

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian Darapladib terhadap jumlah vasa vasorum dalam menghambat proses inflamasi tikus *Sprague-Dawley* model dislipidemia. Pemberian Darapladib bekerja dengan menghambat Lp-PLA₂ terhadap Ox-LDL plasma yang mampu menurunkan progresifitas aterosklerosis. Berikut merupakan pembahasan hasil penelitian yaitu;

6.1 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* terhadap Aorta tikus Diet Normal

Pada kelompok tikus normal terdiri dari 2 serial waktu yaitu kelompok minggu 8 dan kelompok minggu 16 yang masing - masing terdiri dari 5 ekor. Kelompok perlakuan ini, diberikan asupan pakan standar dengan kalori 26 gram/ekor/hari.

6.1.1 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* minggu 8

Perhitungan rata-rata intake pakan sama dengan rata-rata intake pakan *high fat diet* yang dapat diamati pada **tabel 5.1** Berdasarkan tabel data asupan pakan menunjukkan bahwa hasil rata-rata mengalami perbedaan hasil tiap bulanya. Kelompok normal minggu 8 memiliki rata-rata bulan 1-2 secara

berurutan sekitar 11,47 gram dan 12,54 gram. Berat badan rata-rata awal minggu 8 sekitar 208 kemudian mengalami penurunan menjadi 167. Hal ini dipengaruhi akibat asupan pakan menurun. Berdasarkan data **gambar 5.3** mengenai profil lipid dengan rata-rata kelompok 8 minggu yaitu kadar total kolesterol sekitar 72,80 mg/dl, HDL sekitar 34,74 mg/dl, dan LDL sekitar 49,83. Rata-rata jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* minggu 8 sekitar 5 vasa/penampang dengan nilai antara 3-7 vasa/penampang.

6.1.2 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* minggu 16

Kelompok normal minggu 16 menunjukkan perubahan mulai bulan 1-4 yaitu 15,91 gram, 12,67 gram, 24,55 gram, dan 24,93 gram. Perbedaan rata-rata setiap bulannya dipengaruhi oleh tikus *Sprague-Dawley* hanya diberikan pakan standart, sehingga asupan pakan bulan 1-2 baik pada kelompok normal 8 dan 16 hasilnya sangat rendah. Hal ini mungkin terjadi karena selera makan menurun dengan komposisi pakan standar, kemudian diperkirakan tikus tidak mau makan. Kemudian kami segera berkoordinasi dengan ahli gizi untuk mengevaluasi asupan pakan, akhirnya asupakan pakan kelompok normal bulan 3 dan 4 naik kembali sesuai dengan kriteria BB tikus. Kemudian diukur perubahan berat badan tikus. Pengukuran berat badan tikus sesuai selisih berat badan awal pemberian pakan HFD dengan berat badan akhir sebelum tikus dibedah, lalu dihitung rata-rata setiap kelompoknya.

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah vasa vasorum secara manual dalam mengetahui morfologi vasa vasorum secara histologi yang disajikan dalam **gambar 5.4** dan **tabel 5.2**. menunjukkan bahwa dalam keadaan normal sudah terdapat vasa vasorum dalam jumlah sedikit. Dalam penelitian ini mengamati

jumlah VV dalam 2 serial waktu yaitu 8 minggu dan 16 minggu. Sedangkan rata-rata kelompok minggu 16 memiliki nilai maksimal 5-11 vasa/penampang, dengan rata-rata jumlah vasa vasorum sekitar 7 vasa/penampang. Perbedaan jumlah vasa vasorum tergantung waktu yang digunakan dalam penelitian. Dapat disimpulkan bahwa kelompok yang diberikan pakan standar membuktikan tikus *Sprague-Dawley* dalam keadaan normal dan di lapisan adventisia ditemukan vasa vasorum yang berjumlah sedikit. Vasa vasorum yang ditemukan dalam adventisia berfungsi memberikan suplai oksigen terhadap lapisan terluar aorta.

Pada penentuan jumlah vasa vasorum juga dikaitkan dengan profil lipid di setiap kelompok perlakuan. Kelompok minggu 16 mempunyai batas normal rata-rata yang berbeda yaitu kadar total kolesterol sekitar 56,56 mg/dl, HDL sekitar 35,767 mg/dl dan LDL sekitar 19,241 mg/dl. Keadaan normal tikus *Sprague-Dawley* yang hanya diberikan pakan standar, membuktikan bahwa profil lipid dalam batas normal. Menurut penelitian Titin dkk, 2014 menjelaskan mengenai peran vasa vasorum terhadap anti angiogenesis dengan pemberian ekstrak ethanol kulit manggis dengan model tikus *Ratus norvegicus* diet hiperkolesterol menyatakan bahwa dalam keadaan normal terdapat vasa vasorum dengan jumlah 2-6 vasa/penampang dengan nilai rata rata sekitar $3,7 \pm 1,6$ vasa/penampang. Pakan standar yang diberikan memiliki kandungan lemak yang minimal sehingga tidak menimbulkan kelainan terhadap nilai profil lipid. Oleh sebab itu, pemberian pakan standar dengan kalori 26 gram mampu mengkondisikan tikus *Sprague-Dawley*, sehingga jumlah vasa vasorum dalam lapisan adventisia aorta berada pada batas normal.

6.2 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* terhadap Aorta tikus model

Dislipidemia

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). Perubahan profil lipid dengan pemberian high fat diet (HFD) dengan komposisi 40% karbohidrat, 42% lemak, dan 18% protein.

6.2.1 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* minggu 8

Pemberian pakan *high fat diet* berpengaruh terhadap gangguan metabolisme lemak, sehingga terjadi dislipidemia dengan meningkatkannya kadar profil lipid dan dianggap sebagai salah satu faktor resiko utama aterosklerosis (Boudewijn, *et al.*, 2013). Pengukuran rata-rata berat badan yaitu menghitung selisih berat badan awal pemberian pakan HFD dengan berat badan akhir sebelum tikus dibedah. Berat badan akhir kelompok DL 8 minggu sekitar 242 gram. Pada kelompok dislipidemia didapatkan kenaikan kadar lipid yang lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Pada kelompok dislipidemia minggu 8 menunjukkan rata-rata kadar kolesterol total sekitar 115,56 mg/dl, HDL sekitar 8,36 mg/dl, dan kadar LDL sekitar 88,196 mg/dl. Berdasarkan hasil perhitungan vasa vasorum yang disajikan dalam **gambar 5.4** dan **tabel 5.2** menunjukkan rata-rata jumlah vasa vasorum tikus kelompok DL 8 sekitar 18,2 vasa/penampang dengan nilai minimum 15 vasa/penampang dan nilai maksimum 21 vasa/penampang.

6.2.2 Kelompok perlakuan tikus Sprague-Dawley minggu 16

Peningkatan berat badan dapat menyebabkan tikus menjadi obesitas dan mempengaruhi profil lipid tikus. kelompok DL 16 sekitar 343 gram. Rata-rata kelompok minggu 16 memiliki nilai profil lipid yang lebih tinggi, dengan kadar kolesterol total sekitar 117,77 mg/dl, HDL sekitar 18,14 mg/dl, dan LDL sekitar 102,14 mg/dl. Menurut Martati dan Lestari 2008 menyatakan tentang kriteria profil lipid tikus *Sprague-Dawley* model dislipidemia yang diberikan pakan *high fat diet* mengalami hiperkolesterol sesuai dengan hasil data **gambar 5.3** yang menunjukkan tingkat perbedaan kadar profil lipid selama 1-4 minggu. Oleh sebab itu dalam penelitian ini sudah terbukti bahwa tikus *Sprague-Dawley* mengalami dislipidemia akibat konsumsi pakan *high fat diet* dengan kalori 26 gram/ekor/hari. Dislipidemia berpengaruh terhadap resiko terjadinya perkembangan lesi aterosklerosis.

Pada kelompok DL 16 minggu mengalami kenaikan rata-rata sekitar 21,6 vasa/penampang lebih tinggi dibandingkan kelompok minggu 8 dengan nilai minimum 18 vasa/penampang dan nilai maksimal 25 vasa/penampang. Jika dibandingkan dengan kelompok normal, jumlah vasa vasorum kelompok dislipidemia mengalami peningkatan akibat pemberian *high fat diet*. Peningkatan angiogenesis vasa vasorum disebabkan karena neovaskularisasi angiogenesis yang mudah rupture, immatur, dan terjadi pendarahan intraplak sehingga berakibat terjadinya pertukaran sitokin proinflamasi yang meningkatkan progresivitas plak aterosklerosis.

6.3 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* Aorta Tikus Model Dislipidemia yang diberikan Darapladib

Darapladib 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. Berdasarkan **gambar 5.4** dan **tabel 5.2** rata-rata VV dengan pemberian Darapladib (DP) dengan dosis 20 mg/kg BB tikus terjadi penurunan jumlah vasa vasorum baik kelompok minggu ke-8 dan minggu ke-16.

6.3.1 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* minggu 8

Pada kelompok perlakuan 8 minggu mempunyai rata-rata intake pakan kelompok dislipidemia dengan pemberian Darapladib minggu 1 sekitar 25,25 dan bulan 2 sekitar 25,32 gram. Pakan diberikan dengan komposisi HFD sekitar 26 gram. Sedangkan rata-rata berat badan awal sekitar 182 gram, sedangkan berat badan akhir sekitar 272 gram. Peningkatan berat badan dipengaruhi oleh asupan pakan yang meningkat. Profil lipid kelompok DLDP 8 minggu yang terdiri dari kadar kolesterol total sekitar 81,37 mg/dl, rata-rata HDL sekitar 20,02 mg/dl, dan rata-rata LDL meningkat menjadi 60,34 mg/dl. Pemberian DP minggu ke-8 memiliki rata-rata 12 vasa/penampang dengan nilai minimum sekitar 8 dan nilai maksimal 16 dengan presentase menurunkan vasa vasorum sekitar 34%. Penghambatan Lp-PLA₂ dengan Darapladib mampu menurunkan pembentukan plak terhadap tikus dengan defisiensi *apoE*, sehingga dapat menghambat

inflamasi sebagai peran anti-aterogenik selama perkembangan aterosklerosis (Zhang, *et al.*, 2013).

6.3.2 Kelompok perlakuan tikus *Sprague-Dawley* minggu 16

Pada kelompok tikus dengan pemberian darapladib mempunyai intake pakan kelompok DLDP 16 mempunyai rata-rata bulan 1-4 secara berurutan sekitar 22,4 gram, 22,99 gram, 24,01 gram, 22,72 gram. Berat badan awal sekitar 192 gram, lalu mengalami penurunan sekitar 353 gram. Profil lipid tikus kelompok DLDP 16 mengalami penurunan dengan kadar kolesterol total sekitar 101,96 mg/dl, kadar HDL sekitar 21,4, dan kadar LDL sekitar 56,51. Penurunan profil lipid sekitar 66% dikarenakan pemberian Darapladib dengan dosis 20mg/kg BB tikus mampu menurunkan kolesterol total.

Jumlah vasa vasorum dengan jumlah rerata 7,4 vasa/penampang dan nilai minimum (2 vasa/penampang) – nilai maksimum (14 vasa/penampang). Jika dibandingkan dengan kelompok dislipidemia, jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* kelompok 16 mengalami penurunan dengan pemberian Darapladib dosis 20 mg/kg BB sekitar 66%. Pemberian DP dalam penelitian ini membuktikan bahwa Darapladib mampu menurunkan jumlah vasa vasorum pada aorta tikus *Sprague-Dawley* yang diberikan *high fat diet* dengan menghambat Lp-PLA₂ yang dikenal sebagai marker awal terjadinya aterosklerosis.

Beberapa studi telah membuktikan bahwa penelitian secara *invivo* menyatakan terjadi penurunan bermakna aktivitas enzimatik Lp-PLA₂ (Wang, *et al.*, 2010). Berdasarkan riset eksperimental juga telah membuktikan bahwa pemberian Darapladib terhadap manusia dapat menurunkan komplikasi kardiovaskular, karena mampu mengurangi terjadinya inflamasi pada proses

aterosklerosis (Wilensky, et al., 2008). Dalam penelitian ini terjadi penurunan jumlah vasa vasorum kelompok DLDP 8 dan 16 disebabkan oleh mekanisme Darapladib dalam menghambat Lp-PLA₂ sehingga mengurangi tingkat hipoksia jaringan aorta dan menurunkan angiogenesis vasa vasorum. Dapat disimpulkan bahwa hasil dari penelitian tentang pengaruh pemberian Darapladib terhadap jumlah vasa vasorum tikus *Sprague-Dawley* model dislipidemia menunjukkan kesesuaian dengan hipotesis dan teori-teori yang digunakan dalam dasar penelitian ini.

6.4 Perbedaan Jumlah Vasa Vasorum pada Masing-Masing Kelompok

Perkembangan plak aterosklerosis dalam menyumbat aorta menyebabkan jaringan menjadi hipoksia, sehingga mendorong terbentuknya angiogenesis vasa vasorum semakin meningkat. Namun angiogenesis vasa vasorum akan bersifat immatur dan mudah ruptur, karena percabangan yang tidak stabil sehingga mudah mengalami *hemorrhage intraplaque*. Kemudian terjadi kebocoran VV ke dalam intima bagian plak yg tersumbat, dan terjadi peningkatan molekul adhesi, ekspresi sitokin & sel-sel proinflamasi, sehingga mendukung progresitas plak aterosklerosis seiring dengan berkembangnya hipoksia (Doyle dan Caplice, 2007). Oleh sebab itu, terbukti dengan hasil jumlah vasa vasorum meningkat di setiap kelompok yang diberikan *high fat diet* selama 8 dan 16 minggu, tetapi setelah pemberian Darapladib mampu menurunkan jumlah vasa vasorum sehingga dapat simpulkan bahwa jumlah vasa vasorum dapat menjadi indikator dalam perkembangan aterosklerosis.

Pada hasil uji ANOVA tingkat kepercayaan 95% dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian Darapladib menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) terhadap jumlah vasa vasorum. Dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian Darapladib memiliki hasil signifikan terhadap penurunan jumlah vasa vasorum pada kelompok 8 dan 16 minggu yang diberikan *high fat diet* dan Darapladib 20 mg/kg BB tikus. Kemudian berdasarkan **tabel 5.6** dan **tabel 5.7** menyatakan bahwa uji Post Hoc Duncan kelompok normal 8 minggu (N 8), normal 16 minggu memiliki persamaan dalam satu kelompok, sehingga membuktikan bahwa dalam keadaan normal jumlah vasa vasorum ada dan stabil. Kelompok DL yang diberikan *high fat diet* minggu 8 dan 16 menunjukkan berada dalam satu kelompok dan tidak ada perbedaan membuktikan bahwa proses angiogenesis vasa vasorum tidak dipengaruhi waktu, meskipun DL 8 mempunyai nilai yang lebih tinggi dibandingkan DL 16. Tetapi pada kelompok DLDP memiliki perbedaan kelompok antara minggu 8 dan 16, hal ini diperkirakan karena pemberian Darapladib 20 mg/kgBB tikus dipengaruhi oleh waktu serial yang diamati dalam penelitian. Berdasarkan tabel diatas menunjukkan DLDP 16 mempunyai tingkat persamaan dengan N 8 dan N 16, kemungkinan akibat kelompok DLDP 16 lebih cenderung mempunyai nilai mendekati jumlah angiogenesis kelompok normal. Namun jika dilihat berdasarkan nilai signikasi pemberian Darapladib minggu 8 dan 16 yaitu nilai $p = 0,025$. Hal ini membuktikan bahwa 2 serial waktu mempunyai hasil yang signifikan, sehingga jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* dapat mengalami penurunan meskipun jika dilihat uji homogeneous post hoc nilai DLDP 16 lebih tinggi dibandingkan nilai DLDP 8.

Berdasarkan uji Korelasi **tabel 5.8** dan **5.9** menunjukkan bahwa kelompok dengan pemberian Darapladib dosis 20mg/KgBB tikus terhadap jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* minggu ke-8 dan minggu ke-16 mempunyai nilai $p > 0,01$ yang menunjukkan hubungan korelasi tinggi sebesar -0,893 dan -0,783 secara berurutan. Tetapi nilai p hasilnya negatif pada kedua kelompok baik di DLDP minggu 8 dan 16, sehingga jika pemberian Darapladib ditingkatkan maka jumlah vasa vasorum minggu ke-8 dan 16 akan menurun. Sedangkan nilai signifikansi uji korelasi $p=0,007$ dan $p=0,001$ dengan H_0 menunjukkan ditolak, sehingga terdapat hubungan pemberian Darapladib terhadap pemberian jumlah vasa vasorum kelompok perlakuan 8 dan 16 minggu.

6.5 Implikasi Darapladib terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Darapladib dengan dosis 20 mg/kg BB tikus berpengaruh terhadap penurunan jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley*. Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan $p=0,00$ sehingga dapat dikatakan sebagai data yang signifikan, dan nilai signifikansi Post hoc memiliki hasil yang mendekati sama antar kelompok, baik kelompok 8 dan 16 minggu. Pemberian Darapladib dipertimbangkan penggunaannya sebagai salah satu terapi aterosklerosis yang diharapkan mampu mengurangi prevalensi penderita akibat penyakit kardiovaskular. Namun demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian selektif inhibitor Lp-PLA₂ (Darapladib) terhadap dosis, uji toksisitas dan efek samping Darapladib secara *in vivo* terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan mengetahui efek samping pengaruh pemberian Darapladib terhadap manusia melalui penelitian *clinical trial*.

6.6 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini, peneliti mempunyai keterbatasan dalam menentukan secara pasti pemotongan aorta yang digunakan dalam preparat slide. Meskipun telah dipotong oleh ahli PA yang berkompetan, namun kepastian letak pemotongan letak aorta yang berbeda-beda dapat menyebabkan perbedaan nilai dari hasil pengamatan yang dilakukan di masing-masing tikus. Selain itu adanya variasi genetik spesies hewan coba, sehingga respon terhadap perlakuan menghasilkan nilai yang tidak sama dalam setiap kelompok.

