normal (N) dengan diet standar, kelompok diabetes

melitus tipe 2 (DM) dengan diet tinggi lemak, dan kelompok diabetes melitus tipe 2 dengan diet tinggi lemak dan darapladib (DMDP). Setiap kelompok dibagi menjadi dua seri waktu yaitu, 8 minggu dan 16 minggu.

Pengukuran Kadar Glukosa Darah, Kadar Insulin Plasma, dan Resistensi Insulin

Pembuatan tikus model DM tipe 2 dengan pemberian diet tinggi lemak dan injeksi STZ dosis rendah (30 mg/kg berat badan) secara intraperitoneal. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan alat AccuCheck™, darah diambil dari ujung ekor tikus kemudian diteteskan ke *glucostick*. DM tipe 2 didiagnosis setelah kadar glukosa darah >200/mg/dL pada tikus. Sedangkan untuk pengukuran kadar insulin plasma dilakukan dengan menggunakan metode *Sandwich ELISA* menggunakan Rat INS (Insulin) ELISA kit (Cat. No. E-EL R2466). Hasil insulin yang didapat masih dalam satuan ng/mL Untuk konversi kadar insulin plasma dari ng/mL ke IU/L maka menggunakan rumus WHO dengan cara membaginya dengan 0,0347, karena 1 IU ekuivalen dengan 0,0347 mg/L (2). Untuk pengukuran resistensi insulin dilakukan menggunakan rumus HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*) untuk model hewan coba tikus, dengan data yang dibutuhkan adalah kadar glukosa

darah puasa dan kadar insulin plasma (17).

Pengukuran Vasa Vasorum

Pengukuran jumlah vasa vasorum dilakukan setelah pembedahan tikus dengan jaringan yang akan diamati adalah aorta. Jaringan difiksasi menggunakan buffer formalin 10% selama semalam kemudian preparat diwarnai dengan Hematoksin Eosin agar vasa vasorum dapat diamati. Pembacaan vasa vasorum dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan *software* dotSlide Olyvia versi 2.4 (Olympus America inc., Center Valley, PA, USA) dengan keseluruhan lapang pandang untuk setiap sediaan aorta. Vasa vasorum dikarakteristikan dengan gambaran lumen di dalam lapisan aorta yang berisi eritrosit dibagian tengah berwarna merah muda.

Analisis Statistik

Uji *One-Way analysis of variance* (ANOVA) digunakan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian darapladib terhadap profil lipid, kadar Ox-LDL, dan jumlah vasa vasorum pada tikus *Sprague-Dawley* model diabetes melitus tipe 2. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan Uji Post Hoc Duncan metode Tukey HSD

untuk mendeteksi perbedaan parameter pada setiap grup. Analisis statistik menggunakan *software* SPSS versi 16 (IBM Corporation, New York, NY, USA).

HASIL

Kadar Glukosa Darah, Kadar Insulin Plasma dan Resistensi Insulin

Pembuatan tikus model DM tipe 2 dikatakan berhasil dapat diketahui dari pengukuran kadar glukosa darah, kadar insulin plasma, dan resistensi insulin. Rata-rata kadar glukosa darah puasa tertinggi terjadi pada kelompok tikus DM 16 minggu sebesar 148 mg/ml. Rata-rata Kadar insulin tertinggi juga terjadi pada kelompok tikus DM 16 minggu sebesar 11,2 IU/L. Dari rumus HOMA-IR kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin adalah kelompok tikus DM 16 minggu sebesar 3,789 ($> 1,716$). Pada kelompok DM 8 minggu memang belum sampai terjadi resistensi insulin karena nilainya belum melebihi nilai cut-off. Namun, telah terjadi peningkatan nilai HOMA-IR dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM 8 minggu sudah mendekati terjadinya kejadian resistensi insulin seperti yang bisa dilihat pada tabel 1.1.

Table 1.1 Rata-rata Kadar Gula Darah, Kadar Insulin Plasma, dan Resistensi Insulin Setiap Kelompok Tikus

Parameter		Kelompok Perlakuan					
		N 8	DM 8	DM + DP 8	N 16	DM 16	DM + DP 16
Kadar Gula Darah	(mg/ml) (x±SD)	91,6±7,16	128±15,01	103,6±13,72	79,6±14,63	147,8±58,22	101,8±19,07
	(mmol/L) (x±SD)	5,08±0,39	6,21±1,11	5,52±0,89	4,42±0,81	5,03±0,33	5,65±1,05
Kadar Insulin Plasma	(ng/mL) (x±SD)	4,664±0,425	12,071±1,781	5,704±0,573	5,124±0,297	40,220±4,161	8,327±0,859
	(IU/L) (x±SD)	1,344±0,123	3,463±0,513	1,644±0,165	1,477±0,086	11,186±0,909	2,4±0,248
Resistensi Insulin	Nilai HOMA-IR (x±SD)	0,486±0,067	1,551±0,496	0,647±0,141	0,462±0,079	3,789±0,417	0,954±0,142
	Interpretasi	Normal	Normal	Normal	Normal	Resistensi Insulin	Normal

Pengaruh Treatment Darapladib terhadap Jumlah Vasa Vaorum

Perhitungan jumlah vasa vasorum menggunakan teknik manual. Tabel 1.2 menunjukkan hasil pengukuran rata-rata jumlah vasa vasorum pada tiap kelompok tikus. Dari tabel 1.2 didapatkan bahwa pemberian darapladib menurunkan rata-rata jumlah vasa vasorum yang diamati pada aorta tikus. Jumlah vasa vasorum

tertinggi dapat diamati pada kelompok DM 16 minggu dengan rata-rata sebanyak $18 \pm 5,891$ sel/penampang. Sementara itu, jumlah vasa vasorum terendah didapatkan pada kelompok normal 8 minggu dengan rata-rata sebanyak $5 \pm 1,581$. *One-way ANOVA* test menunjukan bahwa pengaruh darapladib memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap jumlah vasa vasorum ($p = 0,000$). Darapladib bermanfaat dalam menurunkan jumlah vasa vasorum.

Table 1.2 Rata-rata Jumlah Vasa Vasorum Setiap Kelompok Tikus (Sel/Penampang)

Parameter	Kelompok Perlakuan						p (ANOVA p < 0,05)
	N 8	DM 8	DM + DP 8	N 16	DM 16	DM + DP 16	
Jumlah Vasa Vasorum	5±1,581 ^a	15±3,391 ^{bc}	11±4,930 ^{ab}	7±2,345 ^a	18±5,891 ^c	8±2,967 ^{ab}	0,000

DISKUSI

High Fat Diet (HFD) yang diberikan kepada tikus mampu meningkatkan kadar gula darah yang menginduksi terjadinya diabetes melitus tipe 2 (15). Hal ini sesuai dengan penelitian Mawarti H, Ratnawati R & Lyrawati D pada tahun 2012. Penelitian tersebut membuktikan bahwa pemberian

HFD selama 8 minggu kepada tikus dapat menginduksi resistensi insulin dan juga memicu terjadinya suatu kondisi metabolik berupa obesitas pada tikus. Apabila kejadian ini terjadi terus menerus secara kronis, maka akan ada desensitisasi reseptor insulin. Sehingga untuk memasukkan glukosa dalam jaringan sel

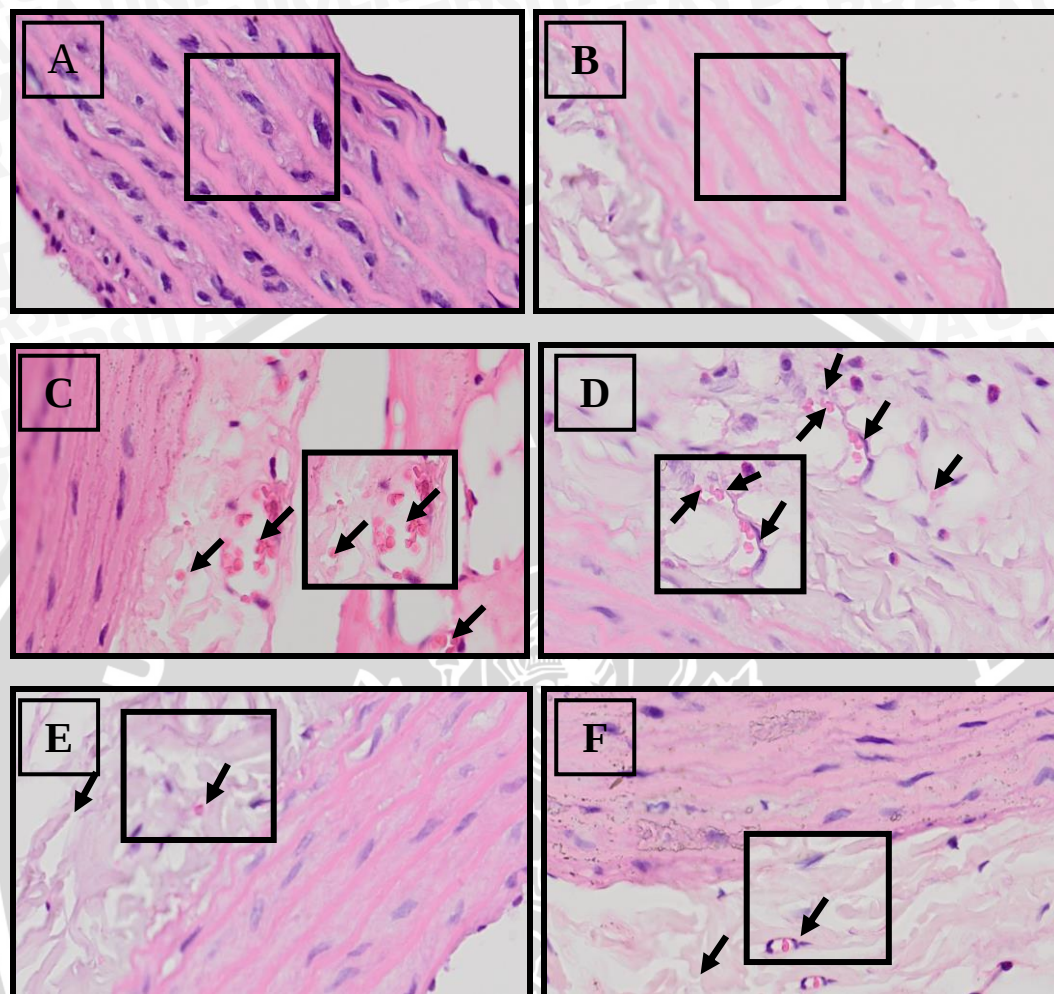
dibutuhkan insulin dalam plasma lebih tinggi. Kelompok tikus yang mengalami resistensi insulin adalah kelompok tikus DM 16 minggu sebesar 3,789 ($> 1,716$). Pada kelompok DM 8 minggu memang belum sampai terjadi resistensi insulin karena nilainya belum melebihi nilai cut-off. Namun, telah terjadi peningkatan nilai HOMA-IR dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM 8 minggu sudah mendekati terjadinya kejadian resistensi insulin. Kelainan pada metabolisme lipoprotein juga berhubungan dengan DM tipe 2 dan memicu perkembangan aterosklerosis (6).

Proses lipolisis yang tinggi, menyebabkan peningkatan kadar asam lemak bebas (*free fatty acid*). Di liver, asam lemak bebas akan diubah menjadi trigliserida. Peningkatan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) distimulasi oleh kadar trigliserida (TG) yang tinggi. Tingginya TG dan peningkatan kadar VLDL didalam plasma menyebabkan penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) dan meningkatnya kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL). Kondisi ini disebut dengan dislipidemia (12). Hiperkolesterol berhubungan dengan disfungsi endotel yang terlibat dalam proses aterogenesis. Dalam kondisi ini profil lipid memburuk dan stress oksidatif mendominasi dan sehingga membuat oksidan dan antioksidan tidak seimbang (21). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan stress oksidatif menyebabkan LDL

teroksidasi menjadi Ox-LDL. Stress oksidatif menyebabkan oksidasi LDL akan ditangkap lebih mudah oleh makrofag dibandingkan lipoprotein non oksidasi (1).

Media terluar arteri besar yaitu tunika adventitia dan tunika media mendapatkan vaskularisasi dari vasa vasorum yang menyuplai oksigen dan nutrisi. Penebalan dinding arteri yang terjadi pada aterosklerosis menyebabkan hipoksia. Stress oksidatif dalam aterosklerosis menghasilkan H_2O_2 dan memicu aktivasi NF- κ B dan peningkatan iNOS. Pembentukan vasa vasorum terjadi pada proses aterosklerosis. Angiogenesis vasa vasorum dimediasi oleh VEGFR-1 dan diregulasi oleh HIF-1 α . Vasa vasorum yang baru terbentuk memiliki sifat mudah rapuh dan immature. Hal ini meningkatkan ketidakstabilan plak (20).

Baru-baru ini, salah satu lipid biomarker lipoprotein terkait fosfolipase A_2 (Lp-PLA $_2$) memiliki peranan cukup besar dalam terjadinya atherosclerosis (8). Data eksperimental menunjukkan bahwa Lp-PLA $_2$ memiliki efek proinflamasi yang mempengaruhi dinding pembuluh darah (9). Berdasarkan data yang disajikan dalam tabel 1.2, jumlah vasa vasorum dari tikus pada kelompok DMDP 8 minggu menunjukkan rata-rata sebesar $11 \pm 4,930$ sel/penampang dengan nilai minimum 4 sel/penampang dan nilai maksimum 15 sel/penampang. Kelompok DMDP 16 minggu menunjukkan rata-rata sebesar $8 \pm 2,967$ sel/penampang dengan nilai



Gambar 1.1 Identifikasi Vasa Vasorum dengan pengecatan HE. (A) Kelompok normal 8 minggu. (B) Kelompok normal 16 minggu. (C) Kelompok diabetes melitus 8 minggu. (D) Kelompok diabetes melitus 16 minggu. (E) Kelompok diabetes melitus + darapladib 8 minggu. (F) Kelompok diabetes melitus + darapladib 16 minggu. Perbesaran 400 kali (40 Objektif x 10 Okuler).

minimum 5 sel/penampang dan nilai maksimum 13 sel/penampang. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok model DM tipe 2 yang diberikan darapladib memiliki jumlah vasa vasorum yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus kelompok DM tipe 2. Bahkan pada tikus kelompok DMDP 16 minggu nilainya mendekati jumlah vasa vasorum yang dimiliki oleh kelompok normal 16 minggu. Hal ini bisa jadi disebabkan oleh karena pemberian

darapladib selama 16 minggu lebih efektif dari pada pemberian darapladib selama 8 minggu. Namun, pemberian darapladib selama 8 minggu sudah mampu menurunkan jumlah vasa vasorum bila dibandingkan dengan kelompok tikus DM tipe 2 selama 8 minggu.

Selain dari jenis pakan yang diberikan, usia juga merupakan faktor yang mempengaruhi terjadinya

peningkatan jumlah vasa vasorum. pada tabel **1.2**, bisa kita lihat bahwa kelompok DMDP 16 minggu memiliki jumlah vasa vasorum yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok DMDP 8 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa usia yang semakin tua berbanding terbalik dengan jumlah vasa vasorum. Semakin lama pemberian darapladib maka jumlah vasa vasorum akan semakin menurun. Berdasarkan uji *One-way ANOVA*, didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,005$) pada kelompok DMDP 16 minggu. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh darapladib terhadap penurunan jumlah vasa vasorum pada kelompok DM tipe 2 yang diberikan darapladib dalam serial waktu 16 minggu. Sedangkan pada kelompok DMDP 8 minggu didapatkan perbedaan yang signifikan hanya jika dilihat dari perhitungan, namun belum memberikan hasil yang signifikan secara statistik. Penurunan disebabkan oleh mekanisme darapladib yang mampu menghambat pembentukan Lp-PLA₂ sehingga juga menghambat terjadinya angiogenesis pembentukan vasa vasorum lebih lanjut.

KESIMPULAN

Penelitian pemberian darapladib 20 mg/kg/BB dalam dua serial waktu 8 minggu dan 16 minggu pada tikus diabetes melitus tipe 2 menunjukkan bahwa darapladib dapat menurunkan jumlah vasa vasorum. Darapladib memiliki peranan sebagai inhibitor Lp-PLA₂ pada proses aterosklerosis yang bisa diukur dari parameter perubahan jumlah vasa vasorum.



DAFTAR PUSTAKA

1. Antoniades C, Tousoulis D, Stefanidis C. 2007. Effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism on oxidative stress, inflammatory status and coronary atherosclerosis: an example of transient phenotype. *J Am Coll Cardiol* 49: 1226.
2. Burns T.A. et al., 2010. Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression Profiles in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Depots of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Light Breed Horses. *J Vet Intern Med.* 2010;24:932–939.
3. Cacho, J., J. Sevellano, J. de Castro, E. Herrera and M.P. Ramos, 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in wistar and sprague-dawley rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295: E1269-E1276. DOI: 10.1152/ajpendo.90207.2008.
4. Dahlof, Bjorn. 2010. Cardiovascular Disease Risk Factors: Epidemiology and Risk Assessment. *Ann J Cardiol.* 105(suppl):3A-9A.
5. Garg, Seema., Madhu, S.V., and Suneja, Shilpa. 2015. Lipoprotein associated phospholipase A2 activity & its correlation with oxidized LDL & glycaemic status in early stages of type-2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Medical Research.* 141(1): 107–114.
6. Heriansyah, T., Wihastuti, T. A., Sargowo, D., Widodo, M. A., Anjani, P. M., Suparno, T. D., Puspitasari, F. I. 2014. Reduction Of Histopathological Images Through A Decrease In H2O2 Levels In Diabetic Rats With Polysaccharide Peptides. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 1–7.
7. Heriansyah, T., Wihastuti, T., Anita, K., Iskandar, A., Suhendra, R., Setiabudi, P., Sishartami, L., 2015. Atherogenesis inhibition by darapladib administration in ayslipidemia model Sprague-Dawley rats. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.* 6, 7.
8. Karakas, Mahir and Koenig, Wolfgang. *Lp-PLA2 Inhibition-The Atherosclerosis Panacea?*, 2010. *Journal Pharmaceuticals.* 2010; 3: 1360-1373.
9. Katan Mira, et al. *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Is Associated with Atherosclerotic Stroke Risk: The Northern Manhattan Study*, 2014. NCBI. 2014; Volume 9: Issue 1.
10. Mawarti, Herin., Ratnawati, Retty., Lyrawati, Diana. 2012. Epigallocatechin Gallate Menghambat Resistensi Insulin pada Tikus dengan Diet Tinggi Lemak. *Jurna Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXVII, No. 1, Februari 2012.
11. Mohler ER, 3rd, Ballantyne CM, Davidson MH, Hanefeld M, Ruilope LM, Johnson JL, and Zalewski A. Darapladib Investigators (2008). *The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* *J Am Coll Cardiol* 51:1632–1641..
12. Mooradian, Arshag D. 2009. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance And Dyslipidemia In Type 2 Diabetes Mellitus. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 5(3): 150-159.
13. Reynolds LA, Tansey EM. 2006. Cholesterol, Atherosclerosis and Coronary Disease in The UK 1950-

2000. London : Wellcome Trust Centre 27.

14. Serruys PW, García-García HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, Duckers H, Bleie O, Dudek D, and Bøtker HE, *et al.*; *Integrated Biomarker and Imaging Study-2 Investigators* (2008) *Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque*. *Circulation* 118:1172–1182.
15. SH, Bintari., K, Nugraheni. 2012. Penurunan Kadar Gula Darah Akibat Pemberian Extra Virgin Olive Oil (Studi pada Tikus Galur Sprague Daley yang diinduksi Pakan Tinggi Lemak). *Jurna MIPA*, 35 (2):116-121.
16. Spector W.G, Spector T.D. 1993. *Pengantar Patologi Umum*. Alih Bahasa: Soetjipto, Harsoyo, Hana Amelia, Astuti Pudji. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
17. Van Dijk JW, Venema M, Van Mechelen W, Stehouwer CD, Hartgens F, 2013. Effect of moderate-intensity exercise versus activities of daily living on 24-hour blood glucose homeostasis in male patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 36: 3448-3453.
18. Wang, W., Zhang, J., Wu, W., Li, J., Ma, Y., Chen, W., Yan, H., Wang, K., Xu, W., Shen, J., Wang, Y., 2011. Inhibition of lipoprotein associated phospholipase A2 ameliorates inflammation and decreases atherosclerotic plaque formation in ApoE-deficient mice. *PLoS One* 6, e23425.
19. White, H., Held, C., Stewart, R., Watson, D., Harrington, R., Budaj, A., Steg, P.G., Cannon, C.P., Krug-Gourley, S., Wittes, J., Trivedi, T., Tarka, E., Wallentin, L., 2010. Study design and rationale for the clinical outcomes of the STABILITY Trial (STabilization of Atherosclerotic plaque by Initiation of darapLadib Therapy) comparing darapladib versus placebo in patients with coronary heart disease. *Am. Heart J.* 160, 655–661.e2.doi:10.1016/j.ahj.2010.07.006.
20. Wihastuti, Andri, Titin, *et al.*, 2014. Vasa vasorum anti-angiogenesis through H₂O₂, HIF-1 α , nF- κ B, and iNOS inhibition by mangosteen pericarp ethanolic extract (*Garcinia mangostana* linn) in hypercholesteroldiet-given *Rattus norvegicus* Wistar strain. *Vascular Health and Risk Management*. 2014:10, 523-531.
21. Wihastuti, Andri, Titin, *et al.*, 2015. Study of the inhibition effect of ethanolic extract of mangosteen pericarp on atherogenesis in hypercholesterolemic rat. *APJTD*. 2015; 5(10): 830-834.
22. World Health Organization. Cardiovascular Disease. [Online]. [cited 2015 November. Available from: "http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en".