

EFEK DARAPLADIB TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL BUSA (*FOAM CELL*) TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL ATEROSKLEROSIS DIABETES MELLITUS TIPE 2

Titin Andri Wihastuti*, Teuku Heriansyah**, Eviana Norahmawati***, Merika Soraya****

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

**Departemen Kardiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Syiah Kuala, Aceh, Indonesia

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

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

ABSTRAK

Penyakit kardiovaskular merupakan salah satu penyebab kematian terbanyak di dunia yang sangat erat kaitannya dengan aterosklerosis. Beberapa faktor seperti sindrom metabolik dan diabetes mellitus merupakan predisposisi kuat terjadinya aterosklerosis. Aterosklerosis ditandai dengan disfungsi endotel dan peningkatan jumlah serta aktivitas sel-sel radang dalam dinding pembuluh darah yang kemudian menghasilkan mediator-mediator pro-inflamasi, salah satunya berupa enzim Lp-PLA₂. Enzim tersebut bekerja dengan cara menghidrolisis LDL teroksidasi yang terakumulasi dalam intima sehingga terjadi penarikan makrofag pada lesi dan memicu pembentukan sel busa yang berperan dalam perluasan plak nekrotik. Saat ini telah dikembangkan inovasi terapi aterosklerosis melalui penghambatan enzim Lp-PLA₂ yang bernama Darapladib. Penelitian ini bertujuan membuktikan penurunan jumlah sel busa dengan pemberian Darapladib.

Studi ini merupakan studi eksperimental menggunakan *post-test only controlled group design* yang dilakukan terhadap 30 ekor hewan coba tikus *Sprague-Dawley* dalam tiga kelompok : (1) kelompok normal (n=10), (2) kelompok DM tipe 2 (n=10), dan (3) kelompok DM tipe 2 yang diberi darapladib (n=10). Masing-masing dibagi kembali menjadi dua kelompok berdasarkan serial waktu 8 dan 16 minggu.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan jumlah sel busa secara bernakna (ANOVA, $p < 0,05$) dengan pemberian Darapladib selama 8 dan 16 minggu terhadap kelompok DM tipe 2, namun tidak terdapat perbedaan signifikan terkait dengan durasi pemberian Darapladib 8 dan 16 minggu ($p > 0,05$).

Dari hasil tersebut disimpulkan pemberian Darapladib dapat menurunkan jumlah sel busa aorta tikus model diabetes mellitus tipe 2.

Kata kunci: Darapladib, Lp-PLA₂, Sel Busa, Aterosklerosis, Diabetes Mellitus Tipe 2

ABSTRACT

Cardiovascular disease is one of the largest global mortality causes. The disease is having a strong correlation with atherosclerosis which is greatly affected by several factors such as metabolic syndrome and diabetes mellitus. Atherosclerosis marked by elevation of pro-inflammatory cells and activity in the arterial wall which then followed with enhancement of several inflammatory mediators concentration. Lp-PLA₂, as one of contributing inflammation mediator hydrolyzes oxidized LDL that has been accumulated in intimal lining which then expands necrotic plaque area. Until now, there has been found a novel treatment of atherosclerosis based on Lp-PLA₂ inhibition mechanism named Darapladib. This study aimed to investigate Darapladib effect on foam cell number reduction.

This true experimental study with post-test only control group design is performed on 30 *Sprague-Dawley* rats that divided into 3 large groups: (1) normal group (n=10), (2) diabetes mellitus type 2 group (n=10), (3) diabetes mellitus type 2 group which given Darapladib (n=10). Each groups then divided again into two time series, 8 and 16 weeks.

The result shows a significant reduction of foam cell number (ANOVA, $p < 0,05$) by Darapladib administration in 8 and 16 weeks groups compared to type 2 DM group, but there are no significant difference related to the duration of Darapladib administration 8 and 16 weeks.

From the data above it is concluded that Darapladib is able to reduce aortic foam cell in type 2 diabetes mellitus rat.

Keywords: Darapladib, Lp-PLA₂, Foam Cell, Atherosclerosis, Type 2 Diabetes Mellitus

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskular adalah salah satu penyakit tidak menular yang banyak diderita oleh masyarakat baik di Indonesia maupun secara global. WHO menyatakan angka kematian akibat penyakit kardiovaskular mencapai 17,5 juta pada tahun 2012, atau sebesar 31% dari seluruh penyebab kematian. Pada tahun 2030, diperkirakan penyakit tidak menular akan menjadi penyebab kematian terbesar yang terutama didominasi oleh penyakit kardiovaskular. Menurut Riskesdas 2013 tercatat bahwa prevalensi penyakit kardiovaskular seperti *stroke* berdasarkan diagnosis dokter atau tenaga kesehatan di Indonesia adalah 7%, sedangkan pada penyakit jantung koroner mencapai 0,5%¹.

Penyakit kardiovaskular berhubungan erat dengan aterosklerosis. Perkembangan aterosklerosis ditandai dengan peningkatan fibrosis intima, pembentukan plak lipid, proliferasi sel-sel otot polos, kalsifikasi, hingga ruptur plak yang diikuti dengan trombosis. Dengan terjadinya thrombosis maka konsekuensi terberat yang dapat terjadi adalah manifestasi keadaan patologis berupa *stroke* atau penyakit jantung koroner (PJK)².

Hingga saat ini, penyebab aterosklerosis tidak diketahui secara pasti namun terdapat beberapa faktor resiko yang meningkatkan predisposisi terjadinya penyakit kardiovaskular. Secara garis besar, faktor resiko aterosklerosis dikelompokkan menjadi faktor yang dapat dimodifikasi dan tidak dapat dimodifikasi. Usia tua, jenis kelamin pria, dan riwayat penyakit kardiovaskular termasuk dalam faktor yang tidak dapat dimodifikasi. Sedangkan faktor yang dapat dimodifikasi terdiri dari gaya hidup *sedentary*, merokok, hipertensi, dislipidemia, obesitas, *impaired glucose tolerance*, dan diabetes mellitus².

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit gangguan metabolik bersifat kronis dengan karakteristik berupa peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia) melalui mekanisme dasar berupa resistensi insulin sel sehingga terjadi ketidakseimbangan homeostasis tubuh dalam mempertahankan kadar glukosa darah secara

efektif dan diikuti oleh disfungsi sel β pankreas serta insufisiensi produksi hormon insulin. Insulin merupakan hormon yang berfungsi sebagai regulator kadar gula darah dan diproduksi oleh sel β pankreas³. Pada diabetes, resiko penyakit kardiovaskular mengalami peningkatan hingga 2-3 kali lebih besar⁴.

Paparan glukosa dalam kadar tinggi secara terus menerus pada permukaan endotel pembuluh darah menginduksi produksi anion superoksida dan ROS (*reactive oxygen species*) pada dinding vaskular yang memicu stress oksidatif. Peningkatan stress oksidatif tersebut akan berimbas pada penurunan *nitric oxide* (NO) yang sebagai agen anti-aterosklerosis⁵. Penurunan produksi NO, secara kronis pada pembuluh darah akan meningkatkan agregasi platelet, peningkatan molekul adhesi, aktivasi leukosit, dan peningkatan sitokin inflamasi yang merupakan mekanisme terjadinya disfungsi endotel^{6,7,8}.

Disfungsi endotel ditandai oleh peningkatan permeabilitas vaskuler sehingga LDL (*Low Density Lipoprotein*) secara mudah terdeposisi pada subendotel⁶. LDL terakumulasi tersebut selanjutnya mengalami modifikasi melalui proses oksidasi menjadi OxLDL (*Oxidized Low Density Lipoprotein*) yang merupakan suatu agen pro-inflamasi dengan memicu produksi sitokin yang meningkatkan molekul adhesi serta faktor kemotaktik sehingga terjadi emigrasi sel-sel inflamasi seperti makrofag, neutrofil, dan monosit menuju lapisan subendotel dan tunika intima⁹.

Monosit kemudian memasuki subendotel dan tunika intima yang selanjutnya segera mengalami diferensiasi menjadi makrofag dan memfagositosis ox-LDL melalui reseptor *scavenger* dan membentuk sel busa yang merupakan prekursor *fatty streak*, yakni penanda awal plak aterosklerosis^{10,11}.

Pada tunika intima, makrofag dan sel-sel inflamasi lain seperti sel mast dan limfosit menghasilkan enzim *Lipoprotein-phospholipase A₂* (Lp-PLA₂). Lp-PLA₂ merupakan suatu enzim yang memiliki peranan penting dalam aterosklerosis. Sebuah studi menyatakan bahwa Lp-PLA₂

merupakan agen pro-inflamasi pada ateroma serta meningkatkan resiko ruptur plak yang memicu pembentukan thrombus hingga berujung pada berbagai komplikasi akibat penurunan perfusi jaringan pada bagian distal pembuluh darah yang mengalami obstruksi tersebut¹²

Selama ini terapi farmakologis aterosklerosis pada DM memiliki prinsip pengontrolan kadar glukosa secara ketat dengan obat golongan biguanida, jenis yang paling digunakan adalah metformin. Namun, kontrol kadar glukosa yang terlalu ketat justru menimbulkan efek samping yang lebih membahayakan seperti hipoglikemia hingga penurunan kesadaran dan koma¹³. Selain beresiko, pada sebuah studi trial diketahui bahwa pada penderita diabetes dengan kontrol glukosa secara ketat tidak memperlihatkan penurunan mortalitas yang terkait dengan komplikasi makrovaskular¹². Selain metformin, terapi aterosklerosis pada DM yang banyak digunakan adalah statin, pemberian statin terutama diperuntukkan bagi penderita diabetes dengan usia lebih dari 40 tahun dengan kadar kolesterol ≥ 135 mg/dL. Namun, penggunaan statin bukan tanpa dengan resiko efek samping. Pada tahun 2012, FDA (*Food and Drug Administration*) menyatakan bahwa statin dapat meningkatkan kadar HbA1c dan kadar glukosa darah puasa. Sehingga pemberian statin untuk penderita DM masih dalam perdebatan¹³.

Oleh karena itu, inovasi dan pengembangan terapi spesifik aterosklerosis sangatlah diperlukan. Dalam satu dekade ini, tengah dikembangkan suatu terapi farmakologis aterosklerosis baru dengan mekanisme penghambatan Lp-PLA₂ secara aktif, selektif, dan reversibel bernama darapladib. Melalui pemberian penyekat Lp-PLA₂ maka terjadi penurunan progresifitas aterosklerosis dengan penghambatan disfungsi endotel akibat ROS, penurunan laju penipisan kapsul fibrosa, dan pencegahan perluasan inti nekrotik secara lebih lanjut. Sehingga plak aterosklerosis cenderung lebih stabil dan tidak mudah ruptur.

Selama ini belum banyak dilakukan penelitian untuk mengevaluasi efek darapladib

pada kondisi diabetes mellitus tipe 2. Untuk mengetahui manfaat darapladib dalam perkembangan aterosklerosis maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian darapladib terhadap penurunan jumlah sel busa pada tikus *Sprague-Dawley* model aterosklerosis diabetes mellitus tipe 2.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain penelitian *Randomized Post Test Only Controlled Group* secara in vivo, paralel 6 kelompok, menggunakan hewan coba tikus *Sprague-Dawley* (SD). Tikus SD yang digunakan berbobot 150-160 gram, usia 6-7 minggu, jantan, sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih. Tikus diperoleh dari Institut Pertanian Bogor. Untuk memperoleh variabilitas dari tikus yang digunakan sebagai sampel/ulangan penelitian, maka tikus tiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana.

Penelitian dimulai tanggal 6 Oktober 2014 saat pertama kali diberi diet tinggi lemak (HFD) dan diberikan darapladib dan diakhiri pada tanggal 11 Februari 2015 ketika tikus terakhir dibedah. Kemudian, dilakukan analisis data sesuai parameter yang telah ditentukan.

Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah kandang, neraca elektronik, *sput*, glukometer, sonde, peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting, botol organ), peralatan untuk pencucian dan fiksasi jaringan, mikroskop, dan komputer dengan software *Dot Slide Olyvia*TM.

Bahan yang diperlukan adalah tikus *Sprague-Dawley* jantan usia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram, pakan standar, pakan tinggi lemak, air minum, streptozotocin (STZ) dosis 30 mg/kg, Darapladib dosis 20 mg/kg, ketamin 15-20

mg/kgBB, formalin 10%, pewarnaan Hematoksilin Eosin, dan ELISA Kit.

Prosedur Penelitian

Penelitian diawali dengan pengurusan etik, kemudian dilakukan persiapan penelitian yang dimulai dengan mempersiapkan alat dan bahan penelitian dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Selanjutnya, dilanjutkan dengan masa aklimatisasi pada 30 ekor tikus selama 7 hari dengan diberi pakan standar. Setelah itu, dilakukan randomisasi tikus ke dalam 3 kelompok perlakuan besar yakni kelompok normal (kontrol negatif/ N), kelompok diabetes mellitus (DM) tipe 2 (kontrol positif/ DM), kelompok DM tipe 2 yang diberi darapladib 20 mg/kg (DM+DP). Ketiga kelompok tersebut kemudian dibagi kembali berdasarkan serial waktu penelitian 8 dan 16 minggu, sehingga terdapat 6 kelompok penelitian dengan jumlah 5 hewan coba pada setiap kelompok.

Pada penelitian ini digunakan metode kombinasi HFD dan injeksi streptozotocin secara intraperitoneal untuk induksi diabetes mellitus tipe 2. Tikus kelompok DM dan DM+DP diberikan pakan HFD selama 2 minggu, kemudian dilakukan injeksi STZ intraperitoneal pada akhir minggu kedua. Satu minggu kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa, insulin plasma dengan metode ELISA, dan perhitungan resistensi insulin untuk menilai kesiapan hewan coba sebagai model DM tipe 2.

Tikus yang diberi darapladib adalah tikus yang telah dinyatakan mengalami diabetes mellitus tipe 2 setelah dinyatakan resisten insulin dengan hasil perhitungan HOMA-IR $>1,716$. Darapladib diberikan selama serial waktu 8 dan 16 minggu sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu sebesar 20 mg/kgBB setiap harinya menggunakan sonde^{14,15}.

Setelah 8 atau 16 minggu perlakuan, tikus dieuthanasia dengan cara disuntikkan ketamin 15-20 mg/kg secara intra peritoneal. Setelah itu, dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta dan dibersihkan dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) dan *paraformaldehyde* (PFA).

Kemudian diawetkan dengan menggunakan formalin 10% dalam botol organ. Jaringan yang terfiksasi tersebut kemudian dipersiapkan untuk proses parafinasi menggunakan *automatic tissue processor*. Selanjutnya blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dan diapungkan diatas *waterbath* kemudian diletakkan di atas *object glass*. Setelah itu dilakukan pengecatan Hematoksilin-Eosin yang diakhiri dengan *mounting*. Slide histopatologi yang telah siap lalu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Sel busa teridentifikasi sebagai sel dengan sitoplasma pucat dan inti berwarna biru pada tunika intima. Penghitungan jumlah sel busa dilakukan oleh lebih dari satu pemeriksa dengan metode *double blind* untuk mengurangi bias dan didapatkan hasil yang lebih objektif. Sedangkan guna meminimalisir error digunakan *software Dot Slide Olyvia™* untuk mencegah *overlap* perhitungan sel busa.

Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah fase penelitian. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 23 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Analisis data diawali dengan uji normalitas Saphiro-Wilk (jumlah sampel <50) dan uji homogenitas *Levene's test*. Data dengan nilai $p>0,05$ maka dinyatakan memiliki distribusi normal dan varians yang homogen sehingga memenuhi persyaratan untuk dilanjutkan ke uji parametrik *Repeated ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji Post-Hoc *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL PENELITIAN

Berikut disajikan data pendukung hasil penelitian yang terdiri dari kadar glukosa darah puasa, resistensi insulin, lipid teroksidasi (OxLDL), dan profil lipid tikus *Sprague-Dawley*.

Rata-rata Hasil Perhitungan Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin Plasma, dan Kadar OxLDL Jaringan Aorta Tikus *Sprague-Dawley* pada Setiap Kelompok

Kelompok	Normal 8 Minggu	Normal 16 Minggu	DM 8 Minggu	DM 16 Minggu	DM + DP 8 Minggu	DM + DP 16 Minggu
Kadar Glukosa Darah Puasa (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 \pm 7,16 ^{ab}	79,6 \pm 14,63 ^a	128 \pm 15,01 ^{bc}	147,8 \pm 58,22 ^c	103,2 \pm 13,72 ^{abc}	101,8 \pm 19,07 ^{abc}
Kadar Insulin Plasma (ng/mL) ($\bar{x} \pm SD$)	4,664 \pm 0,425	5,124 \pm 0,297	12,017 \pm 1,781	40,220 \pm 4,1661	5,704 \pm 0,573	8,327 \pm 0,859
Kadar oxLDL Jaringan Aorta (ng/mL) ($\bar{x} \pm SD$)	1,3476 \pm 0,1556 ^a	2,314 \pm 0,270 ^{ab}	21,0984 \pm 2,8885 ^g	34,049 \pm 1,927 ^h	4,440 \pm 0,6214 ^{bc}	8,415 \pm 1,645 ^d

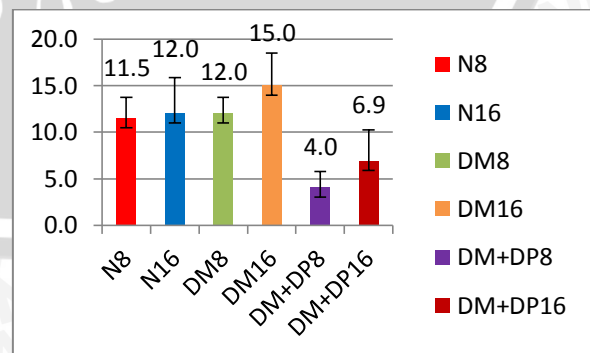
Rata-rata Hasil Perhitungan Resistensi Insulin Metode HOMA-IR Tikus *Sprague Dawley* pada Setiap Kelompok

Kelompok	Normal 8 Minggu	Normal 16 Minggu	DM 8 Minggu	DM 16 Minggu	DM + DP 8 Minggu	DM + DP 16 Minggu	
Sebelum Pemberian DP	Nilai HOMA-IR ($\bar{x} \pm SD$)	0,641 \pm -	0,638 \pm 0,041	2,001 \pm 0,073	6,458 \pm 0,603	1,747 \pm 0,674	3,061 \pm 1,051
	Intepretasi	Normal	Normal	Resisten Insulin	Resisten Insulin	Resisten Insulin	Resisten Insulin
Setelah Pemberian DP	Nilai HOMA-IR ($\bar{x} \pm SD$)	0,486 \pm 0,067	0,462 \pm 0,079	1,551 \pm 0,496	2,967 \pm 1,701	0,647 \pm 0,141	0,954 \pm 0,142
	Intepretasi	Normal	Normal	Normal	Resisten Insulin	Normal	Normal

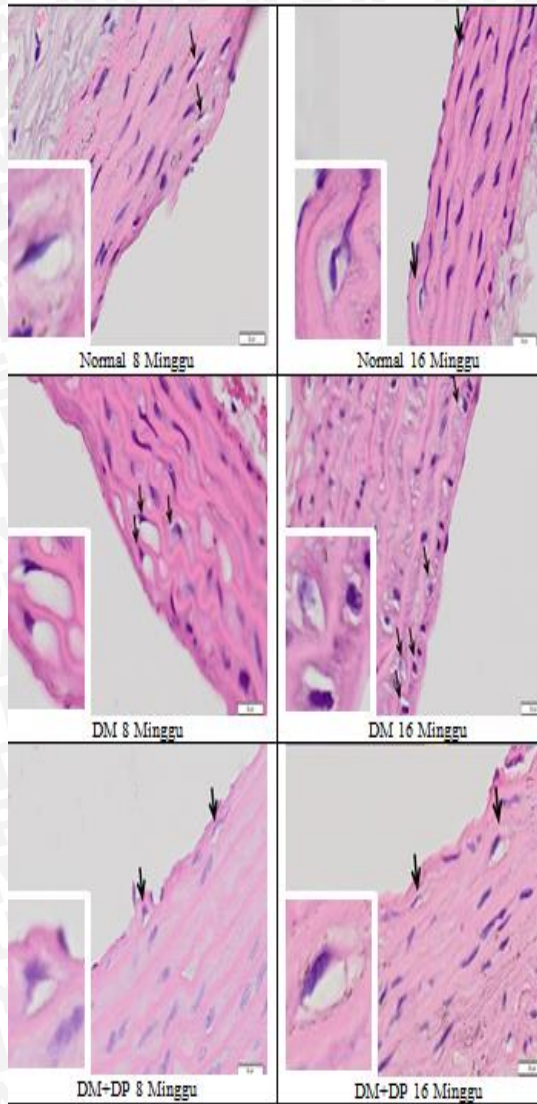
Rata-Rata Profil Lipid pada Setiap Kelompok Perlakuan Tikus *Sprague-Dawley*

Kelompok	Normal 8 Minggu	Normal 16 Minggu	DM 8 Minggu	DM 16 Minggu	DM + DP 8 Minggu	DM + DP 16 Minggu
Kolesterol Total (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	72,79 \pm 4,045 ^a	56,56 \pm 5,43 ^a	123,00 \pm 2,8 ^d	111,72 \pm 7,29 ^{cd}	97,96 \pm 1,70 ^{bc}	98,85 \pm 3,24 ^{9bc}
Kadar HDL (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	34,73 \pm 8,31 ^d	35,76 \pm 1,67 ^d	4,95 \pm 0,41 ^a	13,96 \pm 0,87 ^b	15,93 \pm 1,21 ^{bc}	20,79 \pm 2,76 ^c
Kadar LDL/VLDL (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	49,83 \pm 5,06 ^b	19,24 \pm 3,67 ^a	95,53 \pm 8,66 ^c	88,24 \pm 6,22 ^c	85,91 \pm 6,83 ^c	61,51 \pm 6,03 ^b

Penghitungan jumlah sel busa dilakukan setelah pembuatan preparat menggunakan proses *paraffin block* dengan metode pengecatan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Sel busa diamati secara histopatologi dengan perbesaran 400 kali di bawah mikroskop dan software Dot Slide Olyvia™ pada seluruh lapangan pandang aorta. Sel busa teridentifikasi sebagai sel pucat dengan inti berwarna biru pada tunika intima. Hasil perhitungan jumlah sel busa kemudian dicatat dengan satuan sel/aorta. Berikut merupakan data rata-rata jumlah sel busa pada setiap kelompok:



Grafik Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley* (sel/aorta)



Gambaran Histopatologi Hematoksin Eosin Sel Busa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley*

Data yang telah didapat kemudian diuji menggunakan SPSS versi 23. Hasil analisis data uji normalitas Saphiro-Wilk didapatkan data berdistribusi normal dengan tingkat signifikansi pada kelompok serial waktu 8 minggu adalah $p=0,224$ dan $p=0,483$ ($p>0,05$) pada masa perlakuan 16 minggu.. Kemudian analisis data dilanjutkan dengan uji homogenitas. Setelah dilakukan uji homogenitas didapatkan hasil *Levene's test* $p = 0,336$ pada kelompok perlakuan 8 minggu dan $p = 0,308$ pada kelompok 16 minggu ($p>0,05$) yang menunjukkan bahwa varians data sama. Sehingga data memenuhi persyaratan untuk dilanjutkan ke uji *Repeated ANOVA* dan didapatkan

tingkat signifikansi $p=0,000$ ($p<0,05$). Dari hasil tersebut diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna antara dua serial waktu, sehingga analisis data dilanjutkan ke uji Post-Hoc LSD untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan.

Dari hasil uji Post Hoc LSD jumlah rata-rata sel busa serial waktu 8 dan 16 minggu pada tabel 5.5 didapati bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok DM 8 minggu dengan kelompok DM yang diberi darapladib selama 8 minggu. Perbedaan signifikan juga didapatkan pada kelompok DM 16 minggu dan kelompok DM yang diberi darapladib selama 16 minggu, namun tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok DM yang diberi darapladib selama 8 dan 16 minggu.

PEMBAHASAN

Penghitungan rata-rata jumlah sel busa aorta tikus dilakukan secara histopatologi dengan metode pengecatan Hematoksin-Eosin dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Pada Kelompok normal yang diberi pakan standar selama 8 minggu memiliki rata-rata jumlah sel busa sebesar $11,5 \pm 2,27$ sel/aorta. Sedangkan kelompok normal 16 minggu memiliki rata-rata sel busa sebanyak $12 \pm 3,86$ sel/aorta. Peningkatan tersebut diduga terkait usia yang menyebabkan peningkatan kekakuan dinding arteri dan disfungsi endotel¹⁶. Namun peningkatan tersebut tidak bermakna pada uji *Post-Hoc* ($p=0,112$).

Pada kelompok DM 16 minggu didapatkan rata-rata jumlah sel busa sebesar $15,0 \pm 3,50$ sel/aorta. Jumlah tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DM 8 minggu yang berjumlah $12,0 \pm 1,76$ sel/aorta. Pada kelompok kontrol positif 16 minggu terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,014$) apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif 16 minggu dan 8 minggu ($p=0,000$). Peningkatan jumlah sel busa tersebut disebabkan oleh pemberian diet tinggi lemak, peningkatan usia dan berat badan hewan coba^{17,18}. Terdapatnya faktor-faktor tersebut meningkatkan potensi terjadinya sindrom metabolik yang dapat diketahui dengan peningkatan kadar glukosa darah, tingkat resistensi insulin, dan profil lipid serum pada hewan coba. Dari hasil pengukuran faktor-faktor tersebut,

pada penelitian ini, kelompok DM memiliki hasil yang mengarah pada kondisi sindroma metabolik dengan kadar glukosa darah, tingkat resistensi insulin, kadar kolesterol total, dan LDL/VLDL yang lebih tinggi dibandingkan kelompok lain serta kadar HDL yang lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, terutama pada masa perlakuan 16 minggu.

Kelompok DM yang diberi Darapladib 20 mg/kg memiliki rerata jumlah sel busa yang lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif pada masing-masing serial waktu 8 ($p=0,000$) dan 16 minggu ($p=0,000$) dengan rerata jumlah sel busa $4\pm 1,76$ sel/aorta dan $6,9\pm 3,35$ sel/aorta pada kelompok 8 dan 16 minggu. Hasil tersebut menunjukkan Darapladib dapat menurunkan jumlah sel busa tikus secara signifikan bila dibandingkan dengan hewan coba yang hanya diberi pakan tinggi lemak dalam durasi waktu yang sama. Hal ini dipengaruhi oleh pemberian penyekat Lp-PLA₂ sehingga terjadi penurunan proses perluasan inti nekrotik atheroma, penipisan kapsul fibrosa, dan stabilisasi plak. Sehingga progresifitas aterosklerosis dapat dihambat¹⁹. Hasil penelitian ini sesuai dengan studi trial yang menyatakan bahwa pemberian Darapladib mencegah menekan peningkatan ukuran plak aterosklerosis secara bermakna dibandingkan dengan kelompok pasien yang diberikan plasebo²⁰. Selain itu pada kelompok tikus kontrol positif, pemberian HFD dan streptozotocin dosis rendah menimbulkan gangguan produksi insulin oleh sel β pankreas²¹. Sehingga kadar glukosa yang terus meningkat semakin memicu terjadinya aterosklerosis akibat glikosilasi protein dan lipid, stress oksidatif, dan aktivasi protein kinase C (PKC)²². Oleh karena itu, proses induksi DM tipe 2 dan pemberian darapladib berperan dalam jumlah sel busa antara kelompok DM dan DM+DP.

Kemudian uji Post-Hoc LSD pada kelompok kontrol negatif 8 minggu dan kelompok DM yang diberi Darapladib selama 16 minggu menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p=0,188$). Sehingga dengan pemberian Darapladib

16 minggu terjadi penurunan rerata jumlah sel busa yang mendekati kelompok normal.

Sedangkan pada kelompok DM dengan pemberian Darapladib selama 8 minggu dan 16 minggu didapatkan perbedaan yang tidak bermakna ($p=0,101$). Hasil tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian Darapladib dalam jangka pendek dan jangka panjang. Diduga hal ini dikarenakan perbedaan variasi data yang cukup besar, atau akibat karakteristiknya yang *dose-dependent*²³.

KESIMPULAN

Pemberian Darapladib secara oral dengan dosis 20 mg/kg selama 8 atau 16 minggu dapat menurunkan jumlah sel busa aorta tikus *Sprague-Dawley* model aterosklerosis diabetes mellitus tipe 2 secara signifikan

SARAN

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut terkait pengaruh Darapladib terhadap aterogenesis pada tikus model diabetes mellitus tipe 2 pada masa sebelum perlakuan untuk menambah tingkat reliabilitas penelitian.
2. Penelitian ini menggunakan dosis Darapladib 20 mg/kg/hari. Oleh karena itu untuk penelitian yang lebih lanjut diperlukan variasi dosis untuk mengetahui dosis Darapladib yang optimal dalam menurunkan jumlah sel busa pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek Darapladib terhadap sel busa dengan metode pengecatan spesifik sel busa/makrofag atau menggunakan imunohistokimia

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. 2013; p. 1–384.
2. Graham IM. Risk Factors & Cardiovascular Disease. *Dialogues Cardiovasc Med*. 2008; 13(2):77–152.

3. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalco J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th Ed. New York: McGraw-Hill Education. 2015; p.486-487.
4. WHO. *Diabetes*. Online [WWW]. November; 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> [accessed October 27, 2015].
5. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: Tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr Heart Fail Rep*. 2012;9(3):200–10.
6. Sharma A, Sellers S, Stefanovic N, Leung C, Tan SM, Huet O, *et al*. Direct Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Provides Atheroprotection in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. *Diabetes*. 2015;64(11):3937–50.
7. Wihastuti TA, Widodo MA, Heriansyah T, Apramadha N, Sari K. Study of the Inhibition Effect of Ethanolic Extract of Mangosteen Pericarp on Atherogenesis in Hypercholesterolemic Rat. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2015;5(10):830–4.
8. Wihastuti, TA, Sargowo D, Tjokropawiro A, Permatasari N, Widodo MA, Soeharto S. Vasa vasorum anti-angiogenesis through H₂O₂, HIF-1 α , NF- κ B, and iNOS inhibition by mangosteen pericarp ethanolic extract (*Garcinia mangostana* Linn) in hypercholesterol- diet-given *Rattus norvegicus* Wistar strain. *Vascular Health*. 2014; 10:523-31.
9. Sakellarios AI, Siogkas P, Exarchos T, Stefanou K, Bourantas CV. Modelling LDL Accumulation in the Case of Endothelial Dysfunction. *J Serbian Soc Comput Mech*. 2011;5(2):90–100.
10. Gonçalves I, Edsfeldt A, Ko NY, Grufman H, Berg K, Björkbacka H, *et al*. Evidence Supporting a Key Role of Lp-PLA2-Generated Lysophosphatidylcholine in Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(6):1505–12.
11. Wihastuti TA, Heriansyah T, Soraya M, Wijayanti MD, Firani NK, Iskandar A, Anita KW, Danik A, *et al*. Inhibition of Oxidative Stress in Hypercholesterolemic Rats by Soy Milk. *J of Cardiovasc Dis Research*. 2016;7(2):74-82.
12. Zoungas S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Li Q, Hirakawa Y, *et al*. Follow-up of Blood-Pressure Lowering and Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2014;371(15):1392–406.
13. Chogtu B, Magazine R, Bairy KL. Statin Use and Risk of Diabetes Mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(2):352–7.
14. Wang W, Zhang J, Wu W, Li J, Ma Y, Chen W, *et al*. Inhibition of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Ameliorates Inflammation and Decreases Atherosclerotic Plaque Formation in ApoE-deficient Mice. *PLoS One*. 2011;6(8):e23425.
15. Heriansyah T, Wihastuti T, Anita K, Iskandar A, Suhendra R, Setiabudi P, *et al*. Atherogenesis Inhibition by Darapladib Administration in Dyslipidemia Model Sprague-Dawley Rats. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*. 2015;6(1):1–7.
16. Nilsson PM, Boutouyrie P, Laurent S. Vascular aging: A tale of Eva and ADAM in Cardiovascular Risk Assessment and Prevention. *Hypertension*. 2009;54:3–10
17. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927–46.
18. Murwani S, Mulyohadi A, Muliarta K. Diet Aterogenik Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) Sebagai Model Hewan Atherosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2006;22(1):6-9.
19. Immanuel S, Tjiptaningrum A. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) sebagai Petanda Penyakit Jantung Koroner. *Maj Kedokt Indonesia*. 2010;60(1):32–9.

20. Serruys PW, García-García HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, *et al.* Effects of the Direct Lipoprotein-associated phospholipase A2 Inhibitor Darapladib on Human Coronary Atherosclerotic Plaque. *Circulation*. 2008;118(11):1172–82.

21. Xiang X, Wang Z, Zhu Y, Bian L, Yang Y. [Dosage of Streptozocin in Inducing Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010;39(2):138–42.

22. Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–70.

23. Mohler ER, Ballantyne CM, Davidson MH, Hanefeld M, Johnson JL, Zalewski A. The Effect of Darapladib on Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity and Cardiovascular Biomarkers in Patients with Stable Coronary Heart Disease or Coronary Heart Disease Risk Equivalent: Ther Results of A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(17):1632-41.

