

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Diabetes Mellitus merupakan penyakit kronis yang terjadi karena pankreas tidak menghasilkan cukup insulin atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkan (WHO, 2014). Diabetes Mellitus merupakan salah satu faktor resiko aterosklerosis (Kannel, 2009). Pada Diabetes Mellitus terjadi peningkatan pelepasan asam lemak bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak dari pemberian darapladib terhadap perubahan kadar Ox-LDL pada tikus *Sprague-Dawley* model Diabetes Mellitus type 2.

#### 6.1 HFD dan STZ sebagai pemicu terjadinya resistensi insulin

*High Fat Diet (HFD)* yang diberikan kepada tikus mampu menginduksi terjadinya suatu resistensi insulin (Tanaka *et al*, 2007). Sudah banyak jurnal yang menyatakan bahwa HFD merupakan cara yang lebih baik dalam menginduksi terjadinya suatu keadaan resistensi insulin yang merupakan salah satu fitur penting dalam kejadian Diabetes Mellitus tipe 2 (Zhang *et al*, 2008). HFD menginduksi terjadinya resistensi insulin melalui jalur *insulin-independent glucose transporter* dan *insulin-dependent glucose transporter*. Kedua komponen ini mengalami gangguan saat dilakukan pemberian HFD dan kemudian diikuti oleh penurunan pada aktivasi *5'adenosine monophosphate-activated protein kinase K* (AMPK) pada otot skelet. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh tanaka *et al* pada tahun 2007. Penelitian tersebut membuktikan bahwa pemberian HFD selama 4 minggu kepada tikus yang dilakukan latihan fisik akan menurunkan kemampuan aktivasi dari jalur AMPK, namun tidak mempengaruhi GLUT-4 ataupun *insulin-stimulated Akt Phosphorylation*. Pemberian HFD juga bisa memicu terjadinya suatu kondisi metabolik berupa obesitas pada tikus. Menurut penelitian yang dilakukan oleh sarruf *et al* pada tahun 2010, pemberian HFD selama 8 minggu

sebelum dimulainya perlakuan akan menginduksi terjadinya suatu kondisi obesitas pada tikus. Pada penelitian ini, kelompok DM tipe 2 8 minggu dan 16 minggu diberikan pakan HFD sebanyak 26 gram/ekor/hari.

Peningkatan berat badan yang cukup besar terjadi pada kelompok model DM tipe 2 seperti yang bisa dilihat pada **gambar 5.2**. peningkatan berat badan pada kelompok DM tipe 2 ini juga disertai dengan peningkatan kadar LDL dan total kolesterol. Peningkatan kadar LDL dan total kolesterol ini berbanding terbalik dengan kadar HDL. Kadar HDL dalam kelompok DM tipe 2 ini mengalami penurunan. Tingginya kadar LDL dan total kolesterol disertai dengan rendahnya kadar HDL ini akan meningkatkan kemungkinan terjadinya kejadian pro-aterogenik. Hal ini menunjukkan bahwa sudah terjadi suatu kondisi sistemik yaitu dislipidemia.

Kejadian dislipidemia akan mendukung terjadinya suatu resistensi insulin. Hal ini dikarenakan secara fisiologis, sensitivitas reseptor insulin di sel tubuh menurun (*down regulation*) akibat tingginya kandungan glukosa dalam darah. Desensitasi ini akan muncul bila kejadian ini terjadi berulang-ulang secara kronis. Hal ini berakibat dibutuhkannya kadar insulin yang lebih tinggi untuk memasukkan glukosa ke dalam jaringan sel. Hal ini sesuai dengan data kadar insulin plasma pada kelompok DM tipe 2 yang disajikan dalam **tabel 5.2**.

Resistensi insulin yang diharapkan terjadi dalam penelitian ini akan ditunjang oleh keadaan peningkatan insulin plasma dan kadar glukosa darah puasa. Resistensi insulin diketahui dengan perhitungan menggunakan rumus HOMA-IR untuk hewan coba tikus. Dari perhitungan yang disajikan dalam **tabel 5.3**, diketahui bahwa telah terjadi resistensi insulin pada kelompok DM 16 minggu. 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.

Streptozotocin (STZ) yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan dosis 30 mg/kgBB. Namun penggunaan STZ ini kurang menimbulkan dampak karena masih tingginya kadar insulin plasma pada kelompok DM 8 minggu dan 16 minggu. Penggunaan STZ sebagai induksi model Diabetes Mellitus tipe 2 tidak bisa representatif dikarenakan pada awalnya resistensi terjadi karena desensitisasi reseptor insulin, bukan berkurangnya plasma insulin. Sedangkan untuk representasi DM tipe 1 dan DM tipe 2 dengan kerusakan sel  $\beta$  Langerhans pankreas, STZ dapat digunakan.

## 6.2 Kadar Oxidized LDL (Ox-LDL) pada tikus kelompok normal

Berdasarkan hasil pengukuran kadar Ox-LDL plasma yang disajikan dalam **tabel 5.5**, kadar Ox-LDL pada tikus kelompok normal menunjukkan rata – rata sebesar 0,215 ng/mL. Kadar Ox-LDL ini memiliki nilai maksimum 0,289 ng/mL dan nilai minimum 0,151 ng/mL. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Itabe *et al* (2011), Kadar normal Ox-LDL dalam darah adalah 0,006 ng/ $\mu$ g LDL atau setara dengan 1,5 ng/mL plasma dengan kadar LDL normal adalah 25-50 mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa kadar Ox-LDL pada tikus kelompok ini masih termasuk normal karena kadarnya rendah. Kadar glukosa darah yang dimiliki oleh tikus pada kelompok ini memiliki rata-rata sebesar 84,75 mg/dL dengan nilai minimumnya adalah 71 mg/dL dan nilai maksimumnya adalah 102 mg/dL. Hal ini sesuai dengan penelitian – penelitian sebelumnya dimana kadar gula darah normal tikus adalah 82 mg/dL (Rerup *et al*, 1996). Hal ini menunjukkan bahwa masih terjadi fungsi pankreas yang normal di mana sekresi insulin oleh sel beta pankreas mampu menjaga kadar gula darah tikus dalam batas normal (Srinivasan, 2005).

Berdasarkan **gambar 5.1** bisa kita ketahui bahwa asupan makanan pada tikus kelompok ini memiliki rata – rata sebesar 12,6-13,6 gram setiap harinya di bulan pertama perlakuan. Jumlah asupan tersebut turut mempengaruhi penambahan berat badan dari tikus pada kelompok ini. Bila dilihat pada **gambar 5.2** maka akan kita ketahui bahwa berat badan pada kelompok normal yang dibedah pada bulan pertama mengalami penurunan dibandingkan berat badan awalnya. Namun tidak demikian dengan tikus yang dibedah pada usia 16 minggu. Pada tikus kelompok ini terjadi peningkatan berat badan dibandingkan berat badan awalnya. Rata – rata intake pakan pada tikus kelompok ini mengalami peningkatan menjadi 24,6 gram per harinya pada bulan kedua perlakuan. Hal ini dikarenakan tikus pada kelompok ini sudah beradaptasi terhadap diet standar yang diberikan.

Usia memiliki pengaruh terhadap peningkatan kadar Ox-LDL plasma. Pada data yang disajikan dalam **gambar 5.3**, kelompok yang diberikan diet standar selama 16 minggu memiliki kadar Ox-LDL plasma yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberikan diet standar selama 8 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa usia yang semakin tua berbanding lurus dengan peningkatan kadar Ox-LDL plasma.

Profil lipid juga memiliki pengaruh dalam peningkatan kadar Ox-LDL plasma pada tikus *Sprague-Dawley*. Berdasarkan data yang disajikan dalam **tabel 5.4**, diketahui bahwa kelompok yang diberikan diet standar memiliki kadar kolesterol total, LDL, dan HDL yang normal. Hal ini dikarenakan pakan standar yang diberikan memiliki kandungan lemak yang minimal sehingga tidak sampai menimbulkan kelainan terhadap nilai profil lipid. Teori ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Octifani pada tahun 2012. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kadar LDL kelompok yang diberi diet standar lebih rendah dibandingkan dengan kadar LDL kelompok yang diberi HFD dengan nilai masing-masing adalah 11,50 mg/dL dan 94, 43 mg/dL.

Faktor lain yang turut mempengaruhi terjadinya peningkatan kadar Ox-LDL plasma adalah kadar Glukosa darah puasa dan kadar Insulin Plasma. Seperti yang disajikan pada **tabel 5.1**, kelompok yang diberikan diet standar memiliki kadar glukosa darah puasa yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok lain. Rendahnya kadar glukosa darah puasa menunjukkan tidak terjadinya desensitisasi reseptor insulin di sel yang berarti bahwa kadar insulin plasma yang dibutuhkan juga rendah. Hal ini sesuai dengan nilai kadar insulin plasma yang disajikan dalam **tabel 5.2**.

### 6.3 Kadar Oxidized LDL (Ox-LDL) pada tikus kelompok Diabetes Mellitus

#### Tipe 2

Pemberian *High Fat Diet* (HFD) dapat menyebabkan kenaikan kadar Ox-LDL plasma. Tikus pada kelompok model Diabetes Mellitus tipe 2 ini diberi diet tinggi kalori (*High Fat Diet* / HFD) dengan komposisi lemak 40%, karbohidrat 35%, dan protein 25%. Pemberian HFD ini merupakan dilakukan untuk menginduksi terjadinya suatu dislipidemia yang juga merupakan salah satu faktor resiko dari Diabetes Mellitus tipe 2 dan Aterosklerosis (Kannel, 2009).

Berdasarkan data yang disajikan dalam **Tabel 5.5**, Rata – rata kadar Ox-LDL plasma dari tikus di kelompok ini menunjukkan angka sebesar 4,622 ng/mL dengan nilai minimum 4,410 ng/mL dan nilai maksimum 4,834 ng/mL. Kadarnya bahkan meningkat pada kelompok yang dibedah pada bulan keempat (16 minggu) yaitu sebesar 5,920 ng/mL dengan nilai minimum 5,603 ng/mL dan nilai maksimum 6,237 ng/mL. Hal ini meningkat tajam dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang memiliki rata – rata sebesar 0,215 ng/mL.

Tingginya kadar Ox-LDL plasma pada tikus di kelompok ini diakibatkan karena pemberian pakan HFD dan juga kondisi Diabetes Mellitus tipe 2 yang terjadi. Pemberian HFD akan meningkatkan kadar lemak total (termasuk LDL)

dalam darah. Adanya peningkatan LDL dalam darah ini akan meningkatkan kemungkinan terbentuknya Ox-LDL bila LDL yang ada ini terpapar oleh suatu radikal bebas. Selain itu adanya kondisi Diabetes Mellitus tipe 2 juga turut mempengaruhi peningkatan kadar Ox-LDL dalam darah ini. Adanya defisiensi insulin akibat rusaknya sel beta pankreas ini akan menyebabkan ketidakseimbangan homeostasis glukosa dan lipid (Srinivasan, 2005). Pembuatan model Diabetes Mellitus tipe 2 ini adalah dengan penginjeksian Streptozotocin (STZ) (Zhang, 2003).

Selain dari jenis pakan yang diberikan, usia juga merupakan faktor yang mempengaruhi terjadinya peningkatan kadar Ox-LDL. Pada **gambar 5.3**, bisa kita lihat bahwa kelompok DM 16 minggu memiliki kadar Ox-LDL plasma yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DM 8 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa usia yang makin tua berbanding lurus dengan peningkatan kadar Ox-LDL plasma.

Profil lipid juga memiliki pengaruh dalam peningkatan kadar Ox-LDL plasma pada tikus *Sprague-Dawley*. Berdasarkan data yang disajikan dalam **tabel 5.4**, diketahui bahwa kelompok yang diberikan diet HFD ini memiliki kadar kolesterol total, LDL, dan HDL yang normal. Hal ini dikarenakan pakan HFD yang diberikan memiliki kandungan lemak yang tinggi sehingga mampu menimbulkan nilai profil lipid yang abnormal. Teori ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Octifani pada tahun 2012. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kadar LDL kelompok yang diberi diet standar lebih rendah dibandingkan dengan kadar LDL kelompok yang diberi HFD dengan nilai masing-masing adalah 11,50 mg/dL dan 94, 43 mg/dL.

Faktor lain yang turut mempengaruhi terjadinya peningkatan kadar Ox-LDL plasma adalah kadar Glukosa darah puasa dan kadar Insulin Plasma. Seperti yang disajikan pada **tabel 5.1**, kelompok model DM memiliki kadar glukosa darah puasa yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok lain. Tingginya kadar glukosa

darah puasa menunjukkan terjadinya desensitisasi reseptor insulin di sel yang berarti bahwa kadar insulin plasma yang dibutuhkan juga meningkat. Hal ini sesuai dengan nilai kadar insulin plasma yang disajikan dalam **tabel 5.2**

#### **6.4 Kadar Oxidized LDL (Ox-LDL) pada tikus kelompok Diabetes Mellitus tipe 2 yang diberi Darapladib**

Aterosklerosis merupakan penyakit kronis yang ditandai dengan deposisi lemak pada arterial intima (Wang, *et al.*, 2012). Peningkatan lemak dalam darah menyebabkan timbulnya ROS yang dapat mengoksidasi lemak. Lemak dalam darah yang paling mudah teroksidasi adalah LDL menjadi Ox-LDL di dalam subendotel. Respon tubuh yang disebabkan oleh terbentuknya Ox-LDL adalah migrasi monosit ke dalam subendotel yang kemudian memfagosit Ox-LDL melalui *scavenger receptor* (Douglas, *et al.*, 2014).

Darapladib merupakan obat baru yang menghambat secara langsung aktivitas enzim Lp-PLA<sub>2</sub>. Darapladib menghambat aktivitas Lp-PLA<sub>2</sub> di plasma dan juga di plak aterosklerosis. Darapladib juga menurunkan ekspresi gen inflamasi dalam limfosit T dan makrofag. Ekspresi *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) *chemokine receptor* CCR2 sebagai marker makrofag (subtipe M1) yang diketahui terakumulasi pada lesi aterosklerotik juga menurun (Steen, *et al.*, 2013). Pada penelitian ini, efek darapladib dalam mencegah progresivitas kejadian aterosklerosis akan dibuktikan dengan penurunan kadar Ox-LDL plasma pada tikus.

Berdasarkan data yang disajikan dalam **Tabel 5.5**, Kadar Ox-LDL plasma dari tikus pada kelompok DMDP 8 minggu menunjukkan rata – rata sebesar 0,991 ng/mL dengan nilai minimum 0,972 dan nilai maksimum 1,110 ng/mL. Kelompok DMDP 16 minggu menunjukkan rata - rata sebesar 1,948 ng/mL dengan nilai minimum 1,764 ng/mL dan nilai maksimum 2,132 ng/mL. Hal ini menunjukkan

bahwa kelompok model DM tipe 2 yang diberikan darapladib memiliki kadar Ox-LDL plasma yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok model DM tipe 2. Bahkan nilainya mendekati nilai kadar Ox-LDL plasma yang dimiliki oleh kelompok normal. Kelompok DMDP 16 minggu memiliki kadar Ox-LDL plasma yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DMDP 8 minggu. Hal ini bisa jadi disebabkan oleh karena pemberian Darapladib selama 16 minggu telah melewati dosis terapi sehingga tidak memiliki efek seperti yang terlihat pada kelompok DMDP 8 minggu.

Selain dari jenis pakan yang diberikan, usia juga merupakan faktor yang mempengaruhi terjadinya peningkatan kadar Ox-LDL. Pada **gambar 5.3**, bisa kita lihat bahwa kelompok DMDP 16 minggu memiliki kadar Ox-LDL plasma yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DMDP 8 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa usia yang makin tua berbanding lurus dengan peningkatan kadar Ox-LDL plasma.

Profil lipid juga memiliki pengaruh dalam peningkatan kadar Ox-LDL plasma pada tikus *Sprague-Dawley*. Tabel rata – rata kadar profil lipid pada tiap kelompok tikus (**tabel 5.4**) menunjukkan bahwa kelompok model DM tipe 2 yang diberikan darapladib memiliki kadar kolesterol total, LDL, dan HDL yang berbeda dibandingkan dengan kelompok model DM tipe 2. Hal ini dikarenakan Lp-PLA<sub>2</sub> merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam perubahan profil lipid (Silva, et al.,2013). Sehingga pemberian darapladib juga akan memberikan efek terhadap kadar profil lipid.

Berdasarkan uji *One-way ANOVA*, didapatkan hasil yang signifikan ( $p < 0,001$ ) pada kelompok DMDP 8 minggu dengan DMDP 16 minggu. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh Darapladib terhadap penurunan kadar Ox-LDL pada kelompok DM tipe 2 yang diberikan darapladib dalam serial waktu 8 minggu dan 16 minggu. Penurunan ini disebabkan oleh mekanisme darapladib dalam

menghambat pembentukan Lp-PLA<sub>2</sub> sehingga menghambat juga pembentukan Ox-LDL lebih lanjut. Dapat disimpulkan bahwa hasil dari penelitian tentang efek darapladib terhadap kadar Ox-LDL plasma pada tikus *Sprague-Dawley* model Diabetes Mellitus tipe 2 menunjukkan kesesuaian dengan hipotesis dan teori-teori yang digunakan sebagai dasar dari penelitian ini.

## 6.5 Perbedaan Kadar Oxidized LDL (Ox-LDL) pada masing-masing

### kelompok

Proses mula terbentuknya aterosklerosis adalah diawali dengan masuknya LDL kedalam subendotel arteri kemudian LDL mengalami oksidasi menjadi Ox-LDL. Lalu, sel-sel inflamasi menyekresikan enzim Lp-PLA<sub>2</sub> untuk menghidrolisis Ox-LDL menjadi LysoPC dan Ox-NEFA. Kedua produk ini dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi, ekspresi sitokin oleh endotelium, serta meningkatnya sel darah putih terutama monosit yang menjadi makrofag di jaringan. Sel-sel proinflamasi seperti makrofag, limfosit T, dan sel mast sangat berkontribusi dalam terjadi lesi plak aterosklerosis (Reddy, *et al.*, 2009).

Pengukuran rata - rata kadar Ox-LDL pada kelompok normal menunjukkan rata – rata sebesar 0,215 ng/mL dengan nilai maksimum 0,289 ng/mL dan nilai minimum 0,151 ng/mL. ini menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan hasil pengukuran rata – rata kadar Ox-LDL pada kelompok kontrol positif ( $p < 0,05$ ). Baik itu kelompok yang dibedah pada bulan kedua (usia 8 minggu) ataupun kelompok yang dibedah pada bulan keempat (usia 16 minggu).

Untuk mengetahui perbedaan kadar Ox-LDL plasma pada masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey HSD*. Hasil analisis uji *Post Hoc* metode *Tukey HSD* menunjukkan adanya perbedaan kadar Ox-LDL plasma yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok model DM tipe 2 dengan kelompok model DM tipe 2 yang diberikan darapladib. Adanya perbedaan

signifikan tersebut disebabkan oleh karena kadar Ox-LDL plasma kelompok model DM tipe 2 cenderung jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok model DM tipe 2 yang diberikan darapladib.

Hasil uji analisis *Post Hoc* metode *Tukey HSD* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) hanya antara kelompok normal 8 minggu dengan kelompok normal 16 minggu saja. Tidak adanya perbedaan signifikan dari hasil uji *Post Hoc* antara kelompok kelompok normal 8 minggu dengan kelompok normal 16 minggu dapat disebabkan oleh karena kadar Ox-LDL plasma dalam kondisi normal memang tidak berbeda terlalu jauh. Walaupun hal itu diukur dalam 2 serial waktu yang berbeda, yaitu 8 minggu dan 16 minggu.

#### **6.6 Implikasi Pada Bidang Kedokteran**

Penelitian mengenai potensi darapladib dalam menurunkan kadar Ox-LDL plasma pada tikus Sprague-Dawley model Diabetes Mellitus tipe 2 telah diketahui berdasarkan hasil penelitian ini. Dari analisa data didapatkan hasil yang signifikan terhadap penurunan kadar Ox-LDL plasma pada setiap kelompok perlakuannya. Dengan demikian, darapladib dapat dipertimbangkan penggunaannya sebagai salah satu terapi aterosklerosis. Namun masih perlu dilakukannya suatu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh darapladib dalam menghambat proses aterosklerosis melalui penelitian *clinical trial*.

#### **6.7 Keterbatasan Penelitian**

Terdapat beberapa faktor yang merupakan keterbatasan peneliti dalam melaksanakan penelitian mengenai efek Darapladib terhadap perubahan kadar Oxidized LDL (Ox-LDL) pada tikus Sprague Dawley model DM tipe 2. Adanya variasi genetik antar individu hewan coba dalam satu kelompok perlakuan dapat mempengaruhi hasil pengukuran kadar Ox-LDL plasma. Dalam penelitian yang

menggunakan dua serial waktu, pengukuran kadar Ox-LDL plasma yang ideal adalah dengan menggunakan sampel yang berasal dari hewan coba yang sama. Namun metode pengambilan sampel plasma darah yang memungkinkan hewan coba untuk tetap hidup setelahnya sampai saat ini masih belum ada di Indonesia. Preparasi dengan metode tertentu dari sediaan yang digunakan juga dapat mempengaruhi kualitas sediaan sehingga memungkinkan perbedaan pengukuran hasil kadar Ox-LDL metode ELISA. Selain itu, efek dari perbedaan dosis pemberian darapladib tidak dapat diukur dalam penelitian ini dikarenakan darapladib diberikan secara *single dose* yaitu 20mg/kgBB saja.

