

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Pada bagian ini dijelaskan mengenai teori-teori mengenai ateroskleosis yang diberikan diet tinggi lemak terhadap pemberian Darapladib tentang jumlah vasa vasorum di lapisan aorta tikus *Sprague-Dawley*. Berikut ini penjelasan mengenai proses aterosklerosis dengan pemberian Darapladib.

2.1 Aterosklerosis

2.1.1 Definisi

Aterosklerosis terdiri 2 kata yaitu kata *athero* dan *sklerosis*. Kata *athero* berasal dari bahasa Yunani (*athera*) suatu bentuk mengenai degenerasi lemak atau atheroma. Sedangkan dalam bahasa Yunani, *sklerosis* berarti indurasi atau pengerasan, sehingga digabungkan menjadi degenerasi timbunan lemak-lemak mengalami pengerasan, dan menyebabkan munculnya komplikasi penyakit kardiovaskuler oleh berbagai faktor. Aterosklerosis adalah peningkatan jumlah plak atheroma dalam dinding arteri muskuler besar hingga sedang dan arteri elastik besar (Libby, *et al.*, 2011).

Menurut kriteria plak aterosklereosis secara histologi dibagi menjadi dua, yaitu *vulnerable plaques* dengan *cap fibrous* yang tipis ($FCT < 100\mu m$) dan *stable plaque* dengan *cap fibrous* yang lebih tebal dari $100\mu m$ (Bobryshev, *et al.*, 2008).

Pada lipid core terdiri dari bagian tengah yang halus, kuning, berisi lemak terutama kolesterol dan debris sel. Sedangkan bagian fibrous cap terdiri dari sel otot polos, makrofag, sel busa, kolagen, elastin, proteoglikan, dan juga neovaskularisasi. Menurut *American Heart Association* 2013, penebalan dan pengerasan dinding arteri menyebabkan terjadinya penurunan aliran darah dan suplai oksigen ke jaringan. Pada lapisan intima arteri ditandai dengan terjadinya proses penimbunan substansi lemak, kolesterol, kalsium, fibrin.

Aterosklerosis merupakan respon terjadinya inflamasi kronik bersifat progresif, terhadap pembentukan lipoprotein pada dinding arteri. Bentuk spesifik aterosklerosis yaitu arteriosklerosis, karena pembuluh arteri yang paling tersering mengalami pengerasan dalam tubuh manusia (Gregory dan Michael, 2009). Arteri merupakan pembuluh darah yang paling kaya mengandung oksigen yang sangat berguna mensuplai jantung menuju organ lainnya. Struktur arteri yang sehat bersifat kuat, elastis dan fleksibel, serta lapisannya sangat licin. Namun jika lapisan-lapisan arteri mengalami tekanan maka akan terjadi hambatan dalam mensuplai beberapa organ dan jaringan tubuh. Jika sumbatan mengenai arteri pembuluh otak maka akan terjadi stroke, sedangkan bila menyumbat arteri jantung maka akan terjadi jantung koroner. Mekanisme sumbatan dinding arteri akan menentukan awal terjadinya penyakit komplikasi aterosklerosis.

Proses aterosklerosis dipengaruhi akumulasi lipid oleh munculnya *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan disfungsi endotel menarik migrasi lipoprotein semakin banyak ke *subendothelial space* (Wang, *et al.*, 2012). Akibatnya sel endotel pembuluh darah akan mengalami penurunan Nitrit Oksida (NO), oksigen (O₂), dan peningkatan produksi *superoksida*. Penimbunan plak menyebabkan terjadinya hipoksia jaringan dan terjadi *Diffuse Intimal Thickening*

(DIT), sehingga terjadi perluasan lapisan intima bagian *Internal Elastic Lamina* (IEL) oleh proliferasi sel inflamasi dan produksi matrik plak atheroma. Hal ini menyebabkan intima bagian *External Elastic Lamina* (EEL) mengalami hipoksia akibat jarak difusi meningkat (Subbotin, 2012). Diperlukan proses angiogenesis vasa vasorum dalam membantu mencegah kematian sel akibat hipoksia. Pertumbuhan neovaskularisasi vasa vasorum menjadi tidak terkontrol, sehingga mudah ruptur *immature*, dan mudah terjadi pendarahan intraplak. Oleh sebab itu, terjadi peningkatan jumlah vasa vasorum menandakan tingkat hipoksia akibat progresitas plak aterosklerosis.

2.1.2 Etiologi dan Faktor Resiko

Aterosklerosis merupakan inflamasi kronis pada dinding pembuluh darah, sehingga akan menyebabkan disfungsi endotel (Mudau, *et al.*, 2012). Penimbunan plak akan semakin meningkat, sehingga respon imun akan mengundang sel inflamatori menuju lokasi yang mengalami jejas. Oleh karena proses inflamasi, monosit akan menjadi makrofag dan berikatan LDL teroksidasi yang akan menjadi sel busa (*foam cell*). Proses oxLDL menyebabkan kerusakan endotel pembuluh darah semakin cepat, dan akan terjadi *fatty streak* dalam lapisan pembuluh darah. Pada lumen pembuluh darah akan mengecil, karena pembesaran plak aterosklerotik yang menyebabkan terjadinya *fibrous cup*. Akhirnya aliran pembuluh darah akan tersumbat baik oleh plak yang besar ataupun rupturnya plak, sehingga suplai oksigen organ dan jaringan menjadi berkurang (American Heart Association, 2015).

Mekanisme terjadinya aterosklerosis dipengaruhi oleh beberapa faktor resiko, sehingga memicu stimulus terjadinya disfungsi endotel pembuluh darah. Faktor terjadinya aterosklerosis dibagi menjadi 2 kelompok yaitu minor dan mayor. Berikut pembagian kelompok faktor penyebab aterosklerosis :

Tabel 2.1 Faktor resiko minor dan mayor aterosklerosis (AHA, 2014)

Faktor Minor	Faktor Mayor
Stress	Tidak dapat dimodifikasi
Diet dan nutrisi	Umur
Alkohol	Jenis kelamin
	Keturunan (ras)
	Dapat dimodifikasi
	Hiperkolesterol
	Hipertensi
	Diabetes millietus
	Merokok

Aterosklerosis bersifat multifaktorial yang menyebabkan gangguan metabolisme lemak, sehingga terjadi hiperkolesterolemia dengan kadar LDL yang tinggi dan dianggap sebagai salah satu faktor risiko utama aterosklerosis (Boudewijn, *et al.*, 2013). Dislipidemia merupakan faktor utama terjadinya aterosklerosis. Penumpukan plak oleh tingginya kadar lipid yang mengandung kolesterol dan ester kolesteril plasma dalam dinding pembuluh darah akan menyebabkan penyempitan lumen, sehingga aliran pembuluh darah ke organ dan jaringan menjadi terganggu.

2.2 Dislipidemia

2.2.1 Definisi

Dislipidemia adalah kelainan metabolisme lipid yang ditandai dengan peningkatan maupun penurunan fraksi lipid dalam plasma berupa kenaikan kadar

kolesterol total, kolesterol LDL, kenaikan kadar trigliserida serta penurunan kadar HDL (Jellinger, *et al.*, 2012) Faktor predisposisi utama terbentuk plak atheroma yaitu meningkatnya kadar LDL dalam pembuluh darah menuju jaringan subendotel. *Low Density Lipoprotein* (LDL) mengandung banyak kolesterol ester yang berdensitas lebih kecil dan lebih aterogenik, sehingga resiko terjadinya aterosklerosis akan meningkat. Peningkatan kadar LDL di dalam subendotel akan terjadi oksidasi LDL. Penyerapan OxLDL oleh reseptor scavenger menyebabkan akumulasi kolesterol dalam sel busa lesi aterosklerotik. Akumulasi OxLDL di sel busa pada lesi aterosklerotik dari arteri manusia koroner, arteri karotis, dan aorta kelinci WHHL (*Watanabe Heritable Hypercholesterolemic*) telah ditunjukkan oleh analisis imunohistokimia menggunakan anti-OxLDL antibodi monoklonal (Nishi, *et al.*, 2002). OxLDL menginduksi sejumlah efek proaterosklerotik termasuk aktivasi endotel dan proliferasi otot polos sehingga mengakibatkan terbentuknya plak aterosklerosis. Kriteria dislipidemia pada manusia dikelompokkan menjadi tingkat optimal (normal), beresiko dan tingkat yang sangat berbahaya terhadap terjadinya resiko penyakit kardiovaskuler. Dibawah ini terdapat kriteria dislipidemia pada manusia tabel 2.2

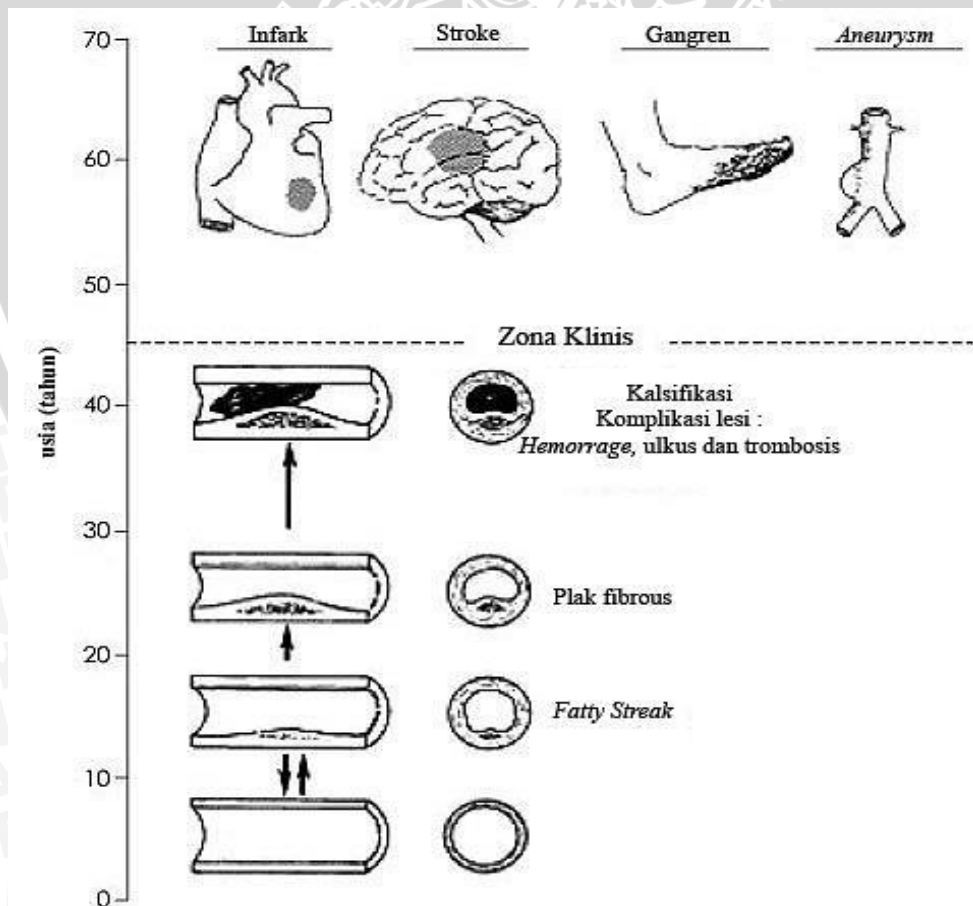
Tabel 2.2 Kriteria dislipidemia pada manusia (AACE, 2012)

Total Cholesterol mg/dL	HDL Cholesterol mg/dL	LDL Cholesterol mg/dL	Triglycerides mg/dL
<i>Optimal</i> <200	<i>Negative Risk Factor</i> ≥60	<i>Optimal</i> <100	<i>Optimal</i> <150
<i>Boderline</i> 200-239	<i>Borderline men</i> 40-59	<i>Near optimal</i> 100-129	<i>Borderline</i> 150-190
<i>High risk</i> ≥240	<i>Borderline women</i> 50-59	<i>Borderline</i> 130-159	<i>High risk</i> 200-499
	<i>High risk men</i> <40	<i>High risk</i> 160-189	<i>Very High risk</i> ≥500
	<i>High risk women</i> <50	<i>Very High risk</i> ≥190	

Keterangan:

- Antara kedua *borderline* dan *high risk* dapat bernilai signifikan terhadap kombinasi dislipidemia atau dislipidemia dengan diabetes mellitus yang beresiko >1000 terjadi pancreatitis
- Pengurangan jumlah HDL pada wanita dapat mengindikasikan sindrom resistensi insuli

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hong, mengatakan bahwa proses aterosklerosis dapat dimulai saat masa anak-anak, namun hanya sebatas. Perkembangan plak diusia remaja dipengaruhi oleh beberapa faktor resiko yang mencakup obesitas, hipertensi, dislipidemia, diabetes melitus dan merokok. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pencegahan primer penyakit aterosklerosis harus dimulai saat anak-anak sebagai langkah awal mencegah atau menunda CVD (Hong, 2010). Faktor usia mempengaruhi tingkat keparahan aterosklerosis lebih meningkat, akibat pengaruh konsumsi makanan yang tidak sehat yang menyebabkan perkembangan plak semakin meningkat. Oleh sebab itu perlunya mengontrol kadar kolesterol dan pola makan agar dapat menghambat progrevitass plak aterosklerosis.



Gambar 2.1 Perkembangan plak berdasarkan usia (Hong, 2010)

Pada tikus *Sprague-Dawley* mempunyai nilai kriteria yang berbeda terhadap profil lipid. Terdapat perbedaan kriteria antara profil lipid manusia dengan tikus. Pengukurannya berdasarkan konsentrasi kolesterol total, HDL, LDL, dan Triglycerida pada serum tikus. Berikut data hasil pemberian HFD pada tikus *Sprague-Dawley* yang diberikan selama 8, 12, dan 16 minggu. Berikut pedoman hasil yang digunakan dalam membuat tikus *Sprague Dawley* menjadi dislipidemia.

Tabel 2.3 Kriteria tikus *Sprague-Dawley* yang diberikan HFD pada kelompok normal, 8, 12, dan 16 minggu (**Jing wu, et al., 2014**)

Profil lipid	Normal	Minggu 8	Minggu 12	Minggu 16
	Rata-rata ± sd (mmol/L)	Rata-rata ± sd (mmol/L)	Rata-rata ± sd (mmol/L)	Rata-rata ± sd (mmol/L)
Total Kolesterol	1,76 ± 0,28	1,97 ± 0,46	2,10 ± 0,48	2,51 ± 0,59
HDL	0,55 ± 0,10	0,53 ± 0,09	0,47 ± 0,10	0,50 ± 0,10
LDL	0,24 ± 0,05	0,68 ± 0,15	0,83 ± 0,30	1,21 ± 0,31
Triglycerida	0,56 ± 0,12	0,57 ± 0,10	0,59 ± 0,13	0,61 ± 0,14

2.2.2 Metabolisme lipid

Lipid merupakan zat organik hidrofobik yang bersifat sukar larut *dalam* air, sehingga tidak larut dalam plasma darah. Dibutuhkannya pelarut yang mampu mengikat lemak pada protein yang larut dalam air, ikatan antara lipid dan protein disebut dengan lipoprotein. Lipoprotein adalah senyawa kompleks antara lemak dan protein. Terdapat empat kelompok utama lipoprotein yaitu; kilomikron, VLDL, HDL, dan LDL. Kilomikron berasal dari penyerapan trigliserida dan lipid lain di usus halus, dengan densitas sekitar 0,93 g/ml. VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) berasal dari hati yang memiliki komposisi trigliserida yaitu 59% dari berat partikel. HDL (*High Density Lipoprotein*) merupakan lipoprotein yang berperan dalam mengangkut kolesterol dari sel dan membawanya ke hati untuk

di eliminasi secara parsial dari tubuh, terdiri dari 50% protein dan 50% protein. LDL (*Low Density Lipoprotein*) merupakan tahap akhir metabolisme VLDL yang mengangkut kolesterol dari hati, termasuk sel endotel pembuluh darah. LDL merupakan kolesterol buruk karena berkontribusi dalam progresifitas plak aterosklerosis.

Pada metabolisme lipoprotein terdapat dua jalur yaitu jalur eksogen, dan jalur endogen. Jalur metabolisme eksogen, trigliserida dan kolesterol berasal dari makanan maupun hati diserap menuju mukosa usus halus. Trigliserida mengalami perubahan menjadi asam lemak bebas, sedangkan kolesterol mengalami esterifikasi menjadi kolesterol ester. Asam lemak bebas di usus halus diubah kembali menjadi trigliserida. Kolesterol ester, trigliserida, apolipoprotein, dan fosfolipid akan membentuk kilomikron. Trigliserida dalam kilomikron akan mengalami hidrolisis, sehingga kilomikron kehilangan sebagian besar trigliserida, lalu kilomikron ini akan menuju ke hati (Mansbach dan Gorelick, 2007).

Jalur metabolisme endogen dimulai ketika hati mensintesis kolesterol dan trigliserida lalu akan disekresikan ke sirkulasi sebagai lipoprotein VLDL. Dalam sirkulasi kadar VLDL akan mengalami hidrolisa oleh enzim lipoprotein lipase menjadi IDL. Kemudian IDL terhidrolisa kembali menjadi LDL melalui serangkaian proses yang kaya kadar kolesterol. Dalam tubuh memerlukan sedikit kolesterol, dan sisa kolesterol yang tidak diperlukan akan dilepaskan dalam darah yang akan berikatan dengan HDL. Sebagian dari LDL akan mengalami oksidasi, lalu ditangkap oleh reseptor scavenger oleh makrofag dan menjadi sel busa (*foam cell*) (Lee, *et al.*, 2014).

Peningkatan level plasma LDL-C juga dipengaruhi oleh usia, menurut studi Framingham, wanita dan pria akan mengalami kolestrol tinggi saat usia 20-60 tahun. Tetapi pria akan lebih meningkat pada usia setelah umur 20 tahun, sedangkan saat wanita LDL-C akan meningkat saat usia setelah 50 tahun karena faktor menopause. Faktor lain yang mempengaruhi yaitu makanan yang mengandung diet tinggi lemak jenuh, tinggi kolestrol, obesitas, kurang aktifitas, dll (Sorace, *et.al.*, 2006).

2.3 Dislipidemia terhadap Perkembangan Aterosklerosis

Perkembangan plak dipengaruhi oleh pola makan yang berkaitan erat dengan peningkatan kadar kolestrol, trigliserida, LDL tinggi akibat adanya asupan kolestrol dan lemak jenuh yang tinggi pada makanan dan beberapa faktor seperti merokok, kurang konsumsi serat, kurang berolah raga dan stres. Proses terbentuknya plak diawali usia anak-anak, dewasa, dan bermanifestasi terjadinya beberapa penyakit saat usia tua. Terjadinya peningkatan plak oleh akumulasi lipid terus-menerus akan mengaktifkan respon inflamasi pada endotel pembuluh darah. Akumulasi partikel LDL di *subendotelial space* akan berinteraksi dengan proteoglikan dan protein lainnya yang menyebabkan terjadinya modifikasi LDL (agregasi, *glycosylation*, enzimatis, proteolysis, oksidasi, dll), sehingga proses aterogenik meningkat dan terjadi retensi vascular intima yang menandakan lesi aterosklerosis (Badimon, *et al.*, 2009). Dalam perkembangan lesi, akumulasi lipid dipengaruhi oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan disfungsi endotel sehingga akan meningkatkan permeabilitas

migrasi lipoprotein. Disfungsi endotel merupakan pertanda awal munculnya aterosklerosis dalam lapisan pembuluh darah.

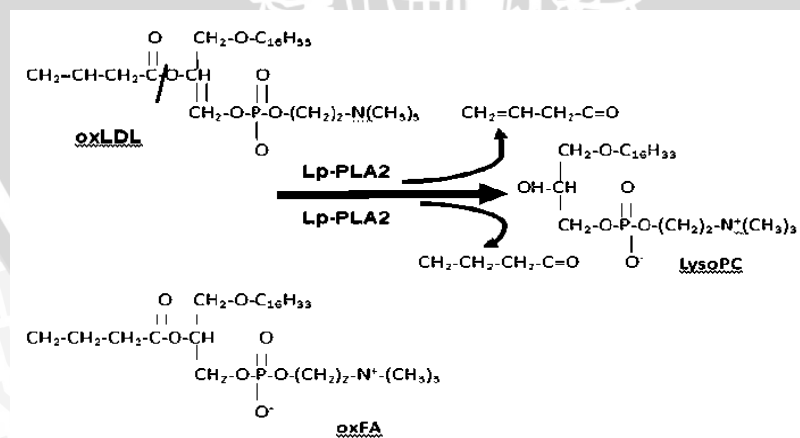
Disfungsi endotel merupakan pemicu terjadinya aterosklerosis, karena penimbunan plak pada pembuluh darah. Penyebab disfungsi endotel yaitu deposisi *low density lipoprotein* (LDL), hipertensi, merokok, ROS, dll. Disfungsi endotel terjadi akibat adanya lesi pembuluh darah, sehingga menyebabkan perubahan fungsi endotel yang sehat. Disfungsi endotel akan mengekspos reseptor kemokin, menurunkan produksi NO sehingga terjadi vasokonstriksi, agregasi platelet, dan perlekatan neutrofil ke endotel (Vogiatzi, *et al.*, 2009). Terjadinya abnormalitas fungsi endotel akan mengundang sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF α , dll) yang merupakan sitokin umum terjadinya aterosklerosis dan stabilisasi plak (Tedgui dan Mallat, 2006).

Peningkatan akumulasi lipoprotein akan menyebabkan senyawa lipid khususnya di lapisan luar LDL terperangkap di darah yang berpotensi mengalami oksidasi sehingga terbentuk oxLDL dan lipid peroksida. Oksidasi LDL menyebabkan perubahan muatan apoB-100 sehingga menjadi mLDL (*mild modified* LDL) mengaktifkan kemoatraktan sel-sel proinflamasi, dan menyebabkan terjadinya migrasi platelet, monosit dan sel T ke jaringan sub endotel (Singh, *et al.*, 2002). Pada sirkulasi pembuluh darah akan terjadinya infiltrasi mLDL ke dalam jaringan endotel. LDL teroksidasi akan terbentuk OxPC (*oxidized phosphatidylcholines*) (Adibhatla dan Hatcher, 2010). Proses OxLDL akan menstimulus reseptor Lp-PLA₂ untuk aktif menghidrolisis OxPC menghasilkan senyawa bioaktif yaitu LysoPC dan oxNEFA yang merangsang proses inflamasi semakin meningkat (Anping, *et al.*, 2013). Kemudian monosit bermigrasi menjadi makrofag di jaringan dinding pembuluh darah. Selain itu

monosit dan makrofag juga mengeluarkan sitokin proinflamasi yang berfungsi sebagai autokrin dalam mensekresikan enzim Lp-PLA₂ (Shi, *et al.*, 2007).

2.3.1 Peran Lp-PLA₂ sebagai Marker Aterosklerosis

Lp-PLA₂ (*Lipoprotein Associated Phospholipase A₂*) merupakan anggota kelompok enzim phospholipase A₂ yang merupakan kelompok enzim penghidrolisis asam lemak. Enzim ini disekresikan oleh makrofag, limfosit, dan sel mast sebagai sumber Lp-PLA₂ di plasma (Mcintyre, *et al.*, 2009). Plak aterosklerotik terutama inti lipid (*lipid core*) dan kapsul fibrosa lesi yang akan ruptur (*rupture prone lesion*). Hidrolisis asam lemak bebas dan 2-*lysophospholipid* dari fosfolipid diakibatkan oleh kinerja Lp-PLA₂ (Burke dan Dennis, 2008). Lp-PLA₂ termasuk enzim *Ca²⁺ independent phospholipase* dengan berat molekul 45 kDa. Oleh karena itu, Lp-PLA₂ dapat dipakai sebagai biomarker destabilisasi plak sebelum terjadi ruptur plak arteri dalam mencegah komplikasi penyakit kardiovaskuler (Sudhir, 2005).



Gambar 2.2 Hidrolisis OxLDL oleh Lp-PLA₂ (Neto HCCF, *et al.*, 2005)

Lp-PLA₂ disebut juga sebagai PAF-AH (*platelet activating factor asetilhydrolase*) merupakan enzim yang dihasilkan dan disekresikan oleh

monosit-makrofag sebagai respon terhadap pembentukan lipid peroksida khususnya senyawa PAF dan peroksida fosfokolin. Dalam sirkulasi kadar Lp-PLA₂ terikat apoB LDL sekitar 80% dan 20% terikat apoB lipoprotein lainnya. Pada manusia terbukti bahwa plasma Lp-PLA₂ terikat lipoprotein, di ujung karbonil dari apoB LDL (Wilensky dan Macphee, 2009). LDL (*low density lipoprotein*) akan mengalami oksidasi menjadi OxLDL. LDL di endotel khususnya senyawa fosfokolin sangat berpotensi mengalami oksidasi sehingga terbentuk OxPC. Kemudian akan berikatan dengan reseptornya dan menghidrolisis gugusan asil pendek posisi *sn-2* fosfolipid dari OxLDL membentuk 2 mediator lipid yang bioaktif yaitu *lysophosphatidylcholine* (LysoPC) dan asam lemak teroksidasi (Ox-NEFA) yang berperan penting dalam proses aterosklerosis.

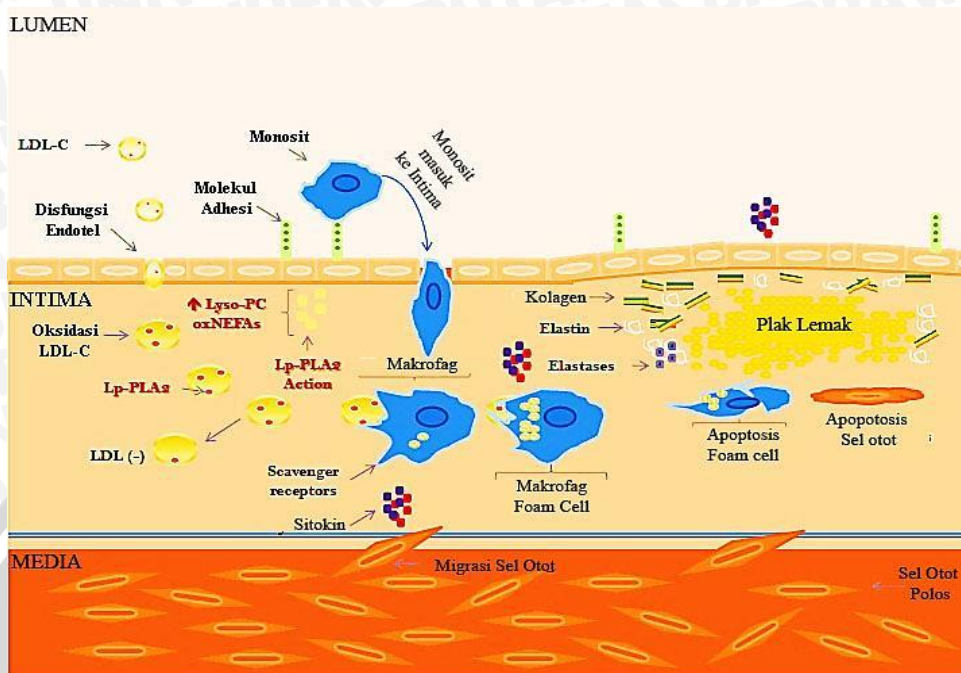
Sintesis Lp-PLA₂ dipengaruhi oleh OxLDL yang akan membentuk OxPC sebagai substrat reaksi hidrolisis. Jumlah Lp-PLA₂ yang terikat apoB LDL akan teramati dalam plasma yang dapat diperkirakan sesuai dengan bertambahnya usia. Senyawa bioaktif OxFA atau Ox-NEFA akan memicu proses aterosklerosis dengan meningkatkan stress oksidasi dan LDL teroksidasi serta lipoprotein lainnya di plasma dan dinding pembuluh darah (Khan-Merchant, *et al.*, 2002). Sedangkan LysoPC sebagai produk hidrolisis PC oleh Lp-PLA₂ mampu menginduksi respon inflamasi yang ditunjukkan oleh peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF α , serta menstimulasi endotel dengan mensekresi molekul adesi, sehingga memfasilitasi migrasi monosit dari sirkulasi masuk ke jaringan dinding pembuluh menjadi makrofag (Matsumo, *et al.*, 2007). Peningkatan sel inflamatori yang disertai diet tinggi lemak dalam jaringan aorta akan semakin meningkatkan produksi Lp-PLA₂ (Karakas dan Koeing, 2010).

Beberapa tahun ini banyak penelitian yang menghubungkan antara metabolisme lipid dan inflamasi proses aterosklerosis terhadap Lp-PLA₂ (Mohler, *et al.*, 2008).

Berdasarkan *The Lp-PLA₂ Studies Collaboration* tahun 2010 merupakan analisis besar dengan 32 studi prospektif meneliti hubungan pemberian Lp-PLA₂ dengan berkurangnya risiko penyakit jantung koroner dan stroke, sehingga tingkat kematian di dunia dapat menurun. Oleh sebab itu, Lp-PLA₂ menjadi marker aterogenesis yang berpotensi secara dini dalam mendeteksi aterosklerosis (Madjid, *et al.*, 2010).

2.3.2 Proses perkembangan plak aterosklerosis

Proses inflamasi pembuluh darah diakibatkan oleh disfungsi endotel, karena terjadi kerusakan barrier endotel yang menstimulus perubahan fungsi kinerjaseperti terjadinya pergerakan lipoprotein ke dalam dinding pembuluh darah. Peningkatan permeabilitas endotel membuat LDL menuju ke lapisan intima, sehingga berpengaruh terhadap sirkulasi darah. Ketika akumulasi LDL mengumpul di intima akan terakumulasi di subendotel dan berikatan dengan matriks ekstraseluler yaitu proteoglikan. Terikatnya LDL dengan proteoglikan mengakibatkan infiltrasi dan terperangkap lebih lama dalam jaringan dinding pembuluh darah dan akan menyebabkan lesi aterosklerosis semakin meningkat. Beberapa sitokin saling bekerja sama dalam proses inflamasi di dalam pembuluh darah. TNF α akan meregulasi molekul adhesi dengan ekspresi CAM dan menstimulus migrasi VCAM. IL-1 merupakan autoinflamasi dengan meningkatkan TNF α , CAM, dan IL-6.



Gambar 2.3 Proses perkembangan plak aterosklerosis (Silva, *et al.*, 2011)

Pada proses inflamasi diperankan oleh beberapa kemokin yang diekspresikan dalam lesi aterosklerotik yaitu MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) yang berperan dalam mengaktifasi leukosit integrin dalam menghasilkan perekatan erat monosit di daerah inflamasi, MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) guna meningkatkan scavenger reseptor protein sintesis dan diferensiasi monosit menjadi makrofag, sedangkan IFN- γ (*interferon- γ*) yang meningkatkan perkembangan plak dan pembentukan sel busa (Wang, *et al.*, 2012). Monosit akan migrasi ke jaringan subendotel menjadi makrofag serta sel-sel kekebalan lainnya seperti dendritik sebagai pengembangan kekebalan antigen. Hal ini juga dipengaruhi oleh OxNEFA yang menyebabkan aktivasi monosit menjadi makrofag dan terjadinya proses apoptosis oxLDL. Makrofag, limfosit, dan sel mast akan mensekresikan enzim Lp-PLA₂ yang merupakan sub tipe dari superfamili fosfolipase A₂ sebagai kelompok enzim yang menghidrolisis fosfolipid. Sel limfosit T akan mengekspresikan IFN γ dan TNF α

dan teraktivasi dalam menginduksi apoptosis dari makrofag yang berkaitan dengan proses agregasi debris seluler dari inti nekrotik. Melalui *scavenger receptor* (SR) seperti CD36, SR-A, dan SRB akan diproses oleh makrofag dengan memfagosit oxLDL tanpa down regulasi, sehingga terjadi penumpukan LDL dan terbentuklah sel busa (*foam cell*) (Kzhyshkowska, *et al.*, 2012).

Pada *foam cell* akan berisi molekul-molekul lemak dengan bentuk bergelembung, yang akan berakumulasi dan merangsang rekrutmen sel otot polos (dari lapisan media, sel endotel, fibroblast adventia). Lapisan berlemak yang terdapat pada permukaan sel otot polos berwarna agak kekuning-kuningan dan mulai menyebabkan penyumbatan arteri koronaria. Mekanisme rekrutmen sel otot polos mengakibatkan adanya bagian menonjol ke dalam lumen yang mengandung tumpukan lemak, kalsium, dan berbagai sel radang lainnya, sehingga mempengaruhi terbentuknya plak di lapisan intima. Akumulasi penumpukan *foam cell* dengan rekrutmen otot polos yang terus menerus menyebabkan terjadinya *fatty streak*. Perkembangan *fatty streak* dipengaruhi oleh migrasi jaringan otot polos, dan jaringan fibrosa yang saling berproliferasi dalam progresivitas plak. Penyumbatan akan menyebabkan sejumlah jaringan ikat dan sklerosis menjadi besar, sehingga arteri menjadi kaku. Jika kadar kalsium garam menumpuk akan mengendap bersama kolesterol lipid lain, sehingga menimbulkan kalsifikasi sekeras tulang yang membuat pembuluh darah tidak elastis (Guyton dan Hall, 2006).

Proses terbentuknya *fibrous cup* terjadi akibat proliferasi otot polos dari intima dan lapisan media melalui penetrasi membran elastika interna. Lapisan berlemak dalam pembuluh darah akan bergabung dan membentuk lapisan yang lebih tebal dan keras. Secara histologis plak aterosklerosis mengandung fibrous,

tampak putih dan tebal sehingga menonjol ke dalam lumen. Plak aterosklerosis 30-40% tersusun oleh kristal kolesterol bebas, ester kolesterol dan lipid peroksida (Shah, 2007). Penonjolan plak yang semakin menebal menyebabkan terbentuknya bekuan darah, sehingga trombus/embolus akan menyumbat aliran darah secara tiba-tiba (Guyton dan Hall, 2006). Selain itu perkembangan plak akan mengakibatkan jaringan bagian dalam mengalami hipoksia.

2.3.3 Pengaruh Hipoksia akibat Plak Aterosklerosis

Pada proses inflamasi kebutuhan oksigen sel-sel inflamasi meningkat, sehingga suplai oksigen berkurang dan terjadilah hipoksia sel. Pada awalnya hanya terjadi hipoksia sel saja, kemudian seiring perkembangan plak menyebabkan pertukaran oksigen tidak optimal dalam jaringan pembuluh darah. Pada percobaan lebih lanjut membuktikan bahwa hipoksia berhubungan dengan keadaan makrofag dan angiogenesis plak karotis manusia. Hipoksia dinding pembuluh darah meningkatkan terjadinya penebalan intima melebihi difusi oksigen minimal yaitu antara 100-250 μm . Hal ini membuat jaringan menginduksi neovaskularisasi vasa vasorum semakin meningkat (Jarvilehto, *et al.*, 2009). Jika perkembangan plak intima meningkat maka tingkat hipoksia semakin tinggi.

Hipoksia jaringan terjadi pada sel inflamatori yaitu makrofag, namun hanya sebagian dari makrofag saja yang mengalami hipoksia tergantung keparahan perkembangan plak. Menurut Sluimer 2008 sel hipoksia akan mengaktifkan HIF-1 α dengan menginduksi angiogenesis vasa vasorum guna mensuplai O₂ dan nutrisi dalam hipoksia makrofag. Hal ini terbukti dengan peningkatan produksi sitokin, LDL teroksidasi, dan lipid yang terjadi dalam

perkembangan sel-sel inflamasi proses aterosklerosis. Namun beberapa stimulus non hipoksia juga berperan dalam mengaktifkan HIF seperti lipopolisakarida, angiotensin II. Proses hipoksia terjadi saat rendahnya konsentrasi ATP (*adenosine triphosphate*) glukosa, dan glikogen, tetapi terdapat konsentrasi tinggi laktat. Penurunan suplai oksigen pembuluh darah koroner pada hewan coba babi aterosklerotik menyebabkan ekspresi *hypoxia-inducible factor* (HIF-1 α) serta stress oksidatif meningkat dan produksi superoksida semakin banyak (Gossl, *et al.*, 2009). HIF berpengaruh terhadap proses patologis aterosklerosis termasuk pembentukan sel busa, proliferasi sel, plak ulserasi, lesi perdarahan, dan ruptur. Hipoksia akan menekan degradasi HIF-1 α yang menyebabkan terakumulasi di dalam nukleus dan menghasilkan aktivasi transkripsional sitokin seperti VEGF (*Vascular endothelial growth factor*).

VEGF berperan dalam meningkatkan permeabilitas kapiler, sehingga timbul angiogenesis patologis dan ekstravasasi protein plasma. Angiogenesis dipengaruhi oleh VEGFR-1, sehingga jumlah vasa vasorum akan meningkat. Peningkatan sitokin proinflamasi dan molekul adhesi menyebabkan platelet dan leukosit mudah menempel pada dinding endotel. Pengerakan dari leukosit (terutama monosit dan limfosit T) ke dalam dinding pembuluh darah merupakan tahap awal dalam atherogenesis. Kemudian terbentuk neointima yang berasal dari perekrutan sel-sel otot polos lapisan media, tetapi menurut hipotesis outside-in menyatakan bahwa penebalan neointima berasal dari lapisan adventisia (Hoglund, *et al.*, 2010).

Perkembangan plak mengakibatkan *Diffuse Intimal Thickening* (DIT), sehingga terjadi perluasan lapisan intima bagian *Internal Elastic Lamina* (IEL) oleh proliferasi sel inflamatori dan produksi matrik plak atheroma. Hal ini

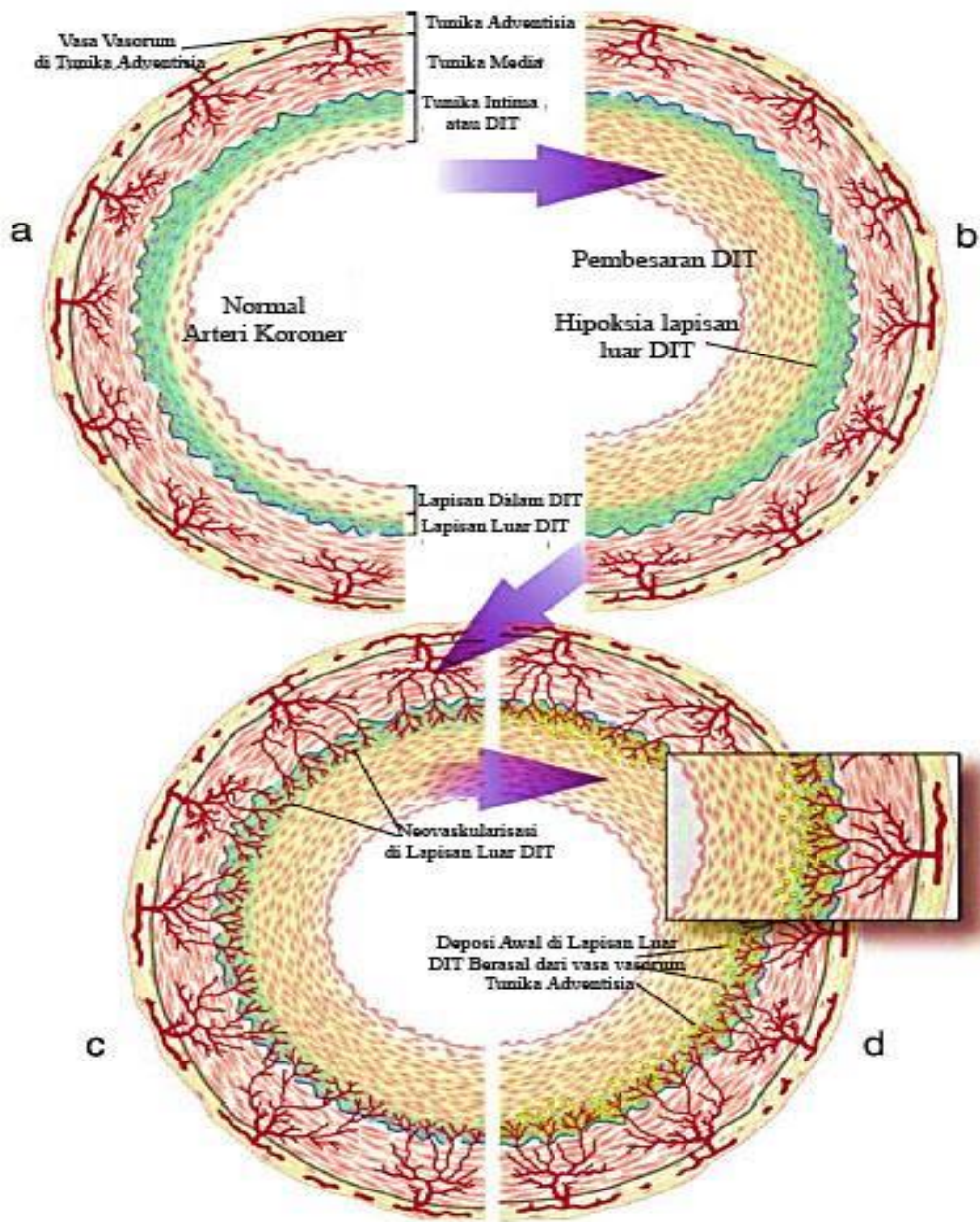
berpengaruh terhadap meningkatnya jarak difusi lapisan intima EEL (*External Elastic Lamina*), lapisan media, dan adventisia akan mengalami hipoksia akibat suplai oksigen dan nutrisi berkurang (Subbotin, 2012). Kemudian munculah proses angiogenesis vasa vasorum dalam membantu mencegah kematian sel akibat hipoksia, tetapi neovaskularisasi ini juga akan membuat progresivitas aterosklerosis semakin meningkat.

2.4 Angiogenesis Vasa Vasorum

2.4.1 Definisi Vasa Vasorum

Vasa vasorum adalah arteri kecil yang berpenetrasi sebagai *microvessel* dengan membentuk jaringan kompleks dari lapisan adventisia dan media outer. Vasa vasorum terdiri dari arteri kecil yang masuk ke dinding pembuluh darah baik dari abluminal permukaan yaitu VV *externae* (VVE) sebagai percabangan major dan biasanya ditemukan di adventisia-media outer, VV *interna* (VVI) yang berasal dari permukaan luminal dan bercabang langsung terhadap dinding arteri, sedangkan venous VV (VVV) (Ritman dan Lerman, 2007). Vasa vasorum biasanya sering merujuk terhadap VVE, karena 96% *microvessel* baru di aterosklerosis berasal dari VV di adventisia dan hanya bagian kecil dari vessel lumen (Bitar, *et al.*, 2008). Secara anatomi, vasa vasorum terdiri dari sel-sel endotel, sel otot polos, bagian luar tertutup oleh jaringan ikat, dan berfungsi dalam mentransport molekul dari darah ke adventisia (Pereira, 2010). Selain itu VVE berperan dalam merespon tingkat oksigenasi dan kebutuhan nutrisi lain lapisan advensia dan media outer saat tidak mendapatkan difusi dari permukaan luminal ketika dinding pembuluh darah melebihi ketebalan. Pada

mamalia terjadi saat ketebalan mencapai 0.5 mm, atau 29 lamellar unit, kemudian VVE akan bertindak dalam neovaskularisasi memberikan suplai oksigen dan nutrisi terhadap lapisan yang akan mengalami hipoksia akibat perkembangan plak aterosklerosis yang semakin meningkat.



Gambar 2.4 Proses angiogenesis vasa vasorum akibat aterosklerosis; **a)** lapisan arteri dengan vasa vasorum normal di adventia, **b)** Disfungsi endotel yang mengakibatkan DIT mengalami perluasan oleh plak athero, **c)** Intima bagian outer DIT mengalami hipoksia, sehingga vasa vasorum berupaya memberikan suplai oksigen, **d)** Angiogenesis vasa vasorum di outer DIT mengakibatkan progefitas plak menjadi meningkat dan VV menjadi unstable dan mudah rupture. (Subbotin,2012)

Neovaskularisasi vasa vasorum juga berfungsi sebagai masuknya makrofag dan faktor inflamasi lain dalam perkembangan angiogenesis aterosklerosis (Moulton, *et al.*, 2003). Vasa vasorum secara fundamental berperan dalam patofisiologi dari 3 sindrom akut aorta, yaitu *aortic dissection*, *intramural hematoma* (IMH), dan *penetrating ulcer*. Beberapa studi mengatakan bahwa VV berperan dalam distribusi, inisiasi, perkembangan serta komplikasi aterosklerosis. Peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah dan rupturnya plak *microvessel* menunjukkan ketidakstabilan plak aterosklerosis. Kemudian terjadi *intraplaque hemorrhage* yang menyebabkan terjadinya peningkatan sitokin dan sel inflamasi mengakibatkan progevitas plak semakin meningkat. Patologis neovaskularisasi vasa vasorum ditandai dengan peningkatan permeabilitas endotel dan kerapuhan dalam proses aterosklerosis (Junyan Xu, *et al.*, 2015).

Peningkatan jumlah vasa vasorum dihubungkan dengan penderita hipertensi kronis, hipertensi krisis, dan iskemia akibat proses konstriksi pembuluh darah (Pereira, 2010). Selain itu, beberapa penelitian mengatakan bahwa *hemorrhage* vasa vasorum menjadi faktor pencetus pembentukan lesi aterosklerosis yang tidak stabil. Hubungan terjadinya peningkatan vasa vasorum terbukti pada pasien *acute coronary syndrome* yang telah meninggal akibat pendarahan plak aterosklerosis (Ritman dan Lerman, 2007). Hal ini akan berpengaruh terhadap HIF-1 α yang semakin banyak, sehingga terjadi keparahan hipoksia jaringan dan meningkatkan VEGF dalam meningkatkan angiogenesis vasa vasorum dalam memberikan suplai lapisan intima dan media jaringan aorta. Menurut Moulton *et al.*, penghambatan neovaskularisasi vasa vasorum dapat mengurangi perkembangan lesi pada tikus apoE. Oleh sebab itu diperlukan pengobatan dalam menghambat Lp-PLA₂ sebagai marker aterosklerosis dengan

pemberian Darapladib, sehingga dapat menimalisir terjadinya angiogenesis vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley*.

2.4.2 Angiogenesis Vasa Vasorum

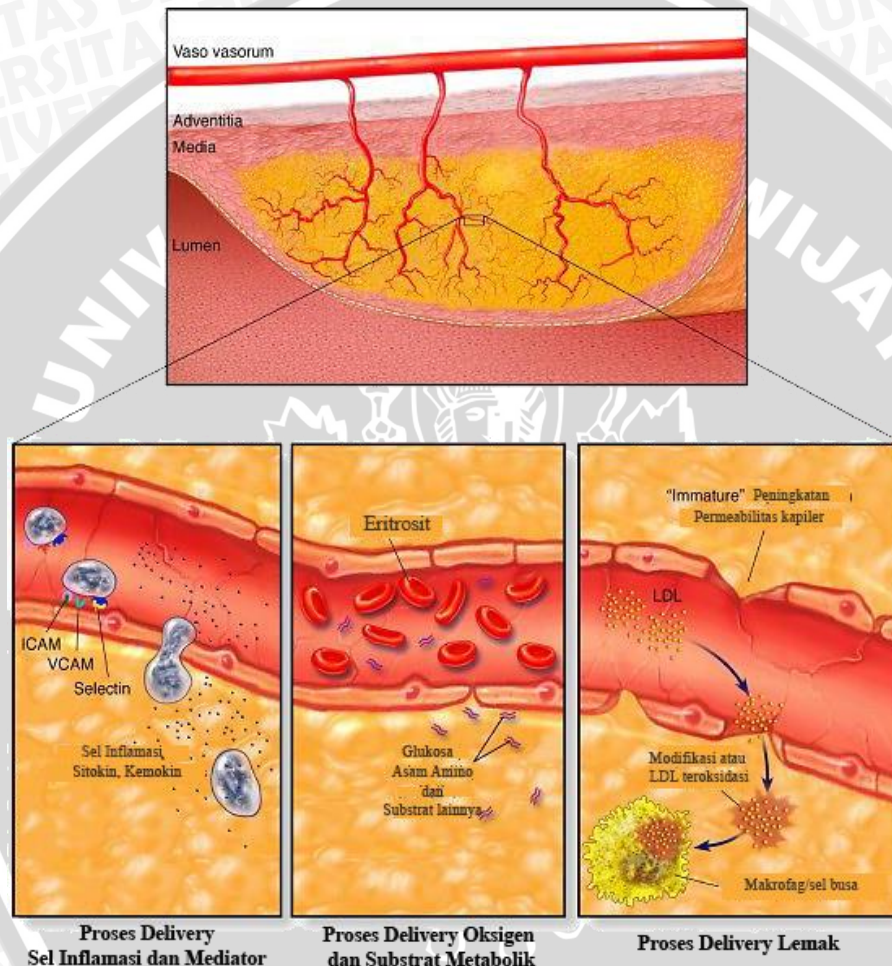
Penimbunan plak mengakibatkan *Diffuse Intimal Thickening* (DIT) akibat perluasan lapisan intima bagian *Internal Elastic Lamina* (IEL) oleh proliferasi sel inflamatori dan produksi matrik plak atheroma. Hal ini menyebabkan terjadinya hipoksia jaringan, sehingga menstimulus angiogenesis vasa vasorum dan mampu menunjukkan penebalan plak. Hipoksia akan meregulasi *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), *heterodimeric transcription factor* terdiri dari HIF-1 α dan HIF-1 β . Aktivasi terbukti lebih dari 40 gen diketahui mengaktifasi transkripsi level HIF-1 yang memproduksi *nitric oxide synthase* dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Hirota dan Semenza, 2006). VEGF juga diketahui sebagai faktor permeabilitas vaskuler sebagai *growth factor* angiogenesis. Dalam perkembangan VEGF memiliki famili meliputi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan VEGF-E yang terdistribusi dalam jaringan yang berbeda-beda dan berikatan dengan berbagai reseptor VEGF. Permeabilitas komponen VEGF memfasilitasi angiogenesis patologis dan ekstravasasi protein plasma dalam mingirasi sel. Peran VEGF berpotensi dalam *physiological* dan *pathological* angiogenesis.

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dan berperan dalam proses aterogenik di penyakit koroner dan karotid, neovaskularisasi intima muncul mengikuti aktivasi dan proliferasi dari jaringan padat pembuluh di adventisia yang berdekatan dengan plak (Moulton, 2006). Neovaskularisasi vasa vasorum dimediasi oleh *sprouting cell* endotel dari

postcapillary venule yang mengawali pembentukan kapiler baru (Potente, *et al.*, 2011). Proses angiogenesis vasa vasorum bertujuan untuk memberikan suplai O₂ dan nutrisi dilapisan intima, sehingga mencegah kematian seluler dan berkontribusi dalam stabilisasi awal pertumbuhan plak. Namun secara bersamaan akan terjadi infiltrasi sel inflamatori, dan produksi sitokin proangiogenik, sehingga memicu proliferasi *microvessel* neointima yang mudah ruptur dan *immature*. Hal ini menyebabkan terjadinya *hemorrhage intraplaque*, menyebabkan kebocoran sitokin dan sel-sel proinflamasi menuju lapisan intima, sehingga otomatis plak akan meningkat. Peningkatan *high fat diet* menyebabkan dinding pembuluh darah termasuk *microvessel* vasa vasorum menjadi kaya lipid dan mensuplai ke bagian plak di intima, menyebabkan tingkat inflamasi dengan beberapa sitokin proinflamasi meningkat. Pada model hewan coba, neovaskularisasi terjadi saat awal minggu 4-6 setelah dimulai diet hiperkolesterolemia (Herman, *et al.*, 2001). Hal ini membuktikan bahwa dengan neovaskularisasi angiogenesis vasa vasorum selain mampu mensuplai nutrisi dalam mencegah hipoksia jaringan, namun juga berperan dalam meningkatkan progresivitas aterosklerosis (Ten-Kate, *et al.*, 2010).

Neovaskularisasi terjadi ketika lapisan intima mengalami penebalan 500 µm, meskipun pengamatan terbaru menunjukkan bahwa hal itu mungkin terjadi lebih awal (Khurana, *et al.*, 2005). Pembentukan neovaskularisasi di awal aterosklerosis dihubungkan dengan inflamasi dan deposisi lipid dalam perkembangan plak. Menurut Groszek dan Grundy, angiogenesis akan memfasilitasi progresivitas aterosklerosis melalui *microvessels* yang mengalami kebocoran lipoprotein menuju lapisan intima dan terjadi peningkatan sel-sel proinflamasi (monosit, makrofag, mast sel), sitokin dan kemokin proinflamasi

lainnya (Doyle dan Caplice, 2007). Pembuluh darah baru yang mengalami inflamatori menjadi mudah *immature* dan ruptur terutama didaerah yang mengalami infiltrasi makrofag dan daerah *cap atheroma* yang menebal (Slevin, et al., 2009).



Gambar 2.5 Peran neovaskularisasi vasa vasorum dalam perkembangan progrevitas plak aterosklerosis (Doyle dan Caplice, 2007)

Rupturnya neovaskularisasi menyebabkan pendarahan intraplak, dan muncul beberapa komplikasi. Tetapi angiogenesis vasa vasorum menjadi neovaskularisasi utama pada aterosklerosis yang dimediasi oleh *sprouting* sel endotel dari *postcapillary venule* yang mengawali pembentukan kapiler baru (Potente, et al., 2011). Proses terbentuknya neovaskularisasi akibat suplai

oksigen dan nutrisi yang berkurang, sehingga vasa vasorum dari lapisan adventisia meluas menuju lapisan intima dan jumlah vasa vasorum meningkat seiring dengan progresitas aterosklerosis.

2.5 Peran Darapladib sebagai inhibitor Lp-PLA₂ terhadap jumlah vasa vasorum

2.5.1 Definisi dan Peran Darapladib

Darapladip merupakan selektif inhibitor enzim *Lipoprotein-associated phospholipase A₂* (Lp-PLA₂) terhadap terjadinya proses aterosklerosis, sehingga dapat mencegah perkembangan plak. Pemberian Darapladib telah dikembangkan oleh *Glaxo Smith Kline* (GSK) menjadi obat untuk aterosklerosis. Pada percobaan di IBIS-2 terhadap pasien kardiovaskuler, bahwa pemberian Darapladib mampu menghambat volume *necrotic core* plak koroner (Rosenson dan Stafforini, 2009). Hal ini membuktikan bahwa Darapladib sebagai inhibitor Lp-PLA₂ dengan mengurangi terjadinya perkembangan plak aterosklerosis, sehingga menurunkan komplikasi penyakit kardiovaskuler.

Pemberian Darapladib yang diamati secara histologi dengan menggunakan metode *Intravascular Ultrasound* mendapatkan hasil bahwa terjadi penurunan jumlah plak, jika dibandingkan dengan model yang tidak diberikan pengobatan terhadap proses aterosklerosis (Boekholdt, *et al.*, 2008). Hal ini membuktikan bahwa Darapladib mampu menghambat proses aterogenesis dengan mekanisme penghambatan terhadap enzim Lp-PLA₂, sehingga mampu mengurangi perkembangan plak. Pada percobaan menggunakan model babi aterosklerosis dengan memberikan Darapladib dalam menurunkan tingkat

lipoprotein A₂ di dalam plak, membuktikan bahwa lesi nekrotik di daerah inti menjadi berkurang dan mampu menghambat perkembangan lesi di arteri koroner. Dalam penelitian eksperimental juga membuktikan bahwa pemberian Darapladib terhadap manusia dapat menurunkan komplikasi kardiovaskular, karena mampu mengurangi terjadinya inflamasi pada proses aterosklerosis (Wilensky, *et al.*, 2008).

Pada penelitian sebelumnya membuktikan bahwa pengamatan secara histologi bahwa pemberian Darapladib mampu mengurangi LDL teroksidasi (Ox-LDL) dan jumlah foam cell, dan sedikit mengurangi ketebalan PVAT (Heriansyah, *et al.*, 2015). Ketika pembuluh darah mengalami disfungsi endotel yang disebabkan oxLDL akan menyebabkan enzim Lp-PLA₂ menjadi aktif yang telah disekresikan oleh monosit-makrofag, limfosit, dan sel mast di plasma, sehingga plak aterosklerosis dilapisan intima menjadi meningkat. Hal ini menyebabkan jaringan menjadi hipoksia, sehingga memerlukan suplai O₂ dan nutrisi lebih dari angiogenesis vasa vasorum. Enzim Lp-PLA₂ akan mempengaruhi neovaskularisasi yang menyebabkan jumlah vasa vasorum lapisan adventisia semakin banyak menuju lapisan intima, namun vasa vasorum akan mudah ruptur, *immature* dan *unstable* hingga menyebabkan progresivitas aterosklerosis semakin meningkat. Penelitian ini mencoba mengamati hubungan Darapladib terhadap jumlah vasa vasorum ketika jaringan mengalami hipoksia akibat perkembangan plak aterosklerosis semakin meningkat di lapisan intima. Oleh sebab itu pemberian Darapladib sebagai oral selektif inhibitor Lp-PLA₂ diharapkan mampu menurunkan jumlah vasa vasorum, sehingga dapat menghambat progresivitas aterosklerosis dan dapat mencegah terjadinya komplikasi penyakit kardiovaskuler.

2.5.2 Mekanisme kerja Darapladib

Darapladib merupakan oral selektif inhibitor Lp-PLA₂ yang berguna dalam menghambat proses aterosklerosis. Darapladib berpotensi menghambat Lp-PLA₂ dalam plasma manusia dengan nilai IC₅₀ bernilai 5 ± 2 nm. Nilai IC₅₀ darapladib adalah konsentrasi Darapladib (mg/mL) yang dapat memberikan efek 50% terhadap inhibitor Lp-PLA₂ dan dapat ditentukan panjang gelombang rata-rata yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan satuan nm. Selain itu Darapladib mampu mencegah terbentuknya 2 senyawa bioaktif Lyso-PC dan Ox-NEFA, sehingga mampu mengurangi respon inflamasi. Menurut penelitian Tselepis *et al.*, 2011 tentang pemberian Darapladib secara oral pada model kelinci hyperlipidemia yang membuktikan bahwa dosis 10 mg/kgBB mampu menurunkan Lp-PLA₂ plasma sekitar >60% yang dipertahankan selama lebih dari 24 jam, sedangkan dengan dosis 30mg/kgbb selama 2 jam berperan dalam inhibitor Lp-PLA₂ sekitar 95% yang dapat menghambat perkembangan plak aterosklerosis.

Pada penelitian secara in-vivo, bioavailabilitas Darapladib diketahui sebesar $11 \pm 2\%$ dan sekitar 21% pada tikus (kondisi dengan atau tanpa puasa), sedangkan pada anjing sebesar $28 \pm 4\%$ (Rosenson dan Stafforini, 2009). Berdasarkan nomenklatur penamaan Darapladib oleh IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) yaitu *N*-[2-(diethylamino)-ethyl]-2-[2-[(4-fluorophenyl)methylsulfanyl]-4-oxo-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl]-*N*-[[4-[4-(trifluoromethyl)phenyl] phenyl]methyl]acetamide. Menurut penelitian Hu, *et al.*, 2015 telah menjelaskan mengenai farmakokinetik, farmakodinamik dan efek samping terhadap subjek *Chinese* yang diberikan Darapladib 160mg/kgBB tikus.

Tabel 2.4 Farmakokinetik Darapladib single dan mutiple dose (Hu, *et al.*, 2015)

Parameters	Single Dose (N =24)	Mutiple Dose 28 hari (N = 24)
C_{max} (ng/mL) ^a	17,9 (55,2)	34,4 (49,0)
T_{max} (hr) ^b	9,0 (6,0-24,0)	6,0 (0,0-15,0)
$AUC_{(0-7)}$ (ng.h/mL) ^a	153 (69,0)	519 (33,3)
$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL) ^a	645 (34,0)	NA
$t_{1/2}$ (hr) ^a	39,2 (18,0)	116 (15,8)
Cr day 14 (ng/mL) ^a	NA	16,6 (28,1)
Cr day 26 (ng/mL) ^a	NA	16,3 (26,2)
Cr day 27 (ng/mL) ^a	NA	16,6 (33,7)

^a Values are expressed as mean (% Coefficient of Variation)

^b Values are expressed as median (range)

C_{max} = maximum plasm concentration; T_{max} = time of occurrence of C_{max} ; $AUC_{(0-7)}$ = Area under the concentration-time curve over the dosing interval; $AUC_{(0-\infty)}$ = Area under the concentration-time curve from time zero (pre-dose) extrapolated to infinite time; $t_{1/2}$ = Terminal phase half-life; Cr = Pre-dose (trough) concentration; NA: Not applicable; N Number of subjects

Farmakokinetik Darapladib baik *single* dan *mutiple dose* berpengaruh terhadap pengaruh pengobatan. Proses absorpsi Darapladib berlangsung pelan sekitar 5-6 jam, sedangkan waktu paruh diperkirakan pemberian *mutiple dose* (116 jam) lebih lama dibandingkan pemberian *single dose* (39,2 jam). Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh lama pengambilan sampel darah *mutiple dose* (hingga 28 hari pasca terakhir dosis), sedangkan dosis *single* (4 hari pasca dosis). Paparan sistemik terhadap *single dose* di subjek Chinese mempunyai kemiripan dengan penelitian yang dilakukan di subjek Western. Namun paparan sistemik ($AUC_{(0-7)}$) subjek Chinese sekitar 65% lebih tinggi dibandingkan subjek Western (Hu, *et al.*, 2015).

Proses penilaian farmakodinamik Darapladib diperlukan sampel darah dalam menentukan aktivitas Lp-PLA₂ yang dikumpulkan hari ke 28, sedangkan pra-dosis dikumpulkan sampel darah hari ke- 14, 26, dan 27. Plasma dipisahkan oleh sentrifugasi (4°C) sekitar 1600 g selama 15 menit dan disimpan dalam *polypropylene tube* sekitar -20°C. Penilaian aktivitas Lp-PLA₂ menggunakan metode *micro colorimetric*. Pemberian *mutiple dose* Darapladib mampu

menghambat aktivitas Lp-PLA₂ sekitar 70% (70.3, 69.8, dan 71.4%) pada hari 14, 26, 27, 28 (Hu, *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil penelitian menyatakan bahwa pemberian Darapladib dengan dosis 160mg/kgBB menyebabkan beberapa efek samping, seperti *abnormal faeces*, *urine odour abnormal*, diare, *nasopharyngitis*, nyeri perut, penurunan jumlah neutrofil dan sel darah putih, dan *abdominal distension*. Tidak ditemukan perubahan klinis yang signifikan terhadap nilai laboratorium, vital sign, dan ECG dan pemeriksaan fisik, namun pemberian Darapladib dengan dosis 160mg/kgBB baik secara single maupun multiple dose secara signifikan dapat meningkatkan kesehatan *subject Chinese* (Hu, *et al.*, 2015).

2.6 Peran Sprague-Dawley sebagai hewan coba penelitian

Pada penelitian ini menggunakan tikus *Sprague-Dawley* (SD) kelompok tikus albino yang sering digunakan dalam penelitian dalam medis. Dalam sejarahnya tikus ini SD pertama kali pada tahun 1925 oleh Robert S. Dawley di peternakan Sprague Dawley (kemudian menjadi Perusahaan *Animal Sprague Dawley*) di *Madison, Wisconsin*. Kemudian dikembangkan oleh beberapa perusahaan besar seperti, *Charles River (Charles River, Quebec, Canada)* dan *Harlan (Harlan, Michigan, USA)* secara luas penangkaran tikus *Sprague-Dawley*. Sedangkan di Indonesia tempat penangkaran tikus ini berada di IPB.

Secara fisik tikus ini berbeda dengan golongan wistar, meskipun termasuk kelompok tikus albino. Berat badan tikus SD tergantung usianya. Pada tikus SD usia 7 minggu mempunyai berat badan 130-230 gram (betina) dan 250-350 gram (jantan) dengan masa aklimatisasi minimal 6 hari (Gautier, 2014). Rentang hidupnya sekitar 2,5-3,5 tahun. Ekornya lebih panjang dibandingkan

dengan ekor wistar. Berapa penelitian banyak yang menggunakan jenis SD karena sifatnya lebih tenang, sehingga memudahkan dalam perlakuan penelitian. Hewan coba ini sering digunakan dalam menginduksi berbagai penyakit yang berhubungan dengan metabolisme di beberapa penelitian di luar negeri, dibandingkan dengan penggunaan jenis wistar.



Gambar 2.6 Tikus *Sprague-Dawley*

Tikus SD digunakan sebagai model tikus dengan berbagai kondisi yaitu diabetes, obesitas, kanker, penyakit kardiovaskular yang mempunyai respon baik terhadap respon terapeutik (Brower, *et al.*, 2015). Penelitian dengan model dislipidemia dalam menginduksi terjadinya aterosklerosis pada tikus SD telah terbukti dengan adanya beberapa literatur yang membahasnya. Pemilihan model tikus ini dianggap cocok sebagai model dislipidemia, karena merespon baik pemberian *high fat diet* 32-45% dari total kalori (Gadja, *et al.*, 2008).