

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

Salah satu faktor resiko yang menyebabkan aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular adalah diabetes mellitus. Berikut ini adalah tinjauan kepustakaan mengenai konsep aterosklerosis, diabetes mellitus tipe 2, diabetes mellitus tipe 2 sebagai faktor resiko aterosklerosis, sel busa (*foam cell*), Darapladib sebagai agen penghambat Lp-PLA<sub>2</sub>, serta pembuatan model diabetes mellitus tipe 2 pada hewan coba.

#### 2.1 Aterosklerosis

Untuk memahami konsep aterosklerosis diperlukan wawasan mengenai definisi, etiologi, faktor resiko, patogenesis, manifestasi klinis, dan komplikasi yang dapat ditimbulkan akibat aterosklerosis.

##### 2.1.1 Definisi, Etiologi, dan Faktor Resiko

Aterosklerosis adalah keadaan patologis yang terjadi pada arteri berukuran sedang hingga besar dengan karakteristik berupa inflamasi dan disfungsi endotel serta penumpukan kolesterol, lipid, dan *debris* seluler. Proses ini menimbulkan pengerasan dinding arteri dan pembentukan plak yang mengakibatkan penyempitan pembuluh darah sehingga suplai darah ke organ target menjadi terganggu (Longo *et al.*, 2015). Aterosklerosis merupakan penyakit yang multifaktor, sebagian bersifat konstitusional sehingga tidak dapat diubah tetapi sebagian lain bersifat didapat dan dapat dikendalikan. Faktor resiko yang tidak dapat diubah mencakup riwayat keluarga dan genetik, jenis kelamin, serta penambahan usia. Faktor resiko genetik serta predisposisi familial pada aterosklerosis sebagian besar ditunjang dengan adanya faktor resiko lain-lain, seperti hipertensi atau diabetes terkait dengan kelainan genetik yang berpengaruh terhadap

metabolisme lipoprotein yang menyebabkan peningkatan kadar lemak dalam darah seperti pada kondisi hiperkolesterolemia familial. Selain faktor genetik, usia memiliki pengaruh dominan pada aterosklerosis. Aterosklerosis biasanya belum nyata secara klinis sampai usia pertengahan atau lebih, dimana lesi pada arteri mulai mencederai organ, misal infark miokardium. Insiden infark miokardium akan meningkat hingga 5 kali lipat pada rentang usia 40 sampai 60 tahun. Jenis kelamin juga turut berpengaruh terhadap aterosklerosis, pada perempuan pramenopause infark miokard jarang terjadi sementara laki-laki jauh lebih rentan. Sedangkan, pada perempuan usia 70-80 memiliki frekuensi infark miokardium yang sama dengan laki-laki (Kumar *et al.*, 2007).

Kemudian, pada faktor resiko yang dapat diubah terdapat empat faktor utama yakni hipertensi, merokok, hiperlipidemia, dan diabetes. Merokok telah terbukti sebagai faktor resiko aterosklerosis yang bermakna. Merokok satu bungkus atau lebih per hari selama beberapa tahun dapat meningkatkan angka kematian akibat penyakit jantung iskemik hingga 200%. Selain merokok, hipertensi juga merupakan faktor utama aterosklerosis.

Peningkatan tekanan darah lebih dari 169/95 mmHg menunjukkan peningkatan resiko penyakit jantung iskemik lebih dari 5 kali dibanding dengan tekanan darah 140/90 mmHg atau kurang. Sedangkan dua faktor lainnya adalah diabetes mellitus dan hiperlipidemia. Diabetes mellitus dapat meningkatkan resiko aterosklerosis melalui peningkatan ROS dan disfungsi endotel yang kemudian diperparah dengan kondisi hiperkolesterolemia sehingga terjadi peningkatan kemungkinan terbentuknya plak aterosklerosis dan komplikasi penyakit kardiovaskular sebesar 2-3 kali lipat (Kumar *et al.*, 2007).

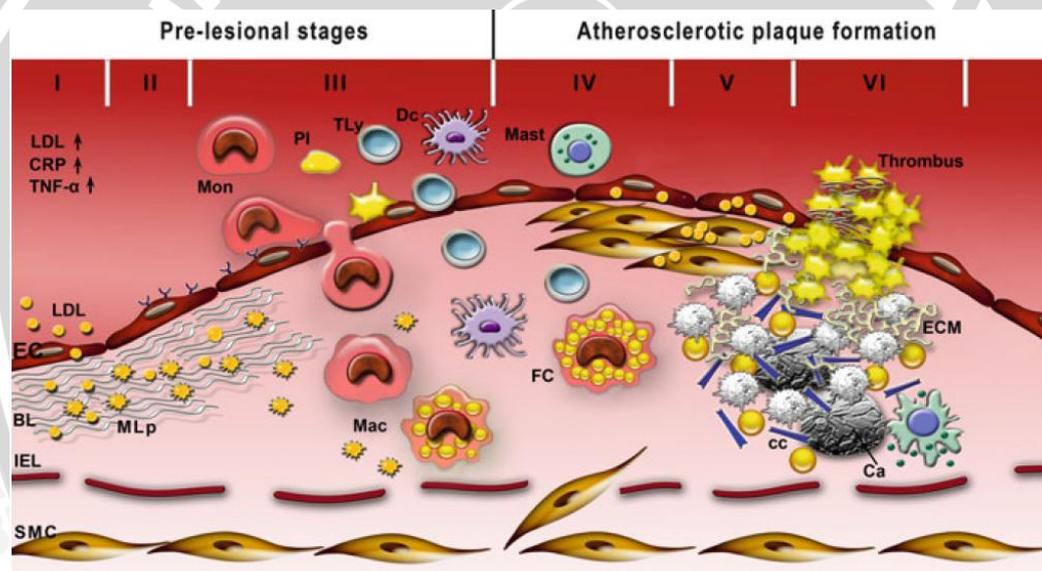
### 2.1.2 Patogenesis

Aterosklerosis merupakan penyakit immuno-inflamatori dan fibro-proliferatif yang berlangsung secara kronis. Sel endotel, leukosit, dan sel-sel otot polos tunika intima berperan penting dalam aterosklerosis (Falk, 2006).

Aterosklerosis diawali oleh jejas pada endotel yang kronis atau berulang. Hal ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor, diantaranya adalah pengelupasan mekanis, gaya hemodinamik, pengendapan kompleks imun, radiasi, dan diet tinggi lemak. Keadaan hiperlipidemia yang kronis akan mengganggu fungsi endotel melalui peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida dan deaktivasi NO (*nitric oxide*). NO adalah suatu enzim ateroprotektif yang memiliki fungsi sebagai agen vasodilator, dan merupakan protektor pembuluh darah dari kerusakan endotel dengan mencegah inflamasi melalui penurunan ekspresi molekul adhesi leukosit. Dengan menurunnya kadar NO maka akan semakin memperparah disfungsi endotel dan progresifitas aterosklerosis terus berlangsung (Kumar *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2015; Wihastuti *et al.*, 2015).

Dampak yang ditimbulkan oleh peningkatan permeabilitas vaskular selanjutnya memicu akumulasi LDL yang dengan mudah memasuki *sub-endothelial space* (Sakellarios *et al.*, 2011). LDL yang mengalami sekuesterasi di dalam tunika intima sangat rentan mengalami modifikasi melalui proses oksidasi karena keberadaannya yang terbatas terhadap paparan antioksidan plasma. Setelah teroksidasi, maka LDL menjadi OxLDL yang bersifat pro-inflamasi dengan menghasilkan sitokin yang meningkatkan molekul adhesi serta faktor kemotaktik yang mengundang sel-sel inflamasi seperti sel T, makrofag, neutrofil, dan monosit ke dalam tunika intima (Chhabra, 2009). Monosit dalam tunika intima selanjutnya segera mengalami diferensiasi

menjadi makrofag dan memfagosit OxLDL. Hal ini dimediasi oleh reseptor klasik yang terdapat pada permukaan OxLDL yang dikenali oleh reseptor *scavenger* makrofag sehingga terbentuklah sel busa. Sel busa memiliki peranan penting dalam aterosklerosis karena sel busa menggambarkan proses pembentukan *fatty streak* yang merupakan prekursor plak aterosklerosis. OxLDL dalam sel busa bersifat sitotoksik sehingga sel busa pada tunika intima akan mengalami kematian sel terprogram (apoptosis). Kematian makrofag yang berisi lipoprotein tersebut akan membentuk inti plak kaya lipid (inti nekrotik) (Longo *et al.*, 2015).



**Gambar 2.1. Perkembangan Aterogenesis** (Simionescu dan Sima, 2012)

Akumulasi sitokin-sitokin inflamasi seperti IL-1 (Interleukin-1) dan TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) dan *growth factor* seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *fibroblast growth factor* oleh sel monosit, makrofag, dan limfosit kemudian memicu respons vaskular berupa proses migrasi sel otot polos dari lapisan tunika media ke tunika intima. Sel otot polos pembuluh darah berproliferasi dan memproduksi matriks ekstraseluler untuk membentuk

suatu struktur berbentuk kubah atau *fibrous cap* dengan inti nekrotik yang merupakan tanda lesi endotel tingkat lanjut. (Fok, 2012).

Lp-PLA<sub>2</sub> merupakan suatu enzim yang dihasilkan oleh sel-sel pro-inflamasi seperti makrofag, limfosit, dan sel mast. Migrasi sel-sel tersebut ke dalam lapisan sub-endotel dan plak aterosklerosis akan meningkatkan kadar Lp-PLA<sub>2</sub> dalam jaringan pembuluh darah. Reseptor Lp-PLA<sub>2</sub> ditemukan pada OxLDL. Terbentuknya ikatan antara Lp-PLA<sub>2</sub> dengan reseptornya selanjutnya menghasilkan reaksi berupa hidrolisa partikel OxLDL dengan hasil akhir berupa LysoPC (*Lysophosphatidylcholine*) dan OxFA (*Oxidized Fatty Acid*). LysoPC yang memicu proses inflamasi dan disfungsi endotel dengan menghambat kerja *endothelial nitric oxide synthetase* (eNOs) secara kronis serta melalui karakteristiknya berupa kemotaksis dan pro-apoptotik. OxFA juga memiliki efek peningkatan inflamasi dengan mengaktifasi monosit hingga menginduksi apoptosis makrofag. Akibat inflamasi yang terus meningkat, menyebabkan perluasan inti nekrotik ateroma, penipisan kapsul fibrosa, hingga destabilisasi plak (Immanuel dan Tjiptaningrum, 2010).

#### 2.1.2.1 Disfungsi Endotel

Endotel adalah satu lapis sel yang menyelimuti lumen vaskular. Endotel memiliki peranan penting dalam regulasi tonus vaskular, aliran darah, dan respons inflamasi melalui keseimbangan antara hasil sekresi faktor-faktor vasodilator berupa *endothelium-derived hyperpolarization factor* (EDHF), NO, dan prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), serta faktor vasokonstriktor seperti endothelin-1, angiotensin II, dan ROS. Selain itu, keseimbangan antara molekul antitrombotik (NO dan PGI<sub>2</sub>) dan protrombotik (faktor *von Willebrand* yang memicu agregasi platelet, dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) (Sena *et al.*, 2013).

Salah satu mediator penting yang disintesis oleh endotel adalah NO karena fungsinya sebagai agen vasodilator, antiplatelet, antiproliferatif, anti-inflamasi, dan antioksidan. NO mampu menghambat proses *rolling* dan adhesi leukosit dengan menurunkan sitokin yang meningkatkan ekspresi VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), MCP (*Monocyte Chemotactic Protein-1*), dan inhibisi transkripsi NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) (Kolluru *et al.*, 2012).

Disfungsi endotel berkaitan erat dengan penurunan NO, baik akibat penurunan sintesis NO maupun penurunan aktivitasnya. Hal ini sangat dipengaruhi oleh stress oksidatif yang di induksi oleh ROS seperti radikal hidroksil, super oksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ). Dalam keadaan normal, ROS akan berikatan oleh antioksidan, namun peningkatan ROS yang berlebih tidak mampu dikendalikan oleh antioksidan. Sehingga NO pada endotel bereaksi dengan ROS dan membentuk peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) yang semakin menginduksi stress oksidatif sel. Beberapa kondisi seperti dislipidemia, hipertensi, merokok, hiperglikemia, dan resistensi insulin pada diabetes mellitus adalah faktor resiko penting peningkatan stress oksidatif (Douglas dan Channon, 2014).

Akibat penurunan produksi NO pada dsifungsi endotel maka terjadi *up-regulation* molekul adhesi, peningkatan sekresi kemokin dan adhesi leukosit, peningkatan permeabilitas sel, oksidasi LDL, aktivasi platelet, dan proliferasi serta migrasi otot polos pada endotel. Sehingga dinding pembuluh darah yang disfungsi lebih rentan mengalami aterosklerosis (Favero *et al.*, 2014).

### 2.1.2.2 Inflamasi

Inflamasi adalah suatu respons protektif yang ditujukan untuk eliminasi penyebab awal jejas pada sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan asal. Inflamasi terbagi menjadi dua pola dasar.

Inflamasi akut adalah radang yang berlangsung relatif singkat, dari beberapa menit sampai beberapa hari, dan inflamasi kronis yang berlangsung selama berhari-hari hingga bertahun-tahun (Kumar *et al.*, 2007).

Inflamasi merupakan cikal bakal terjadinya aterosklerosis yang diawali dengan akumulasi sel-sel pro inflamasi. Beberapa jenis sel-sel pro-inflamasi sering ditemukan pada ateroma, diantaranya adalah makrofag dan sel T limfosit (Longo *et al.*, 2015). Pada aterosklerosis, inflamasi pada endothel berlangsung secara kronik akibat respons terhadap retensi lipid dan peningkatan ROS (Wong *et al.*, 2012).

Rendahnya bioavailabilitas NO akibat peningkatan ROS pada retensi lipid menimbulkan inflamasi pada endothel. Keadaan tersebut meningkatkan ekspresi MCP-1, *monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF), serta molekul adhesi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) yang diinduksi oleh produksi sitokin seperti TNF dan IL-1 dari monosit (Spagnoli *et al.*, 2007). M-CSF menginduksi peningkatan reseptor *scavenger* dan diferensiasi monosit. Sedangkan kemokin MCP-1 mengaktifasi integrin pada membran plasma leukosit untuk memberikan peningkatan afinitas pengikatan sel inflamasi terkait molekul adhesi endothel sehingga memfasilitasi leukosit memasuki lapisan subintima (Kumar *et al.*, 2007).

Setelah bermigrasi ke dalam lapisan intima, monosit segera berdiferensiasi menjadi makrofag dan melakukan fagositosis terhadap lipoprotein yang terdeposisi, terutama LDL teroksidasi melalui mediasi reseptor "klasik" *scavenger* pada LDL yang diinduksi oleh M-CSF. Sehingga terbentuk sel busa yang berakumulasi menjadi *fatty streak* (Longo *et al.*, 2015).

Selama perkembangan ateroma berlangsung, beberapa sel inflamasi bermigrasi menuju plak, antara lain makrofag, limfosit, dan sel mast. Sel mast memiliki peranan pro-aterogenik dengan menghasilkan mediator interleukin-6 (IL-6) dan interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) yang meningkatkan kaskade inflamasi. Sedangkan makrofag menghasilkan sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$  yang meningkatkan produksi faktor pertumbuhan, termasuk *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factors*, dan faktor-faktor lain yang berkontribusi terhadap perkembangan plak (Longo *et al.*, 2015).

Sel T yang merupakan *cell mediated immunity* pada tunika adventisia juga berperan dalam maturasi plak. Sel T-*helper* 1 (Th1) mensekresikan sitokin IFN- $\gamma$  dan TNF. Sementara sel *T-regulation* (Treg) mensekresi IL-10 dan *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) sebagai substansi stimulan poten terhadap produksi kolagen interstisial dan otot polos. Bila proses ini terus berlanjut maka plak ateroma akan berkembang menjadi plak fibrosa (Douglas dan Channon, 2014).

### 2.1.2.3 Migrasi sel otot polos

Sel otot polos pembuluh darah (VSMC) adalah sel stromal yang dominan pada tunika media. VSMC terlibat baik dalam perubahan fisiologis maupun patologis pada dinding pembuluh darah (Lacolley *et al.*, 2012). Pada pembuluh darah normal, VSMC diselubungi oleh kompleks matriks ekstraseluler (ECM) yang terdiri dari kolagen tipe I dan III, elastin, dan proteoglikan guna mempertahankan strukturnya. *Matrix metallo-proteinase* (MMP) merupakan suatu substansi yang dihasilkan oleh monosit/makrofag. Sitokin-sitokin inflamasi seperti interleukin (IL)-1, IL-4, dan TNF- $\alpha$ , serta *growth factor* seperti PDGF, dan *fibroblast growth factor* (FGF)-2 bekerja secara sinergis untuk menginduksi sekresi MMP. MMP bertindak sebagai

katalisator proses degradasi membran basalis di sekitar VSMC sehingga memfasilitasi kontak antara VSMC dengan matriks interstitial. Hal ini mendorong terjadinya perubahan fenotipe dari VSMC (Rudijanto, 2007).

VSMC memiliki beberapa jenis fenotipe. Pada pembuluh darah normal, VSMC kontraktil merupakan fenotipe dominan yang berperan dalam fungsi fisiologis pembuluh darah melalui mekanisme regulasi diameter tekanan darah (vasodilatasi dan vasokonstriksi) serta pengaturan aliran darah. Sebagai respons terhadap *injury* lipid, VSMC mendapatkan fenotipe sintetik dan proliferaatif serta kehilangan beberapa marker fenotipe kontraktil. Fenotipe sintetik VSMC memiliki kapasitas untuk memproduksi protein ECM (Louis dan Zahradka, 2010).

Seiring dengan perkembangan aterosklerosis, ECM terakumulasi pada lesi akibat sitokin-sitokin aterogenik yang menstimulasi VSMC untuk memproduksi proteoglikan dan fibronektin yang berperan dalam keparahan aterosklerosis. Selain meningkatkan produksi ECM, VSMC juga mengekspresikan molekul adhesi seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) yang memfasilitasi migrasi monosit dan limfosit. Selain itu, VSMC juga memicu aktivasi leukosit, menginduksi disfungsi endotel, dan meningkatkan produksi sitokin-sitokin seperti PDGF, TGF- $\beta$ , *macrophage inhibitory factor* (MIF), IFN- $\gamma$ , dan MCP-1 yang semakin memperpanjang proses inflamasi dan disfungsi endotel aterosklerosis (Wang *et al.*, 2012).

Migrasi VSMC serta sintesis ECM merubah *fatty streak* menjadi plak *fibrous fatty* karena ECM merupakan molekul yang bersifat stabilisator terhadap plak aterosklerosis terkait sifatnya yang *fibrous*. Namun, aktivasi inflamasi dan sel-sel imun pada plak dapat menyebabkan apoptosis VSMC

yang biasa diikuti dengan rupturnya plak pada stadium lanjut aterosklerosis (Louis dan Zahradka, 2010).

### 2.1.3 Manifestasi Klinis Aterosklerosis

Aterosklerosis terjadi terutama pada arteri elastik (misal, aorta, arteri karotis, dan arteri iliaka) serta arteri muskular besar. Aterosklerosis ditandai dengan lesi pada tunika intima yang disebut ateroma atau *fibrofatty plaque* yang menyumbat lumen pembuluh maupun melemahkan tunika media sehingga dapat menyebabkan beberapa komplikasi kardiovaskular yang serius. Manifestasi simptomatik aterosklerosis paling sering mengenai arteri yang memperdarahi jantung, otak, ginjal, dan ekstremitas bawah. Infark miokardium (serangan jantung), infark serebri (*stroke*), aneurisma aorta, dan penyakit vaskular perifer (gangren tungkai) merupakan konsekuensi utama aterosklerosis (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.2 Diabetes Mellitus Tipe 2

Untuk memahami konsep diabetes mellitus tipe 2 diperlukan wawasan mengenai definisi, etiologi, faktor resiko, komplikasi, dan terapi.

### 2.2.1 Definisi dan Patogenesis

Diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) merupakan kelainan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia kronis. DMT2 adalah gangguan metabolisme yang multifaktor. Kerentanan genetik dan faktor lingkungan seperti gaya hidup, nutrisi, aktivitas fisik, dan obesitas berpengaruh terhadap manifestasi DMT2. Obesitas, terutama obesitas viseral atau sentral sangat umum ditemukan pada penderita DMT2 (>80% penderita adalah obese). DM tipe 2 terjadi akibat gangguan produksi insulin, resistensi insulin, atau kombinasi keduanya (Kasper *et al.*, 2015).

Dalam metabolisme glukosa secara normal, insulin memiliki peranan penting. Insulin adalah hormon yang diproduksi pada sel  $\beta$  pankreas. Produksi hormon insulin diregulasi secara dominan oleh glukosa dan faktor-faktor minor lain seperti asam amino, keton, peptide gastrointestinal, dan neurotransmitter. Kadar glukosa serum  $>70$  mg/dL menstimulasi sintesis insulin dengan meningkatkan translasi dan *processing* protein. Hormon insulin bekerja pada sel target melalui ikatan dengan reseptornya yang menstimulasi aktivitas intrinsik tirosin kinase sehingga reseptor insulin mengalami autofosforilasi serta mengaktivasi kaskade fosforilasi dan defosforilasi yang kompleks guna menghasilkan efek metabolik. Insulin merupakan hormon yang bersifat anabolik melalui efeknya yang menginduksi penyimpanan karbohidrat dan lemak serta sintesis protein. Sehingga, insulin merupakan regulator penting keseimbangan metabolisme lemak, protein, dan karbohidrat (Longo *et al.*, 2015).

**Tabel 2.1. Kriteria Diabetes Mellitus** (American Diabetes Association, 2015)

A1C $\geq 6,5\%$
ATAU
Kadar glukosa puasa $\geq 126$ mg/dL (7,0 mmol/L). Kondisi puasa didefinisikan sebagai tidak adanya ambilan kalori selama $\geq 8$ jam
ATAU
2 jam glukosa plasma $\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L) selama OGTT ( <i>Oral Glucose Tolerance Test</i> ). Asupan glukosa sebanding dengan 75 gram glukosa anhydrous yang dilarutkan dalam air
ATAU
Pasien dengan gejala klasik hiperglikemia atau krisis hiperglikemia, gula darah acak $\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L)

Pada kondisi fisiologis, kadar glukosa plasma tidak mengalami perubahan fluktuatif meskipun terjadi perubahan keseimbangan antara suplai dan kebutuhan metabolisme tubuh yang cukup besar. Hal ini dikarenakan adanya mekanisme homeostasis glukosa. Homeostasis glukosa merupakan

refleksi dari keseimbangan produksi glukosa dan *uptake* glukosa perifer. Keseimbangan ini secara dominan dipengaruhi oleh peran hormon insulin. Namun pada DMT2, mekanisme homeostasis glukosa tidak berjalan dengan baik. Hal tersebut disebabkan oleh defisiensi insulin akibat gangguan sekresi akibat disfungsi sel  $\beta$  pankreas maupun penurunan respons jaringan terhadap insulin atau resistensi insulin (Ozougwu *et al.*, 2013).

Pada fase awal DMT2, toleransi glukosa masih berada dalam ambang normal meskipun telah terjadi resistensi insulin, hal ini disebabkan oleh mekanisme kompensasi sel  $\beta$  pankreas melalui peningkatan output insulin. Seiring dengan meningkatnya progresifitas resistensi insulin serta hiperinsulinemia kompensatif, sel islet pankreas tidak mampu mempertahankan kondisi hiperinsulinemia yang berlangsung secara kronis. Pada fase lebih lanjut, terjadi defisiensi insulin yang lebih berat serta peningkatan kadar glukosa puasa yang berujung pada diabetes akibat kegagalan fungsi sel  $\beta$  pankreas (Longo *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Faktor Resiko

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit multifaktor. Beberapa faktor resiko yang diketahui dibagi menjadi faktor resiko yang dapat dimodifikasi dan yang tidak dapat dimodifikasi. Faktor resiko yang tak dapat dimodifikasi adalah usia, ras (afrika amerika, latin, asia amerika), dan genetik atau riwayat keluarga dengan diabetes (Holt *et al.*, 2010). DM tipe 2 (DMT2) sangat erat kaitannya dengan riwayat keluarga (Féry dan Paquot, 2010). Dari suatu penelitian kohort diketahui bahwa seseorang dengan riwayat keluarga yang mengalami diabetes berhubungan dengan peningkatan resiko diabetes yang independen terhadap faktor lain seperti obesitas, resistensi insulin, dan gaya hidup. Terutama riwayat diabetes maternal, karena mutasi DNA

mitokondrial diturunkan secara maternal, dan proses pemrograman metabolisme terjadi selama masa *intrauterine* (Fetita *et al.*, 2006).

Perubahan pada gen regulator glukokinase pada kromosom 7p yang dibutuhkan dalam proses glikolisis glukosa juga merupakan salah satu etiologi genetik DMT2. Karena sifatnya yang termasuk dalam regulator metabolisme glukosa, defek pada gen tersebut menyebabkan penderita jatuh ke keadaan hiperglikemia yang dapat didiagnosa sebelum usia 25 tahun atau yang disebut sebagai *maturity onset diabetes of the young* (MODY) (Fajans dan Bell, 2011).

Selain faktor genetik seperti yang telah dipaparkan diatas, faktor yang dapat dimodifikasi atau faktor lingkungan juga berperan dalam terjadinya DMT2 antara lain kurangnya aktivitas fisik dan diet yang tidak seimbang misal tingginya konsumsi lemak dan gula sederhana yang ditambah dengan rendahnya konsumsi serat. Kedua hal tersebut dapat memicu kondisi sindrom metabolik. Sindrom metabolik yang terdiri dari hipertensi, peningkatan glukosa darah, trigliserida, kolesterol, penurunan HDL, dan obesitas abdominal turut berperan dalam DMT2. Obesitas ( $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), terutama obesitas viseral merupakan faktor resiko terbesar dengan persentase sebesar 80-85% dari keseluruhan faktor resiko DMT2 dengan resiko 4-5 kali lebih besar (Ozougwu *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Komplikasi

Keadaan hiperglikemia yang kronis pada diabetes mellitus bersifat destruktif pada multiorgan. Secara umum komplikasi diabetes mellitus dibagi menjadi komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular. Komplikasi mikrovaskular DMT2 dapat bermanifestasi sebagai retinopati diabetik yang banyak dijumpai pada penderita DMT2. Komplikasi mikrovaskular lain dapat berupa diabetik nefropati, dan diabetik neuropati. Mekanisme dasar

komplikasi mikrovaskular adalah akumulasi sorbitol pada sel akibat tingginya jumlah glukosa yang melewati polyol *pathway* sehingga menimbulkan stress osmotik sel. Sedangkan pada komplikasi makrovaskular, mekanisme utamanya adalah aterosklerosis yang berujung pada terjadinya *stroke*, miokard infark, dan komplikasi lainnya (Fowler, 2008).

#### 2.2.4 Terapi

DMT2 merupakan penyakit metabolik yang tak dapat disembuhkan namun dapat dikontrol. Tujuan terapi pada DMT2 adalah mengeliminasi gejala-gejala yang berkaitan dengan hiperglikemia, menurunkan resiko komplikasi mikro dan makrovaskular jangka panjang, dan mengembalikan fungsi normal pasien. Untuk memperoleh tujuan-tujuan tersebut maka dibuat target kontrol glikemik pasien (Gambar 2.3). Gejala-gejala yang berkaitan dengan diabetes akan menurun pada kadar plasma glukosa acak <200 mg/dL (Longo *et al.*, 2015).

**Tabel 2.2 Target Terapi DMT2 (Longo *et al.*, 2015)**

Indeks	Target
Kontrol glikemik	
A1C	<7,0%
Kadar glukosa pre-prandial	70-130 mg/dL
Kadar puncak glukosa post-prandial	<180 mg/dL
Tekanan darah	<130/80
Lipid	
LDL	100 mg/dL (<2,6 mmol/L)
HDL	40 mg/dL (>1 mmol/L) pada laki-laki 50 mg/dL (>1,3 mmol/L) pada perempuan
Trigliserida	150 mg/dL (<1,7 mmol/L)

Terapi DMT2 terdiri dari edukasi pasien, modifikasi nutrisi, perubahan gaya hidup, dan terapi farmakologis. Edukasi pasien diabetes terdiri dari *self-monitoring* terhadap kadar glukosa, pemakaian terapi insulin, manajemen hipoglikemia, perawatan kaki dan tangan, serta perbaikan faktor resiko. Selain itu, penyesuaian nutrisi juga diperlukan pada pasien DMT2. Perubahan

tersebut dapat berupa mengurangi lemak *trans* dan lemak jenuh hingga <7% dari kalori total, modifikasi *intake* karbohidrat, protein, dan lemak yang telah disesuaikan dengan kebutuhan kalori per hari, dan mengurangi konsumsi alkohol (1 gelas per hari). Perubahan diet sebaiknya juga diimbangi dengan aktivitas fisik secara reguler (150 menit/minggu) minimal 3 kali dalam satu minggu untuk mencapai target penurunan 7% berat badan (ADA, 2012).

Terapi farmakologis merupakan lini kedua manajemen DMT2 setelah perubahan gaya hidup. Terapi farmakologis DMT2 mencakup obat-obatan golongan biguanida, sulfonilurea, thiazolidinedione, dan bermacam-macam obat lainnya. Biguanida adalah golongan obat yang umum diberikan setelah seseorang didiagnosa DMT2 yang mampu menurunkan kadar glukosa dengan menghambat produksi glukosa hepatic. Obat golongan sulfonilurea memiliki mekanisme meningkatkan sekresi insulin. Sedangkan thiazolidinedione berguna untuk menurunkan resistensi insulin dan meningkatkan pemakaian glukosa jaringan. Apabila selama 3-6 bulan terapi non-insulin tersebut tidak mencapai target HbA1C maka dapat dipertimbangkan pemberian insulin eksogen (ADA, 2012). Perbandingan berbagai golongan anti diabetes disajikan pada tabel dibawah ini

**Tabel 2.3 Perbandingan Golongan Obat Anti Diabetes (PERKENI, 2011)**

Jenis Obat	Cara Kerja Utama	Efek samping utama	Reduksi A1C	Keuntungan	Kerugian
<b>Sulfonilurea</b>	Meningkatkan sekresi insulin	BB naik, hipoglikemia	1,0-2,0%	Sangat efektif	Meningkatkan berat badan, hipoglikemia (glibenklamid dan klorpropamid)
<b>Glinid</b>	Meningkatkan sekresi insulin	BB naik, hipoglikemia	0,5-1,5%	Sangat efektif	Meningkatkan berat badan, pemberian 3x/hari, harganya mahal dan hipoglikemia

Lanjutan →

Jenis Obat	Cara Kerja Utama	Efek samping utama	Reduksi A1C	Keuntungan	Kerugian
<b>Penghambat glukosidase-alfa</b>	Menghambat absorpsi glukosa	Flatulens, tinja lembek	0,5-0,8%	Tidak ada kaitan dengan berat badan	Sering menimbulkan efek gastrointestinal, 3x/hari, mahal
<b>Tiazolidindion</b>	Menambah sensitifitas terhadap insulin	Edema	0,5-1,4%	Memperbaiki profil lipid (pioglitazon), berpotensi menurunkan infark miokard (pioglitazon)	Retensi cairan, CHF, fraktur, berpotensi menimbulkan infark miokard, dan mahal
<b>DPP-4 inhibitor</b>	Meningkatkan sekresi insulin, menghambat sekresi glukagon	Sebah, muntah	0,5-0,8%	Tidak ada kaitan dengan berat badan	Penggunaan jangka panjang tidak disarankan, mahal
<b>Inkretin analog/mimetik</b>	Meningkatkan sekresi insulin, menghambat sekresi glukagon	Sebah, muntah	0,5-1,0%	Penurunan berat badan	Injeksi 2x/hari, penggunaan jangka panjang tidak disarankan, dan mahal
<b>Insulin</b>	Menekan produksi glukosa hati, stimulasi pemanfaatan glukosa	Hipoglikemi, BB naik	1,5-3,5%	Dosis tidak terbatas, memperbaiki profil lipid dan sangat efektif	Injeksi 1-4x/hari, harus dimonitor, meningkatkan berat badan, hipoglikemia, dan analognya mahal

### 2.3 Diabetes Mellitus Tipe 2 Sebagai Faktor Resiko Aterosklerosis

Diabetes mellitus berkaitan erat dengan hiperglikemia, resistensi insulin, dislipidemia, obesitas sentral, dan sering pula disertai dengan hipertensi. Kondisi tersebut dikenal sebagai sindroma metabolik yang merupakan faktor resiko utama dalam aterosklerosis.

Beberapa penelitian *in vivo* menyatakan bahwa kelinci yang diinduksi diabetes dengan alloxan yang diberi pakan tinggi kolesterol serta diinjeksi insulin menunjukkan peningkatan plak aterosklerosis dan meningkatkan resiko kejadian penyakit kardiovaskular sebesar 1,5-2 kali lipat (DeFronzo, 2010).

Terdapat tiga mekanisme utama pemicu terjadinya aterosklerosis pada diabetes mellitus tipe 2 yakni akibat glikosilasi protein dan lipid, stress oksidatif, dan aktivasi protein kinase C (PKC) (Giacco dan Brownlee, 2010).

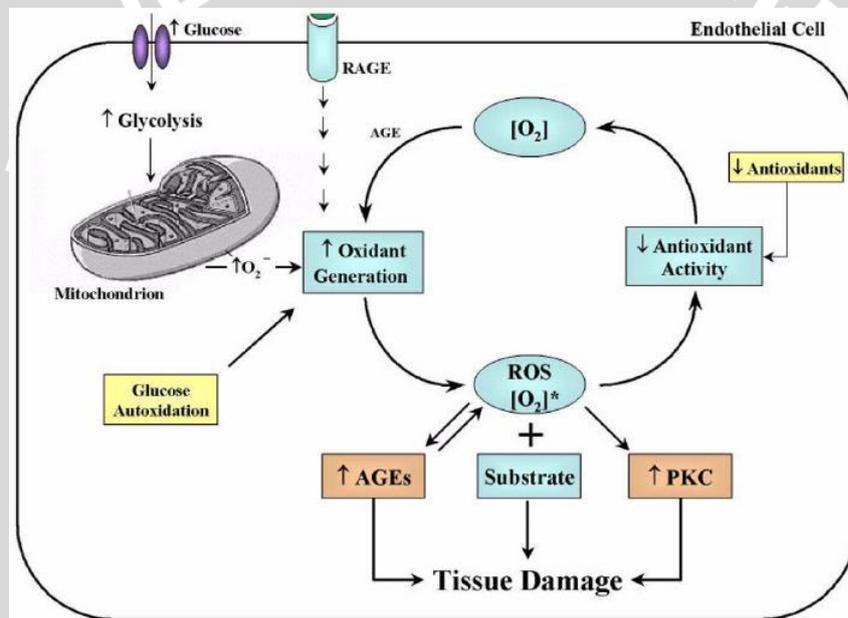
Glikosilasi protein dan lipid terjadi akibat kondisi hiperglikemia, glukosa yang tersirkulasi dalam jumlah besar akan meningkatkan kemungkinan untuk mengadakan reaksi kimia dengan molekul lainnya, seperti protein berupa kolagen dalam pembuluh darah sehingga membentuk kompleks *advanced glycosylation end products* (AGE) yang bersifat ireversibel. Pembentukan AGE dapat menyebabkan akselerasi proses aterosklerosis melalui berbagai mekanisme diantaranya adalah dengan meningkatkan glikosilasi apoprotein B dan fosfolipid pada LDL sehingga terjadi perubahan proses klirens LDL fungsional oleh makrofag dan meningkatkan potensi pembentukan LDL teroksidasi. Hal ini terjadi karena apo-B yang merupakan protein pada LDL yang dikenali oleh reseptor makrofag mengalami glikosilasi sehingga makrofag tidak mengenali LDL melalui reseptor utamanya yang memiliki afinitas tinggi melainkan melalui reseptor *scavenger* yang memiliki afinitas lebih rendah sehingga LDL yang difagositosis cenderung terakumulasi pada intraseluler dan terbentuk sel busa serta aterosklerosis. Selain itu, proses glikosilasi juga terjadi pada komponen matriks dinding vaskular yang mempengaruhi interaksinya dengan reseptor integrin transmembran, sehingga menyebabkan penurunan adhesi molekul endotel. Akibat penurunan adhesi endotel maka permeabilitasnya terhadap makromolekul seperti lipid semakin meningkat sehingga lipid dengan mudah memasuki lapisan subendotel dan mengalami akumulasi. Mekanisme lain terkait AGE yang dapat meningkatkan aterosklerosis dicapai melalui pembentukan ikatan dengan reseptor AGE (RAGE) yang terdapat pada sel-sel yang berkaitan dengan aterosklerosis

seperti makrofag, sel endotel, dan otot polos. Pada makrofag, AGE memiliki pengaruh meningkatkan produksi mediator inflamasi IL-1, TNF- $\alpha$ , dan PDGF. Sedangkan pada otot polos, ikatan AGE pada reseptornya berperan dalam proliferasi seluler. Sementara itu peningkatan molekul adhesi terjadi akibat interaksi AGE pada dinding endotel untuk memfasilitasi migrasi sel inflamasi ke dalam lesi (Draznin, 2006; Rupp dan Bernhard, 2012).

Mekanisme utama kedua adalah melalui aktivasi sistem PKC. Aktivasi PKC terjadi oleh karena hiperglikemia intraseluler pada sel insulin independen yang melakukan kompensasi terhadap resistensi insulin. Sistem PKC teraktivasi oleh peningkatan pembentukan diasilgliserol (DAG) yang dibentuk dari hasil *intermediate* glikolisis berupa dihidroksi-aseton-fosfat dan gliseraldehyde 3-fosfat. Sistem PKC banyak terdistribusi di dalam sel dan terlibat dalam transkripsi dan transduksi sinyal faktor-faktor pertumbuhan, meningkatkan ekspresi TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) yang merupakan faktor pertumbuhan terpenting dalam regulasi matriks ekstraseluler dengan mengaktivasi ekspresi gen proteoglikan dan kolagen serta menghambat sintesis enzim proteolitik. Sehingga peningkatan TGF- $\beta$  dapat memberikan efek penebalan pada membran basalis kapiler (Abdul-Ghani dan DeFronzo, 2010).

Sedangkan mekanisme terakhir adalah stress oksidatif. Proses utama terjadinya stress oksidatif pada hiperglikemia adalah melalui *hyperglycemia-induced intracellular* ROS, yang diproduksi oleh mitokondria akibat peningkatan glikolisis pada sel independen insulin. Hal ini berkaitan dengan rantai transport electron yang menyebabkan peningkatan produksi superoksida (Liemburg-Apers *et al.*, 2015).

Ketiga mekanisme diatas tidak berdiri secara sendiri-sendiri melainkan memiliki hubungan antara satu sama lain, contohnya adalah pada *hyperglycemia-induced intracellular ROS* maka akan meningkatkan pembentukan AGE dan aktivasi PKC secara langsung. Akibat peningkatan mediator-mediator inflamasi pada proses tersebut serta keadaan hiperglikemia yang kronis pada DM2, maka pembentukan *reactive oxygen species* turut terstimulasi sehingga terjadi stress oksidatif yang semakin mempercepat progresifitas aterosklerosis (Giacco dan Brownlee, 2010).



Gambar 2.2 Patogenesis Aterosklerosis pada Diabetes Mellitus Tipe 2 (Chikezie, 2015)

## 2.4 Sel Busa (Foam Cell)

Untuk memahami mengenai sel busa diperlukan wawasan mengenai definisi, patogenesis, dan metode perhitungannya.

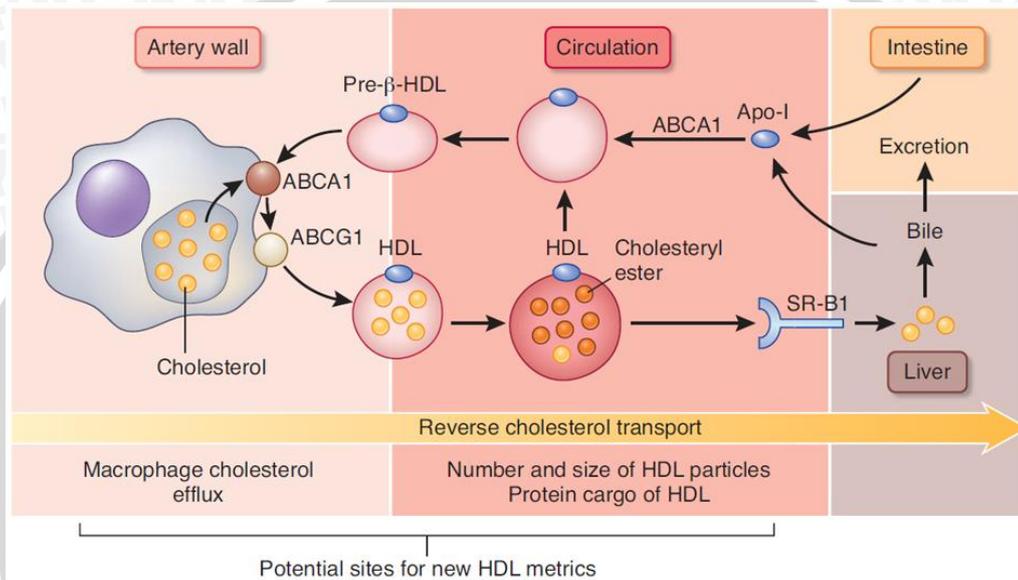
#### 2.4.1 Definisi

Sel busa adalah sel kaya lemak pada lesi aterosklerosis. Sel ini berasal dari sel monosit darah yang telah berdiferensiasi menjadi sel makrofag jaringan. Pada kondisi aterosklerosis, kondisi hiperlipidemia menyebabkan LDL mengalami agregasi pada lapisan intima pembuluh darah. Proses oksidasi LDL oleh radikal bebas yang dihasilkan oleh makrofag dan sel pro inflamasi lainnya selanjutnya menginduksi perubahan sifat kimiawi lemak dan menghasilkan LDL teroksidasi (OxLDL). OxLDL lalu difagositosis oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* makrofag sehingga terbentuk sel busa (Kumar, 2007).

#### 2.4.2 Pembentukan Sel Busa

Sel busa adalah tanda utama fase awal aterosklerosis. Ketidakseimbangan antara influks kolesterol, esterifikasi, dan efluks merupakan mekanisme utama pembentukan sel busa. Sel busa terbentuk akibat fagositosis OxLDL yang diperantarai oleh *scavenger receptors* (SRs), CD 36, dan SR-kelas A (SR-A). Lipoprotein lalu dibawa menuju lisosom untuk dihidrolisa menjadi FC (*free cholesterol*) oleh lysosomal acid lipase (LAL). Untuk mencegah efek toksik akumulasi FC maka FC yang dilepas akan di re-esterifikasi pada retikulum endoplasma (ER) oleh Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT1) menjadi kolesterol ester (CE) dan diakumulasi dalam sitoplasma sebagai droplet lipid. Kemudian kolesterol mengalami efluks baik secara difusi pasif atau secara aktif melalui transporter ATP-binding cassette (ABC) A1 (ABCA1), ABCG1, dan *scavenger receptor*-B1 (SR-B1). Selanjutnya kolesterol yang mengalami efluks berikatan dengan HDL atau apolipoprotein A-I untuk dimetabolisme di dalam liver. Mekanisme ini disebut sebagai *reverse cholesterol transport* (Yu et al., 2013).

Dalam aterosklerosis, proses ini tidak berlangsung dengan baik, akibat kadar kolesterol plasma yang tinggi maka proses efluks tidak dapat mengimbangi influks maupun esterifikasi lipid yang berlebihan, sehingga makrofag bertransformasi menjadi sel busa yang menjadi cikal bakal terbentuknya *fatty streak* dan plak aterosklerosis.



**Gambar 2.3 Skema Mekanisme Reverse Cholesterol Transport** (Heinecke, 2012)

Diabetes Mellitus (DM) dan hiperglikemia berhubungan terhadap aterosklerosis yang prematur dengan progresifitas cepat. Hal ini dimediasi oleh disfungsi vaskular, peningkatan inflamasi dan peroksidasi lipid yang meningkatkan makrofag serta pembentukan sel busa. Pada DM, oksidasi LDL oleh makrofag meningkat akibat aktivasi sistem pro-oksidan dan deplesi antioksidan seperti paraoxonase (PONs). PONs berfungsi sebagai protektor aterogenesis melalui mekanismenya yang menghambat perkembangan aterosklerosis dengan menstimulasi sekresi insulin dari sel  $\beta$  pankreas serta dan sifat antioksidan yang dimilikinya (Kaplan *et al.*, 2012).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Kaplan *et al* (2012), diketahui bahwa insulin secara signifikan menghambat pembentukan sel busa dan plak aterosklerosis. Insulin secara langsung menghambat oksidasi lipid dan mencegah akumulasi makrofag serta kolesterol dengan menghambat ekspresi CD36 sebagai reseptor pembentukan ligan makrofag dengan kolesterol serta menurunkan ekspresi HMGcoA reduktase sehingga terjadi penurunan biosintesis kolesterol. Sehingga kondisi hipoinsulinemia maupun resistensi insulin pada DM tipe 2 merupakan faktor resiko yang penting terhadap pembentukan sel busa.

#### **2.4.3 Perhitungan Sel Busa (*foam cell*)**

Sel busa dapat diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali setelah pewarnaan dengan pengecatan hematoksilin eosin (Wang *et al.*, 2012).

##### **2.4.3.1 Fiksasi Blok Parafin**

Melalui pengamatan secara mikroskopis, sel dan jaringan pada keadaan sehat memiliki pola reguler. Namun, dalam keadaan patologis perubahan struktural dapat terjadi dan dapat diamati secara histopatologis yakni dilakukan dengan melihat sediaan jaringan dibawah mikroskop (Rolls, 2011). Prinsip dari pembuatan blok paraffin meliputi fiksasi sampel organ pada formalin 10%, dehidrasi supaya parafin dapat memasuki jaringan secara sempurna menggunakan alkohol bertingkat atau dengan *Automatic Tissue Processor*, pembuatan blok parafin, dan pemotongan (*sectioning*) blok paraffin (Nowacek, 2010). Proses pemotongan memerlukan instrumen dengan presisi yang tinggi untuk mempermudah pengamatan jaringan yakni dilakukan dengan mikrotom. Parafin dipotong dengan ketebalan 3-5  $\mu\text{m}$  lalu diapungkan pada permukaan air dalam *waterbath* dan ditempatkan diatas slide mikroskop

dan dilanjutkan dengan pengecatan agar bisa diamati dibawah mikroskop binokuler (Rolls, 2011).

#### 2.4.3.2 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Hematoksilin adalah pewarnaan yang paling penting dan paling sering digunakan pada histologi, histokimia, histopatologi, dan sitologi. Hematoksilin berasal dari batang kayu *Hematoxylin campechianum*. Pengecatan dengan hematoksilin eosin adalah teknik yang biasa digunakan untuk pengamatan jaringan secara umum dengan hasil dari pewarnaan meliputi warna biru, merah muda, dan merah. Pengecatan hematoksilin umum digunakan sebagai *nuclear counter stain* dan pewarnaan substansi intraseluler maupun ekstraseluler, dan digunakan sebagai pewarna tekstil meskipun penggunaannya jarang (Avwioro, 2011).

Prosedur pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) menurut Avwioro (2011) terdapat beberapa langkah. Pertama sediaan dideparafinisasi terlebih dahulu dalam *xylene* I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi dalam larutan alkohol 100% (6 menit), alkohol 95% (6 menit), dan alkohol 70% (3 menit) lalu dibilas dengan air bersih mengalir selama 5 menit. Setelah direhidrasi, dilakukan pengecatan dengan *Ehrlich's hematoxylin* selama 15 menit lalu dibilas dengan air bersih mengalir. Untuk memastikan pewarnaan tidak berlebih, slide dibilas dengan alkohol asam (HCl 1% dalam alkohol 70%) selama 1 menit dan dibilas kembali dengan air bersih mengalir. Selanjutnya dilakukan *blueing* atau pembuatan warna biru dengan air mengalir selama 10 menit atau dengan *Scott's tap water* selama 2 menit. Dilanjutkan dengan pewarnaan kedua menggunakan *counter stain* Eosin 1% selama 1 menit. Kemudian didehidrasi dengan alkohol asam dan alkohol absolut masing-masing selama 6 menit. Setelah itu dibersihkan dengan Xylen

I dan II masing-masing 5 menit. Kemudian diakhiri dengan *mounting* dan ditempelkan *cover glass*.

## 2.5 Darapladib

Darapladib adalah inovasi terapi farmakologis aterosklerosis yang dikembangkan mulai tahun 2003 oleh GlaxoSmithKline (GSK). Darapladib bekerja sebagai penyekat enzim *lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>* (Lp-PLA<sub>2</sub>) yang bersifat selektif dan reversibel. Lp-PLA<sub>2</sub> merupakan enzim yang berhubungan dengan metabolisme lipid dan memicu terjadinya inflamasi serta berperan terhadap ketidakstabilan plak aterosklerosis (Riley dan Corson, 2009).

Penggunaan Darapladib bagi manusia tersedia dalam bentuk *enteric coated* dengan dosis 160 mg. Darapladib memiliki karakteristik farmakokinetik berupa sifatnya yang terikat kuat pada protein plasma dengan kadar obat tersirkulasi sebesar 0,034%. Waktu absorpsi yang diperlukan pada tablet *enteric coated* Darapladib mencapai 5-6 jam. Darapladib memiliki waktu  $t_{1/2}$  selama 39,2 jam. Sedangkan  $T_{max}$  (waktu yang diperlukan untuk mencapai  $C_{max}$ / konsentrasi maksimum) adalah selama 9 jam. Setelah mencapai puncak, kadarnya menurun pelan hingga selama 96 jam. Sementara itu, metabolisme Darapladib berkaitan dengan CYP3A4 yang banyak ditemukan di liver (Hu *et al.*, 2015). Sedangkan eliminasi Darapladib banyak dilakukan melalui feses yakni sebesar 43-53% (Dave *et al.*, 2014).

Profil farmakodinamik dari pemberian Darapladib dosis 160 mg/hari selama 28 hari didapatkan aktivitas inhibisi Lp-PLA<sub>2</sub> plasma sekitar 70%. Aktivitas Lp-PLA<sub>2</sub> kembali ke *baseline level* setelah 19 hari pasca dosis terakhir Darapladib. Efek samping yang ditemukan dari penggunaan Darapladib pada 24 subjek antara lain bau feses abnormal (8 subyek/ 33%),

bau urine abnormal (7 subjek [29%]), dan diare (6 subyek [25%]). Intensitas efek samping hanya bersifat ringan dan hilang setelah akhir studi. Tidak ada perubahan signifikan terhadap nilai lab, *vital sign*, EKG, dan pemeriksaan fisik (Hu *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian dengan berbagai metode, jenis hewan coba, dan parameter terkait aterosklerosis telah banyak dilakukan. Pemberian Darapladib pada hewan coba babi yang diinduksi diabetes-hiperkolesterol menunjukkan hasil yang memuaskan terhadap penurunan aktivitas Lp-PLA<sub>2</sub> plasma hingga sebesar 89%. Pada penelitian tersebut, Darapladib diberikan selama 24 minggu dengan dosis sebesar 10 mg/kg/hari (Karakas dan Koenig, 2010). Selain itu, penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa pemberian Darapladib menurunkan ekspresi gen terkait dengan sel makrofag dan sel T, sehingga diduga penyekat enzim Lp-PLA<sub>2</sub> dapat memberikan efek penghambatan progresifitas serta stabilisasi pada plak aterosklerosis. Hasil positif juga ditunjukkan pada penelitian dengan hewan coba *Sprague-Dawley* yang diberi diet hiperkolesterol dan terapi Darapladib dosis rendah (25 mg/kg/hari) dan dosis tinggi (50 mg/kg) yang ditandai dengan peningkatan produksi NO, dan penurunan kadar CRP serta apoptosis kardiomyosit (Zhang *et al.*, 2016). Sedangkan pada hewan coba kelinci hiperlipidemia, pemberian Darapladib 10 mg/kg dapat menurunkan aktivitas Lp-PLA<sub>2</sub> plasma sebesar >60%, kemudian setelah pemberian Darapladib dengan dosis 30 mg/kg terjadi penghambatan aktivitas Lp-PLA<sub>2</sub> hingga sebesar >95% dalam plak aterosklerosis (Tselepis *et al.*, 2011).

Pada fase ke-II *clinical trial* terkait Darapladib, pemberian Darapladib pada dosis 40 mg dan 80 mg selama 14 hari yang diikuti dengan endarterektomi karotis pada 24 jam pasca dosis terakhir dinyatakan bahwa

terjadi penurunan aktivitas Lp-PLA2 sebesar 52% dan 81% pada masing-masing dosis. Dalam analisis selanjutnya didapatkan bahwa pemberian Darapladib dosis 80 mg secara signifikan menurunkan aktivitas kaspase-3 dan kaspase-8 plak sebagai marker apoptosis (Johnson *et al.*, 2014)

Kemudian penelitian *trial* lainnya dilakukan dengan berbagai dosis Darapladib yang bertujuan untuk mengetahui dosis optimal yang diperlukan sebagai terapi aterosklerosis dengan parameter aktivitas Lp-PLA2 dan biomarker lainya terkait inflamasi yang menjadi dasar aterosklerosis seperti IL-6 dan CRP. Pemberian Darapladib dosis 40, 80, dan 160 mg selama 12 minggu dinyatakan menurunkan aktivitas Lp-PLA2 sebesar 43%, 55%, dan 66% pada masing-masing dosis. Sehingga, didapati bahwa efek Darapladib adalah *dose-dependent* dengan efek terbaik ditunjukkan pada dosis 160 mg. Selain penurunan aktivitas Lp-PLA2, marker inflamasi IL-6 dan CRP juga menunjukkan penurunan secara signifikan (Mohler *et al.*, 2008).

Namun, pada tahun 2008, penelitian *trial* STABILITY (*Stabilization of Atherosclerotic Plaque By Initiation of Darapladib Therapy*) dan SOLID-TIMI 52 (*The Stabilization of Plaque Using Darapladib – Thrombolysis in MI 52*) yang dilaksanakan oleh (White *et al.*, 2014) yang bertujuan untuk mengkonfirmasi efektivitas, serta *monitoring* efek samping terapi Darapladib pada manusia menunjukkan hasil yang sebaliknya. Pada akhir penelitian *clinical trial* ini diketahui bahwa pemberian Darapladib dosis 160 mg/hari selama 2,5-3,7 tahun bersama dengan terapi standard statin pada pasien dengan PJK tidak menunjukkan hasil yang signifikan dalam penurunan mortalitas terkait dengan penyakit kardiovaskular.

Berdasarkan hasil beberapa penelitian mengenai Darapladib tersebut dapat disimpulkan masih ada perbedaan pendapat mengenai peran

Darapladib sebagai agen anti-aterogenik sehingga penelitian terhadap Darapladib sebagai pencegah penyakit kardiovaskular masih terus dalam tahap pengembangan

## 2.6 Pembuatan Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Pembuatan tikus model diabetes mellitus tipe 2 dalam penelitian ini dilakukan pada tikus jenis *Sprague-Dawley* dan proses induksi diabetes mellitus tipe 2 pada tikus dijelaskan lebih lanjut pada sub bab berikut ini.

### 2.6.1 Tikus *Sprague-Dawley* Sebagai Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Tikus *Sprague dawley* adalah salah satu strain *Rattus norvegicus* albino yang banyak digunakan dalam penelitian medis. Krinke (2000) menjelaskan bahwa klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai berikut: Kingdom: Animalia, Phylum: Chordata, Subphylum: Vertebrata, Class: Mammalia, Order: Rodentia, Family: Muridae, Genus: *Rattus*, Species: *norvegicus*. Perbedaan tikus *Sprague dawley* dengan tikus *Wistar* adalah peningkatan asupan makanan dibandingkan dengan tikus *strain Wistar* (Kučera *et al.*, 2011). Tikus *Sprague-Dawley* memiliki karakteristik berwarna albino, rata-rata pengeluaran kotoran 6-12 kali dengan berat rata-rata 5-6 gram saat dilahirkan. Sedangkan pada dewasa rata-rata berat badan tikus *Sprague-Dawley* mencapai 250-300 gram untuk betina dan 450-520 gram untuk jantan. Rentang hidup tikus albino dapat mencapai 2,5-3,5 tahun. Ditemukan oleh R.W. Dawley dari Wisconsin pada tahun 1925 (Koolhas, 2010), tikus *Sprague-Dawley* adalah *strain* yang cocok digunakan pada model obesitas dan aterosklerosis akibat responsnya yang baik terhadap induksi *high-fat diet* hingga 32-45 kkal% diet lemak (Gajda, 2008).

## 2.6.2 Pembuatan Tikus *Sprague-Dawley* Diabetes Mellitus Tipe 2

### 2.6.2.1 High Fat Diet (HFD)

Diet tinggi lemak (HFD) pertama kali diperkenalkan oleh Masek dan Febry pada tahun 1959 sebagai jenis pakan untuk induksi obesitas dengan mengintervensi nutrisi pada tikus. Beberapa studi mengungkapkan bahwa pemberian HFD dapat memicu hiperglikemia dan resistensi insulin secara sistemik akibat pengaruhnya terhadap transduksi sinyal insulin pada jaringan otot dan liver. Dari hasil penelitian-penelitian yang telah dilakukan, pemberian HFD dapat diterima sebagai jenis pakan yang mampu menginduksi sindroma metabolik dengan resistensi insulin serta menyebabkan kompromisasi fungsi sel  $\beta$  pada tikus (Buettner *et al.*, 2006).

Berbagai penelitian menggunakan HFD dalam penelitian mengenai aterosklerosis. Berikut ini merupakan komposisi diet aterogenik HFD pada penelitian Murwani (2006) :

**Tabel 2.4 Komposisi Pakan (Murwani, 2006)**

Bahan Pakan	Pakan				
	Normal	I	II	III	IV
Confeed PAR-S	225 gr	200 gr	200 gr	200 gr	200 gr
Terigu	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr
Kolesterol	-	4 gr	8 gr	8 gr	8 gr
Asam kolat	-	0,4 gr	0,4 gr	0,8 gr	0,8 gr
Minyak babi	-	10 ml	10 ml	10 ml	40 ml
Air	100 ml	85,6 ml	81,6 ml	81,2 ml	51,2 ml

**Tabel 2.5 Hasil Pengukuran Kadar Kolesterol Darah (mg/dL) (Murwani, 2006)**

No.	Diet Normal	Diet Aterogenik			
		Pakan I	Pakan II	Pakan III	Pakan IV
1.	70,61	119,00	212,58	263,23	256,34
2.	58,88	159,30	182,74	258,33	376,64
3.	64,27	259,90	292,23	383,33	368,00
4.	48,71	208,90	272,99	311,69	402,00
Rata-rata (SD)	60,62 (9,27)	186,78 (61,06)	240,14 (51,14)	304,15(58,02)	351,25(68,84)

Dari hasil pengukuran kadar kolesterol pada tabel diatas dapat diamati bahwa pemberian asam kolat sebesar 0,2% dan minyak babi 10% dapat meningkatkan kadar kolesterol darah lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan minyak babi dan asam kolat. Komposisi pakan HFD yang diberikan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

**Tabel 2.6 Komposisi Pakan HFD**

Bahan Pakan	Berat (gram)
Tepung	200
PAR-S	620
Kolesterol	10
Asam Kolat	2
Korsvet	168
Total	<b>1000</b>

#### 2.6.2.2 Streptozotocin (STZ)

STZ adalah senyawa glukosamin-nitrosurea yang berasal dari *Streptomyces achromogenes*. Secara klinis, STZ digunakan sebagai agen kemoterapi terhadap karsinoma sel  $\beta$  pankreas karena sifatnya yang toksik terhadap sel tersebut. Oleh karena itu STZ juga banyak digunakan dalam penelitian diabetes mellitus. Sifat toksik STZ dicapai dengan mekanismenya yang cenderung terakumulasi di dalam sel  $\beta$  pankreas yang difasilitasi oleh reseptor GLUT2 transporter sehingga terjadi kondisi hipoinsulinemia dan hiperglikemia (Graham *et al.*, 2011).

Penentuan penggunaan dosis STZ disesuaikan terhadap efek yang diharapkan pada hewan coba. Pada dosis besar (160-240 mg/kg) terjadi kerusakan yang masif pada sel  $\beta$  pankreas sehingga tikus mengalami DM tipe

1 yang parah. Sementara pada dosis yang lebih rendah (20-30 mg/kg) terjadi progresifitas diabetes mellitus yang juga rendah tetapi tidak berdampak pada penurunan massa sel  $\beta$  pankreas (Graham *et al.*, 2011; Okamoto *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2010). Sehingga untuk induksi kondisi diabetes mellitus tipe 2 pada hewan coba digunakan STZ dalam dosis yang rendah.

