

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Pengaruh Darapladib sebagai penghambat selektif Lp-PLA₂ terhadap penurunan ekspresi HIF-1 α dan VEGF pada tikus *Sparague dawley* model Dislipidemia. Berikut merupakan pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, yaitu;

6.1 Pengaruh Pemberian Diet terhadap rata-rata asupan pakan, berat badan, dan profil lipid Tikus Sprague-Dawley pada setiap kelompok

Berdasarkan **table 5.1** dan **gambar 5.1** menunjukkan nilai tertinggi rata-rata asupan pakan pada tikus kelompok Dislipidemia, jika dibandingkan dengan kelompok asupan diet normal. Jumlah rata-rata asupan pakan paling tinggi pada kelompok dislipidemia menyebabkan kenaikan berat badan paling banyak pada kelompok ini. Kenaikan berat badan diketahui dengan menghitung selisih berat badan akhir dan awal penelitian. **Gambar 5.2** menunjukkan bahwa pada masing-masing kelompok antara serial waktu 8 minggu dan 16 minggu terjadi kenaikan pada berat badan, kecuali kelompok Normal 8 minggu yang mengalami penurunan berat badan akhir sebelum pembedahan. Pengaturan nafsu makan sama halnya dengan pengaturan berat badan dipengaruhi oleh aktivitas hormon Leptin (Tsalissavrina, 2013). Diet tinggi lemak akan menurunkan kadar Leptin yang lebih banyak dibandingkan diet tinggi karbohidrat. Leptin yang semakin rendah akan meningkatkan nafsu makan (James, 2005). Hal tersebut terbukti pada penelitian ini, kelompok diet tinggi lemak, mempunyai nafsu makan atau rata-rata asupan energi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok normal.

Berdasarkan pengukuran Profil lipid yang dilakukan pada kelompok perlakuan tikus 8 minggu, kadar rata-rata kolesterol total kelompok Dislipidemia yang diberikan diet tinggi lemak (115,56 mg/dl) lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok dengan asupan pakan Normal (72,80 mg/dl), Peningkatan kadar kolesterol total pada kelompok dislipidemia menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi lemak mampu meningkatkan kadar kolesterol total (Murwani, *et al.*, 2006). Pada kelompok dengan pemberian diet tinggi lemak dan pemberian darapladib memberikan nilai 81,37 mg/dl, Penurunan pada kadar ini mungkin karena disebabkan oleh pemberian terapi Darapladib. Peningkatan juga dijumpai pada rata-rata kadar LDL yang mengalami perubahan nilai pada kelompok diet tinggi lemak dengan nilai 88,20 mg/dl, jika dibandingkan dengan kadar pada diet Normal sekitar 49,83 mg/dl, dan pada kelompok Dislipidemia dengan darapladib sekitar 60,34 mg/dl. Perbedaan kadar ini menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi lemak memiliki efek terhadap kadar LDL (Srivastava, *et al.*, 2000). Pada kadar rata-rata HDL, kelompok Dislipidemia mengalami penurunan rata-rata HDL 8,36 mg/dl jika dibandingkan dengan kelompok diet Normal yang memiliki nilai 34,74 mg/dl dan kelompok dislipidemia dengan darapladib yang memiliki nilai rata-rata HDL sekitar 20,02 mg/dl. Hal ini diakibatkan oleh pemberian pakan tinggi lemak diyakini dapat menurunkan jumlah kadar HDL (Murwani, *et al.*, 2006), peningkatan pada kelompok DLDP kemungkinan karena dipengaruhi pemberian darapladib.

Pada kelompok perlakuan 16 minggu, kadar rata-rata kolesterol total pada kelompok Dislipidemia dengan pemberian *high fat diet* sekitar 117,77 mg/dl, sedangkan pada kelompok Normal sekitar 56,56 mg/dl, dan kelompok Dislipidemia yang diberikan Darapladib sekitar 101,96 mg/dl. Pemberian pakan

tinggi lemak selama 16 minggu dapat meningkatkan kadar kolesterol total (Guilford, 2013), penurunan kadar pada kelompok DLDP mungkin disebabkan pemberian Darapladib. Kadar LDL pada kelompok tikus yang diberi diet tinggi lemak (HFD) 102,4 mg/dl mengalami peningkatan dibanding kelompok tikus normal 19,24mg/dl. Hal ini disebabkan oleh pemberian pakan yang mengandung lemak tinggi mampu meningkatkan kadar LDL (Gani, *et al.*, 2013). Sedangkan pada kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan Darapladib selama 16 minggu, terjadi penurunan kadar LDL 56,61 mg/dl. Kadar HDL pada kelompok Normal menunjukkan hasil yang lebih tinggi 35,77 mg/dl, dari pada kelompok Dislipidemia yang diberikan diet tinggi lemak (HFD) 18,14 mg/dl. hal tersebut sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan Tsalissavrina, *et al.*, bahwa pemberian diet tinggi lemak terutama lemak jenuh beresiko menurunkan kadar HDL kolesterol (Tsalissavrina, *et al.*, 2013). Pada kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan Darapladib memiliki kadar HDL yang meningkat 21,4 mg/dl karena sudah diberikan terapi Darapladib selama 16 minggu.

Faktor yang dapat meningkatkan resiko terjadinya Aterosklerosis seperti Dislipidemia memiliki beberapa kriteria yaitu adanya peningkatan kadar lipid darah seperti peningkatan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*) darah, Kolesterol total dan Trigliserida darah serta penurunan HDL (*High Density Lipoprotein*) darah (Tsalissavrina, *et al.*, 2013) (Sorace, *et al.*, 2006). Hal ini sesuai dengan kadar profil lipid yang diukur pada penelitian ini, yang menunjukkan bahwa adanya peningkatan kadar kolesterol total dan LDL serta penurunan kadar HDL.

6.2 Perbedaan Ekspresi HIF-1a Pada Setiap Kelompok Perlakuan

Hipoksia sangat terkait dengan pertumbuhan plak dan ketidakstabilan plak aterosklerosis. Ketika terjadi hipoksia, sel-sel akan beradaptasi dengan

mengaktifkan HIF-1 α (Wihastuti, 2015). Dapat dilihat pada **Gambar 5.4** bahwa kelompok DL8 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet tinggi lemak (HFD) selama 8 minggu memiliki rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 787.41 ± 114.74 lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok N8 yang memiliki rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 661.56 ± 40.01 . hal ini disebabkan karena pada tahap awal perkembangan aterosklerosis dipengaruhi factor risiko seperti dislipidemia (Hong, 2010). beberapa faktor yang menyebabkan keadaan dislipidemia yaitu genetik, usia tua, obesitas, serta High Fat Diet dan kolesterol (Sorace, *et al.*, 2006).

Darapladib merupakan obat baru yang menghambat secara langsung aktivitas enzim Lp-PLA2. Sel-sel inflamasi yang terlibat pada proses aterosklerosis seperti monosit, makrofag dan neutrofil mensekresikan enzim Lp-PLA2 (*Lipoprotein-associated phospholipase A2*) sebagai respon terhadap terbentuknya Ox-LDL (Rosenson, *et al.*, 2012). Lp-PLA2 juga berperan dalam ketidakstabilan dan ruptur plak aterosklerosis. Penghambatan aktivitas Lp-PLA2 diharapkan mampu untuk menghambat progresifitas lesi aterosklerosis (O'Donoughe, *et al.*, 2011). Kerja darapladib dalam menurunkan progresifitas aterosklerosis dapat dibuktikan pada penelitian ini yaitu pada kelompok perlakuan DLDP8 kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet tinggi lemak (HFD) dan darapladib 20mg/kg/hari selama 8 minggu memiliki rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 637.18 ± 74.16 . Menunjukkan penurunan ekspresi HIF-1 α jika dibandingkan dengan kelompok DL8.

Kemudian, hasil yang sama juga terjadi pada kelompok perlakuan 16 minggu. pada kelompok N16 memiliki rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 662.14 ± 32.06 , meningkat pada kelompok DL16 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan

pemberian diet tinggi lemak (HFD) selama 16 minggu yang memiliki rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 1372.10 ± 166.14 . peningkatan ekspresi HIF-1 α pada kelompok ini jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok 8 minggu, Hal ini dikarenakan pemberian pakan diet tinggi lemak yang lebih lama sehingga ekspresi HIF-1 α lebih banyak terbentuk. Pada kelompok perlakuan DLDP16 juga terjadi penurunan rata-rata ekspresi HIF-1 α sebesar 634.78 ± 108.41 . Hasil ini sesuai dengan studi-studi lain yang juga menunjukkan adanya pengaruh Darapladib terhadap penurunan lesi aterosklerosis.

Berdasarkan *Kruskal-Wallis Test* dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney Test*, ditemukan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) pada kedua kelompok perlakuan kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan Darapladib selama 8 minggu serta 16 minggu. Hal ini membuktikan bahwa ada perbedaan pengaruh pemberian darapladib sebagai inhibitor Lp-PLA₂ terhadap ekspresi HIF-1 α pada tikus *Sparague dawley* model Dislipidemia. Penurunan ini disebabkan oleh mekanisme darapladib dalam menghambat pembentukan Lp-PLA₂ sehingga menghambat juga peningkatan ekspresi HIF-1 α .

6.3 Perbedaan Ekspresi VEGF Pada Setiap Kelompok Perlakuan

Dalam kondisi hipoksia, terjadi hubungan yang erat antara VEGF dan HIF-1 α . Jika terjadi peningkatan pada ekspresi HIF-1 α maka menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi VEGF (Kalim et al., 2013). Dapat dibuktikan pada hasil penelitian ini, pada kelompok N8 memiliki rata-rata ekspresi VEGF sebesar 809.40 ± 236.66 yang meningkat pada kelompok DL8 dengan rata-rata ekspresi VEGF sebesar 1509.65 ± 495.20 . Selanjutnya kelompok perlakuan DLDP8 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet tinggi lemak

(HFD) dan darapladib 20mg/kg/hari selama 8 minggu memiliki rata-rata ekspresi VEGF sebesar 1265.56 ± 697.28 , lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok DL8 yang belum diberi darapladib. Darapladip merupakan selektif inhibitor enzim Lp-PLA₂ (*lipoprotein-associated phospholipase A₂*) yang digunakan untuk mencegah produksi Lp-PLA₂ sehingga dapat mengurangi penimbunan plak (Serruys, 2008). Jika penimbunan plak berkurang diharapkan dapat mengurangi hipoksia yang selanjutnya dapat mengurangi ekspresi VEGF.

Kemudian pada kelompok N16 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet standar selama 16 minggu memiliki rata-rata ekspresi VEGF sebesar 1198.39 ± 170.08 , berikutnya kelompok DL16 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet tinggi lemak memiliki rata-rata ekspresi VEGF sebesar 1481.64 ± 239.22 . pemberian pakan tinggi lemak pada tikus Wistar mampu memicu keadaan dislipidemia (Gani, 2013), kondisi dislipidemia merupakan *trigger* aterosklerosis yang selanjutnya menyebabkan kondisi hipoksia pada sel yang menginduksi pelepasan HIF-1 α dan VEGF, sehingga pada kelompok DL16 terjadi peningkatan ekspresi VEGF jika dibandingkan dengan kelompok normal.

Pada penelitian darapladib menggunakan hewan coba, terjadi penurunan pada pembentukan lesi aterosklerosis dan perubahan stabilitas plak melalui penurunan inflamasi vaskular. Selain itu, terapi darapladib dengan dosis 10mg/kg/hari juga menurunkan gen penyandi aktivitas leukosit sehingga reaksi inflamasi dapat berkurang (Rosenson, *et al.*, 2012). Seperti yang diketahui, Inflamasi memainkan peranan penting dalam setiap tahapan aterosklerosis mulai dari perkembangan plak sampai terjadinya ruptur plak yang dapat menyebabkan thrombosis. Dengan menghambat aktivasi enzim Lp-PLA₂ progresivitas plak

atherogenetik menjadi berkurang, dan vaskularisasi mampu memberikan nutrisi dan suplai kembali (Heriansyah, 2015) sehingga menurunkan kondisi hipoksia. Hal ini terbukti pada kelompok perlakuan DLDP16 yaitu kelompok perlakuan tikus dengan pemberian diet tinggi lemak (HFD) dan darapladib 20mg/kg/hari selama 16 minggu memiliki rata-rata ekspresi VEGF sebesar 1126.04 ± 110.38 , lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok dislipidemia 16 minggu.

Berdasarkan *Kruskal-Wallis Test* dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney Test*, ditemukan hasil yang tidak signifikan ($p > 0,05$) pada kedua kelompok perlakuan kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan Darapladib selama 8 minggu serta 16 minggu. Menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pengaruh pemberian darapladib sebagai inhibitor Lp-PLA₂ terhadap ekspresi VEGF pada tikus *Sparague dawley* model Dislipidemia. Menurut Hu et al (2015), farmakokinetik darapladib tergantung waktu. Sehingga, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh Darapladib terhadap ekspresi VEGF pada serial waktu yang lebih lama.

6.4 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Potensi atau manfaat Darapladib dalam penghambatan perkembangan aterosklerosis dibuktikan dengan hasil penelitian mengenai ekspresi HIF-1 α dan VEGF. Dari analisis data didapatkan hasil yang signifikan pengaruh pemberian darapladib terhadap penurunan jumlah ekspresi HIF-1 α pada aorta. Sehingga Darapladib sebagai penghambat Lp-PLA₂ dapat digunakan untuk menurunkan pembentukan ekspresi HIF-1 α saat terjadi hipoksia sel yang kemudian mampu mengurangi progresifitas aterosklerosis untuk mencegah komplikasi yang lebih lanjut. Penelitian mengenai efek darapladib terhadap ekspresi VEGF diperlukan

untuk mengetahui efektifitas darapladib dalam menurunkan ekspresi VEGF pada dosis tertentu agar memberikan hasil yang signifikan, serta dibutuhkan penelitian untuk mengetahui pengaruh darapladib dalam menghambat proses aterosklerosis melalui penelitian *clinical trial*.

6.5 Keterbatasan Pada Penelitian

Terdapat beberapa faktor yang menjadi keterbatasan peneliti dalam melaksanakan penelitian mengenai Ekspresi HIF-1 α dan VEGF pada tikus *Sparague dawley* model Dislipidemia setelah pemberian Darapladib. Penelitian *in vivo* menggunakan hewan coba memiliki keterbatasan dalam pemilihan hewan coba yang sesuai untuk penelitian karena adanya variasi genetik dalam tiap spesies hewan, hal ini dapat menyebabkan berbedanya respon hewan terhadap perlakuan yang diberikan. Kurang fasilitas seperti CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*) di lingkungan FKUB sehingga peneliti menganalisis secara kuantitatif dengan menggunakan software Olympus fluoview versi 1.7A di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains Universitas Brawijaya.