

**EFEK DARAPLADIB SEBAGAI PENYEKAT SELEKTIF LP-PLA2
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-1 β DAN INTERLEUKIN-6
PADA JANTUNG TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL DIABETES
MELLITUS TIPE 2**

THESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Biomedik**



Oleh:

ROSARIA DIAN LESTARI

NIM 156070100011005

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018



TESIS

Efek Darapladib Sebagai Penyekat Selektif Lp-PLA2 terhadap Ekspresi Interleukin-1 β dan Interleukin-6 pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Oleh:

Rosaria dian lestari,dr

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal : 6 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

Dr. Titin Andri Wihastuti, S.Kp. M.Kes.
Ketua

Prof. Dr. dr. Djangan Sargowo, SpPD., SpJP (K)
Anggota

Penguji,

dr. Hidayat Sujuti, SpM., Ph.D
Penguji 1

Dr. dr. Umi Kalsum, MKes
Penguji 2

Malang,
Universitas Brawijaya
Dekan,



Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP. 195804141987012001



IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL TESIS:

EFEK DARAPLADIB SEBAGAI PENYEKAT SELEKTIF LP-PLA2 TERHADAP
EKSPEKSI INTERLEUKIN-1 β DAN INTERLEUKIN-6 PADA JANTUNG TIKUS
SPRAGUE DAWLEY MODEL DIABETES MELLITUS TIPE 2

Nama Mahasiswa : Rosaria Dian Lestari
NIM : 156070100011005
Program Studi : Biomedik
Peminatan : Anatomi dan Histologi

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. Titin Andri Wihastuti, S.Kp, M.Kes
Anggota : Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo, Sp.PD, Sp.Jp, FIHA, FACC,
FESC, FCAPC, FASCC

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM.
Dosen Penguji 2 : Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

TIM MONITORING EVALUASI

Tim Monev : Edwin Widodo, S.Si, M.Sc
Tanggal Ujian : 6 Januari 2018

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak dapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 6 Januari 2018

Mahasiswa.



Nama : Rosaria dian Iestari
NIM : 156070100011005
PS : Ilmu Biomedik
Prog. : Pascasarjana
Fak : Kedokteran UB

RIWAYAT HIDUP

Rosaria Dian Lestari, lahir pada tanggal 6 Februari 1985 di Surabaya, merupakan anak pertama dari Bapak Ir. H. Midyansyah Baslan dan Ibu Hj. Sri Lestari Fatima. Lulus dari SDN Lowokwaru IV Malang pada tahun 1997, lulus dari SMPN 5 Malang pada tahun 2000, dan lulus dari SMUN 3 Malang pada tahun 2003. Pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan lulus dengan mendapatkan gelar dokter (dr.) pada tahun 2009. Pada tahun 2016 mengambil Program Magister Ilmu Biomedik pada Universitas Brawijaya Malang dan selesai ujian akhir pada tanggal 6 Januari 2018. Bekerja sebagai dokter umum pada RSUD Prasetya Husada, BLK Lawang, dan tim Telemedicine FKUB Malang pada tahun 2010-2011. Sejak tahun 2011-saat ini bekerja sebagai dosen pada Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Malang, Februari 2018



ABSTRAK

Rosaria Dian Lestari, NIM. 070100011005. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 6 Januari 2018. Efek Darapladib Sebagai Penyekat Selektif Lp-PLA2 Terhadap Ekspresi Interleukin-1 β dan Interleukin-6 pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model Diabetes Mellitus Tipe 2. Komisi Pembimbing Ketua: Titin Andri Wihastuti, Anggota: Djanggan Sargowo, Hidayat Sujuti, Umi Kalsum.

Penyakit metabolik seperti diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) merupakan suatu kondisi pro inflamasi dan dapat menurunkan fungsi dari jantung. Pola *classical western diet* yang mengandung banyak lemak dan gaya hidup sedenter (kurang aktif bergerak) juga memiliki efek pada patofisiologi kardiovaskuler. Makanan tinggi lemak saat ini juga dikaitkan dengan dengan efeknya pada patofisiologi jantung, seperti inflamasi dan disfungsi kontraktilitas jantung. Resistensi insulin yang merupakan penanda dari diabetes mellitus tipe 2 merupakan faktor resiko dari terjadinya gagal jantung, yang merupakan penyebab kematian utama pada pasien dengan DMT2.

Terdapat hubungan antara inflamasi kronis ringan dan kelainan metabolik, yang berhubungan dengan abnormalitas produksi sitokin. Inflamasi adalah respon pertama dan utama dari jantung pada kondisi diabetes, dan secara aktif terlibat dalam proses terjadinya gagal jantung pada kardiomiopati diabetik. Beberapa sitokin pro inflamasi yang meningkat ekspresinya pada obesitas dan diabetes adalah Interleukin-1 β (IL-1 β) dan Interleukin-6 (IL-6).

Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) dikenal dapat meregulasi proses inflamasi. Darapladib adalah obat baru yang secara selektif menghambat kerja enzim Lp-PLA2, sehingga memiliki efek anti inflamasi. Sehingga penelitian ini dilakukan bertujuan untuk menyelidiki apakah Darapladib sebagai penyekat selektif Lp-PLA2 dapat mencegah terjadinya proses inflamasi pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 dengan menurunkan produksi sitokin pro inflamasi, khususnya IL-1 β dan IL-6.

30 tikus Sprague-Dawley dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok normal (N), diabetes mellitus tipe 2 (DM) dan diabetes mellitus tipe 2 dengan terapi Darapladib (DMDP). Masing-masing kelompok dibagi menjadi periode perlakuan 8 minggu dan 16 minggu. Kelompok normal diberi pakan normal dan minum *ad lib*, sementara kelompok DM mendapat pakan tinggi lemak selama 4 minggu. Kemudian diberikan injeksi Streptozotozin (STZ) dosis rendah pada intraperitoneal pada akhir minggu ke 4. Pemberian pakan tinggi lemak kemudian dilanjutkan sampai 8 minggu dan 16 minggu. Darapladib diberikan pada kelompok DMDP per oral dengan dosis 20mg/kg selama 8 dan 16 minggu. Parameter pada penelitian ini adalah ekspresi IL-1 β dan IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2, yang diukur menggunakan metode immunofluoresensi dan dikuantifikasi menggunakan *software Fluoview v.1.7.A*. Penelitian ini juga mengukur kadar gula darah puasa, kadar insulin plasma dan resistensi insulin menggunakan rumus *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR).

Kelompok DM memiliki kadar glukosa darah puasa dan insulin plasma yang tertinggi dibandingkan kelompok lain, dan secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal. Sementara kelompok DMDP memiliki kadar glukosa darah puasa dan plasma insulin yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DM. Pada akhir masa perlakuan, kelompok DM memperlihatkan kondisi resistensi insulin (HOMA-IR > 1.716) sementara kelompok normal dan DMDP tidak memperlihatkan kondisi resistensi insulin (HOMA-IR < 1.716).

Pada periode perlakuan 8 minggu, ekspresi IL-1 β pada kelompok normal berbeda signifikan dengan kelompok DM, sementara kelompok DMDP menunjukkan penurunan yang tidak signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok DM. Ekspresi IL-6 pada kelompok normal berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DM, serta pada kelompok DMDP juga menunjukkan penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DM. Pada periode perlakuan 16 minggu, ekspresi IL-1 β pada kelompok normal berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DM, tetapi kelompok DMDP tidak

menunjukkan penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DMDP. Ekspresi IL-6 pada kelompok normal berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok DM, tetapi kelompok DMDP tidak menunjukkan penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DM.

Hal yang terlihat pada penelitian ini adalah Darapladib sebagai penyekat selektif enzim Lp-PLA2 dapat menurunkan ekspresi IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 pada periode perlakuan 8 minggu. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa proses inflamasi pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 dapat dicegah pada fase awal oleh Darapladib. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat efek Darapladib secara lokal pada jaringan jantung, khususnya pada model DMT2, dengan mengukur ekspresi dan aktivitas enzim Lp-PLA2 pada jaringan jantung hewan coba model diabetes mellitus tipe 2.



ABSTRACT

Rosaria Dian Lestari, NIM. 070100011005. Postgraduate Program Faculty of Medicine Universitas Brawijaya Malang. January 6th 2018. The Effect of darapladib as an Lp-PLA2 Inhibitor to Interleukin-1 β and Interleukin-6 Expression on the Heart of Diabetes Mellitus Model Sprague-Dawley Rats. Supervisor Chairman: Titin Andri Wihastuti, Members: Djanggan Sargowo, Hidayat Sujuti, Umi Kalsum.

Metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a pro-inflammatory condition and may lead to compromised myocardial function. The classical western diet which contain a lot of fat and sedentary life style also has effects on cardiovascular pathophysiology. High fat diet even now related to many pathologic effects happened on heart, such as inflammation and contractility dysfunction of the heart. Insulin resistance, which is a hallmark of T2DM is a risk factor of heart failure, the leading cause of death in T2DM patients.

There is a potential link between chronic low-grade inflammation and metabolic disorders, which are associated with abnormal cytokine production. Inflammation is the first respond of the heart in diabetic state, and is actively related to heart failure in diabetic cardiomyopathy. Some of the pro-inflammation cytokine which expression altered in obesity and diabetes are interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6).

Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) regulates the inflammatory process. Darapladib is a novel drug that selectively targets the active-site serine residue of enzyme Lp-PLA2 and therefore has anti-inflammation effect. Therefore, this study wanted to investigate whether Darapladib as an Lp-PLA2 inhibitor can prevent the inflammatory process happened in the heart of Sprague-dawley T2DM rat model by reducing pro-inflammatory cytokine, especially IL-1 β and IL-6.

30 Sprague-Dawley rats were divided into three groups which was normal (N), T2DM (DM), and T2DM with Darapladib administration (DMDP) group. Each group was divided into 8 and 16 weeks (early and late phase). The normal group received normal diet and water *ad lib* and the T2DM model was made by induced the SD rats with High Fat Diet (HFD) for 4 weeks and then Streptozotozin (STZ) low dose was injected in intraperitoneal at the end of week 4. The HFD was then continued for 8 and 16 weeks. Darapladib was given to the DMDP rats per oral with the dose of 20mg/kg for 8 and 16 weeks. The parameters in this study are IL-1 β and IL-6 expressions in heart, measured using immunofluorescence. We also measured the fasting glucose level, plasma insulin level and insulin resistance using HOMA-IR formulation.

The DM groups are having the highest fasting glucose and plasma insulin levels that are significantly higher compared to the normal groups. While the DMDP groups had a lower fasting glucose and plasma insulin levels that are significantly different from the DM groups. At the end of the study, the DM groups revealed an insulin resistance (HOMA-IR > 1.716) while the normal and DMDP groups showed no insulin resistance (HOMA-IR < 1.716).

In early phase, the IL-1 β expression in normal group was significantly different from DM, while in DMDP group the decreasing trend is not significantly differ from the DM. The IL-6 expression was significantly different in normal and DM group, and also in DMDP compared with DM group. In late phase, the IL-1 β expression in normal group was significantly different from the DM group, while in DMDP group the decreasing trend is significantly differ from the DM group. The IL-6 expression in normal group was significantly different from the DM group, while in DMDP the decreasing trend is not significantly differ from the DM group.

As a conclusion, Darapladib as a selective inhibitor of enzyme Lp-PLA2 could reduce the expression of IL-6 on the heart of SD T2DM model rats in 8 weeks of serial time. Therefore, inflammatory process in the heart of Sprague-Dawley T2DM rats model could be reduced by Darapladib in early phase of diabetes mellitus. Further reaserach is needed to find out the effect of Darapladin locally in heart tissue, by measuring the expression and activity of enzyme Lp-PLA2 on heart, especially in T2DM model.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul: Efek Darapladib Sebagai Penyekat Selektif Lp-PLA2 Terhadap Ekspresi Interleukin-1 β Dan Interleukin-6 Pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model Diabetes Mellitus Tipe 2.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi peran enzim Lp-PLA2 yang dikenal memiliki dualisme sebagai pro-inflamasi dan anti-inflamasi. Ketertarikan penulis akan topik ini didasari fakta bahwa diabetes melitus tipe 2 (DMT2) merupakan suatu kondisi pro-inflamasi dan meningkatkan kemungkinan terkena penyakit kardiovaskuler. Sementara penyebab utama kematian pada DMT2 adalah gagal jantung. Darapladib merupakan penyekat selektif dari Lp-PLA2 yang diharapkan dapat menurunkan resiko terjadinya inflamasi yang merupakan dasar patogenesis penyakit jantung pada DMT2. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian Darapladib mampu menurunkan inflamasi yang terjadi pada jantung dengan cara mencegah aktivasi NF-kB dan ekspresi sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1 β dan IL-6 pada jantung tikus Sprague-dawley yang diinduksi oleh pemberian *high fat diet* (HFD) dan injeksi streptozotocin (STZ).

Dengan selesainya tesis ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Titin Andri Wihastuti, S.Kp, M.Kes., sebagai pembimbing pertama yang telah dengan sabar membimbing mulai proses penentuan topik, penulisan proposal sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

2. Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo, Sp.PD, Sp.Jp, FIHA, FACC, FESC, FCAPC, FASCC., sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan dan koreksi pada penulisan tesis ini.
3. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM. sebagai penguji 1 yang telah memberikan masukan dan koreksi pada penulisan Tesis ini.
4. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes sebagai penguji 2 yang telah memberikan banyak masukan dan koreksi pada penulisan Tesis ini.
5. Laboran LSIH yang telah menyempatkan waktunya untuk mendampingi penelitian ini.
6. Yang tercinta Putra Agung D. dan Nadya-Nindya atas segala doa, dampingan, pengertian, kesabaran dan kasih sayangnya.
7. Teman-teman satu payung penelitian Dinda, Hanifa, Tya, Yuni, Ika dan Lutfi atas kerja sama dan kerja kerasnya.
8. Dekan FK Unisma, dr. H. R. M. Hardadi Airlangga, Sp.PD serta Ketua Program Magister Ilmu Biomedik tahun ajaran 2015/2016 Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK.(K) atas kesempatan belajar yang telah diberikan.
9. Teman-teman dosen FK UNISMA atas semua dukungannya.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tesis ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Tesis ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon kritik dan saran membangun dari para pembaca, agar dapat memberikan hasil yang lebih baik nantinya

Malang,

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL

i

LEMBAR PENGESAHAN

ii

PERNYATAAN ORISINALITAS

iii

HALAMAN IDENTITAS TIM PENGUJI

iv

HALAMAN PERNYATAAN KOMUNIKASI ILMIAH

v

KATA PENGANTAR

vi

RINGKASAN

viii

SUMMARY

x

DAFTAR ISI

xi

DAFTAR GAMBAR

xv

DAFTAR BAGAN

xvii

DAFTAR TABEL

xviii

DAFTAR LAMPIRAN

xix

DAFTAR SINGKATAN

xx

BAB 1 PENDAHULUAN

1

1.1 Latar belakang

1

1.2 Rumusan Masalah

5

1.3 Tujuan Penelitian

5

1.4 Manfaat Penelitian

6

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

7

2.1 Jantung dan Pembuluh Darah

7

2.1.1 Anatomi, Histologi dan Fisiologi Jantung dan Pembuluh Darah

7

2.1.2 Anatomi, Histologi, dan Fisiologi Jantung Tikus Sprague-

10

Dawley

13

2.1.3 Imunologi Jantung dan Pembuluh Darah

18

2.2 Penyakit pada Jantung dan Pembuluh Darah

18

2.2.1 Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah: Penyebab Utama

18

Kematian di Dunia

xi

2.2.2 Patomekanisme Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah	19
2.3 Diabetes Mellitus Tipe 2	26
2.3.1 Patofisiologi Diabetes Mellitus tipe 2	26
2.3.2 Hubungan Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah	29
2.3.2.1 Diabetes dan Metabolisme Jantung	33
2.4 Interleukin-1 β	36
2.4.1 Interleukin-1 (IL-1) dan Penyakit Kardiovaskuler	38
2.5 Interleukin-6	41
2.5.1 Interleukin-6 (IL-6) dan Risiko Penyakit Jantung dan Pembuluh darah	43
2.6 <i>Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2)</i>	45
2.6.1 Peran Antioksidan dari Lp-PLA2	47
2.6.2 Aksi Pro-Inflamasi dari Lp-PLA2	49
2.6.3 Lp-PLA2 sebagai Penanda Risiko Kardiovaskuler	53
2.6.4 Peran Lp-PLA2 pada Sindroma Metabolik dan Diabetes Mellitus	57
2.7 Darapladib sebagai Penyekat Selektif <i>Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2)</i>	59
2.7.1 Metabolisme Darapladib	61
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	64
3.1 Kerangka Konsep	64
3.2 Hipotesis	65
BAB 4. METODE PENELITIAN	66
4.1 Desain Penelitian	66
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	66
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian	67
4.3.1 Populasi Penelitian	67
4.3.2 Sampel Penelitian	67
4.3.3 Kriteria Inklusi	67
4.3.4 Kriteria Eksklusi	67
4.3.5 Besar Sampel	67
4.4 Variabel Penelitian	69
4.4.1 Identifikasi variabel	69

4.4.2 Hubungan Antar variabel	69
4.4.3 Defisini Operasional Variabel	69
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	71
4.6 Prosedur Kerja Penelitian	73
4.6.1 Fase Persiapan	74
4.6.2 Fase Perlakuan	74
4.6.2.1 Pembuatan Hewan Coba Model DMT2	75
4.6.2.2 Prosedur Pemberian Darapladib	76
4.6.2.3 Prosedur Pembedahan Tikus	76
4.7 Uji Laboratorium	77
4.7.1 Pemeriksaan Glukosa Darah	77
4.7.2 Pengukuran Kadar Insulin Plasma dan Resistensi Insulin	77
4.7.3 Pemeriksaan Ekspresi IL-1 β Jantung	78
4.7.4 Pemeriksaan Ekspresi IL-6 Jantung	79
4.8 Prosedur Penelitian	80
4.9 Analisis Data	81
4.10 Alur Penelitian	82
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	83
5.1 Data Asupan Pakan dan Perubahan Berat Badan	83
5.2 Pengukuran Kadar Glukosa Puasa, Kadar Insulin, dan Resistensi Insulin	85
5.3 Analisis <i>Immunofluorescence</i>	88
BAB 6 PEMBAHASAN	94
6.1 Pemberian HFD dan STZ dalam menginduksi DMT2	96
6.1.1 Pemberian HFD dan STZ dalam menginduksi peningkatan berat badan	96
6.1.2 Pemberian HFD dan STZ dalam menginduksi hiperglikemia, hiperinsulinemia, dan resistensi insulin	99
6.1.3 Inflamasi pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2 yang Diinduksi HFD dan STZ	101
6.1.3.1 Ekspresi IL-1 β pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2	103
6.1.3.2 Ekspresi IL-6 pada Jantung Tikus Sprague-Dawley	105

Model DMT2	
6.2 Pengaruh Darapladib pada Tikus Sprague-Dawley Model DMT2 yang Diinduksi HFD-STZ	107
6.2.1 Pengaruh Darapladib Pada Glukosa Darah, Insulin Plasma dan HOMA-IR	107
6.2.2 Peran Darapladib pada Inflamasi pada Jantung	110
6.2.2.1 Peran Darapladib terhadap Ekspresi IL-1 β pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2	112
6.2.2.2 Peran Darapladib terhadap Ekspresi IL-6 pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2	113
6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran	114
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	116
7.1 Kesimpulan	116
7.2 Saran	116
DAFTAR PUSTAKA	117
LAMPIRAN	136



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Gambaran Histologis Sel Otot Jantung	10
Gambar 2.2	Gambar Skematis Peran Sitokin dalam Disfungsi Miokard	17
Gambar 2.3	Jejas pada Permukaan Arteri	21
Gambar 2.4	Inflamasi dalam Ruptur Plak dan Trombosis	24
Gambar 2.5	Produksi IL-1 β dan IL-1Ra pada makrofag yang menginfiltrasi sel islet	28
Gambar 2.6	Sitokin Pro-Inflamasi (Hubungan antara Inflamasi dan Trombosis)	31
Gambar 2.7	Peran Insulin pada Jantung	32
Gambar 2.8	Interleukin-1 (IL-1) dan Atherosklerosis	41
Gambar 2.9	Lp-PLA2 dan PARs (<i>Protease-Activated Receptors</i>), mediator-mediator inflamasi	50
Gambar 2.10	Gambaran Skematik dari Mekanisme Pro-Atherogenik dari Lp-PLA2 di Dalam Dinding Pembuluh Darah	51
Gambar 2.11	Peran Lp-PLA2 dalam Penyakit Kardiovaskuler	54
Gambar 5.1	Grafik Perubahan Berat Badan Pada Awal Dan Akhir Perlakuan	84
Gambar 5.2	Grafik Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin, Dan HOMA-IR Pada Tiap Kelompok Perlakuan	87
Gambar 5.3	Hasil Pengecatan <i>Immunofluorescence</i> Yang Menunjukkan Ekspresi IL-1 β Pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Berbagai Kelompok Perlakuan	89

Gambar 5.4 Hasil Pengamatan *Immunofluorescence* Yang Menunjukkan Ekspresi IL-6 Pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Berbagai Kelompok Perlakuan 90

Gambar 5.5 Hasil Analisis Pengamatan *Immunofluorescence* Yang Menunjukkan Ekspresi IL-1 β Dan IL-6 Pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Menggunakan *Software Fluoview V.1.7.A* 91

Gambar 5.6 Grafik Rata-Rata IL-1 B Dan IL-6 Pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2 92



DAFTAR BAGAN

Bagan 3.1	Kerangka Konsep Penelitian	64
Bagan 4.1	Bagan Hubungan Antar Variabel	69



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Komposisi HFD	72
Tabel 5.1	Rata-Rata Asupan Pakan/Hari Dan Perubahan Berat Badan Pada Tiap Kelompok	83
Tabel 5.2	Rata-Rata Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin dan Resistensi Insulin pada Tiap Kelompok Sebelum Pemberian Darapladib	86
Tabel 5.3	Rata-Rata Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin dan Resistensi Insulin pada Tiap Kelompok di Akhir Perlakuan	86
Tabel 5.4	Rata-Rata Ekspresi IL-1 β dan IL-6 Jantung	91



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Berat Badan Tikus dan Analisis Statistik Perubahan Berat Badan Tikus	136
Lampiran 2	Kadar Glukosa Puasa, Insulin, dan HOMA-IR sebelum Pemberian Darapladib	140
Lampiran 3	Kadar Glukosa Puasa, Insulin, dan HOMA-IR pada Akhir Perlakuan dan Analisis Statistik Perubahan Kadar Glukosa, Insulin, dan HOMA-IR	141
Lampiran 4	Ekspresi IL-1 β dan IL-6 Jantung Tikus Sprague-Dawley model DMT2 dan Analisis Statistik Perubahan Ekspresi IL-1 β dan IL-6 Awal dan Akhir Perlakuan	144
Lampiran 5	Surat Pernyataan Kelaikan Etik	149
Lampiran 6	Bukti Acceptance Jurnal Internasional	150
Lampiran 7	Jurnal yang Telah Terbit	151

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus tipe 2 (*Type 2 Diabetes Mellitus-T2DM*) merupakan suatu kondisi pro-inflamasi dan dapat meningkatkan resiko terkena penyakit jantung koroner (Duncan *et al.*, 2003; Klover *et al.*, 2003; Kolb and Mandrup-Poulsen, 2005). Penyakit metabolik seperti obesitas dan diabetes mellitus tipe 2 dapat membuat terjadinya hipertropi kardia dan mengganggu fungsi miokard. Walaupun terdapat peran genetik, usia, obesitas dan gaya hidup kurang bergerak (*sedentary life style*) adalah faktor predisposisi perkembangan penyakit diabetes mellitus tipe 2 (Srinivasan *et al.*, 2005).

Pola *classical western diet* yang mengandung banyak lemak juga dapat menginduksi terjadinya resistensi insulin pada jantung, yang memiliki beberapa efek pada fisiologi kardiovaskuler dan tampaknya berperan dalam perkembangan penyakit kardiovaskuler. Bahkan diet tinggi lemak telah dihubungkan dengan sejumlah efek yang terjadi pada jantung, termasuk diantaranya adalah inflamasi, hipertrofi, fibrosis dan disfungsi kontraktilitas (Tikellis *et al.*, 2008). Resistensi insulin, yang merupakan penanda dari diabetes mellitus tipe 2 juga merupakan faktor resiko dari terjadinya gagal jantung, yang merupakan penyebab kematian utama pada diabetes mellitus tipe 2 (Palomer *et al.*, 2013). Tetapi walaupun data epidemiologis telah menunjukkan bukti tersebut, mekanisme dimana diabetes mellitus tipe 2 mempengaruhi jantung masih belum sepenuhnya terungkap.

Penyakit kardiovaskuler saat ini dikategorikan sebagai penyebab kematian utama di dunia. Penyakit jantung iskemik dan stroke juga masuk pada 10 kelompok teratas penyebab kematian di seluruh dunia, dan tetap tercatat pada

penyebab utama kematian di seluruh dunia pada 15 tahun terakhir (WHO, 2014; Benjamin *et al.*, 2017). Sejumlah besar kasus kematian yang terkait kardiovaskuler muncul disebabkan oleh atherosklerotik dan komplikasi akut dari atherosklerotik, utamanya disebabkan oleh disrupsi plak. Inflamasi merupakan mekanisme penting dari terjadinya disrupsi plak dan sangatlah penting untuk mengetahui mekanisme molekulernya (Libby, 1998; Libby *et al.*, 2014).

Inflamasi kronis subklinis muncul pada kondisi resistensi insulin dan diabetes mellitus tipe 2. Penyakit-penyakit ini berhubungan dengan sindroma metabolik dan dicirikan dengan produksi sitokin yang abnormal, peningkatan protein fase akut, dan aktivasi jalur sinyal inflamasi (Maedler *et al.*, 2011).

Respon utama yang muncul pada jantung terhadap kondisi diabetes adalah stress oksidatif, inflamasi, disfungsi endotel, fibrosis kardias, hipertrofi dan apoptosis, dimana pada keseluruhannya terdapat peran dari *Nuclear Factor* (NF)- κ B. Inflamasi pada jantung adalah hal yang muncul dan terlihat pada awal respon terhadap diabetes dan secara aktif terlibat dalam perkembangan terjadinya gagal jantung pada kardiomiopati diabetik (Lorenzo, Picatoste and Ares-Carrasco, 2011). Beberapa sitokin pro-inflamasi yang diketahui meningkat kadarnya di sirkulasi pada pasien obesitas dan diabetes, adalah *Tumor Necrosis Factor*/TNF- α dan Interleukin-6 (IL-6), yang berperan dalam proses fisiologis yang berkaitan dengan obesitas dan resistensi insulin di dalam jantung (Gray and Kim, 2011).

Interleukin adalah protein-protein yang memfasilitasi perkembangan dan propagasi respon imun dengan memediasi interaksi antara sejumlah besar kelompok sel imun dan inflamasi. Interleukin diperkirakan memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit yang mengenai otot jantung (Han *et*

et al., 1991). Sitokin-sitokin ini mungkin disintesis dan dilepaskan secara lokal di dalam miokardium oleh limfosit dan makrofag (Francis *et al.*, 1998).

Interleukin-1 (IL-1) merupakan mediator pro-inflamasi utama pada proses inflamasi akut dan kronis (Dinarello, 2011). IL-1 β merupakan bentuk utama dari IL-1 yang ada dalam sirkulasi (Stutz, Golenbock and Latz, 2009; Dinarello, 2011). Penelitian oleh Han, *et al.* (1991) menemukan bahwa interleukin yang diekspresikan oleh sel-sel non-sirkulatorik (IL-1 β , IL-4 dan IL-8) ditemukan terdeteksi dalam sampel jaringan jantung manusia. Di dalam miokardium, IL-1 β mRNA dan proteinnya ditemukan di dalam sel-sel endothelial di dalam pembuluh darah kecil, di regio intersitiel diantara miosit dan di dalam miosit jantung itu sendiri. Hal ini mendukung teori bahwa produksi IL-1 β didalam miokardium dan arteri koronaria dapat merupakan faktor penting dalam terjadinya disfungsi miokard pada kardiomiopati dan kemungkinan kondisi lain dimana sel-sel inflamasi menginvasi jaringan jantung (Francis *et al.*, 1998).

Interleukin-6 (IL-6) diketahui juga merupakan penanda inflamasi. Peningkatan kadar IL-6 dalam serum berhubungan dengan peningkatan resiko terkena penyakit kardiovaskuler (Papanicolaou *et al.*, 1998; Ridker *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2003). Peningkatan kadar IL-6 juga berperan dalam patogenesis resistensi insulin. Pada jantung, IL-6 menginduksi faktor transkripsi STAT1 dan STAT3, yang mentargetkan gen yang mengkode protein yang diaktivasi dibawah kondisi stress seperti misalnya pada infark mioakrd akut dan stimulus hipertrofi (Boengler *et al.*, 2008). Karenanya terapi yang ditujukan pada usaha untuk menurunkan regulasi sekresi IL-6 selama obesitas, dapat meningkatkan fungsi jantung dan selanjutnya menurunkan resiko munculnya penyakit kardiovaskuler (Palomer *et al.*, 2013).

Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) diketahui sebagai suatu asetilhidrolase pengaktivasi platelet (*Platelet Activating Factor Acetylhydrolase/PAF-AH*). Enzimnya tersusun dari molekul dengan berat 45 kDa, disekresikan oleh monosit, limfosit T, makrofag, sel-sel mast, dan utamanya oleh sel-sel inflamasi (Zhu, 2016). Lp-PLA2 menghidrolisis LDL teroksidasi (ox-LDL) menjadi lisofosfatidilkolin (*LysoPC*) dan mengoksidasi asam lemak (MacPhee *et al.*, 1999). *LysoPC* menginduksi sitokin-sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , IL-6 dan (TNF- α) (Carlquist, Muhlestein and Anderson, 2007). Proses inflamasi sendiri telah lama dikenal sebagai komponen penting dari patogenesis sindroma metabolik (Koh, Han and Quon, 2005) dan Lp-PLA2 telah dilaporkan berkorelasi dengan beberapa komponen dari sindroma metabolik (Ballantyne *et al.*, 2004; Persson *et al.*, 2007).

Sejumlah obat yang bekerja sebagai inhibitor selektif Lp-PLA2 mulai dikembangkan dan diteliti secara *in vitro* dan *in vivo*, salah satunya darapladib (Hassan, 2015). Darapladib dilaporkan memiliki sifat anti aterogenik dan antiinflamasi melalui hambatan pada proses perluasan plak aterosklerosis dan menurunkan hidrolisis oxLDL dan produk lysoPC (Stafforini and Zimmerman, 2014).

Penelitian yang dilakukan akhir-akhir ini makin mengungkap bukti bahwa terdapat hubungan potensial antara inflamasi kronis ringan pada jantung dan disregulasi metabolik. Mekanisme yang mendasari hubungan inflamasi, gagal jantung dan kardiomiopati dilatasi adalah hal yang tidak sederhana, karena menggabungkan antara metabolisme sistemik yang abnormal dan perubahan fenotipe kardiomiosit. Hal ini mendasari adanya peran signifikan dari inflamasi jantung pada patogenesis penyakit jantung akibat diabetes. Karenanya penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah

Darapladib yang berperan sebagai penyekat selektif Lp-PLA2 dapat mencegah terjadinya fase awal proses inflamasi pada jantung T2DM dengan mereduksi sitokin pro-inflamasi, khususnya IL-1 β dan IL-6.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dapat menurunkan ekspresi Interleukin-1B (IL-1 β) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2?
2. Apakah Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dapat menurunkan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) untuk menghambat terjadinya proses inflamasi pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui apakah Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dapat menurunkan ekspresi Interleukin-1B (IL-1 β) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2.

2. Untuk mengetahui apakah Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dapat menurunkan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Manfaat keilmuan yang didapat adalah menambah pengetahuan dan pemahaman mengenai mekanisme efek Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dalam menghambat terjadinya inflamasi pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis yang didapat adalah menambah pengetahuan mengenai manfaat penyekat selektif Lp-PLA2 untuk menghambat atau mencegah terjadinya inflamasi pada diabetes mellitus tipe 2, sehingga dapat mencegah terjadinya penyakit jantung dan pembuluh darah, dan pada akhirnya mencegah terjadinya kematian akibat penyakit jantung dan pembuluh darah pada diabetes mellitus tipe 2.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jantung dan Pembuluh Darah

2.1.1 Anatomi, Histologi dan Fisiologi Jantung dan Pembuluh darah

Jantung merupakan bagian dari tubuh yang berfungsi sebagai pompa penghisap dan penyalur darah ke seluruh bagian tubuh.

Jantung terdiri dari 2 pompa muskuler yang walaupun terpisah, tetapi beraksi selaras, membedakan sirkulasi mejadi 2 komponen: sirkulasi pulmonal dan sirkulasi sistemik. Bagian kanan jantung menerima darah dengan oksigen minimal, dari seluruh tubuh, melalui vena cava superior dan inferior; dan memompanya melalui trunkus pulmonalis dan arteri menuju paru untuk menerima oksigenasi. Jantung sebelah kiri menerima darah yang teroksigenasi dari paru melalui vena pulmonalis dan memompanya menuju aorta untuk didistribusikan ke seluruh tubuh. Karbondioksida ditukar dengan oksigen di dalam kapiler paru, kemudian darah yang kaya oksigen akan kembali ke jantung kiri (atrium kiri) melalui vena pulmonalis. Sirkuit ini, dari ventrikel kanan menuju paru kemudian ke atrium kiri dinamakan sirkulasi pulmoner. Ventrikel kiri menampung darah yang kaya oksigen yang dikembalikan ke jantung dari sirkulasi pulmoner melalui arteri sistemik (aorta dan cabang-cabangnya), menukarkan oksigen dan nutrisi dengan karbondioksida di kapiler-kapiler dalam tubuh. Kemudian darah yang rendah oksigen ini kembali ke jantung (atrium kanan) melalui vena sistemik (vena cava superior dan inferior). Sirkuit dari ventrikel kiri menuju atrium kanan ini disebut sirkulasi sistemik (Moore, Dalley and Agur, 2010).

Terdapat 3 tipe pembuluh darah: arteri, vena dan kapiler. Darah dengan tekanan tinggi meninggalkan jantung dan didistribusikan ke seluruh tubuh oleh cabang arteri berdinding tebal. Pembuluh darah dengan posisi paling akhir, arteriol, akan menghantarkan oksigen kaya darah ke kapiler. Kapiler kemudian akan membentuk lempeng kapiler (*capillary bed*), dimana terjadi pertukaran oksigen, nutrisi, produk sisa dan substansi lain dengan adanya cairan ekstraseluler. Darah dari lempeng kapiler lewat menuju venula berdinding tipis. Venula kemudian berjalan menuju vena kecil dan kemudian ke vena yang lebih besar. Vena paling besar, yaitu vena cava superior dan inferior, mengembalikan darah dengan oksigen rendah ke dalam jantung (Moore, Dalley and Agur, 2010).

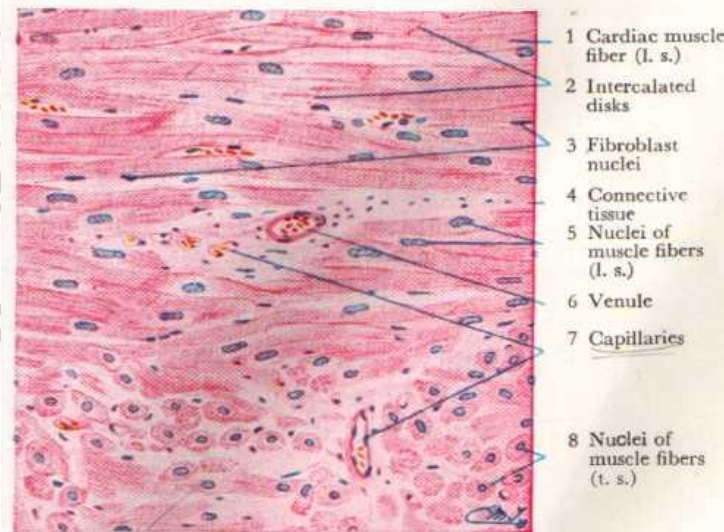
Sistem konduksi jantung terdiri dari nodus intrinsik khusus yang secara ritmis membuat stimulus dan kumpulan otot jantung yang mengkonduksikan impuls. Hasilnya adalah kontraksi yang terkoordinasi dari atrium dan ventrikel. Ritme pembentukan dan kecepatan konduktivitas ditingkatkan oleh divisi simpatis dan diinhibisi oleh parasimpatis dari sistem saraf otonom untuk mencukupi kebutuhan dan mempertahankan energi. Nodus sinoatrial (*SA node*) dan nodus atrioventricular (*AV node*) disuplai oleh cabang nodal dari arteri coronaria dekstra. Bundel atrioventricular dan cabang-cabangnya disuplai oleh arteri coronaria sinistra. Oklusi dari salah satu arteri koroner dengan infark sebagian dari nodal atau jaringan konduktif dapat menjadikan seseorang memerlukan bantuan *pacemaker* kardial buatan. Efek sistem saraf otonom pada arteri koronaria masih paradoks. Stimulasi simpatis membuat terjadinya

vasodilatasi dan stimulasi parasimpatis buat terjadinya vasokonstriksi (Moore, Dalley and Agur, 2010)

Otot lurik yang membentuk dinding Muskuler jantung disebut miokardium. Beberapa otot jantung juga ada pada dinding aorta, vena pulmonalis, dan vena cava superior. Kontraksi otot jantung tidak dibawah kontrol volunter. Denyut jantung diregulasi secara intrinsik oleh suatu *pacemaker*, suatu sistem yang menghantarkan impuls, yang tersusun dari otot jantung khusus, yang nantinya akan dipengaruhi oleh sistem saraf otonom. Otot lurik jantung tampak bergaris di bawah mikroskop. Otot lurik ini dicirikan dengan kecepatan dan kekuatan kontraksinya. Otot lurik jantung berbeda dengan otot lurik skeletal dari lokasi, penampakan, tipe aktivitasnya dan stimulusnya. Untuk mendukung aktivitas jantung yang tinggi dan terus menerus, maka diperlukan aliran darah 2 kali lebih banyak ke otot lurik jantung, dibandingkan dengan otot lurik skeletal (Moore, Dalley and Agur, 2010)

Pada dinding atrium, endocardium terdiri atas endotel, yaitu sebuah lapisan jaringan ikat subendotel tebal, dan miokard tebal pada muskulatur yang tersusun longgar. Epikard membungkus jantung yang diluarnya dilapisi selapis mesotel. Lapisan subepikard terdiri dari jaringan ikat dan lemak yang jumlahnya bervariasi pada bagian jantung yang berbeda. Endokard ventrikel lebih tipis jika dibandingkan dengan endokard atrium, sedangkan miokardnya tebal dan lebih padat. Epikard dan jaringan ikat subepikard menyatu dengan epitel lain dan jaringan ikat yang ada di atrium. Serat purkinje atau serat penghantar impuls yang terdapat pada jaringan subendotel yang longgar. Serat ini berbeda dengan serat otot jantung biasa, karena ukurannya lebih

besar dan terpusat lebih lemah. Pada potongan melintang, serat purkinje terlihat memiliki lebih sedikit myofibril yang tersebar di perifer, meninggalkan sitoplasma perinuclear yang tampak terang. Serat purkinje menyatu dengan serat jantung pada serat peralihan; bagian atas serat sesuai dengan serat purkinje dan bagian bawah sesuai dengan serat otot jantung biasa (Eroschenko, 2003)



Gambar 2.1 Gambaran Histologis Sel Otot Jantung (Eroschenko, 2003)

2.1.2 Anatomi, Histologi dan Fisiologi Jantung Tikus Sprague-Dawley

Penggunaan hewan coba dalam riset bukanlah hal yang baru. Pada tahun 150 M, diseksi manusia telah dilarang karena alasan etik, sehingga percobaan menggunakan hewan coba mulai berkembang.

Saat ini, tikus adalah hewan yang paling banyak digunakan dalam percobaan klinis (de Carvalho and Thomazini, 2013).

Jantung tikus berada pada rongga dada sebelah kiri, diatas diafragma. Jantung terdiri dari 4 ruang (2 atrium dan 2 ventrikel) dan terbungkus oleh selaput perikardia. Perikardia tersusun atas 2 lapisan, yaitu lamina parietalis dan lamina visceralis. Diantara kedua lapis tersebut terdapat ruang perikardia yang berisi cairan perikardia. Otot

jantung walaupun tidak dibawah kontrol kesadaran, tetapi terdiri dari otot lurik, dengan ciri khas adanya diskus intercalatus (Manitoba, tanpa tahun; Biologi, 2016).

Sistem sirkulasi vertebrata terdiri dari pembuluh darah dan sistem limfatika. Sistem peredaran darah pada vertebrata adalah sistem tertutup. Struktur umum dari sistem sirkulasi tikus hampir sama dengan manusia. Sirkulasi pulmoner membawa darah ke paru untuk oksigenasi dan kemudian kembali ke jantung. Darah dari bagian posterior tubuh akan memasuki atrium kanan jantung melalui vena cava inferior dan vena cava superior. Darah mengalir dari atrium kanan ke ventrikel kanan melalui katup trikuspidalis. Darah kemudian dipompa melalui katup semilunaris dan menuju trunkus pulmonaris dimana darah akan menuju ke paru melalui arteri pulmonari dan akan terjadi proses oksigenasi. Darah kemudian akan menuju atrium kiri dan menuju ventrikel kiri melalui katup bikuspidalis (atau katup mitral). Darah akan meninggalkan ventrikel kiri jantung melalui katup semilunar aorta dan memasuki aorta. Aorta memiliki arkus yang mengarah ke sisi kepala sebelum arteri tersebut mengarah turun ke cavum thoracica. Aorta memiliki 4 area umum, yaitu: (1) Aorta ascending, pada bagian atas pembuluh darah yang dimulai dari atrium, (2) Arcus aorta, tempat dimana aorta membelok ke kiri, (3) Aorta Descending, setelah belokan, aorta dapat dilacak melalui diafragma, (4) Aorta abdominalis, aorta yang melalui diafragma dan memasok darah untuk ekstremitas bawah (Biologycorner, tanpa tahun; Manitoba, tanpa tahun).

Arteri coronaria berlokasi pada bagian atas jantung dan menyediakan darah untuk jantung. Cabang aorta yang pertama terlihat

adalah arteri brachiocephalica, arteri ini bercabang menjadi arteri carotis communis kanan, yang mensuplai bagian kanan leher; dan arteri subclavia kanan, yang mensuplai bahu dan lengan kanan. Pada bagian anterior dari arkus aorta adalah arteri carotis communis kiri, yang mensuplai darah untuk leher bagian kiri. Arteri ini akan bercabang menjadi arteri carotis interna dan eksterna. Pada bagian kiri dari arteri carotis communis kiri adalah arteri subclavia kiri, yang mensuplai darah untuk bahu dan lengan kiri. Arteri subclavia akan menjadi arteri aksillaris ketika memasuki lengan atas (Biologycorner, tanpa tahun).

Secara umum, darah akan meninggalkan jantung dan memasuki satu atau lebih arteri besar dan cabang-cabangnya, sampai arteri-arteri tersebut akan mengecil ukurannya dan akan menuju ke seluruh jaringan tubuh. Di dalam jaringan, arteri-arteri kecil (atau arteriol) akan menuju ke pembuluh darah yang lebih kecil lagi, yaitu arteriol, dimana metabolit dan gas ditukar antara darah dan jaringan. Bagian sistem peredaran darah antara jantung dan kapiler adalah sistem arterial. Selanjutnya setelah meninggalkan kapiler, darah kemudian memasuki pembuluh darah kecil (venule) yang merupakan bagian dari sistem venous. Venula-venula akan bergabung membentuk vena yang lebih besar yang akan menuju ke jantung. Sehingga sistem venous akan terdiri dari bagian pembuluh darah dari kapiler yang berlokasi pada jaringan tubuh dan paru menuju ke jantung (Manitoba, tanpa tahun)

Greene (1935) dalam penelitian oleh De Carvalho dan Thomazini (de Carvalho and Thomazini, 2013) menjelaskan tentang vena thoracica. Vena ini dibentuk dengan pengaruh vena jugularis interna dan vena subclavia setinggi iga pertama. Kemudian pembuluh darah ini akan berjalan di ventral menuju ke permulaan vena subclavia dan

berjalan turun (ke arah ekor) menuju atrium kanan. Vena kanan lebih pendek dan terbuka langsung pada bagian posterior atrium. Vena sebelah kiri berjalan lebih pada area posterior dari lengkung aorta, vena pulmonalis, dan tuba bronkial kiri, memasuki atrium dibawah vena cava inferior.

Halpern (1957) dalam penelitian oleh De Carvalho dan Thomazini (de Carvalho and Thomazini, 2013) menjelaskan mengenai sistem vaskularisasi ganda pada jantung tikus. Sistem yang sama ditemukan pada ikan dan mamalia lain, yang tampaknya akan hilang selama perkembangan filogenik. Riset ini menyimpulkan bahwa otot kardial jantung tikus divaskularisasi oleh arteri koronaria dan sistem ekstra kardial. Adanya sistem ini akan membantu riset yang membutuhkan jalur alihan dari peredaran darah, karena suplai atrium dan ventrikel terpisah, dan karenanya suplai untuk nodus sinoatrial dan atriventrikular juga berdiri sendiri-sendiri. Penulis juga menjelaskan adanya sistem yang belum pernah dilihat pada mamalia. Sistem ini dibentuk oleh vena yang bermula di hati dan berakhir pada vena cava superior. Sistem ini dibuat oleh 2 vena yang lebih besar yang menyilang linea media dan pada akhir vena cava inferior, berbalik ke arah lateral menuju sumbernya. Vena-vena bermuara pada conus di dalam ventrikel kanan dan vena cephalika sentral pada ventrikel kiri.

2.1.3 Imunologi Jantung dan Pembuluh Darah

Penyakit jantung dan pembuluh darah dahulu disangka sebagai penyakit metabolik dibandingkan penyakit akibat inflamasi, dimana perubahan metabolisme lipid dan glukosa dihubungkan dengan progresi kelainan pada arteri koroner dan gangguan fungsinya. Tetapi

saat ini, respon inflamasi selama terjadinya serangan jantung mulai berkembang penelitiannya (Van Tassell *et al.*, 2013). Pasien dengan penyakit koroner akut memiliki penanda inflamasi yang meningkat, termasuk diantaranya CRP (*C-reactive protein*) yang menggantikan peran aktiitas IL-1 (Libby, Ridker and Maseri, 2002).

Sistem imun telah berevolusi sehingga memungkinkan pertahanan pejamu terhadap patogen yang menginvasi, dan juga membuat pertumbuhan jaringan dan perbaikan selama perkembangannya atau selama terjadi jejas jaringan steril, seperti yang dapat terjadi pada miokardium. Seperti pada hampir semua jaringan, sel-sel imun primer yang ada pada jantung adalah makrofag, yang terlihat ada di dekat sel-sel endothel atau di dalam ruang interstisial, dan sebagian kecil (jika ada) monosit ditemukan di jaringan jantung. Populasi dari sel dendritik (*dendritic cells/DC*) tersebar di dalam jaringan kardia, beberapa berlokasi di katup kardia, dimana disana mereka akan mengambil contoh antigen. Sel mast ditemukan di jaringan kardia yang sedang mengalami relaksasi dan diteorikan menjadi pemicu awal utama dari respon imun. Sejumlah kecil sel B dan sel T regulator juga ada pada jaringan kardia yang sedang mengalami relaksasi, sementara netrofil umumnya tidak ditemukan di dalam jaringan kardia yang tidak mengalami inflamasi (Epelman, Liu and Mann, 2015).

Miokardium dapat mengalami jejas melalui berbagai proses patofisiologi, yang dapat dikelompokkan menjadi etiologi iskemik dan non-iskemia. Jejas iskemia merupakan mekanisme terjadinya jejas yang umum terjadi pada jantung. Oklusi dari pembuluh darah koroner setelah ruptur plak akut juga dapat memicu 2 hal, yaitu infark miokard yang muncul jika aliran darah tidak dapat dikembalikan, yang berakibat

pada anoksik permanen dan jejas jaringan karena kekurangan nutrisi.

Jika aliran darah dapat dikembalikan pada kondisi iskemia (tetapi jaringan masih hidup), jejas reperfusi (*inflammatory reperfusion injury*) juga dapat muncul (Epelman, Liu and Mann, 2015).

Endothelium sendiri adalah suatu organ yang memegang peran dalam beberapa faktor resiko kardiovaskuler, dan merupakan inisiator awal dari inflamasi vaskuler dan atherosclerosis. Disfungsi endotel dicirikan dengan terganggunya respon vasomotor (berkurangnya vasodilatasi dan peningkatan kontraksi yang dependen endothel), proliferasi sel, adhesi/agregasi platelet, permeabilitas vaskuler dan interaksi endotel-lekosit yang berpartisipasi dalam inflamasi vaskuler (Savoia and Schiffrin, 2007).

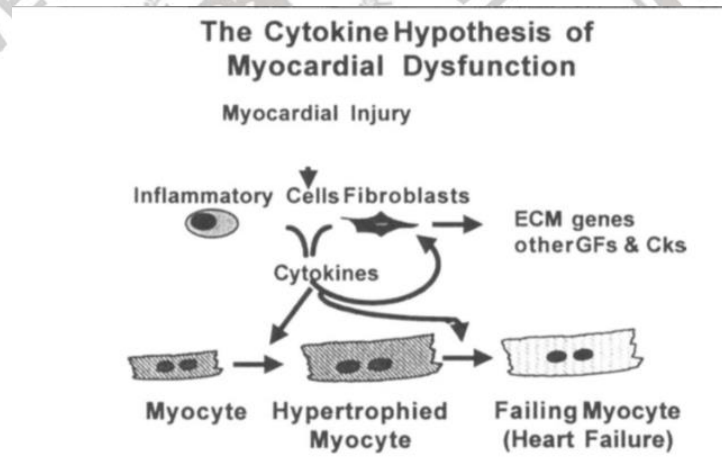
Hiperkolesterolemia, hipertensi dan resistensi insulin berkontribusi pada disfungsi endotel dan inflamasi pada dinding vaskuler, seperti pada peningkatan oksidasi lipoprotein, proliferasi sel otot polos, deposisi matriks ekstraseluler, adhesi sel dan pembentukan thrombus; semua proses ini akan terlibat dalam perkembangan atherosclerosis dan penyakit jantung iskemik (Ross, 1999; Libby, 2002; Savoia and Schiffrin, 2007). Pasien dengan penyakit kardiovaskuler muncul dengan peningkatan ekspresi dan konsentrasi plasma dari penanda dan mediator inflamasi, seperti CRP dan molekul-molekul adhesi (Blake and Ridker, 2001; Savoia and Schiffrin, 2007).

Sitokin pro-inflamasi dipandang berperan dalam disfungsi jantung setelah mengalami jejas akut (Zhang *et al.*, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Maass, *et al.*, (2002) menemukan peran lain dari IL-6 yang berhubungan dengan TNF- α dan IL-1 β : IL-6 dapat memperberat

efek depresif miokardial dari TNF- α dan IL-1 β . Bagaimana perubahan akut atau kronis dari IL-6 dapat mempengaruhi depresi miokardial setelah terjadi jejas akut masih belum diketahui. Terdapat penelitian yang menyebutkan bahwa terdapat peran aktif dari sitokin ini pada kondisi inflamasi akut (Riedemann *et al.*, 2003), sementara ada pendapat lain yang menyatakan perannya sebagai penanda (Remick *et al.*, 2005) atau mediator anti-inflamasi (Xing *et al.*, 1998). Depresi miokard setelah terjadinya jejas akut diperkirakan dimediasi oleh TNF- α dan IL-1 β , yang akan menginisiasi kaskade termasuk menginduksi produksi Nitrat oksida/NO dan radikal bebas, dan meningkatkan apoptosis miokardial. Walaupun IL-6 memainkan peran sebagai protein fase akut, perannya dalam mendepresi fungsi miokard belum sejelas fungsi TNF- α dan IL-1 β . Penelitian oleh Zhang, *et al.* (2007) mendukung hipotesis bahwa IL-6 adalah mediator aktif untuk respon inflamasi di dalam jantung, dimana tikus dengan model defisiensi IL-6 menunjukkan respon inflamasi yang lebih ringan, menurunkan apoptosis dan meningkatkan fungsi kontraktilitasnya, sementara tikus yang mengekspresikan IL-6 di dalam otot jantungnya menunjukkan inflamasi yang lebih hebat, meningkatkan jumlah apoptosis dan mendepresi fungsi kontraktilitas jantung. Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin inflamasi sekunder yang menginduksi peningkatan konsentrasi plasma dari fibrinogen, *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), dan CRP, dan pada pria sehat peningkatan kadar IL-6 dihubungkan dengan peningkatan resiko infark miokard (Ridker, *et al.*, 2000).

Interleukin-1 (IL-1) adalah sitokin inflamasi yang terlibat dalam tahap awal proses inflamasi. Kadar IL-1 meningkat pada pasien

dengan penyakit jantung koroner (Wæhre *et al.*, 2004). Terdapat beberapa pendapat bahwa sitokin seperti IL-1 memainkan peran dalam patogenesis disfungsi kardial. Walaupun IL-1 tidak beraksi sendirian dalam kondisi adanya jejas pada mioakrdia, tetapi jika berhubungan dengan molekul pro-inflamasi dan efekturnya, dapat meningkatkan respon mioakrdial terhadap adanya jejas. IL-1 diproduksi oleh sel-sel miokardial sebagai respon terhadap adanya jejas (Long, 2001). Dalam penelitiannya yang menggunakan trabekula atrial yang diambil dari operasi jantung, Cain, *et al.* (1999) menemukan bahwa IL-1 mendepresi fungsi miokard dan efek ini sinergis dengan TNF- α (Cain *et al.*, 1999)



Gambar 2.2 Gambar Skematis Peran Sitolin Dalam Disfungsi Miokard

"Cytokine Hypothesis" dari disfungsi miokard pada saat terjadi jejas pada miokard dihubungkan dengan kerjasama antara molekul-molekul pro-inflamasi yang dikeluarkan oleh sel-sel efektor imun dan sel-sel intrinsik pada jantung itu sendiri. Sitolin-sitolin ini kemudian bertindak baik sebagai parakrin (pada miosit kardial) dan autokrin (pada fibroblast kardial) yang kemudian akan memfasilitasi terjadinya perubahan fenotipe dan fungsi miokardial menjadi suatu kondisi yang dinamakan gagal jantung (*heart failure*). (Long, 2001).

Apabila ekspresi lokal dari sitokin-sitolin pro-inflamasi ini dapat dijadikan target untuk terapi, respon miokardial terhadap adanya jejas

baik pada saat fase akut atau saat telah terjadi remodeling jantung, akan dapat dimodifikasi (Long, 2001)

2.2 Penyakit pada Jantung dan Pembuluh Darah

2.2.1 Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah: Penyebab Utama Kematian di Dunia

Terdapat dua penyebab kematian utama di dunia, yaitu penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke; kedua penyakit ini bertanggung jawab pada lebih dari 12 juta kematian (22% dari total 55 juta). 7 juta kematian disebabkan oleh PJK dan 5 juta sisanya disebabkan oleh stroke; dengan 6 juta penyebab lain juga didasarkan pada penyebab terjadinya PJK. Umumnya kematian karena PJK muncul pada negara-negara miskin, dengan alasan demografis. Pola ini tidak akan berubah pada tahun 2020 dengan PJK dan stroke akan tetap menjadi 2 penyebab utama kematian dan keduanya juga menjadi salah satu penyebab utama terjadinya disabilitas seumur hidup (*disability adjusted life years lost/DALYs*) (Beaglehole, Saracci and Panico, 2001).

Penyebab awal terjadinya PJK secara epidemik sudah banyak diketahui. Faktor resiko mayor (diet yang tidak tepat, kurang aktivitas fisik, yang diekspresikan melalui kadar lipid yang tidak terkendali, obesitas, dan peningkatan tekanan darah; bersama dengan penggunaan tembakau) menjelaskan sekitar 75% kemunculan kasus PJK baru, paling tidak pada negara berkembang pada tahun 1970an dan 1980an (Stamler, Stamler and Neaton, 1999).

Banyak yang dapat dipelajari mengenai prioritas pencegahan dari banyak riset yang meneliti hubungan dari berbagai strategi pencegahan untuk PJK pada pertengahan 1960-an, dan lebih awal lagi untuk stroke

(Rosamund, Folsom and Chambless, 2001). Awalan dari strategi pencegahan ini dapat dimulai dari perubahan diet dan reduksi jumlah rokok khususnya pada pria. Tetapi tidak ada bukti bahwa strategi pencegahan ini menunjukkan hasil berarti (baik pada prevensi primer maupun sekunder) (Beaglehole, Saracci and Panico, 2001).

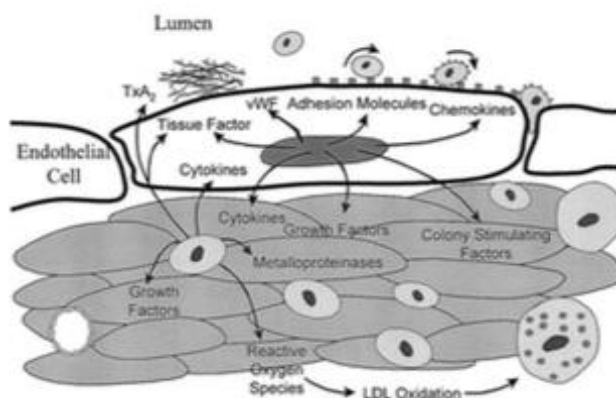
2.2.2 Patomekanisme Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah

Penelitian menggunakan angiografi yang dilakukan sebelum dan sesudah infark miokard biasanya menghasilkan gambaran adanya penyempitan arteri lebih dari 50% sebelum terjadinya kondisi akut miokard (Little *et al.*, 1988). Karenanya mekanisme terjadinya oklusi luminal tampaknya menjadi penentu terhadap terjadinya kejadian ruptur plak, aktivasi platelet, dan pembentukan trombus yang berakhir pada kondisi penyakit jantung koroner (Koh, Han and Quon, 2005). Inflamasi kronis merupakan kondisi patogenik dari atherosclerosis (Ross, 1999). Inisiasi awal dari inflamasi vaskuler bervariasi. Jejas langsung pada dinding vaskuler dapat membuat sel-sel endotel dan sel otot polos dari arteri besar menjadi aktif secara transkripsional dan mensintesis protein-protein pro-inflamasi, termasuk diantaranya kemokin, molekul adhesi sel (*cell adhesion molecules/CAMs*) dan sitokin-sitokin seperti factor pertumbuhan (*growth factor/GF*) dan substansi protrombogenik. Sitosin yang diaktivasi makrofag dan sel-sel otot polos yang mensekresi matriks metalloproteinase, yang ketika diaktivasi akan merusak jaringan penghubung diantara dinding pembuluh darah dan menipiskan lapisan fibrosa yang melindungi plak yang mudah ruptur. Hal ini nantinya akan meningkatkan potensi terjadinya ruptur plak dikarenakan paparan elemen-elemen trombogenik plak (Libby, 1998).

Disfungsi endotel yang dicirikan oleh turunnya produksi NO dan meningkatnya sintesis serta sekresi dari endothelin-1 menambah efek vasokonstriktor dan meningkatkan sintesis serta pelepasan sitokin pro-inflamasi. Turunnya produksi NO juga membuat terjadinya agregasi platelet dan pelepasan GF di dalam dinding pembuluh darah (Ross, 1999; Koh, 2000; Vincent, Montagnani and Quon, 2003). Peningkatan kadar asam lemak bebas yang berhubungan dengan resistensi insulin, obesitas, diabetes dan sindroma metabolik menyebabkan disfungsi endotel dengan cara mengaktivasi jalur respon inflamasi sistem imun alamiah dari *nuclear transcription factor, nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) (Vincent, Montagnani and Quon, 2003). Karenanya inflamasi berkontribusi pada terjadinya disfungsi endotel; sementara disfungsi endotel sendiri akan meningkatkan resiko terjadinya inflamasi. Hasil ini akan menurunkan bioaktivitas NO, dan merupakan faktor penting untuk mengawali terjadinya atherosclerosis. Hal ini juga menjelaskan mengapa penanda inflamasi akut juga menggambarkan peningkatan resiko terjadinya penyakit kardiovaskuler dan menggambarkan transisi dari angina stabil menjadi angina tidak stabil yang dihubungkan dengan respon inflamasi sistemik (Koh, Han and Quon, 2005)

Inflamasi berkontribusi pada banyak karakter plak yang berimplikasi pada pathogenesis sindroma koroner akut (ACS/Acute Coronary Syndrome). Terdapat 2 mekanisme yang terjadi pada hampir semua ACS: ruptur dari tutup fibrous plak dan erosi superfisial dari intima. Jalur dimana inflamasi memicu rupturnya lapisan fibrosa dari plak jelas sekali melibatkan inflamasi. Erosi superfisial memiliki hubungan yang kurang jelas dengan inflamasi. Terdapat beberapa ciri

plak yang dapat menyebabkan ACS, termasuk diantaranya adalah selaput fibrosa yang tipis, adanya banyak makrofag, inti lipid (nekrotik) yang besar, terdapat kalsifikasi, dan remodeling pembuluh darah (Libby et al., 2014).

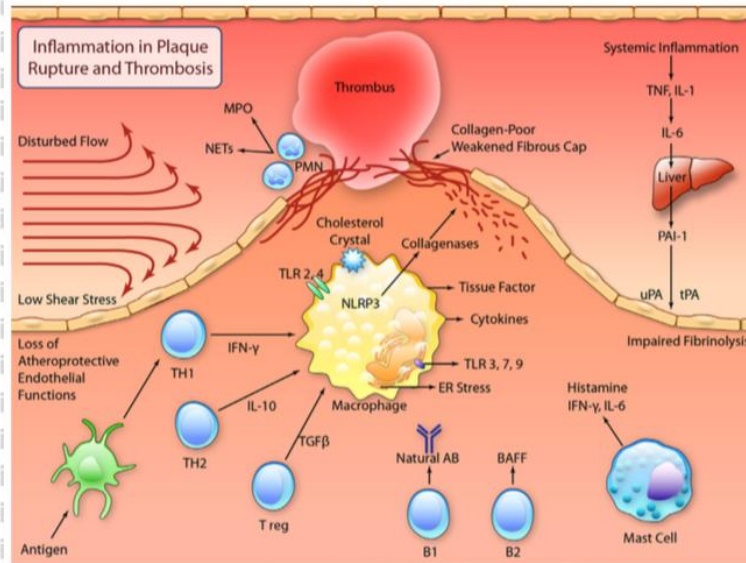


Gambar 2.3. Jejas pada permukaan arteri mengaktifasi sel-sel endothelial dan menginisiasi sintesis protein pro-inflamasi termasuk kemokin, sel-sel molekul adhesi dan sitokin-sitokin seperti faktor pertumbuhan dan substansi protrombogenik. Monosit ditarik menuju dinding pembuluh darah kemudian berubah menjadi makrofag, yang akan memakan LDL teroksidasi (*oxidized low-density lipoprotein*) dan menjadi sel busa (Koh, Han and Quon, 2005).

Plak yang telah ruptur menyebabkan infark miokard akut yang fatal, biasanya memiliki kapsul fibrosa yang tipis. Inflamasi menyebabkan metabolisme kolagen, komponen utama yang membentuk kapsula fibrosa. Sinyal inflamasi seperti sel T helper 1 (T_{H1}) interferon- γ merusak kemampuan sel otot polos, yang merupakan sumber utama dari hampir seluruh kolagen interstisial, untuk mensintesis kolagen baru yang diperlukan untuk memperbaiki dan mempertahankan matriks ekstraseluler dari kapsula fibrosa. Beberapa data menyebutkan bahwa peran dari proteinase yang mendegradasi matriks sangat diregulasi oleh mediator-mediator inflamasi, sebagai kontributor pada dissolusi dari kolagen interstisial yang menipis dan memperlemah kapsula fibrosa dan kemudian menyebabkan plak rentan untuk ruptur (Libby et al., 2014).

Gambar 2.3 ini menunjukkan diagram potongan melintang dari intima pada bagian arteri yang terkena atherosclerosis. Perubahan hidrodinamika, yang digambarkan pada sisi kiri atas menyebabkan hilangnya fungsi atheroprotektif dari sel-sel endothelial –termasuk vasodilator, anti-inflamasi, fibrinolitik, dan komponen antikoagulan. Antigen yang dipresentasikan pada *Antigen-presenting Cells* (APC) seperti sel dendritik (DC/*Dendritic cells*) dapat mengaktifasi sel limfosit TH1 untuk memproduksi interferon- γ (IFN- γ), yang akan mengaktifasi makrofag (M ϕ , berwarna kuning). Subtipe lain dari limfosit (digambarkan berwarna biru) termasuk sel limfosit TH2, yang dapat membuat sitokin anti inflamasi interleukin-10 (IL-10) dan sel T regulator yang mensekresikan sitokin anti-inflamasi yang berubah menjadi *transforming growth factor- β* (TGF- β). Pada permukaannya, makrofag mengandung *toll-like receptor* (TLR) 2 dan 4, yang dapat mengikat pola molekuler yang menyerupai pathogen dan pola molekuler yang terkait kerusakan. TLR intraseluler 3, 7, 9 juga mungkin berkontribusi pada akumulasi lipid dan fungsi pro-atherogenik lain dari makrofag. Makrofag dapat menjadi pemicu stress dari retikulum endoplasma (ER) dibawah kondisi atherogenik. Kristal kolesterol ditemukan di dalam plak dapat mengaktifasi NOD-, LRR-, dan *pyrin domain*-yang mengandung 3 inflammasome yang dapat membuat IL-1 β matur dari prekursor inaktifnya. Makrofag yang teraktivasi mensekresikan kolagenase yang dapat mendegradasi kolagen interstisial tripel heliks yang memperkuat struktur kapsula fibrosa. Makrofag yang teraktivasi juga mengekspresikan faktor jaringan, yang merupakan prokoagulan poten, dan mengelaborasi sitokin pro-inflamasi yang memperkuat dan

mempertahankan proses inflamasi di dalam plak. Ketika terjadi ruptur plak karena kekurangan kolagen, kapsula fibrosa yang lemah, adanya darah di lumen dapat berhubungan dengan faktor jaringan di inti lipid, yang akan memicu terbentuknya formasi thrombus (berwarna merah). Ketika terbentuk thrombus, lekosit polimorfonuklear (PMN) dapat berakumulasi dan membentuk *myeloperoxidase* (MPO), yang pada gilirannya akan mengelaborasi asam hipoklorus yang merupakan pro-oksidan poten. Sel-sel PMN yang hampir mati akan mengeluarkan DNA yang dapat membentuk *neutrophil extracellular traps* (NET), yang dapat menjebak lekosit dan mempropagasi thrombosis. Sel-sel inflamasi lain memodulasi atherosclerosis. Limfosit B1 mensekresikan antibodi natural yang dapat menghambat inflamasi plak. Sebaliknya, limfosit B2, sebagian melalui *B-cell activating factor* (BAFF), dapat memicu inflamasi dan komplikasi plak. Sel mast dapat memperbesar atherogenesis dengan melepaskan histamin dan sitokin IFN- γ dan IL-6. Konsekuensi dari ruptur plak ini tergantung tidak hanya pada kondisi solid pada plak intima, tetapi juga pada fase cairan darah, seperti yang terlihat pada sisi kanan atas. Inflamasi sistemik dapat membangkitkan sitokin, menjadikan produksi berlebihan dari IL-6 yang akan memicu respon hepatik fase akut. Reaktan fase akut (tidak diperlihatkan pada gambar) berpartisipasi secara langsung pada formasi thrombus. Reaktan fase akut lain, *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) dapat memperbaiki fibrinolysis dengan menghambat mediator fibrinolitik endogen, urokinase- dan *tissue-type plasminogen activators* (uPA dan tPA) (Libby et al., 2014)



Gambar 2.4 Inflamasi dalam Ruptur Plak dan Trombosis.

Luasnya inti nekrotik juga menggambarkan plak yang menyebabkan ACS. Inflamasi plak dapat membuat terjadinya inti nekrotik, dan pada akhirnya nekrosis plak dapat memperburuk inflamasi pada atheromata tahap lanjut. Inti nekrotik mengandung sel-sel mati dan detritusnya, dan karena hampir seluruh sel mati terdiri dari makrofag busa, maka debris lipid juga ada di sekitarnya. Inti nekrotik tampaknya berkontribusi terhadap terjadinya ruptur plak dan ACS karena inti ini mengandung komponen inflamasi, proteolitik, dan trombogenik (Galis *et al.*, 1994; Ball *et al.*, 1995; Tabas, 2005). Lebih lagi, komponen materi yang kaya akan lipid pada inti nekrotik menempatkan tekanan biomekanik pada bagian atas kapsul fibrosa dan karenanya berkontribusi pada ruptur kapsul (Finet *et al.*, 2007).

Sel-sel mati yang terakumulasi di inti nekrotik tampaknya memiliki 2 sumber: kematian sel sekunder karena kombinasi apoptosis dan pembersihan efektif dari sel-sel apoptotik (*efferocytosis*) dan nekrosis seluler primer, yang juga dikenal sebagai necroptosis atau oncosis.

Makrofag memiliki umur yang panjang (relatif), tetapi perubahan makrofag di intima muncul pada tiap tahap atherosclerosis. Pada lesi tahap awal, efferocytosis yang efisien oleh sel fagosit tetangga, yang adalah makrofag, membatasi nekrosis makrofag sekunder (Moore and Tabas, 2011; Thorp, Subramanian and Tabas, 2011). Ketika terjadi perkembangan suatu lesi, apoptosis sel intima meningkatkan beberapa hal, termasuk stimulus inflamasi dan faktor-faktor yang membuat terjadinya kondisi oksidatif dan stress pada retikulum endoplasma.

Stressor ini memicu jalur apoptosis dari mitokondria dan tampaknya bekerja dengan faktor plak lain yang mengaktivasi TLR, reseptor kematian dan jalur apoptotik mitokondria lainnya (Libby *et al.*, 2014).

Ketika plak makin besar, mekanisme efferocytosis mulai rusak, membuat terjadinya nekrosis sekunder dari sel-sel apoptotik dan hilangnya sinyal anti-inflamasi yang dimediasi oleh efferocytosis. Ekor sitoplasmik dari reseptor efferocytosis biasanya memediasi jalur anti-inflamasi ini dan berakibat pada produksi IL-10 dan TGF- β (Fadok, Bratton and Henson, 2001). Pelepasan *damage-associated molecular pattern* (DAMP) dari sel-sel yang nekrotik tampaknya makin memperbesar inflamasi pada plak. DAMP memicu jalur inflamasi pada makrofag dengan mengaktivasi reseptor imun alami, termasuk TLR, dan DAMP tampaknya membuat progresi plak yang membuat seseorang rentan terkena ACS (Libby *et al.*, 2014).

Adanya lokasi kalsifikasi menggambarkan plak yang berhubungan dengan ACS. Lempong besar dari mineral kalsium dapat mempengaruhi stabilisasi plak. Konsep terbaru memperkenalkan kalsifikasi sebagai proses yang aktif dan dinamis yang sangat tergantung pada sel-sel

inflamasi dan sinyaling (Libby *et al.*, 2014). Percobaan pada mencit dengan defisiensi makrofag CSF, suatu aktivator makrofag, menggambarkan adanya akumulasi kalsium pada atheromata, yang dikarenakan terganggunya aktivitas osteoclastic pada fagosit mononuclear (Rajavashisth *et al.*, 1998).

2.3 Diabetes Mellitus Tipe 2

2.3.1 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2

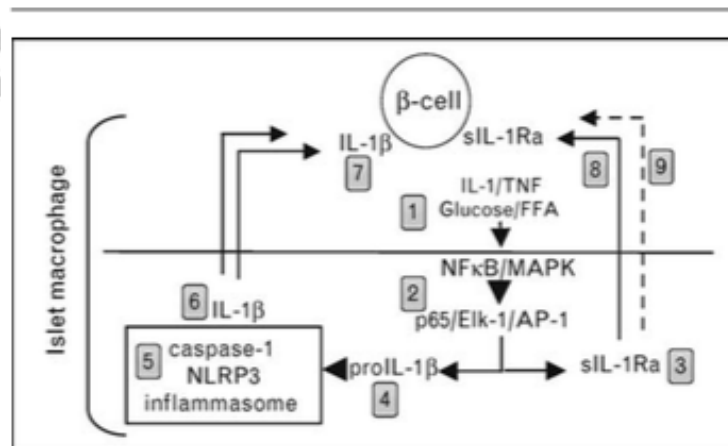
Nutrisi berlebih merupakan penyebab utama diabetes mellitus tipe 2, dan karenanya, paparan glukosa, leptin, dan asam lemak bebas pada sel islet akan menginduksi produksi dan pelepasan IL-1 β (Dinarello, Donath and Mandrup-Poulsen, 2010). Glukosa dengan konsentrasi tinggi sangat berhubungan dengan aktivasi *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) (Shalev *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008; Koenen *et al.*, 2011). *Reactive Oxygen Species* akan menghilangkan ikatan antara TXNIP dari thioredoxin dan setelah dibebaskan, TXNIP akan berikatan dengan protein yang dinamakan *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat containing protein 3* (NLRP3), yang pada akhirnya akan mengaktifasi kaspase-1 dan memproses prekursor IL-1 β yang inaktif menjadi bentuk IL-1 β yang matur dan aktif (Robertson *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010). Ketika dilepaskan, IL-1 β dapat memperbesar sinyalnya dengan auto-aktivasi melalui ikatan dengan reseptor I IL-1 yang akan membuat terjadinya siklus inflamasi. IL-1 β akan menginduksi dirinya sendiri seperti kemokin, dan pada akhirnya akan menarik makrofag menuju ke jaringan yang inflamasi, seperti sel islet dan jaringan adiposa (Böni-Schnetzler *et al.*, 2008; Dinarello, 2011; Koenen *et al.*, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Spranger, *et al.* (2003) juga menunjukkan bahwa adanya kombinasi peningkatan IL-1 β dan IL-6 dibandingkan kenaikan dari IL-6 saja, secara independen meningkatkan resiko terjadinya diabetes mellitus tipe 2. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi inflamasi subkkinis juga memiliki peran dalam pathogenesis diabetes mellitus tipe 2 (Spranger *et al.*, 2003).

Seperti yang dapat dilihat pada gambar 2.4, autostimulasi seringkali muncul pada saat terjadi kondisi ketidakseimbangan antara agonis IL-1 β terhadap antagonis alamiahnya, yaitu IL-1Ra. Pada diabetes tipe 2, kadar IL-1Ra yang lebih rendah menunjukkan bahwa ketidakseimbangan ini berkaitan dengan kondisi inflamasi pada sel islet (Dinarello, Donath and Mandrup-Poulsen, 2010). Bahkan pada pasien dengan diabetes tipe 2, ketika terjadi peningkatan IL-1 β , ekspresi IL-1Ra ditemukan menurun pada sel islet (Maedler *et al.*, 2002, 2004). Selanjutnya, sel beta pankreas akan terpapar pada efek tersebut, karena banyaknya paparan terhadap reseptor IL-1 tipe I (Böni-Schnetzler *et al.*, 2009). Sekali teraktivasi, autostimulasi IL-1 β akan menetap dan melibatkan aktivasi NF- κ β (Böni-Schnetzler *et al.*, 2008). Karenanya, peningkatan konsentrasi nutrien dan adipokin dapat menginduksi ekspresi gen IL-1 β , sintesis dan pelepasannya pada sel islet pankreas. Bergantung pada besarnya stress dan kadar sitokin anti-inflamasi alami, khususnya IL-1Ra, hal ini dapat memicu proses inflamasi yang luas. Juga dimungkinkan bahwa pada lingkungan mikroskopis sel islet pada diabetes tipe 2, anggota lain dari familial IL-1 yang juga memiliki efek toksik pada sel beta, dapat menyeimbangkan

jumlah anggota anti-inflamasi dari familial IL-1 seperti reseptor IL-1 tipe II atau reseptor Ig IL-1 yang berhubungan (Dinarello, 2009).

Selama proses infeksi, jejas atau pada saat ada respon imunologis, IL-1 β menginduksi produksi sitokin dan kemokin dari epitel, endotel dan sel-sel imunokompeten. Efek dari IL-1 β ini juga tampak pada sel islet pankreas dan berakibat pada pemanggilan makrofag. Infiltrasi makrofag akan meningkatkan produksi IL-1 β lokal. Blokade atau netralisasi dari aktivitas IL-1 β akan mencegah siklus autostimulasi IL-1 β dan mencegah infiltrasi sel imun yang mengakibatkan efek toksik langsung pada sel beta (Mandrup-Poulsen *et al.*, 1986; Weksler-Zangen *et al.*, 2008).



Gambar 2.5 Produksi IL-1 β dan IL-1Ra pada makrofag yang menginfiltrasi sel islet. (1) Makrofag sel islet merespon pada konsentrasi lokal dari IL-1 β , TNF- α dan kombinasi dari peningkatan kadar glukosa dan *free fatty acid* (FFA). (2) Sinyal transduksi yang berbeda akan memicu ekspresi gen dari IL-1 β dan IL-1Ra. (3) IL-1Ra ditranslasikan sebagai bentuk yang disekresikan (sIL-1Ra). (4) IL-1 β ditranslasikan sebagai precursor inaktif (pro-IL-1 β). (5) Prekursor dari IL-1 β memerlukan proses oleh kaspase-1 melalui aktivasi NLRP3. (6) Setelah pembelahan oleh kaspase-1, bentuk IL-1 β aktif disekresikan. (7) Di dalam sel islet, IL-1 β berikatan dengan reseptor tipe 1 pada sel beta dan menginisiasi kematian sel. (8) IL-1Ra berkompetisi dengan IL-1 β untuk berikatan dengan reseptor IL-1 pada sel beta, yang memproteksi sel beta dari IL-1 β yang menginduksi kematian sel. (9) Garis putus-putus mengindikasikan turunnya produksi IL-1Ra yang berakibat pada kondisi defisiensi IL-1Ra dan peningkatan aktivitas IL-1B pada sel beta (Dinarello, Donath and Mandrup-Poulsen, 2010)

2.3.2 Hubungan Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah

Pada individu yang menderita diabetes mellitus, maka resikonya untuk terkena penyakit jantung akan meningkat, dan kondisi ini umumnya muncul pada diabetes tipe 2. Bahkan penyakit jantung adalah penyebab kematian utama pada individu yang terkena diabetes tipe 2.

Studi Framingham adalah salah satu bukti utama yang menunjukkan bahwa individu dengan diabetes lebih rentan terkena penyakit jantung dibandingkan individu yang bebas diabetes (Mahmooda *et al.*, 2014).

Hiperkolesterolemia, hipertensi, dan resistensi insulin berkontribusi pada disfungsi endotel yang diikuti dengan terjadinya inflamasi pada dinding pembuluh darah, meningkatkan oksidasi lipoprotein, proliferasi sel-sel otot polos, deposisi matriks ekstraseluler, akumulasi materi kaya lemak, aktivasi platelet, dan pembentukan thrombus. Kondisi patogenik ini akan berkontribusi pada perkembangan atherosclerosis dan penyakit jantung koroner (Ross, 1999; Koh, 2000; Vincent, Montagnani and Quon, 2003; Tousoulis *et al.*, 2010).

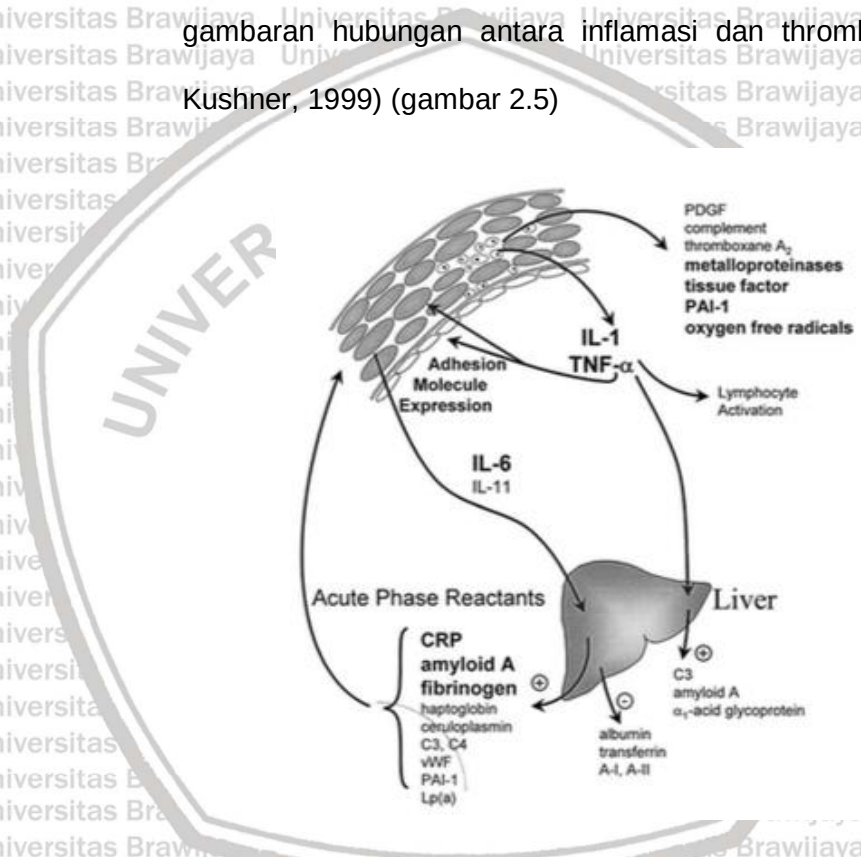
Kelainan metabolik seperti obesitas, resistensi insulin dan diabetes mellitus tipe 2 dihubungkan dengan penyakit kardiovaskuler seperti hipertrofi kardia dan gagal jantung. Kardiomiopati diabetik khususnya, adalah suatu penyakit yang dicirikan dengan adanya kelainan dari struktur dan fungsi dari otot jantung pada individu yang menderita diabetes, yang pada akhirnya akan memicu terjadinya gagal jantung, dan tidak secara langsung berkaitan dengan penyakit arteri coronaria atau hipertensi. Beberapa mekanisme terlibat dalam patogenesis kardiomiopati diabetik, seperti misalnya gangguan metabolisme energi dan sinyal kalsium pada miokard. Gangguan metabolik yang terjadi

selama kondisi kardiomiopati diabetik dicirikan dengan peningkatan oksidasi lipid, akumulasi TG intramiokardial, dan berkurangnya penggunaan glukosa. Keseluruhan perubahan ini berakibat pada terjadinya stress oksidatif, disfungsi mitokondrial, dan apoptosis kardiomiosit. Pada sisi lain, progresi gagal jantung dan hipertrofi kardial biasanya menunjukkan peningkatan lokal dari sitokin di sel-sel kardial dan aktivasi dari faktor transkripsi pro-inflammasi NF- κ B. Penelitian yang dilakukan akhir-akhir ini makin mengungkap bukti bahwa terdapat hubungan potensial antara inflamasi kronis ringan pada jantung dan disregulasi metabolik (Palomer *et al.*, 2013).

Kardiomiopati diabetik yang merujuk pada perubahan struktur dan fungsi jantung pasien, berhubungan dengan gangguan metabolisme energi di dalam miokard, yang membuat terjadinya patogenesis penyakit jantung. Penyakit diabetes yang mengenai jantung dicirikan dengan adanya hipertrofi pada ventrikel kiri, kardiomiopati dilatasi dan fibrosis ekstraseluler, yang kesemuanya akan mempengaruhi curah jantung. Jika hal-hal tersebut diikuti oleh peningkatan oksidasi lemak, akumulasi TG pada intramiokardium dan turunnya penggunaan glukosa, maka akan berakibat terjadinya stress oksidatif, disfungsi mitokondria dan apoptosis (Palomer *et al.*, 2013).

Sintesis IL-1 yang diinduksi glukosa pada endotel vaskuler dan lesi atherosklerotik yang mengalami inflamasi di penyakit-penyakit makrovaskuler tampaknya merupakan penyebab terjadinya respon inflamasi ringan pada obesitas dan diabetes tipe 2 (Dinarelllo, Donath and Mandrup-Poulsen, 2010). Sitokin-sitokin pro-inflamasi, termasuk diantaranya IL-1 β , IL-6 dan TNF- α dilepaskan dari makrofag kedalam

dinding pembuluh darah selama periode respon inflamasi. Sitokin-sitokin ini memediasi efek inflamasi jarak jauh, termasuk mengaktifkan gen-gen hepatik, yang akan mengkode reaktan fibrinogen fase akut (*acute phase reactants fibrinogen*), CRP, dan serum amyloid-A. CRP akan menginduksi sintesis sitokin, CAM, dan factor jaringan pada monosit dan sel-sel endothelial. Faktor jaringan nantinya akan mengaktifkan kaskade koagulasi ekstrinsik, yang akan memberikan gambaran hubungan antara inflamasi dan thrombosis (Gabay and Kushner, 1999) (gambar 2.5)



Gambar 2.6. Sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti Interleukin-1 β , IL-6, dan *Tumor necrosis factor* (TNF)- α dilepaskan dari arteri yang mengalami jejas dan menginisiasi hepar untuk mensintesis reaktan fase akut. Beberapa reaktan fase akut memiliki efek pada segmen arteri dan berkontribusi pada respon inflamasi (Koh, Han and Quon, 2005).

Walaupun resistensi insulin dan kegagalan sel β tetap dikenal sebagai penyebab utama dalam perkembangan diabetes tipe 2, paradigma lain telah berkembang. Terdapat temuan yang mengindikasikan dasar patologi inflamasi untuk penyakit jantung dan

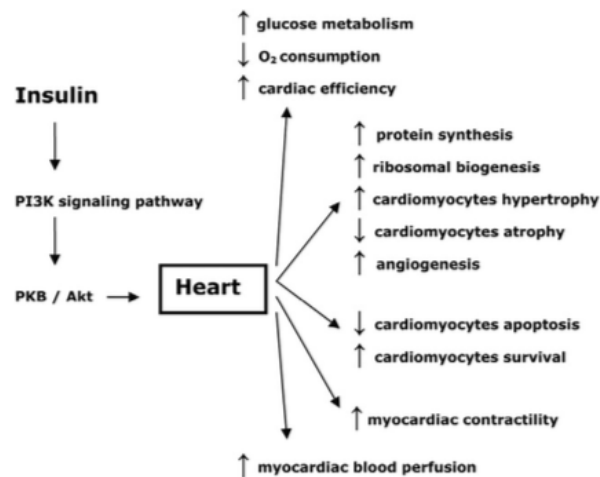
pembuluh darah. Misalnya pada penelitian oleh Duncan, *et al.* (2003) pada penelitian jangka panjang yang melibatkan individu sehat, didapatkan bukti bahwa inflamasi sistemik ringan dapat memprediksi terjadinya diabetes mellitus tipe 2 di masa yang akan datang. Temuan ini menunjang hipotesis bahwa diabetes adalah penyakit inflamasi, seperti juga pada proses penyakit metabolik (Duncan *et al.*, 2003).

Resistensi insulin adalah ciri utama dari DM2, dan berkembang pada banyak organ, termasuk jantung. Dibandingkan dengan perannya pada organ lain, peran fisiologis dari resistensi insulin pada jantung masih belum banyak diketahui (Gray and Kim, 2011). Peningkatan insulin akan memfasilitasi *uptake* dan metabolisme glukosa, yang merupakan sumber energi jantung yang utama (60-70%). Insulin juga menginduksi *uptake* asam lemak (FA/*fatty acid*) dan dapat mendegradasi FA menjadi sumber energi sekunder bagi jantung (20%). Insulin juga dapat mereduksi konsumsi oksigen miokardium dan meningkatkan efisiensi jantung (kerja jantung/konsumsi oksigen) (Iliadis, Kadooglou and Didangelos, 2011).

Insulin juga memiliki peran terhadap kontraktilitas jantung, dengan mempengaruhi kontraksi kardiomyosit dan mempengaruhi relaksasi miokardial. Insulin juga meningkatkan biogenesis ribosomal dan sintesis protein. Insulin juga dapat menstimulasi VEGF dan karenanya dapat memicu angiogenesis, untuk mempertahankan keseimbangan antara hipertropi kardial dan perfusi darah. Insulin mensupresi aktivitas enzim proteolitik yang dikenal sebagai kaspase, dan mereduksi apoptosis, sehingga insulin juga dikenal untuk pertahanan sel. Insulin yang berperan pada endotel arteri koroner, mengaktifasi eNOS dan meningkatkan produksi NO dari *L-arginine*. Efek vasodilatasi dari insulin

ini meningkatkan jumlah kapiler yang terbuka dan meningkatkan aliran darah pada arteri koroner (Iliadis, Kadoglou and Didangelos, 2011).

Gambar 2.6 merangkum efek menguntungkan dari insulin pada fungsi, morfologi dan perfusi miokard.



Gambar 2.7 Peran Insulin pada Jantung.

2.3.2.1 Diabetes dan Metabolisme Jantung

Jantung memiliki kapasitas untuk beradaptasi terhadap berbagai kondisi patofisiologi dengan menyelaraskan metabolismenya terhadap karbohidrat dan asam lemak.

Hilangnya fleksibilitas metabolik ini berhubungan dengan kondisi

patologis yaitu hipertrofi kardia dan gagal jantung (Palomer *et al.*,

2013). Pada kondisi diabetes, dan juga pada kondisi

hiperinsulinemia dan hiperglikemia, munculnya resistensi insulin pada jantung, bersama dengan peningkatan lipolisis sistemik

memperlihatkan bahwa sumber energi jantung bergantung

hanya kepada β -oksidasi asam lemak mitokondria (Burkart *et al.*,

2007). Turunnya *uptake* dan penggunaan glukosa pada jantung

berakibat pada perubahan jalur sinyal insulin yang kemungkinan berperan dalam hilangnya kapasitas untuk berganti antara jalur glukosa dan asam lemak pada resistensi insulin dan bentuk defisiensi insulin pada diabetes (Duncan *et al.*, 2007).

Penelitian oleh Park, *et al.* (2005) memperlihatkan bahwa pemberian pakan tinggi lemak dalam waktu hanya 10 hari cukup untuk membuat model resistensi insulin pada jantung tikus, dikarenakan adanya asupan lipid berlebih, yang nantinya akan meningkatkan penggunaan lipid dan menurunkan metabolisme glukosa pada jantung. Sementara resistensi insulin pada otot lurik, jaringan adiposa dan jantung berkembang setelah 3 minggu pemberian pakan tinggi lemak. Hal ini mengindikasikan bahwa resistensi insulin pada jantung yang diinduksi oleh pemberian pakan tinggi lemak berkembang terpisah dari perubahan metabolisme glukosa sistemik dan hiperinsulinemia sistemik. Pemberian pakan tinggi lemak pada tikus akan menderegulasi metabolisme jantung dan akhirnya memicu remodeling jantung yang patologis dan disfungsi sistolik (Park *et al.*, 2005).

Walaupun kadar oksidasi lemak tampak lebih tinggi pada jantung yang terkena diabetes, akumulasi lipid pada miokardium merupakan hal yang menyebabkan penyakit ini. Jantung bukan merupakan lokasi utama untuk penyimpanan lemak, tetapi asam lemak dapat disimpan dalam bentuk *triacylglycerols* (TG) dan fosfolipid di dalam kardiomiosit, khususnya ketika jumlahnya banyak, seperti kondisi yang muncul pada diabetes atau obesitas (Finck and Kelly, 2002). Jika hal ini berlangsung lebih

lama, maka jantung akan mulai untuk mengakumulasi *intermediate* lipid yang toksik untuk jantung, seperti *ceramide* dan *diacylglycerol*, dan ROS, yang berhubungan dengan perkembangan resistensi insulin dan lipotoksik kardiomiopati (Duncan *et al.*, 2007). Lipotoksik kardiomiopati dicirikan dengan disfungsi mitokondria dan peningkatan konsumsi oksigen miokard, semuanya berhubungan dengan apoptosis miosit dan disfungsi kontraktilitas. Bahkan sebenarnya terdapat hubungan kuat antara akumulasi lipid intrakardial dan gagal jantung (Pagano *et al.*, 2008).

Dibawah stimulus patologis, miokard akan mensekresikan sejumlah sitokin dan kemokin pro-inflamasi, seperti TNF- α , MCP-1, dan IL-6 (Ancey *et al.*, 2003), yang akan memberikan beberapa efek autokrin pada sel-sel jantung. Peningkatan kadar dari sitokin dan kemokin pro-inflamasi ini berhubungan dengan inflamasi miokard, gagal jantung dan kardiomiopati dilatasi (Takano *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2006). Ekspresi sitokin pro-inflamasi berada di bawah kontrol NF- κ B yang akan teraktivasi dalam kondisi miokarditis, gagal jantung kongestif, dan hipertrofi kardial. Beberapa stimulus eksogen dan endogen dapat menginduksi NF- κ B, terutama adalah sitokin pro-inflamasi sendiri, kondisi hiperglikemia, peningkatan kadar asam lemak bebas di plasma, ROS, angiotensin II, endothelin 1, TLR, lipoprotein dan anoksia (Palomer *et al.*, 2013).

2.4 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 (IL-1) pertama kali dideskripsikan pada tahun 1972 sebagai *lymphocyte-activating factor*. Aktivitasnya tidak terbatas hanya pada sistem imun, tetapi juga terlibat dalam regulasi kadar kalsium darah, stimulasi proliferasi berbagai sel, regulasi tekanan darah, atau modulasi fase tidur. IL-1 merepresentasikan salah satu mediator respon inflamasi yang penting, yang dapat menginduksi kaskade molekul efektor pro-inflamasi. Banyak laporan menyebutkan bahwa IL-1 terlibat dalam patogenesis beberapa penyakit kardiovaskuler, khususnya yang dipotensiasi mediator pro-inflamasi (Vicenová *et al.*, 2009)

Interleukin-1 merupakan istilah untuk 2 protein yang saling berhubungan, yaitu interleukin-1 α dan interleukin-1 β , yang dikode oleh 2 gen yang berbeda. Keduanya diproduksi sebagai konsekuensi dari stress atau jejas jaringan, dimana prekursor 31-kDa yang menjalani proses proteolitik oleh protease spesifik selama proses maturasi. Sel-sel yang memproduksi IL-1 utamanya adalah makrofag, tetapi sel-sel lain seperti netrofil, limfosit, sel-sel dendrit, keratosit, sel endothelial, hepatosit, fibroblast atau sel-sel otot juga telah menunjukkan kemampuan untuk mensintesis IL-1. Target utama dari IL-1 adalah sel-sel penting dari sistem imun, yaitu monosit, limfosit, granulosit, sel-sel dendritik; tetapi sitokin ini juga mampu mempengaruhi sel lain seperti sel epitelial, fibroblast, sel-sel endothelial atau sel otot polos (Vicenová *et al.*, 2009).

Yang menjadi hal penting dalam banyak penyakit inflamasi adalah peningkatan pelepasan IL-1 β bentuk aktif. Kaspase-1 adalah protein sistein intraseluler yang membelah *N-terminus* 116 aa dari precursor IL-1 β , dan kemudian mengkonversi prekursor inaktif menjadi bentuk sitokin matur.

Kaspase-1 ada pada makrofag jaringan dan sel-sel dendritik sebagai zimogen inaktif dan memerlukan konversi menjadi bentuk enzim aktif melalui proses autokatalisis (Netea, Nold-Petry and Nold, 2009). Pelepasan bentuk IL-1 β aktif dari monosit darah dikontrol ketat dengan hanya kurang dari 20% dari total prekursor IL-1 β diproses dan dilepaskan (Dinarello, 2011).

Inflamasi dan karsinogenesis berhubungan dengan pembentukan spesies oksigen reaktif (*Reactive oxygen species/ROS*), dan ROS telah diteorikan untuk mengaktifasi jalur inflammasome kaspase-1 (Zhou et al., 2010). Karena IL-1 β tampaknya memainkan peran dalam karsinogenesis, adalah suatu hipotesis yang menarik bahwa ROS mengaktifasi inflammasome secara langsung untuk menginduksi pelepasan IL-1 β dan memicu inflamasi (Dinarello, 2011).

Beberapa mekanisme dilaporkan untuk sekresi dan pemrosesan IL-1 β matur, termasuk hilangnya keutuhan membran, diperlukannya fosfolipase C dan lisosom sekretorik, dan terkelupasnya mikrovesikel membran plasma atau badan multivesikuler yang mengandung eksosome (Dinarello, 2011).

Efek inflamasi yg dimediasi oleh IL-1 dapat dihambat oleh inhibitor alami yang efektif, yaitu antagonis reseptor IL-1 (*IL-1 receptor antagonist/IL-1Ra*). Molekul IL-1Ra yang larut berikatan dengan reseptor IL-1, tetapi interaksi ini tidak memicu aktivasi jalur sinyal. IL-1Ra disintesis utamanya di monosit dan makrofag, tetapi mungkin juga diproduksi oleh tipe sel lain (Vicenová et al., 2009).

Makin banyak bukti yang menghubungkan adanya ketidakseimbangan antara mediator-mediator pro-inflamasi dan peningkatan resiko patologi dari jantung dan pembuluh darah. Beberapa penyakit kardiovaskuler tampaknya memiliki komponen autoimun. Interleukin-1 (IL-1) merupakan regulator utama

dari proses inflamasi pada eukariot dan telah terbukti terlibat dalam beberapa penyakit kardiovaskuler (Vicenová *et al.*, 2009).

Interleukin-1 merupakan model sitokin inflamasi dan berperan penting pada fase awal inflamasi sebagai mediator (Wæhre *et al.*, 2004). Dari 11 anggota familial interleukin-1, IL-1 β telah maju sebagai target terapi primer untuk kondisi-kondisi inflamasi, yang dinamakan penyakit autoinflamasi.

Terdapat banyak bukti bahwa IL-1 β memediasi inflamasi pada sel islet yang merupakan penyebab/pathogenesis dari diabetes mellitus tipe 2. Proses inflamasi kronis yang menyebabkan kegagalan sel beta untuk mensekresi jumlah insulin yang cukup merupakan pathogenesis yang muncul pada individu dengan diabetes mellitus tipe 2 (Wæhre *et al.*, 2004). Sitokin, melalui modulasi respon sel T, dapat menginduksi infiltrasi sel bulat (*round cell infiltration*) (insulinitis) dan menghambat pelepasan insulin oleh sel beta (el Nawawy *et al.*, 1996). Insulinitis, didasarkan pada aktivasi patologis dari inflamasi alamiah oleh sistem imun dikarenakan stress metabolik dan didasari oleh jalur sinyal IL-1 (Dinarello, Donath and Mandrup-Poulsen, 2010). Pasien dengan penyakit jantung koroner juga memiliki peningkatan kadar IL-1 (Wæhre *et al.*, 2004).

2.4.1 Interleukin-1 (IL-1) dan Penyakit Kardiovaskuler

Penyakit arteri koroner/penyakit jantung koroner merupakan penyakit kronis yang merupakan akibat dari pembentukan plak atheromatous di dalam arteri (yang disebut "*atherosclerosis*" – pengerasan arteri) dan reduksi subsekuen dari diameter lumen arteri.

Kematian dapat terjadi ketika terjadi infark miokard, penyakit serebrovaskuler, dan gagal ginjal. Faktor resiko klasik untuk atherosclerosis diantaranya termasuk peningkatan kadar LDL, merokok,

obesitas, diabetes atau gaya hidup sedenterik. Tetapi seiring berjalan waktu, terbukti bahwa atherosclerosis juga memiliki komponen autoimun dan banyak sitokin berpartisipasi dalam pathogenesis kelainan ini khususnya pada individu yang tidak memiliki faktor resiko. Data terbaru menunjukkan bahwa atherosclerosis berhubungan dengan aktivitas proses inflamasi dan dengan peningkatan molekul pro-inflamasi sistemik, seperti IL-1, IL-6, TNF atau CRP dan karenanya penyakit ini berubah dari penyakit sederhana yang diakibatkan oleh akumulasi lemak menjadi penyakit kompleks yang dipengaruhi oleh respon inflamasi pada dinding arteri (Libby, 2002). Efek patogen dari IL-1 ada pada kemampuannya untuk memodulasi sejumlah efek penting yang terlibat dalam kompleks inflamasi dari proses atherogenesis, seperti inflamasi dinding pembuluh darah, kemotaksis dan adhesi leukosit, serta ruptur plak (Libby, 1998; Von der Thüsen, 2003; Wæhre *et al.*, 2004).

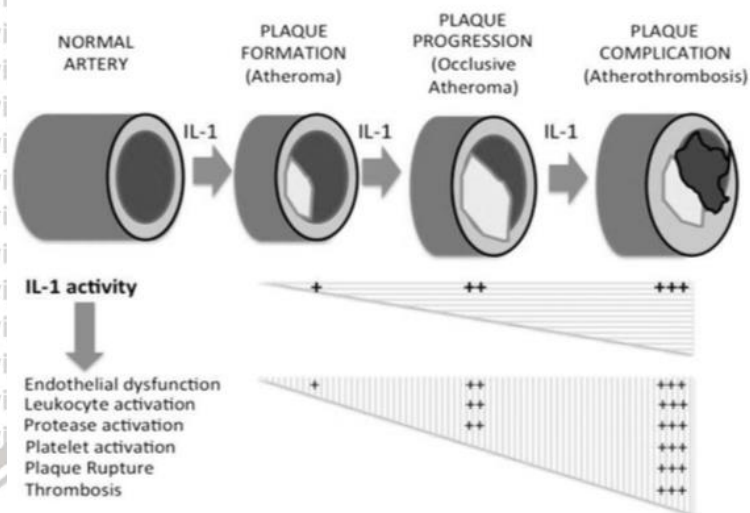
Keterlibatan IL-1 selama proses atherogenesis dapat dicontohkan dengan kemampuannya untuk membuat instabilitas plak atheromatous, yang disebabkan oleh upregulasi matriks metalloproteinase pada lokasi pembentukan plak. Peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi IL-1 dan TNF seperti juga kemokin IL-8 ditemukan di dalam plak atheromatous, bersama dengan matriks metalloproteinase yang disintesis oleh sel otot polos, sel-sel endothel dan makrofag. Endopeptidase dependen zinc ini memiliki kemampuan untuk mendegradasi bermacam-macam komponen dari matriks ekstraseluler dan lebih dalam lagi, memiliki kemampuan untuk menginduksi pemecahan kolagen pada plak atheromatous. Matriks metalloproteinase telah terbukti di-upregulasi oleh IL-1 dan sitokin pro-inflamasi lain di dalam sel otot polos, sel-sel endotel dan makrofag; dan sebaliknya induksinya di sel otot polos dapat diinhibisi oleh IL-1Ra.

Peningkatan ekspresi matriks metalloproteinase diinduksi oleh sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 yang karenanya dapat memicu destabilisasi plak atheromatous dan memicu thrombosis (Vicenová *et al.*, 2009).

Potensi pro-atherogenik lain dari IL-1 adalah kemampuan sitokin ini untuk memodulasi adhesi sel dan infiltrasi monosit subsekuen kedalam ruang subendothelial (Vicenová *et al.*, 2009). Ketiadaan dari IL-1 β menurunkan tingkat keparahan dari atherosclerosis pada tikus defisiensi ApoE, melalui penurunan ekspresi *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) di dalam aorta (Kirii *et al.*, 2003). Molekul-molekul yang membuat terjadinya adhesi ini tampaknya menarik monosit ke dalam intima arteri. Setelah terjadi adhesi, monosit akan memasuki intima, berdiferensiasi menjadi makrofag dan kemudian berubah menjadi sel busa, yang merupakan langkah kunci dari terbentuknya atherogenesis (Vicenová *et al.*, 2009).

Derajat terbentukny plak, progresi terbentuknya plak, dan ruptur tergantung pada derajat inflamasi di dalam plak. Pada plak atherosklerotik manusia, ekspresi IL-1 α dan IL-1 β berhubungan dengan progresi plak atherosklerotik, dengan ekspresi minimal pada arteri coronaria sehat, dan terdapat peningkatan ekspresi pada plak atherosklerotik sederhana, dan tinggi ekspresinya pada plak dengan komplikasi (Dewberry *et al.*, 2000). Penelitian eksperimental pada hewan coba atherosklerotik secara konsisten menunjukkan bahwa delesi genetik atau inhibisi farmakologis dari sinyal IL-1 menurunkan pembentukan dan progresi plak atherosklerotik, sementara aktivitas IL-1 (oleh administrasi eksogen IL-1 β atau downregulasi alamiah oleh IL-1Ra) akan memicu progresinya (Van Tassell *et al.*, 2013). IL-1 β memediasi respon jaringan terhadap jejas

endothel, berkontribusi pada respon intima proliferatif (Dewberry et al., 2000).



Gambar 2.8 Interleukin 1 (IL-1) dan Atherosklerosis. Riwayat atherosclerosis dicirikan oleh adanya pembentukan plak, progresi (pertumbuhan), dan komplikasi. IL-1 memainkan peran kunci dalam pembentukan, progresi dan komplikasi plak atherosklerotik. Peningkatan aktivitas IL-1 menyebabkan destabilisasi plak, ruptur dan pembentukan thrombus di atasnya (Van Tassel et al., 2013)

2.5 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6), adalah suatu polipeptida dengan 185 asam amino. IL-6 adalah sitokin poliotropik dengan aktivitas biologis yang beragam, termasuk kemampuannya untuk mentimulasi diferensiasi sel B, mengaktifasi timosit dan diferensiasi sel T, mengaktifasi makrofag, menstimulasi hepatosit untuk memproduksi protein fase akut, dan mengaktifasi sel *Natural killer* (NK). IL-6 juga memiliki kemampuan pro dan anti-inflamasi. IL-6 diproduksi tidak hanya oleh sel-sel imun dan sel aksesoris imunologis, termasuk monosit dan makrofag; tetapi juga oleh komponen kardiovaskuler, seperti sel-sel endothelial, sel-sel otot polos vaskuler, dan miosit iskemik. IL-6 adalah faktor inflamasi kunci yang memiliki kepentingan dalam pathogenesis dan penyebab klinis dari penyakit vaskuler atherosclerosis. Kompleks reseptor IL-6 terdiri dari 2

glikoprotein yang terikat membran, suatu komponen yang terikat ligan dengan berat 80 kD (yang dinamakan IL-6R) dan suatu komponen transduksi sinyal dengan berat 130 kD (yang dinamakan gp130). Walaupun IL-6 dapat mengikat IL-6R dan menunjukkan respon biologis, IL-6 juga mengaktivasi IL-6R yang terlarut (*Soluble IL-6R/sIL-6R*). Kompleks IL-6/sIL-6R yang teraktivasi berperan sebagai agonis poten yang mengikat komponen transduksi sinyal dari reseptor yang terikat membran, gp130, dengan afinitas yang tinggi. Melalui mekanisme ini, IL-6 dipercaya untuk mempotensiasi aktivitas biologisnya sendiri dan menunjukkan efeknya pada sel-sel yang kekurangan IL-6R per se. Bahkan kompleks IL-6/sIL-6R telah menunjukkan mampu menstimulasi rekrutmen leukosit dan untuk mempromosikan respon inflamasi oleh sel endotelial (Kanda and Takahashi, 2004)

Interleukin-6 adalah sitokin pro-koagulan utama. IL-6 meningkatkan konsentrasi fibrinogen, inhibitor plasminogen aktivator tipe 1, dan CRP (Willerson, 2004). Peningkatan kadar IL-6 dihubungkan dengan peningkatan resiko terjadinya infark miokard di masa depan pada individu laki-laki sehat (Ridker, Rifai, *et al.*, 2000). Peningkatan kadar IL-6 telah dihubungkan dengan resiko tinggi yang menyebabkan kematian pada individu dengan usia lanjut (Tsutamoto *et al.*, 1998). Konsentrasi IL-6 dihubungkan tidak hanya dengan keparahan suatu penyakit, tetapi juga merupakan prediktor kuat untuk hasil akhir dari penyakit tersebut, contohnya, didapatkan peningkatan kadar IL-6 pada pasien angina unstabil dengan komplikasi, dibandingkan dengan pasien tanpa komplikasi (Biasucci *et al.*, 1999; Kanda and Takahashi, 2004). Sitokin-sitokin pro-inflamasi dapat berperan dalam destabilisasi dan kerusakan plak atherosclerotic pada arteri coronaria. Adanya proses inflamasi merupakan ciri dari lokasi ruptur plak atau erosi, dan sitokin-sitokin pro-inflamasi mampu mengupregulasi ekspresi matriks metalloproteinase, yang diketahui terlibat dalam

remodeling vaskuler dan disrupsi plak (van der Wal *et al.*, 1994; Rajavashisth *et al.*, 1999).

2.5.1 Interleukin-6 (IL-6) Dan Resiko Penyakit Jantung Dan Pembuluh

Darah

Protein fase akut, yang bertanggung jawab pada sitokin pro-inflamasi sistemik, seperti IL-6, meningkat pada penyakit kardiovaskuler dan merupakan penanda prediktor untuk kejadian iskemik di masa yang akan datang. Hal ini menunjukkan pentingnya peran sitokin pro-inflamasi dan/atau protein fase akut di perkembangan awal lesi (Huber *et al.*, 1999).

Penelitian yang dilakukan oleh Huber, *et al.* (1999) menunjukkan hasil bahwa perubahan sitokin-sitokin pro-inflamasi dan protein fase akut mungkin lebih dari sekedar penanda atherosclerosis, tetapi merupakan partisipan nyata pada perkembangan awal lesi.

Penyakit jantung dan pembuluh darah umumnya muncul pada proses inflamasi kronis yang ringan, yang dicirikan dengan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi (IL-6, $\text{TNF}\alpha$ dan IL-1 β), molekul adhesi terlarut (ICAM-1 dan P-selectin) dan protein fase akut yang merespon terhadap sitokin termasuk diantaranya CRP, PAI-1, dan fibrinogen (Tracy, 1997).

Penelitian oleh Tracy (1999) menunjukkan bahwa IL-6 eksogen secara signifikan meningkatkan perkembangan lesi lemak pada hewan coba atherosclerosis, tetapi tidak pada hewan coba yang resisten terhadap atherosclerosis. Hal ini menunjukkan bahwa faktor inflamasi memainkan peranan penting dalam proses perjalanan penyakit.

Pada pasien PJK yang dirawat di rumah sakit, konsentrasi serum IL-6 berhubungan dengan mortalitas karena penyakit jantung, sehingga

diperlukan pemahaman mengenai jalur inflamasi untuk langkah pencegahan terhadap penyakit jantung koroner (Su *et al.*, 2013).

Terdapat juga bukti yang mendukung bahwa terdapat hubungan yang potensial antara inflamasi kronis ringan dan kelainan metabolik seperti resistensi insulin, obesitas dan diabetes mellitus tipe 2, yang berhubungan dengan produksi sitokin yang abnormal. Produk lemak yang ada dalam diet sehari-hari akan mempengaruhi ekspresi gen, struktur, metabolisme dan fungsi kontraksi dari jantung. Bahkan pada tikus yang diberikan pakan tinggi lemak akan berakibat pada terjadinya resistensi insulin miokard dan berhubungan dengan beberapa efek yang langsung terjadi pada jantung, termasuk inflamasi, hipertrofi, fibrosis dan disfungsi kontraktilitas (Tikellis *et al.*, 2008). Metabolisme glukosa dalam jantung menurun pada tikus obese yang diberikan pakan tinggi lemak, dalam proses yang berhubungan dengan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi (Hwi *et al.*, 2009). Pada sisi lain, progresi gagal jantung dan hipertrofi kardial biasanya menaikkan secara lokal kadar sitokin seperti IL-6, MCP-1, dan TNF- α (Haugen *et al.*, 2007). Molekul-molekul ini menunjukkan beberapa efek autokrin di dalam sel kardial melalui aktivasi downstream dari NF- κ B, yang mungkin berkontribusi pada kondisi yang berhubungan dengan inflamasi miokard, seperti jejas iskemik miokard, gagal jantung, dan kardiomiopati dilatasi (Takano *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2006).

Peran insulin pada jantung tampak jelas berkurang pada kondisi diabetes mellitus tipe 2, contohnya pada miosit yang diisolasi dari jantung tikus yang diberi diet tinggi lemak (Palomer *et al.*, 2013). Insulin membuat terjadinya pengambilan (*uptake*) dan penggunaan glukosa, insulin juga

menurunkan konsumsi oksigen pada miokard dan meningkatkan efisiensi kardia (Iliadis, Kadoğlu and Didangelos, 2011). Sebagai konsekuensi dari terjadinya resistensi insulin, pengambilan basal glukosa menurun, yang berkaitan dengan penurunan kadar GLUT4 dan menurunnya regulasi dari aktivitas glikolitik, seperti yang dapat dilihat pada tikus yang secara genetis db/db. Pada tikus Zucker obese, pengambilan asam lemak terganggu pada jantung yang tampaknya muncul pada fase awal dari proses diabetogenik, dibandingkan dengan disregulasi pengambilan glukosa. Hal ini mungkin berperan pada akumulasi lipid intraseluler yang tampak sangat jelas dan telah banyak didemonstrasikan pada model obese dan diabetes tipe 2, yang berkaitan dengan disfungsi miokard (Palomer *et al.*, 2013).

Pada pasien dengan gagal jantung yang menjalani transplantasi jantung, serum IL-6 berhubungan dengan reduksi kontraktilitas miokardial (Deng *et al.*, 1998). IL-6 dan reseptor spesifiknya (IL6R) ditingkatkan regulasinya pada miokardium yang mengalami kerusakan (Plenz, Fang and Tjan, 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Plenz, *et al.* (2002) menemukan bahwa miosit dan sel-sel endotelial mikrovaskuler adalah tipe sel pada jantung yang mengekspresikan IL-6 (Plenz *et al.*, 2002).

2.6 Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2)

Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) merupakan suatu enzim yang dapat menghidrolisis fosfolipid teroksidasi untuk membentuk lisofosfatidilkolin dan asam lemak teroksidasi, yang memiliki kemampuan pro-inflamasi (Ballantyne *et al.*, 2004). Tetapi, kemampuan Lp-PLA2 dalam menghidrolisis *platelet-activating factor* (PAF) dan fosfolipid lain juga dapat mereduksi kejadian inflamasi (Tjoelker *et al.*, 1995). Lp-PLA2 terkait utamanya

dengan LDL dan aktivitas enzimatisnya meningkat dengan adanya LDL (Karabina *et al.*, 1994).

LP-PLA2 termasuk anggota superfamili dari enzim fosfolipase A2. Lp-PLA2 merupakan protein dengan berat 45-kDA dengan 441 asam amino yang berbeda dengan anggota lain dari famili fosfolipase A2 karena independen terhadap kalsium. Isoform yang disekresikan pertama kali diidentifikasi sebagai dasar dari kemampuannya untuk mendegradasi *platelet-activating factor* (PAF), sehingga Lp-PLA2 juga dikenal sebagai *PAF-acetylhydrolase*. Kontras dengan enzim fosfolipase A2 lain, Lp-PLA2 beraksi pada bagian fosfolipid yang larut air dengan rantai *sn*-2 yang terpotong secara oksidatif, yang membuatnya kekurangan aktivitas enzimatis pada rantai panjang asam lemak di dalam fosfolipid yang ditemukan di membrane seluler (Zalewski and Macphee, 2005).

Gen untuk Lp-PLA2 berada pada kromosom 6, dan produksi enzim ini muncul besar-besaran di monosit dan makrofag dalam sirkulasi dan jaringan, dan dalam jumlah yang lebih sedikit oleh sel T limfosit dan sel mast. Hampir 2/3 dari massa Lp-PLA2 terikat pada LDL-C dan 1/3 lainnya terdistribusi diantara HDL-C dan partikel VLDL. Kadar Lp-PLA2 dapat diukur pada anak-anak, karena hepar dan lien masih besar dan merupakan reservoir besar dari sel yang memproduksi enzim ini. Ketika terjadi atherosclerosis pada 10 tahun pertama kehidupan, kadar LP-PLA2 meningkat (McCullough, 2009).

Hubungan antara penyakit kardiovaskuler dan Lp-PLA2 telah banyak dipelajari saat ini. Enzim Lp-PLA2 telah banyak dilaporkan berhubungan dengan beberapa penanda resiko dan kejadian dari penyakit kardiovaskuler.

Hal ini berhubungan langsung dengan hidrolisis *platelet-activating factor* (PAF) dan fosfolipid teroksidasi, yang merupakan fungsi protektif dari Lp-PLA2. Tetapi kemampuan menghidrolisis lipid bioaktif dan menghasilkan LysoPC, merupakan komponen pro-inflamasi dari enzim ini. Karenanya distribusi Lp-

PLA2 di dalam fraksi lipid menekankan adanya peran ganda dari enzim ini pada proses inflamasi; karena enzim Lp-PLA2-HDL berkontribusi pada reduksi dari atherosclerosis, sementara Lp-PLA2-LDL akan menstimulasi proses ini (Silva, Mello and Damasceno, 2011). Mayoritas Lp-PLA2 dalam plasma akan berikatan dengan LDL, sementara sebagian kecil berhubungan dengan HDL. Lp-PLA2 juga berikatan dengan lipoprotein (a), VLDL dan sebagian kecil lipoprotein lain. Data dari penelitian pada ras Kaukasia menunjukkan bahwa Lp-PLA2 plasma (yang secara primer berhubungan dengan LDL) adalah faktor resiko dari terjadinya penyakit jantung dan pembuluh darah (sebagai tambahan dari adanya faktor resiko konvensional). Di sisi lain, Lp-PLA2 yang berhubungan dengan HDL juga mengekspresikan aktivitas anti-atherogenik dan berhubungan dengan penurunan resiko kematian akibat penyakit jantung (Constantinos and Tselepis, 2014).

2.6.1 Peran Antioksidan dari Lp-PLA2

Stress oksidatif sangat berhubungan dengan inflamasi dan pembentukan lipid bioaktif. Lipid bioaktif ini, seperti PAF, substansi mirip PAF, fosfolipid teroksidasi, telah diidentifikasi ada di dalam plak atherosklerotik (Okamura *et al.*, 2007). Produk-produk yang menyerupai PAF dibentuk ketika fosfolipid dari membran sel mengalami kerusakan oksidatif, yang berakibat pada terbentuknya komponen yang memiliki struktur dengan residu peroksida yang lebih pendek pada rantai karbon keduanya dan menyerupai aksi dari PAF (Tjoelker and Stafforini, 2000).

Dengan adanya fosfolipid teroksidasi, LP-PLA2 akan menyingkirkan fragmen ini dan bertindak sebagai antioksidan. Hal ini disebabkan oleh ekspresi berlebihan dari Lp-PLA2 yang akan memproteksi sel dari

apoptosis yang diinduksi oleh *reactive oxygen species* (ROS) melalui hidrolisis fosfolipid (Silva, Mello and Damasceno, 2011).

Sebagai tambahan, ox-LDL dan LDL (-) diketahui memiliki faktor penting dalam inisiasi dan perkembangan atherosclerosis (Glass and Witztum, 2001; Benítez *et al.*, 2003). Pembentukan fosfolipid teroksidasi pada LDL akan menstimulasi aktivitas Lp-PLA2 (Heery *et al.*, 1995).

Aktivitas Lp-PLA2 dalam menghidrolisis komponen lipid menggambarkan peran anti-atherogenik yang penting. Lp-PLA2 mampu menghidrolisis fosfolipid teroksidasi, meminimalkan pembentukan LDL yang sangat teroksidasi, dan meningkatkan bentuk LDL yang teroksidasi minimal (Watson *et al.*, 1995). Sementara itu, Benitez *et al.* (2003) menemukan bahwa komponen utama Lp-PLA2 berhubungan dengan LDL (-) dibandingkan dengan LDL (+), menggambarkan bahwa pelepasan kemotaktik yang diinduksi oleh LDL (-) dapat merupakan akibat dari tingginya aktivitas Lp-PLA2 (Benítez *et al.*, 2003). Bahkan sebenarnya LDL (-) dapat dibentuk oleh Lp-PLA2, walaupun asal dari sub kelompok LDL ini juga dapat cocok dengan reaksi oksidatif dan mekanisme lain seperti glikosilasi non-enzimatik, perubahan pada ApoE dan Apo CII, dan sebab lainnya (Mello *et al.*, 2011).

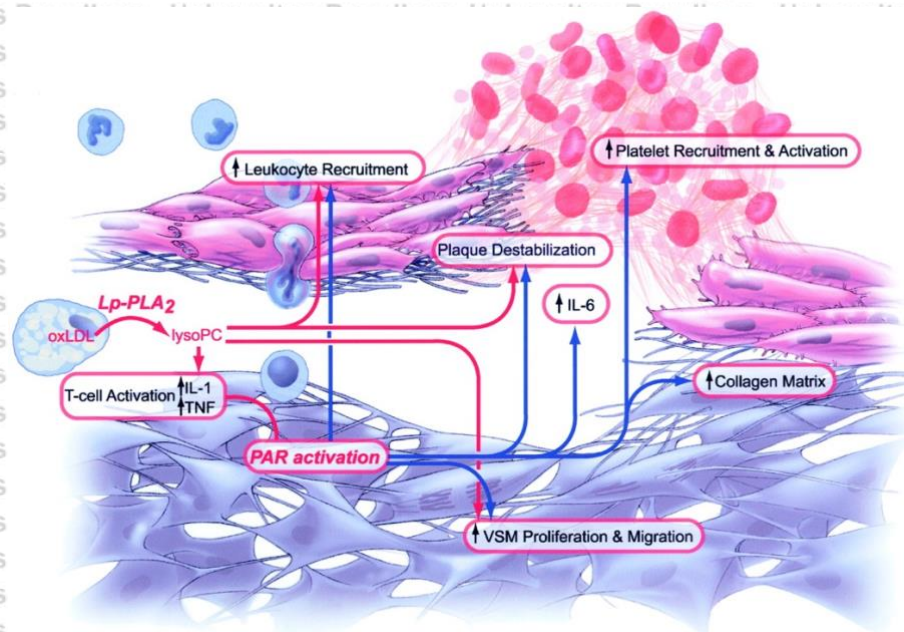
Aktivitas Lp-PLA2 juga penting dalam menurunkan imunogenesitas dari ox-LDL, suatu fenomena yang dapat dihubungkan dengan penurunan fosfolipid teroksidasi pada pasien-pasien dengan penyakit jantung koroner dan pada individu sehat (Lourida *et al.*, 2006). Noto *et al.* (2003) menunjukkan bahwa pada hewan, Lp-PLA2 memproteksi lipoprotein dari oksidasi, lebih sedikit memproduksi lipoprotein pro-atherogenik, dan mempertahankan fungsi HDL (Noto *et al.*, 2003).

2.6.2 Aksi Pro-inflamasi dari Lp-PLA2

Walaupun memiliki efek antioksidan yang telah dideskripsikan diatas, hubungan antara LpPLA2 dan reaksi inflamasi menggambarkan kebanyakan penelitian pada tahun-tahun terakhir ini (Silva, Mello and Damasceno, 2011). Ketika Lp-PLA2 menghidrolisis lipid bioaktif, menurunkan aktivitas biologisnya, metabolit yang paling banyak dibentuk adalah lysofosfolipid. Lipid ini terlibat dalam proses atherosklerotik dan menunjukkan peran destruktif dari Lp-PLA2, yang berkontribusi dalam respon inflamasi (Itabe, 1998; Benítez *et al.*, 2003).

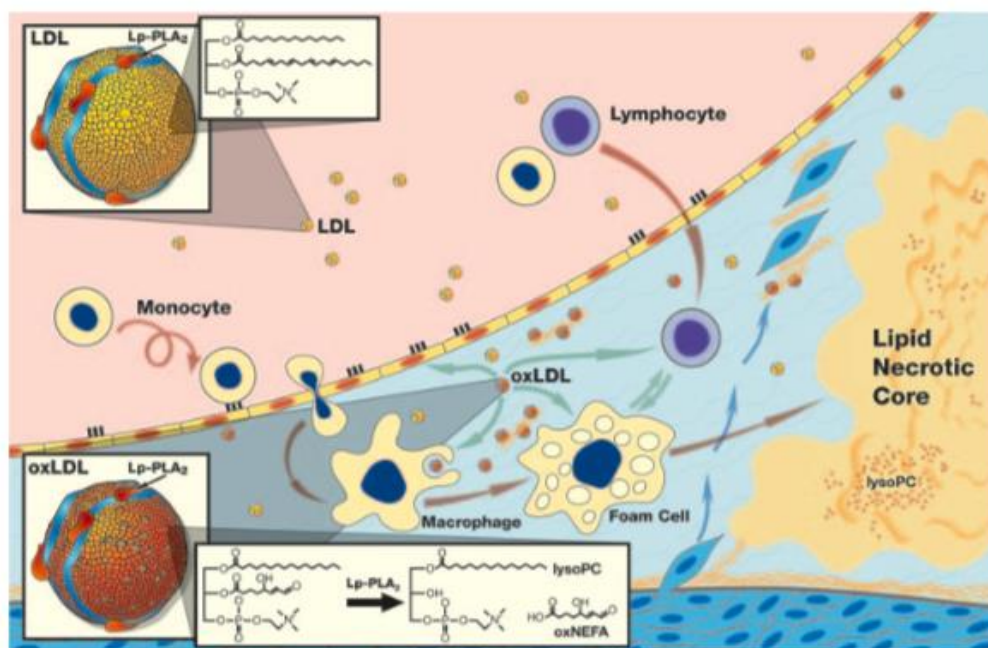
Lp-PLA2 adalah enzim monomer yang menghidrolisis ikatan ester dari sn-2, terutama jika kelompok acyl pendek berada pada posisi sn-2 dari fosfolipid yang teroksidasi. Di dalam plasma, 80% Lp-PLA2 ditemukan berikatan dengan LDL, utamanya LDL dengan berat molekul kecil, dan sekitar 20% dihubungkan dengan HDL. Enzim ini menghasilkan 2 produk bioaktif, yaitu LysoPC dan NEFA, yang dapat mempotensiasi atherogenesis (Szmitko *et al.*, 2003).

LysoPC adalah faktor kemotaktif poten untuk monosit dan menginduksi ekspresi molekul adhesi leukosit mononuclear pada sel-sel endothelial. Sifat ini dapat menginisiasi penambahan lesi. Ketika leukosit telah berada dalam plak yang sedang berkembang, LysoPC dapat berkelompok dengan peptida dan bertindak sebagai antigen yang menstimulasi sel T. Pada aktivasi sel T, reaksi imun di dalam dinding pembuluh darah tidak hanya ditahan tetapi malah ditingkatkan (Szmitko *et al.*, 2003).



Gambar 2.9 Lp-PLA2 dan PARs (Protease-Activated Receptors), mediator-mediator inflamasi. Lp-PLA2 dan PARs berperan dalam proses pro-inflamasi dan pro-atherogenik. Lp-PLA2 mengkonversi oxLDL menjadi lysoPC yang dapat membuat terjadinya adhesi lekosit, proliferasi sel otot polos vaskuler dan mengaktifasi proliferasi sel T, dapat mengaktifasi makrofag dan membuat terjadinya kematian sel otot polos vaskuler, berkontribusi pada destabilisasi plak. Aktivitas PAR juga dapat meningkatkan pemanggilan lekosit dan progresi plak dengan menginduksi sel otot polos vaskuler untuk berproliferasi, bermigrasi, dan mensintesis kolagen. PAR juga berperan dalam menstimulasi sekresi sitokin pro-inflamasi, IL-6 dan kemudian keduanya akan mengaktifasi dan memanggil platelet, yang membuat terjadinya thrombosis. Ekspresi PAR diperkuat oleh IL-1 dan oleh TNF, yang keduanya merupakan produk yang disekresi oleh sel T yang teraktivasi (Szmitko *et al.*, 2003)

Ketika plak mulai berkembang, lysoPC dapat membuat terjadinya proliferasi sel otot polos vaskuler dengan mengaktifasi sintesis DNA. Tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi, biasanya setelah sintesis ox-LDL yang berkepanjangan dan adanya aktivitas Lp-PLA2, LysoPC akan menginduksi kombinasi kematian apoptotik dan non-apoptotik pada sel otot polos vaskuler. Akibatnya, aktivitas Lp-PLA dapat pada akhirnya membuat destabilisasi plak, meningkatkan kemungkinan terjadinya ruptur dan thrombosis. Lebih jauh lagi, aktivitas Lp-PLA2 dapat meningkatkan toksisitas ox-LDL terhadap makrofag, membuat terjadinya bentukan sel busa dan pelepasan beberapa komponen pro-atherogenik (Szmitko *et al.*, 2003).



Gambar 2.10 Gambaran skematik dari mekanisme pro-atherogenik dari Lp-PLA2 di dalam dinding pembuluh darah.

Lp-PLA2 berikatan dengan apoB pada LDL, yang merupakan pembawa primernya; yang akan mengantarkan Lp-PLA2 ke segmen dimana terjadi lesi dari dinding arteri. Oksidasi LDL subsekuen membuat terjadinya pembentukan fosfolipid yang terputus pada posisi *sn*-2, yang membuatnya rentan terhadap hidrolisis enzimatis oleh Lp-PLA2. Hal ini akan berakhir pada pembentukan 2 mediator lipid bioaktif, *lysophosphatidylcholine* (*lysoPC*) dan *oxidized nonesterified fatty acid* (*ox-NEFA*), yang memiliki peran penting dalam mengundang sel-sel inflamasi ke area lesi dan secara local meningkatkan mediator-mediator inflamasi. Influx dari sel-sel inflamasi yang mengekspresikan LP-PLA2 meningkatkan konsentrasinya di dalam dinding pembuluh darah. Mediator lipid bioaktif yang dibentuk oleh Lp-PLA2 juga sitotoksik terhadap makrofag, yang akan memfasilitasi pembentukan intik nekrotik lipid di lesi aterosklerotik kompleks (Zalewski and Macphee, 2005).

Walaupun Lp-PLA2 diekspresikan pada banyak jaringan, enzim di sirkulasi diturunkan dari sel-sel hematopoetik (Zalewski and Macphee, 2005). Pada manusia, sekitar 70-80% enzim berhubungan dengan LDL karena adanya interaksi protein-protein spesifik antara *n-terminus* dari Lp-PLA2 dan *C-terminus* dari apoB. Diantara partikel-partikel LDL yang berbeda, Lp-PLA2 lebih suka berhubungan dengan fraksi LDL yang lebih kecil dan lebih berat, yang dipercaya juga lebih pro-atherogenik. LDL yang memiliki muatan negatif menginduksi ekspresi gen inflamasi dan adhesi monosit terhadap permukaan sel endothelial yang konsisten

dengan efek potensi Lp-PLA2 yang pro-atherogenik (Zalewski and Macphee, 2005).

Pada lesi atherosklerotik manusia, 2 sumber utama dari Lp-PLA2 dapat diidentifikasi, termasuk diantaranya yang dibawa kedalam intima yang berikatan dengan LDL (dari sirkulasi) dan yang disintesis *de novo* oleh plak sel-sel inflamasi (makrofag, sel T, sel mast) (Hakkinen *et al.*, 1999). Deposisi dari *apolipoprotein B* (Apo B), yang mengandung LDL-C, diperlukan untuk perkembangan awal atherosclerosis. Ketika LDL-C sudah terperangkap dalam subintima, apoB akan memfasilitasi beberapa langkah upregulasi dari molekul adhesi dan kemoatraktan permukaan sel yang merekrut monosit dan makrofag ke dalam atheroma. Makrofag memainkan peran dalam memakan kolesterol dan modifikasi lebih lanjut oleh beberapa bentuk dari familia fosfolipase. Pelepasan asam lemak bebas dan LysoPC menyediakan metabolit untuk beberapa jalur inflamasi, dan hal ini telah dipertimbangkan untuk menjadi mekanisme utama dari inflamasi yang disebabkan oleh fosfolipase. Fosfolipase kemudian membuat agregasi dan akumulasi LDL-C. Kelompok fosfolipase IIA dapat dipertimbangkan menjadi enzim kunci dalam proses awal berbagai penyakit inflamasi dan dapat menyebabkan resolusi sebagian dari proses inflamasi. Akhir-akhir ini, fosfolipase yang disekresikan grup V dan grup X serta *platelet-activating factor acetylhydrolase* telah dikenal sebagai enzim penting dalam atherosclerosis, yang akan memodifikasi LDL-C dan membentuk akumulasi di kumpulan lemak (McCullough, 2009).

Terdapat banyak jenis lisofosfolipid, tetapi hasil utama dari aksi Lp-PLA2 adalah LysoPC (Schmitz and Ruebsaamen, 2010). Hidrolisis dari fosfolipid teroksidasi pada LDL yang dimediasi oleh Lp-PLA2 dapat

menggambarkan jalur yang tepat untuk mengetes hipotesis inflamasi.

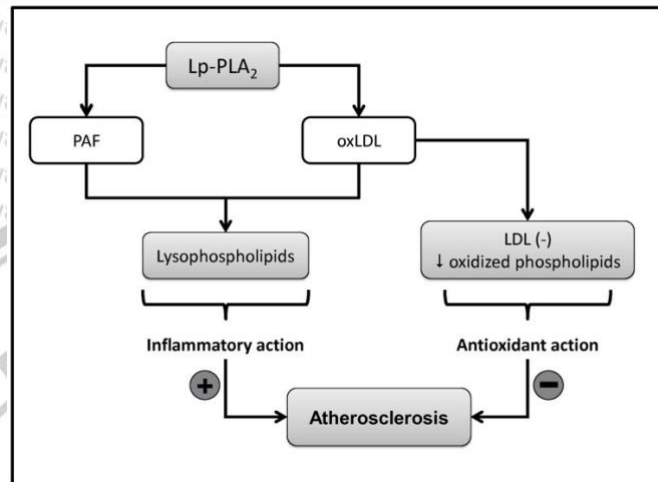
Oksidasi LDL berakibat pada sejumlah modifikasi yang mempengaruhi komponen fosfolipid dan apolipoprotein B (apoB), yang mengubah molekulnya menjadi bentuk yang sangat berbeda dari bentuk aslinya. Reaksi ini termasuk pembentukan dari hidroperoksida lemak dan aldehid (misalnya: malondialdehid, 4-hydroxynonenal) yang bereaksi dengan residu lisin dari apoB, meningkatkan komponen psikokimiawi dari LDL (Mertens and Holvoet, 2001). Peningkatan LDL dalam sirkulasi

dihubungkan dengan kerapuhan plak, disfungsi endotel, dan resikonya akan lebih tinggi pada pasien dengan sindroma coroner akut (Zalewski and Macphee, 2005). Sampai saat ini, modifikasi oksidatif dari LDL diasumsikan akan bertanggung jawab pada beberapa reaksi yang terlibat pada proses atherogenesis (Steinberg, 2002). Tetapi modifikasi oksidatif dari asam lemak tak jenuh pada posisi *sn*-2 dari fosfolipid diantara molekul LDL membuatnya lebih rentan terhadap hidrolisis oleh Lp-PLA₂, menambahkan 2 produk tambahan: *lysophosphatidylcholine* (lysoPC) dan *oxidized non-esterified fatty acid* (NEFA) (gambar 2.8). Akumulasi beberapa fosfolipid teroksidasi dan lysoPC telah dilaporkan ditemukan pada model penelitian atherosclerosis (Hara and Takeomi, 1990; Watson *et al.*, 1997).

2.6.3 Lp-PLA₂ sebagai Pananda Resiko Kardiovaskuler

Terdapat 2 kemungkinan utama dari kerja enzim Lp-PLA₂ dalam hubungannya dengan penyakit kardiovaskuler: aksinya sebagai antioksidan, dimana proses hidrolisis ini mereduksi fosfolipid teroksidasi di plasma dan oxLDL yang berkontribusi dalam pembentukan LDL (-); dan aksi inflamasi, dimana hidrolisis PAF, produk PAF atau fosfolipid

teroksidasi membentuk lisofosfolipid yang akan menstimulasi inflamasi, sehingga proses atherogenik akan terstimulasi. Lp-PLA₂ menunjukkan aksi ganda, yang berhubungan langsung dengan LDL (pro-atherogenik) atau yang berhubungan dengan HDL (anti-atherogenik) (Silva, Mello and Damasceno, 2011)



Gambar 2.11 Peran Lp-PLA₂ dalam penyakit kardiovaskuler (Silva, Mello and Damasceno, 2011)

Adanya perkembangan analisis dan gambaran dari atherosclerosis telah membuat beberapa penemuan yang menghubungkan penanda biologis terlarut dan resiko penyakit kardiovaskuler (Zalewski and Macphee, 2005). Sampai saat ini, kadar malondialdehid dalam serum, suatu penanda untuk oksidasi lipid, juga merupakan prediktor kuat untuk penyakit kardiovaskuler (Walter *et al.*, 2004). Hal ini dapat menjelaskan adanya paparan yang lebih besar pada dinding pembuluh darah terhadap LDL yang telah dimodifikasi secara oksidatif, tetapi juga mengindikasikan peningkatan dalam substrat untuk Lp-PLA₂. Karena kadar Lp-PLA₂ dalam plasma dapat diukur, hubungan antara mediator-mediator lipid dan penyakit kardiovaskuler memainkan peranan yang mendukung bukti bahwa Lp-PLA₂ memainkan peran penting dalam populasi yang memiliki

resiko. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kadar Lp-PLA2 lebih tinggi pada seseorang dengan penyakit kardiovaskuler di kemudian hari. Pada hampir seluruh penelitian, estimasi penghitungan resiko kematian, penyakit jantung koroner atau stroke tetap signifikan walaupun setelah memasukkan faktor resiko lain (Packard *et al.*, 2000; Ballantyne *et al.*, 2004). Karena kadar Lp-PLA2 dependen terhadap kadar pembawanya, yaitu LDL-kolesterol, didapatkan interaksi signifikan pada pengukuran kedua penanda ini (Ballantyne *et al.*, 2004). Sementara kadar CRP dan Lp-PLA2 tidak saling berhubungan, karena tampaknya kedua penanda ini berada pada jalur inflamasi yang berbeda. Tetapi kedua penanda ini tetap memiliki nilai prediktif terhadap resiko kardiovaskuler (Ballantyne *et al.*, 2004; Oei, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Ballantyne, *et al.* (2004) menunjukkan bahwa Lp-PLA2 dan CRP dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu yang memiliki faktor resiko tinggi untuk terkena penyakit jantung koroner. Pada penelitian yang dilakukan oleh Persson, *et al.*, (2007) didapatkan kesimpulan bahwa pada populasi non-diabetik, Lp-PLA2 berhubungan dengan kejadian sindroma metabolik. Peningkatan kadar Lp-PLA2 dalam plasma berhubungan dengan peningkatan resiko insiden penyakit kardiovaskuler (walaupun tanpa didahului sindroma metabolik).

Adanya aktivitas Lp-PLA2 dan sindroma metabolik dapat mengidentifikasi individu dengan resiko tinggi terkena penyakit jantung dan pembuluh darah (Persson *et al.*, 2007). Beberapa penelitian telah menemukan bukti produksi Lp-PLA2 pada lokasi atherosklerosis pada aorta hewan coba.

Lp-PLA2 juga dapat diukur pada sirkulasi koroner, di sinus coronaria dengan konsentrasi yang meningkat, membuat adanya pendapat bahwa terdapat hubungan antara produksi enzim ini dengan jaringan

atheromatous (Lavi *et al.*, 2007). Beberapa penelitian histopatologis telah menemukan Lp-PLA di dalam plak atherosklerotik yang rawan ruptur atau memiliki selubung fibrosa yang tidak intak dan telah berkembang menjadi trombus. Intensitas pewarnaan lokal dari Lp-PLA2 tampaknya berkaitan dengan kerapuhan plak (Kolodgie *et al.*, 2006). Saat ini hanya penanda resiko ini saja yang berlokasi dan langsung tertuju pada pembuluh darah yang terkena atherosklerotik (McCullough, 2009).

Di dalam darah, Lp-PLA2 diukur dari massanya dan aktivitasnya. Alat untuk mengukur massa Lp-PLA2 tersedia di Amerika Serikat sejak tahun 2005 (PLAC; Diadexus, San Francisco Selatan, CA) diindikasikan untuk prediksi resiko penyakit jantung koroner dan stroke. Aktivitas Lp-PLA2 dapat diukur menggunakan 3H -platelet activating factor dalam pemeriksaan aktivitas radiometric tinggi (McCullough, 2009).

Penelitian lain menyebutkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 berhubungan dengan resistensi insulin dan mampu memprediksi insiden pada diabetes pada individu berusia tua. Beberapa penelitian klinis juga menunjukkan bahwa Lp-PLA 2 meningkat secara signifikan pada PJK pada individu diabetik sebelum melakukan prosedur angioplasti (Nelson *et al.*, 2012; Fortunato *et al.*, 2014). Nelson (2012) menyatakan bahwa aktivitas Lp-PLA2 tampak lebih bermakna pada individu dengan T2DM dibandingkan individu nonDM. Terdapat juga hubungan yang berkorelasi positif antara resistensi insulin dan aktivitas Lp-PLA2 (Nelson *et al.*, 2012). Fortunato (2014) juga menyatakan bahwa kadar Lp-PLA2 lebih tinggi pada individu T2DM dibandingkan kelompok non-DM (Fortunato *et al.*, 2014). Hatoum (2010) menyimpulkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 sangat berkaitan dengan insiden penyakit jantung koroner pada individu dengan T2DM dan bahwa aktivitas Lp-PLA2 berhubungan positif dengan lesi yang tidak stabil

dibandingkan dengan atherosklerotik saja (Hatoum *et al.*, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Garg, *et al.*, (2015) menemukan bahwa aktivitas Lp-PLA2 tinggi pada tahap awal diabetes tipe 2, dan kondisi hiperglikemia ditemukan juga berhubungan dengan tingginya aktivitas Lp-PLA2 (Garg, Madhu and Suneja, 2015).

2.6.4 Peran Lp-PLA2 Pada Sindroma Metabolik Dan Diabetes Mellitus

Seperti yang telah diketahui, penyakit jantung koroner akan berkembang lebih cepat dan lebih serius pada pasien diabetes dibandingkan pasien non diabetes (Naito, 2015). Beberapa penelitian telah menunjukkan adanya peningkatan resiko terjadinya penyakit kardiovaskuler yang dikaitkan dengan sindroma metabolik (MetS/*Metabolic Syndrome*) (Isomaa *et al.*, 2001; Haffner, 2006). Apakah faktor resiko ini juga dipengaruhi oleh faktor lain yang berkaitan dengan penyakit jantung koroner masih kontroversial.

Lp-PLA2 adalah suatu penanda inflamasi yang berhubungan dengan beberapa komponen yang mendukung terjadinya MetS, yaitu kolesterol LDL, penyakit atherosklerotik, dan insidensi penyakit jantung koroner (MacPhee *et al.*, 1999; Packard *et al.*, 2000; Ballantyne *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2004; Oei, 2005; Persson *et al.*, 2007), tetapi belum ada penelitian yang menyebutkan resiko yang berhubungan dengan MetS yang ditemukan berhubungan dengan peningkatan kadar Lp-PLA2.

Pengaruh Lp-PLA2 pada penyakit jantung koroner dapat dilihat dari massanya atau aktivitas dari enzim ini (Packard *et al.*, 2000; Ballantyne *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2004; Oei, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Persson, *et al.* (Persson *et al.*, 2007) menunjukkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 berkaitan dengan kelima komponen MetS, yaitu obesitas

abdominal, hipertrigliseremia, kadar HDL rendah, tekanan darah tinggi, dan peningkatan kadar glukosa darah puasa. Kadar aktivitas Lp-PLA2 yang lebih tinggi pada plasma berhubungan dengan peningkatan resiko insiden terjadinya penyakit jantung koroner yang disebabkan karena MetS (Persson *et al.*, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Nelson, *et al.* (2012) menunjukkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 berhubungan dengan peningkatan resiko terjadinya diabetes mellitus tipe 2, hal ini berkaitan dengan terjadinya resistensi insulin yang tercatat lebih besar pada individu dengan kadar aktivitas Lp-PLA2 yang lebih tinggi (Nelson *et al.*, 2012). Beberapa analisis lain juga mengatakan bahwa individu dengan diabetes memiliki kadar massa/aktivitas Lp-PLA2 yang lebih tinggi dibandingkan individu non DM (Kudolo, Bressler and DeFronzo, 1997; Serban *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2007; Furberg *et al.*, 2008). Terdapat beberapa mekanisme yang mungkin mendasari hubungan Lp-PLA2 dengan diabetes, termasuk diantaranya adalah peningkatan aktivitas inflamasi yang berkaitan dengan aktivitas hidrolisis ox-fosfolipid oleh Lp-PLA2 yang dapat menginduksi resistensi insulin (Noto, Chitkara and Raskin, 2006; Iwase *et al.*, 2008). Peningkatan Lp-PLA2 juga merupakan penanda bagi inflamasi jaringan adiposa, dan proses metabolik lain seperti meningkatnya fluksasi asam lemak, dan/atau perturbasi adipokin, yang mendasari perkembangan resistensi insulin dan gagalnya sel beta pankreas (Rabe *et al.*, 2008). Karena adanya inflamasi pada jaringan adiposa, maka dimungkinkan adanya infiltrasi monosit/makrofag pada kompartemen adiposa yang dapat memicu peningkatan kadar Lp-PLA2 secara lokal (Nelson *et al.*, 2012).

2.7 Darapladib sebagai Penyekat Selektif *Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2)*

Perkembangan atherosklerotik vaskuler bervariasi dan terkait dengan inflamasi vaskuler. Dari titik pandang terapeutik, tantangan yang ada adalah bagaimana mengidentifikasi jalur inflamasi yang spesifik terhadap atherosklerotik, dimana intervensi terapeutik akan berakibat pada perbaikan vaskuler tanpa mempengaruhi kemampuan pertahanan pasien (misalnya selama masa infeksi) (Zalewski and Macphee, 2005). Sebagai kelainan yang disebabkan oleh akumulasi lipid, atherotrombosis diketahui sangat dipengaruhi oleh aktivitas inflamasi yang berinteraksi dengan lipoprotein atherogenik yang mempercepat progresi penyakit, yang akhirnya berakibat pada ruptur plak dan manifestasi klinis yang bermakna (Ridker and Luscher, 2014). *Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2)* telah diidentifikasi sebagai penanda resiko terjadinya penyakit akibat atherosclerosis (Collaboration, 2010) dan karenanya merupakan target untuk intervensi terapeutik.

Peran dari Lp-PLA2 yang berproses dengan oxLDL, inflamasi dan atherogenesis memperlihatkan bahwa inhibisi dari enzim ini dapat memainkan peran positif dalam terapi penyakit kardiovaskuler (Hu *et al.*, 2011). Inhibisi Lp-PLA2 oleh penyekat selektif tidak mencegah oksidasi LDL tetapi menghambat pelepasan Lyso-PC yang tampaknya berperan dalam sitotoksitas dan efek induksi apoptosis oleh ox-LDL pada makrofag. Karena itu, inhibisi Lp-PLA2 mungkin dapat menggambarkan suatu target terapi baru untuk menghindari terjadinya atherosclerosis (Szmitko *et al.*, 2003).

Darapladib adalah penyekat selektif untuk Lp-PLA2 yang masih diteliti potensinya untuk menstabilisasi plak atherosklerotik beresiko tinggi dan potensinya dalam menurunkan penyakit kardiovaskuler (Mohler *et al.*, 2008; Wilensky *et al.*, 2008). Darapladib telah menjalani fase pengembangan klinis

lanjut sebagai agen anti atherosklerotik potensial ketika diberikan bersama kombinasi dengan terapi standar pada pasien dengan sindroma koroner akut atau pada penyakit jantung koroner (Mohler *et al.*, 2008; Serruys *et al.*, 2008). Obat ini telah terbukti aman dan ditoleransi dengan baik pada riset klinisnya. Dosis 160 mg menghasilkan efek yang signifikan dalam menghambat kerja Lp-PLA2 dalam plasma dan mencegah progresi inti nekrotik pada plak; yang merupakan determinan utama terjadinya kerapuhan pada plak (Serruys *et al.*, 2008). Walaupun efek farmakokinetiknya dan interaksinya dengan obat lain minimal, Darapladib gagal pada fase III percobaan klinis, karena tidak menunjukkan hasil yang signifikan dalam menurunkan resiko terkena penyakit koroner dibandingkan dengan pemberian plasebonya (*The SOLID-TIMI 52 Randomized Clinical Trial*) (O'Donoghue *et al.*, 2014). Hal ini membuat Darapladib merupakan obat yang menarik untuk diteliti efeknya (Heriansyah, Wihastuti, *et al.*, 2016).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa penyekat selektif spesifik Lp-PLA2, Darapladib, memperingan kondisi inflamasi pada pasien dengan penyakit jantung koroner yang stabil, dan mencegah terjadinya perluasan inti nekrotik; yang merupakan faktor kunci dari terjadinya ruptur plak (Mohler *et al.*, 2008; Serruys *et al.*, 2008). Pada riset dengan hewan coba, inhibisi Lp-PLA2 oleh Darapladib menurunkan kompleks plak atherosklerotik pada arteri koronaria pada hewan babi yang diinduksi diabetes dan hiperkolesterolemia (Wilensky *et al.*, 2008). Penelitian oleh Hu, *et al.* (2011) memperlihatkan bahwa inhibisi Lp-PLA2 oleh Darapladib menurunkan inflamasi dan formasi plak atherosklerotik pada tikus dengan defisiensi reseptor LDL dengan diet tinggi lemak (Hu *et al.*, 2011). Penelitian dengan menggunakan tikus dengan model defisiensi ApoE menunjukkan bahwa Darapladib mengurangi inflamasi *in vivo* dan menurunkan pembentukan plak pada tikus; mendukung perannya sebagai

anti-atherogenik selama perkembangan atherosclerosis (Wang *et al.*, 2011).

Hal ini dapat merupakan strategi baru untuk terapi atherosklerotik. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa pada pasien dengan penyakit arteri perifer, Darapladib efektif dalam mereduksi aktivitas Lp-PLA2 (Berger *et al.*, 2011). Penelitian lain oleh Heriansyah, *et al.* (2016) menunjukkan bahwa pemberian darapladib mampu menurunkan kadar ox-LDL dan jumlah sel busa pada tikus Sprague-Dawley model dislipidemia. Darapladib juga mampu menurunkan ketebalan jaringan adiposit perivaskuler (*perivascular adiposit tissue*/PVAT) pada hewan coba yang menerima diet tinggi lemak (Heriansyah, Wihastuti, *et al.*, 2016).

2.7.1 Metabolisme Darapladib

Darapladib dikembangkan oleh GlaxoSmithKline plc, merupakan inhibitor Lp-PLA2 terbaru yang memiliki sifat farmakokinetik lebih baik, dengan interaksi antar obat yang minimal dan memiliki kadar di dalam darah yang stabil dengan penggunaan oral sekali sehari. Studi menggunakan babi model diabetes menunjukkan bahwa darapladib dapat menurunkan progresivitas plak arteri melalui penurunan jumlah makrofag inflamasi di dalam plak dan menurunkan respon sel T (Riley and Corson, 2009).

Inhibisi Lp-PLA2 menggunakan Darapladib dapat menurunkan pembentukan jejas atherosklerotik pada hewan coba dan meningkatkan stabilitas dari plak atherosclerosis melalui penghambatan inflamasi vaskuler (Serruys *et al.*, 2008; Wilensky *et al.*, 2008). Pada model babi hiperkolesterol, terapi menggunakan Darapladib dengan dosis 10mg/kg/hari dapat menurunkan 84% aktivitas Lp-PLA2, mengurangi area plak dan kejadian nekrotik pada inti plak dibandingkan dengan

kontrol (Wilensky *et al.*, 2008). Terapi dengan Darapladib juga menurunkan ekskresi beberapa gen yang berhubungan dengan aktivitas leukosit (CD68, reseptor kemokin/ligan mRNA). Data-data ini menunjukkan bahwa terapi menggunakan Darapladib memiliki efek penting dalam jalur kunci inflamasi (Rosenson and Hurt-Camejo, 2012).

Pada uji klinis fase I dan II, darapladib memiliki efek menurunkan aktivitas Lp-PLA2 sebanyak 95%. Darapladib dapat mencegah kemotaksis monosit dan produksi asam lemak teroksidasi. Darapladib juga dapat menurunkan level hsCRP dan IL-6 (Charo and Taub, 2011).

Studi oleh Zhang *et al.* (2016) membandingkan pemberian darapladib dosis rendah (25mg/kgBB/hari) dan dosis tinggi (50mg/kgBB/hari) pada tikus *Sprague dawley* yang diberikan HFD selama 10 minggu menunjukkan bahwa pada dosis rendah dapat menurunkan level Lp-PLA2 serum secara signifikan pada tikus model aterosklerosis (Zhang *et al.*, 2016). Pada manusia, darapladib dapat ditoleransi dengan baik pada dosis 40,80 dan 160 mg perhari dan dapat menurunkan aktivitas Lp-PLA2 sebesar 66% selama 12 minggu terapi. Efek samping ditemukan pada 16-36% subyek, di antaranya diare dan malodor pada urin dan feses (Rosenson and Stafforini, 2012).

Aktivitas darapladib dipengaruhi oleh level profil lipid. Penggunaan obat-obatan penurun kolesterol dapat mempengaruhi efek darapladib dalam mencegah perkembangan lesi atherosklerosis yang tidak stabil. Enzim Lp-PLA2 dilaporkan dapat menurunkan marker inflamasi IL-6 sebesar 12.3% tapi tidak mempengaruhi CRP. Meskipun nama lain Lp-PLA2 adalah PAF-AH karena kemampuannya dalam menghidrolisa PAF, tetapi darapladib belum dilaporkan berpengaruh pada fungsi platelet (Steen and O'Donoghue, 2013).

M. Dave, et al. (2014) menyatakan dalam penelitiannya bahwa ekskresi preklinis dan studi metabolisme pada tikus dan anjing memperkirakan bahwa absorpsi Darapladib, berdasarkan sekresi bilier dan ekskresi-nya di urine dari materi berbahan radioaktif, cukup rendah, sekitar 4% dari dosisnya, dengan kebanyakan dosis akan dieliminasi sebagai obat yang tidak terabsorpsi melalui feces. Rute utama eliminasi dari obat yang diabsorpsi adalah melalui sekresi bilier. Pemberian melalui rute intravena memperlihatkan bahwa proses eksresinya, dimana Darapladib akan dieliminasi adalah melalui feces dan urine sebagai obat atau metabolit. Pada penelitian sebelumnya, terlihat bahwa darapladib diakumulasi (30-60%) pada sirkulasi sistemik setelah beberapa dosis oral (Dave et al., 2014).

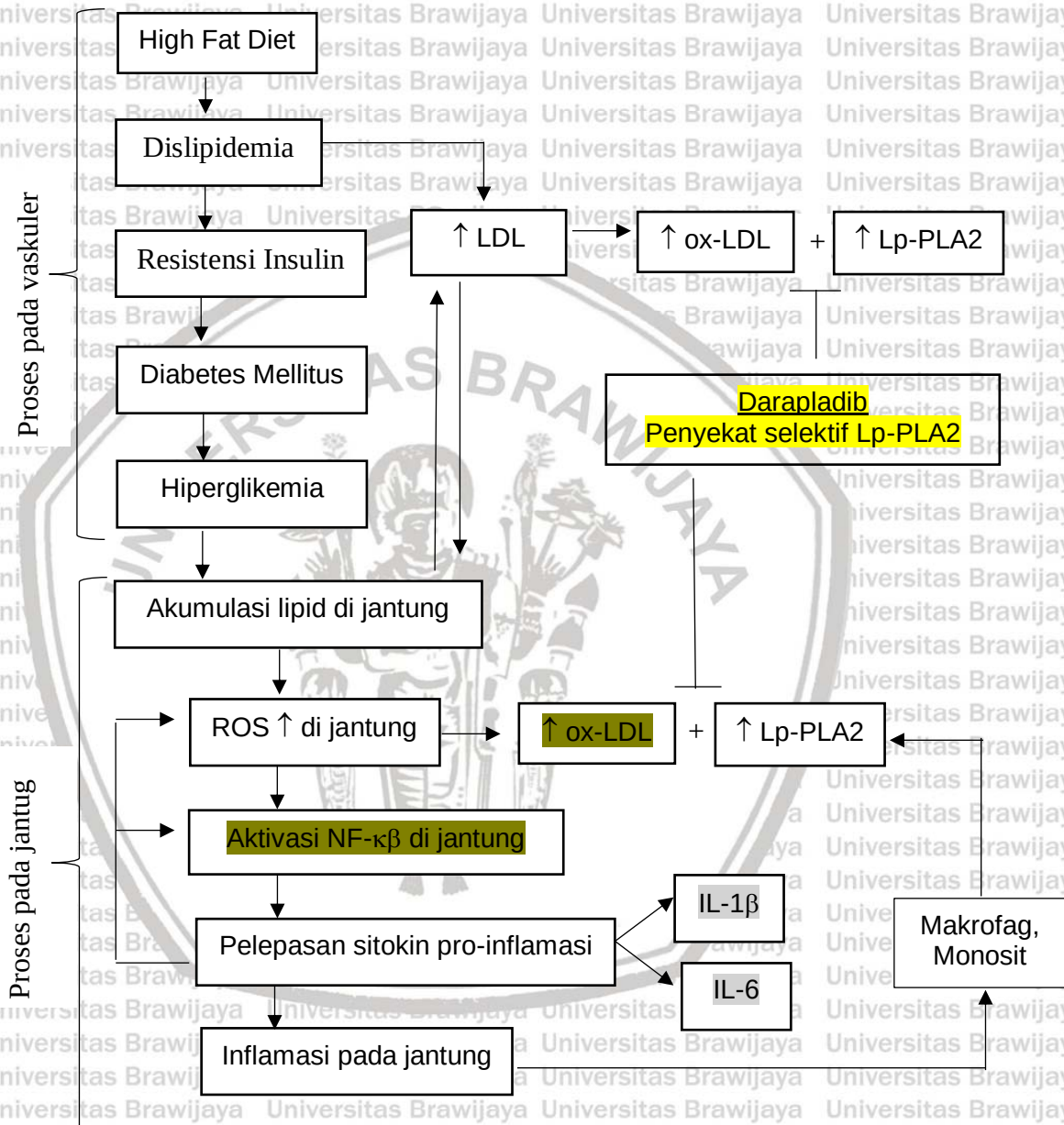




BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan bagan: : variabel tergantung

: variabel bebas

: variabel tidak diukur

Bagan 3.1. Kerangka Konsep. Jantung memiliki kapasitas untuk beradaptasi terhadap berbagai kondisi patofisiologi dengan menyelaraskan metabolismenya terhadap karbohidrat dan asam lemak. Pemberian pakan tinggi lemak dapat membuat terjadinya resistensi insulin ada jantung tikus, dikarenakan adanya asupan lipid berlebih, yang nantinya akan meningkatkan penggunaan lipid dan menurunkan metabolisme glukosa pada jantung (Park *et al.*, 2005). Pada kondisi diabetes, asam lemak akan disimpan dalam bentuk TG dan fosfolipid di dalam kardiomyosit (Finck and Kelly, 2002). Akumulasi lipid pada miokard merupakan hal yang menyebabkan inflamasi pada jantung. Jika hal ini berlangsung lebih lama, maka jantung akan mulai untuk mengakumulasi *intermediate* lipid yang toksik untuk jantung, seperti *ceramide* dan *diacylglycerol*, dan ROS, yang berhubungan dengan perkembangan resistensi insulin dan lipotoksik kardiomiopati (Duncan *et al.*, 2007). Lipotoksik kardiomiopati dicirikan dengan disfungsi mitokondria dan peningkatan konsumsi oksigen miokard, semuanya berhubungan dengan apoptosis miosit dan disfungsi kontraktilitas (Pagano *et al.*, 2008). Dibawah stimulus patologis, miokard akan mensekresikan sejumlah sitokin dan kemokin pro-inflamasi (Ancey *et al.*, 2003), seperti IL-1 β dan IL-6. Peningkatan kadar dari sitokin dan kemokin pro-inflamasi ini berhubungan dengan inflamasi miokardia, gagal jantung dan kardiomiopati dilatasi (Takano *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2006). Ekspresi sitokin pro-inflamasi berada di bawah control NF- κ B yang akan teraktivasi dalam kondisi miokarditis, gagal jantung kongestif, dan hipertrofi kardial. Beberapa stimulus eksogen dan endogen dapat menginduksi NF- κ B, terutama adalah sitokin pro-inflamasi sendiri, kondisi hiperglikemia, peningkatan kadar asam lemak bebas di plasma, ROS, angiotensin II, endothelin 1, *toll-like receptors*, lipoprotein dan anoksia (Palomer *et al.*, 2013). Lp-PLA2 adalah suatu penanda inflamasi yang berhubungan dengan beberapa komponen yang mendukung terjadinya sindroma metabolik, salah satunya yaitu tingginya kolesterol LDL (MacPhee *et al.*, 1999; Packard *et al.*, 2000; Ballantyne *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2004; Oei, 2005; Persson *et al.*, 2007). Aktivitas Lp-PLA2 berhubungan dengan peningkatan resiko terjadinya diabetes mellitus tipe 2, hal ini berkaitan dengan terjadinya resistensi insulin yang tercatat lebih besar pada individu dengan kadar aktivitas Lp-PLA2 yang lebih tinggi (Nelson *et al.*, 2012). Pemberian penyekat selektif Lp-PLA2 (darapladib) akan menghambat aktivitas Lp-PLA2, sehingga diharapkan dapat mempengaruhi ekspresi penanda inflamasi (IL-1 β dan IL-6) di jantung.

3.2 Hipotesis

Pemberian Darapladib sebagai penyekat selektif Lp-PLA2 pada tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2 dapat menurunkan ekspresi IL-1 β dan IL-6 sebagai mediator inflamasi pada jantung tikus, sehingga dapat mencegah terjadinya proses inflamasi yang berperan dalam patologi penyakit jantung akibat diabetes mellitus tipe 2.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *serial post test with control group* secara *in vivo*, paralel 3 kelompok, menggunakan hewan coba tikus *Sprague Dawley* (SD). Dipilihnya tikus tersebut didasarkan atas beberapa laporan ilmiah terdahulu yang menyebutkan SD merupakan model tepat untuk menginduksi atherosklerosis dengan pemberian diet tikus aterogenik/*high fat diet* (HFD). SD adalah model non-genetik (*transgenic*) yang tepat pula untuk memperlihatkan bagaimana munculnya resistensi insulin dan DMT2 seperti pada manusia melalui induksi dengan HFD dan *streptozotocin* (STZ) dosis rendah.

Tiga kelompok dalam penelitian ini meliputi kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif (DMT2) serta kelompok perlakuan yaitu DMT2 yang diberikan penyekat selektif Lp-PLA2 (Darapladib/DP) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Pengamatan dilakukan secara serial setelah 8 dan 16 minggu setelah pemberian darapladib untuk menilai ekspresi IL-1 β dan IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH-UB) Malang dan Departemen Patologi Anatomi (PA) FK Universitas Brawijaya (FKUB) Malang dari bulan Juli 2016 hingga Desember 2016.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus Sprague-Dawley yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus Sprague Dawley berjumlah 30 ekor yang memenuhi kriteria inklusi

4.3.3 Kriteria Inklusi

1. Tikus galur Sprague-Dawley
2. Berat 150-200 gram
3. Usia 6-8 minggu
4. Sehat (ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih)

4.3.4 Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit
2. Tikus mati saat penelitian berlangsung

4.3.5 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan menggunakan rumus Ferderer (1966), yang dikutip oleh Supranto (2000), yaitu sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 3$$

$$r \geq 4$$

keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

(Federer, 1966)

Dengan jumlah perlakuan sebanyak 6 (Normal 8, Normal 16, DM 8, DM 16, DMDP 8, dan DMDP 16), diperoleh jumlah replikasi/ulangan minimal tiap kelompok adalah 4 ekor tikus. Mengingat potensi risiko kematian dan kegagalan yang lebih besar maka ditambahkan antisipasi kegagalan 10% sehingga ditetapkan ulangan sebesar 5 ekor tikus tiap kelompok. Dengan demikian, jumlah keseluruhan sampel/ulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus.

Berikut merupakan rincian 6 kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini:

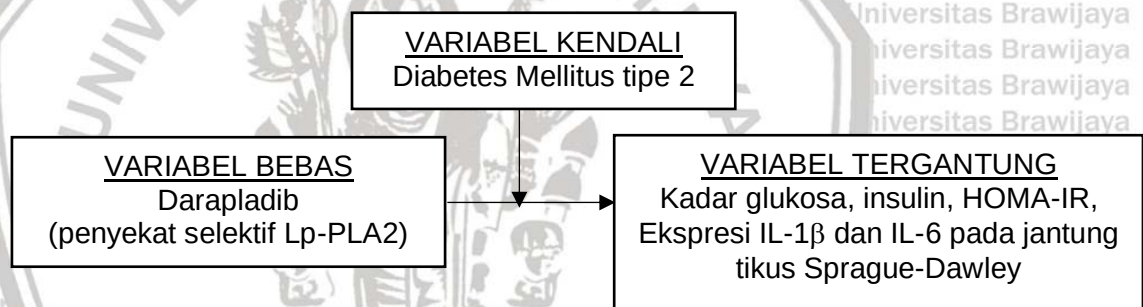
1. Kelompok 1: diberi pakan standar selama 8 minggu.
2. Kelompok 2: diberi pakan standar selama 16 minggu.
3. Kelompok 3: diberi HFD selama 8 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD.
4. Kelompok 4: diberi HFD selama 16 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD.
5. Kelompok 5: diberi HFD selama 8 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD, ditambahkan pemberian darapladib per oral dosis 20mg/kgBB selama 8 minggu.
6. Kelompok 6: diberi HFD selama 16 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD, ditambahkan pemberian darapladib per oral dosis 20mg/kgBB selama 16 minggu.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Identifikasi Variabel

- Variabel bebas: Darapladib (penyekat selektif *Lipoprotein-associated phospholipase A2*)
- Variabel tergantung: Kadar glukosa, insulin dari serum tikus, resistensi insulin (menggunakan formula HOMA-IR), ekspresi IL-1 β pada jantung tikus Sprague-Dawley, ekspresi IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley
- Variabel kendali: Diabetes Mellitus tipe 2

4.4.2 Hubungan Antar Variabel



Bagan 4.1 Bagan Hubungan Antar Variabel. Variabel bebas akan secara langsung mempengaruhi variable tergantung, dengan variabel kendali juga dapat mempengaruhi variable tergantung secara tidak langsung.

4.4.3 Definisi Operasional Variabel

- Darapladib adalah penyekat selektif *lipoprotein-associated phospholipase A2* (Lp-PLA2) yang dalam perkembangannya adalah obat untuk terapi aterosklerosis. Darapladib dikembangkan oleh *Human Genome Sciences* yang bekerjasama dengan GlaxoSmithKline (GSK). Pemberian darapladib dilakukan peroral dosis 20mg/kgBB/hari. Lama

pemberian Darapladib adalah 8 dan 16 minggu bergantung pada kelompok perlakuan.

b. Kadar Glukosa darah: diabetes mellitus tipe 2 dapat didiagnosis terjadi pada hewan coba setelah pengukuran kadar glukosa darah menggunakan GlucoDR (*All Medicus Co, Ltd.*, Dongan-gu, Anyang-Si, Korea). T2DM dapat didiagnosis terjadi apabila kadar glukosa darah puasa 7.5 mmol/L (~136 mg/dL) dan glukosa darah acak 10.4 mmol/L (~208 mg/dL) (Wang *et al.*, 2010).

c. Resistensi Insulin: kadar insulin dalam plasma tikus diukur menggunakan metode sandwich ELISA dengan menggunakan RAT INS (insulin) ELISA kit (Cat. No. E-EL-R 2466). Hasilnya diekspresikan dalam unit ng/mL. untuk mengkonversi kadar insulin plasma menjadi IU/L, digunakan formula WHO dengan membagi hasilnya dengan 0.0347 (1 IU sebanding dengan 0.0347 mg/L (Heriansyah, Adam, *et al.*, 2017). Pengukuran resistensi insulin dapat dilakukan menggunakan formulasi HOMA-IR (*Homeostatic model assessment-insulin resistance*) yang dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh van Dijk, *et al.* (2013) yang mengukur model resistensi insulin pada tikus. Formulasi ini membutuhkan darah dari glukosa darah puasa dan kadar insulin plasma dengan menggunakan formula berikut:

$$HOMA - IR = \frac{FBS \times FINS}{14.1}$$

HOMA-IR : *Homeostatis Model Assessment-Insulin Resistance*
 FBS : *Fasting Blood Glucose/gula darah puasa (mmol/L)*
 FINS : *Fasting Insulin Plasma/insulin plasma puasa (µU/mL)*
 14.1 : faktor pembagi

Interpretasi dari HOMA-IR, apabila hasilnya >1.716 maka dapat dikategorikan sebagai resistensi insulin dengan sensitivitas 83.87% dan spesifisitas 80.56% (van Dijk *et al.*, 2013; Heriansyah, Andri, *et al.*, 2017).

- d. Ekspresi interleukin- 1β (IL- 1β) pada jantung tikus Sprague Dawley adalah kadar sitokin pro-inflamasi yang dapat menjadi satu indikator terjadinya peradangan. Ekspresinya dilihat pada jaringan jantung tikus Sprague-Dawley menggunakan metode immunofluoresensi dengan *confocal laser scanning microscopy* (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) dan kemudian dikuantifikasi menggunakan piranti lunak *Olympus Fluo-View Software* (version 1.7A; Olympus Corporation)
- e. Ekspresi interleukin-6 (IL-6) pada jantung tikus Sprague Dawley adalah kadar sitokin pro-inflamasi yang dapat menjadi satu indikator terjadinya peradangan. Ekspresinya dilihat pada jaringan jantung tikus Sprague-Dawley menggunakan metode immunofluoresensi dengan *confocal laser scanning microscopy* (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) dan kemudian dikuantifikasi menggunakan piranti lunak *Olympus Fluo-View Software* (version 1.7A; Olympus Corporation)

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perawatan Hewan Coba

Botol air minum, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat

dari kawat dan sekam di dalamnya. Setiap perlakuan yang terdiri dari 4 hewan dengan satu tikus satu kandang standart

2. Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

Diet normal (ND) diberikan selama masa aklimasi untuk semua kelompok dan untuk kelompok kontrol negatif selama masa pengamatan. Diet normal yang digunakan adalah pakan yang direkomendasikan oleh *American Institute of Nutrition* (AIN)-93 dengan kandungan air, tepung jagung, kasein, vitamin, mineral, kolin dan gelatin.

ND mengandung total energi Kalori (kcal/gram) sebesar 3,43 (karbohidrat 67 %, protein 21% dan lemak 12 %), sedangkan HFD mengandung total energi Kalori sebesar 5,29 (40 % lemak, 35 % karbohidrat dan 25% protein).

3. Pembuatan Ransum Pakan Aterogenik (*High Fat Diet*)

Pakan aterogenik (HFD) diberikan untuk kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan DMT2 yang diberikan darapladib selama masa pengamatan. Komposisi gizi HFD ini mengadaptasi formula yang digunakan oleh Srinivasan, *et al.* (2005) dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 4.1 Komposisi HFD

Kandungan	Diet (gram/kg)
Tepung diet standar	365
Lemak babi	310
Kolesterol	10
Kasein	250
Campuran vitamin dan mineral	60
Asam kolat	3
Tepung ragi	1
Garam (Natrium klorida)	1

Tiap kilogram campuran vitamin dan mineral mengandung Vitamin A 2000000 IU, Vitamin D3 400000 IU, Vitamin B2 0.8 gram, Vitamin E 300

unit, Vitamin K 0,4 gram, Kalsium pantotenat 1 gram, Nikotinamid 4 gram, Vitamin B12 2,4 gram, Kolin klorida 60 gram, Kalsium 300 gram, Mangan 2,75 gram, Iodium 0,1 gram, Besi 3 gram, Seng 6 gram, Tembaga 0,8 gram dan Kobalt 0,18 gram. Pakan diberikan tiap hari sebesar 26 gram

4. Darapladib

Darapladib didapatkan dari GlaxoSmithKline dalam bentuk bubuk.

Darapladib diberikan pada hewan coba peroral dengan dosis 20mg/kg berat badan tikus

5. Pembedahan tikus

- a. Alat : Gunting bedah, steroform 2, pinset 2, kapas, jarum pentul 2 set
- b. Bahan : Eter, Parafin, Formalin 10% 500 ml, Alkohol 100%, 96%, 85%, 70%, 50%, Xylol, wadah plastic + tutup 20 buah.

6. Pemeriksaan ekspresi IL-1 β dan IL-6 jantung tikus dengan metode immunofluoresensi

- a. Alat : Coverslip, glass slide, CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*)
- b. Bahan : PHEMO buffer (Pipes 0,068 M, HEPES 0,0025 M, EGTA 0,005M, MgCl 0,003 M, 10 % DMSO, PH 6,8), formaldehid, glutaryldehid, triton x-100, 10% goat serum/PBS, antibodi terhadap IL-1 β dan IL-6

4.6 Prosedur Kerja Penelitian

Dalam pelaksanaannya peneliti dibantu oleh 2 orang staf Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya dan 9 orang mahasiswa FKUB yang bertugas memelihara, memberi pakan, menjaga sanitasi dan higienitas perkandangan

serta mengawasi kebugaran dan kesehatan tikus. Untuk uji laboratorium dibantu oleh 6 orang staf Laboratorium Biosains dan 2 orang staf LSIH-UB serta 4 orang staf Departemen PA FKUB Malang.

4.6.1 Fase Persiapan

Fase ini merupakan masa penyesuaian yang lamanya 1 minggu, ditujukan agar tikus menjadi terbiasa dengan lingkungan baru, sehingga siap untuk diteliti. Pada periode ini seluruh hewan coba diberikan ND. Pakan diberikan sekali dalam sehari kemudian diganti pada hari berikutnya. Pakan memiliki berat masing-masing 26 gram, Sisa pakan diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari. Setelah dilakukan aklimatisasi, dilanjutkan ke tahap randomisasi tikus untuk dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok perlakuan.

4.6.2 Fase Perlakuan

Tikus dibagi menjadi kelompok-kelompok yang telah ditentukan sebelumnya. Terdapat 6 kelompok yang dibagi menjadi 2 kelompok kontrol negatif (Normal/N8 dan N16), 2 kelompok kontrol positif (Diabetes mellitus/DM8 dan DM16) dan 2 kelompok perlakuan yang diberikan darapladib (Diabetes mellitus + Darapladib/DMDP8 dan DMDP16). Kelompok kontrol negatif diberikan diet normal sedangkan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan diberikan HFD dan STZ. Pada fase ini dilakukan penimbangan berat badan menggunakan timbangan analitik dengan tingkat ketelitian 0,01 kg. Berat badan tikus dinyatakan dalam gram. Asupan makan tikus adalah selisih antara berat pakan sebelum dan sesudah dimakan yang dinyatakan sebagai asupan harian. Asupan harian kemudian dikonversikan menjadi nilai gizi yaitu kalori, protein, lemak dan karbohidrat.

4.6.2.1 Pembuatan Hewan Coba Model DMT2

Kelompok kontrol positif dan kelompok darapladib, diberikan injeksi streptozotocin (STZ) intraperitoneal dengan dosis rendah 30 mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD. Hal ini didasarkan pada studi literatur menunjukkan bahwa injeksi streptozotocin setelah pemberian HFD selama 4 minggu dapat menginduksi terjadinya sindroma resistensi insulin pada tikus, yang ditandai dengan peningkatan berat badan (obesitas), hiperglikemia ringan, hipertrigliserimia, hiperkolesterolemia, dan hiperinsulinemia kompensatorik, suatu kondisi yang menyerupai kondisi prediabetik pada manusia; sementara injeksi STZ dosis rendah akan merusak sel beta pankreas, dan berakibat pada terjadinya resistensi insulin, yang menyerupai kondisi DMT2 pada manusia (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005). Penelitian oleh Srinivasan, *et al.* (2005) menyebutkan bahwa dosis optimum injeksi STZ untuk menginduksi terjadinya DMT2 adalah dengan dosis 30mg/kgBB.

Tujuh hari setelah injeksi STZ, dilanjutkan dengan pengecekan glukosa darah untuk memastikan telah terjadi hiperglikemia pada tikus. Tikus yang mengalami hiperglikemia, yang ditandai dengan kadar glukosa darah puasa 7.5 mmol/L (~135 mg/dL) atau acak 10.4 mmol/L (~208 mg/dL) (Wang *et al.*, 2010) dapat dikategorikan menjadi tikus DM. Apabila tikus tidak mengalami hiperglikemia 7 hari setelah penyuntikan STZ, maka STZ dapat diberikan lagi melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis

sama, kemudian kadar gula darah diukur kembali 7 hari setelah penyuntikan.

4.6.2.2 Prosedur Pemberian Darapladib

Setelah pemberian HFD selama 8 minggu dan pemberian injeksi STZ, kelompok perlakuan diberikan darapladib peroral dengan dosis 20 mg/kgBB perhari selama serial waktu yang telah ditentukan. Dosis darapladib pada penelitian ini didasarkan pada penelitian pendahuluan yang membandingkan berbagai dosis darapladib (10mg/kgBB, 20mg/kgBB, 40mg/kgBB) pada tikus *Sprague-dawley* dan didapatkan hasil pada dosis 20mg/kgBB terjadi penurunan signifikan level Lp-PLA2 baik dalam level mRNA maupun protein (Heriansyah, Wihastuti, et al., 2016)

4.6.2.3 Prosedur Pembedahan Tikus

Pada akhir fase perlakuan dilakukan eutanasia dengan cara dibius dengan injeksi ketamin intraperitoneal dengan dosis 15-20 mg/kg, kemudian dilakukan pembedahan tikus. Pembiusan dan pembedahan dilakukan oleh peneliti dan staf laboratorium. Darah diambil dari jantung, kemudian ditempatkan pada venojec. Untuk mendapatkan plasma sampel darah disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Plasma yang diperoleh akan dipakai untuk pemeriksaan kadar insulin.

Jaringan jantung dipotong dan dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sisa bekuan darah, kemudian diambil 1/3 bagian untuk dimasukkan dalam botol flakon dan disimpan pada suhu -20 °C guna pembuatan sediaan *paraffin block* untuk pemeriksaan *immunoflouresence*.

4.7 Uji Laboratorium

4.7.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran glukosa darah puasa dilakukan dengan metode enzimatik, setelah tikus dipuasakan selama 16 jam. Pengukuran kadar glukosa puasa pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dilakukan setelah 4 minggu pemberian HFD sebelum diinjeksikan STZ dosis rendah, 7 hari setelah injeksi STZ dan di akhir masa perlakuan sebelum eutanasia. Pengukuran glukosa darah puasa khusus tikus kelompok kontrol negatif dilakukan bersamaan dengan waktu pengukuran tikus DMT2 yaitu sesaat sebelum pemberian STZ dan di akhir masa pengamatan untuk memperoleh kadar glukosa darah dasar (*baseline value*). Pemeriksaan dilakukan dengan mengambil sampel darah dari ujung ekor tikus (vena lateralis). Pengukuran kadar gula darah menggunakan glukometer (GlucoDr Co.Ltd.Korea). Satuan skala pengukuran yang terbaca mg/dL dan dikonversi menjadi mmol/L.

4.7.2 Pengukuran Kadar Insulin Plasma dan Resistensi Insulin

Pengukuran kadar insulin dilakukan untuk mengkonfirmasi terjadinya hiperinsulinemia dan menghitung formula resistensi insulin pada kelompok DMT2 dan untuk menentukan kadar dasar (*baseline value*) insulin pada kelompok kontrol negatif. Pengukuran kadar insulin dilakukan pada akhir periode pengamatan. Pengukuran menggunakan metode *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA), memanfaatkan prinsip ikatan spesifik antigen-antibodi. Langkah pertama, antibodi monoklonal yang spesifik terhadap insulin tikus dimobilisasi ke 96 dasar sumur piringan mikro. Selanjutnya larutan standar, kontrol dan sampel bersama antibodi monoklonal konjugat enzim *horseradish peroxidase* dituangkan ke dalam sumur-sumur

tersebut untuk membentuk lapisan dengan antibodi konjugat. Intensitas warna yang terbentuk, berupa *optical density* (OD) dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm dan hasilnya secara proporsional menunjukkan kadar insulin yang terkandung di dalam sampel. Satuan skala pengukuran yang didapatkan adalah ng/dL dan dikonversi menjadi $\mu\text{U/mL}$ menggunakan formula WHO dengan membagi hasilnya dengan 0.0347 (1 IU sebanding dengan 0.0347 mg/L (Heriansyah, Adam, et al., 2017). Pengukuran resistensi insulin dapat dilakukan menggunakan formulasi HOMA-IR (*Homeostatic model assessment-insulin resistance*) yang dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh van Dijk, et al. (2013) yang mengukur model resistensi insulin pada tikus. Formulasi ini membutuhkan darah dari glukosa darah puasa dan kadar insulin plasma dengan menggunakan formula berikut:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{FBS} \times \text{FINS}}{14.1}$$

HOMA-IR : *Homeostatis Model Assessment-Insulin Resistance*

FBS : *Fasting Blood Glucose/gula darah puasa* (mmol/L)

FINS : *Fasting Insulin Plasma/insulin plasma puasa* ($\mu\text{U/mL}$)

14.1 : faktor pembagi

Interpretasi dari HOMA-IR, apabila hasilnya >1.716 maka dapat dikategorikan sebagai resistensi insulin dengan sensitivitas 83.87% dan spesifisitas 80.56% (van Dijk et al., 2013; Heriansyah, Andri, et al., 2017)

4.7.3 Pemeriksaan Kadar IL-1 β Jantung

Pemeriksaan kadar IL-1 β dari jaringan jantung diukur menggunakan teknik immunofluorosensi. Jaringan jantung difiksasi menggunakan *PHEMO buffer* (68mM PIPES, 25 mM, HEPES, pH 6.9, 15 mMEGTA,

3 mM $MgCl_2$, 10% [v/v] *dimethyl sulfoxide* yang mengandung 3.7% *formaldehyde*, dan 0.05% *glutaraldehyde*) dan diproses menggunakan label immunofluoresensi antibodi *anti-rat IL-1 β* menggunakan antibody sekunder rhodamin (BIOS Inc. Boston, M.A., USA) dan prosedurnya sesuai petunjuk pada kit yang dipakai. Parameter ini diobservasi dengan mikroskop konfokal laser (Olympus Corp., Tokyo, Japan) dan dianalisis secara kuantitatif menggunakan perangkat lunak *Olympus FluoView* (versi 1.7A; Olympus corp.)

4.7.4 Pemeriksaan Kadar IL-6 Jantung

Pemeriksaan kadar IL-6 dari jaringan jantung diukur menggunakan teknik immunofluoresensi. Jaringan jantung difiksasi menggunakan *PHEMO buffer* (68mM PIPES, 25 mM, HEPES, pH 6.9, 15 mMEGTA, 3 mM $MgCl_2$, 10% [v/v] *dimethyl sulfoxide* yang mengandung 3.7% *formaldehyde*, dan 0.05% *glutaraldehyde*) dan diproses menggunakan label immunofluoresensi antibodi *anti-rat IL-6* menggunakan antibody sekunder FITC (Santacruz, USA) dan prosedurnya sesuai petunjuk pada kit yang dipakai. Parameter ini diobservasi dengan mikroskop konfokal laser (Olympus Corp., Tokyo, Japan) dan dianalisis secara kuantitatif menggunakan perangkat lunak *Olympus FluoView* (versi 1.7A; Olympus corp.)

4.8 Prosedur Penelitian

1. Dipilih 30 tikus Sprague Dawley berumur 6-8 minggu dengan berat 150 – 200 gram
2. Masing-masing tikus ditempatkan dalam kandang berukuran 40 x 30 x 20 cm beserta perlengkapan tempat makan dan minumannya. Kandang terbuat dari *fiber glass*, dilengkapi dengan pengatur suhu dan kelembapan digital.
3. Tikus diadaptasi selama 1 minggu dengan diberikan pakan standard dan diberi minum *ad libitum*. Diet diberikan sebanyak 26g/ekor tikus/hari, sisa pakan diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari
4. Setelah adaptasi, tikus dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok berisi 5 ekor tikus
 - a. Kelompok 1: diberi pakan standar selama 8 minggu.
 - b. Kelompok 2: diberi pakan standar selama 16 minggu.
 - c. Kelompok 3: diberi HFD selama 8 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD.
 - d. Kelompok 4: diberi HFD selama 16 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD.
 - e. Kelompok 5: diberi HFD selama 8 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD, ditambahkan pemberian darapladib per oral dosis 20mg/kgBB selama 8 minggu.
 - f. Kelompok 6: diberi HFD selama 16 minggu dan injeksi STZ intraperitoneal dosis 30mg/kgBB setelah 4 minggu pemberian HFD, ditambahkan pemberian darapladib per oral dosis 20mg/kgBB selama 16 minggu.

Penimbangan berat badan dilakukan menggunakan timbangan analitik dengan tingkat ketelitian 0.01kg. Berat tikus dinyatakan dalam gram.

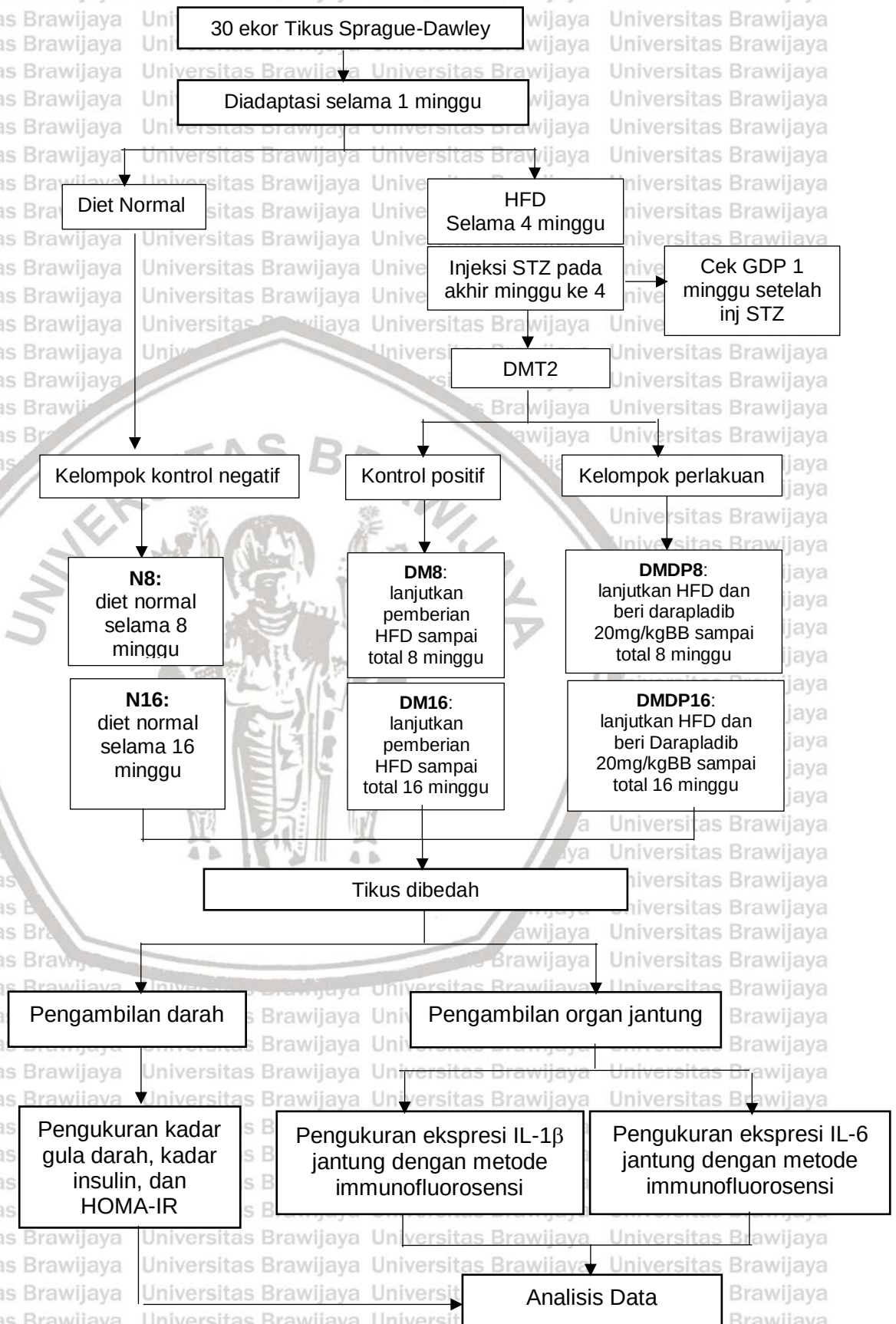
5. Pada akhir perlakuan, tikus kemudian dianestesi kemudian dibedah dan dilakukan pengambilan darah intrakardial serta dilakukan pengambilan jaringan jantung tikus

6. Setelah prosedur pembedahan selesai, dilakukan penguburan tikus pada tempat yang telah disediakan.

4.9 Analisis Data

Glukosa darah, resistensi insulin, HOMA-IR, ekspresi IL-1 β dan IL-6 dicatat dan dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk menentukan normalitas dari data. Data kemudian dianalisis menggunakan uji *one-way* ANOVA untuk menentukan efek administrasi Darapladib pada ekspresi IL-1 β dan IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley. Analisis ini kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan metode Duncan untuk mendeteksi perbedaan parameter pada tiap kelompok perlakuan. Seluruh analisis diatas dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS statistik versi 21, dan $p < 0.05$ dianggap sebagai hasil yang signifikan secara statistik

4.10 Alur penelitian





BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian penyekat selektif Lp-PLA₂ (darapladib) terhadap ekspresi sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1 β dan IL-6 pada jaringan jantung Tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). Hasil pada penelitian ini diekspresikan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi. Berikut ini merupakan data asupan pakan, perubahan berat badan, kadar glukosa darah, kadar insulin plasma, resistensi insulin yang diukur menggunakan formulasi HOMA-IR, serta ekspresi IL-1 β dan IL-6 pada jaringan jantung Tikus Sprague-Dawley model DMT2.

5.1 Data Asupan Pakan dan Perubahan Berat Badan

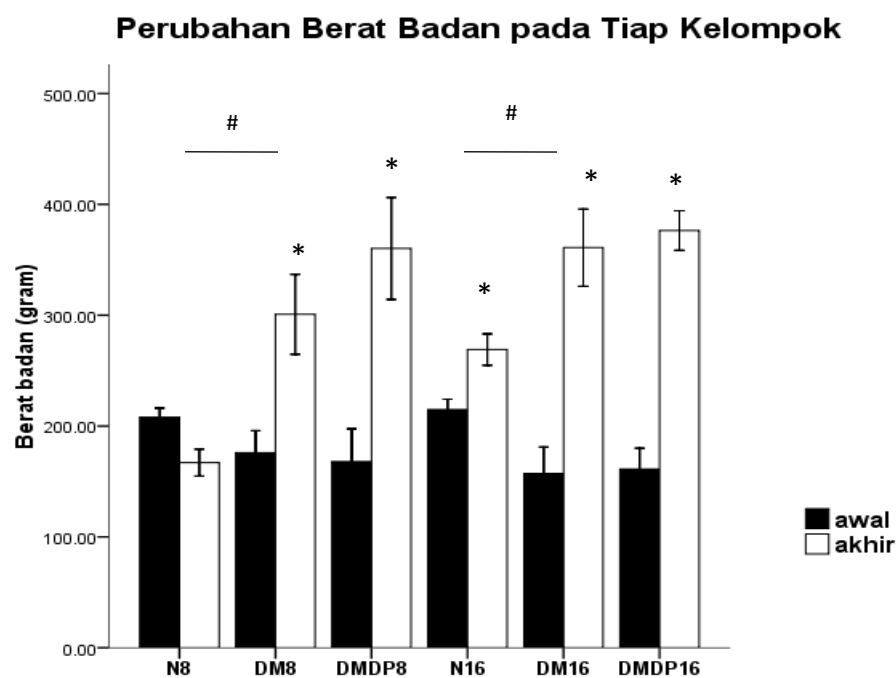
Rata-rata asupan pakan tiap kelompok per hari dan perubahan berat badan tikus dipaparkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.1. Berat badan awal diukur pada minggu pertama setelah masa aklimatisasi, sedangkan berat badan akhir didapatkan sebelum tikus dibedah, pada akhir minggu ke 8 atau minggu ke 16.

Tabel 5.1 Rata-rata asupan pakan/hari dan perubahan berat badan pada tiap kelompok

Kelompok Perlakuan	Pakan/hari (Gram)	Berat Badan (Gram)		
	Rata-rata $\pm$ SD	Awal	Akhir	% Perubahan BB
N8	18.75 $\pm$ 3.83	208 $\pm$ 9.19	167 $\pm$ 13.55	-19.73 $\pm$ 5.35 ^a
DM8	23.30 $\pm$ 1.12	176 $\pm$ 22.11	300.8 $\pm$ 40.35	+70.98 $\pm$ 10.93 ^b
DMDP8	23.03 $\pm$ 1.98	168 $\pm$ 33.01	360.2 $\pm$ 51.47	+117.79 $\pm$ 35.15 ^b
N16	21.13 $\pm$ 5.62	215 $\pm$ 10.36	269 $\pm$ 15.86	+25.19 $\pm$ 6.51 ^d
DM16	23.54 $\pm$ 1.67	157.2 $\pm$ 26.82	361 $\pm$ 38.97	+134.63 $\pm$ 42.12 ^e
DMDP16	24.05 $\pm$ 1.06	161.2 $\pm$ 21.06	376.4 $\pm$ 19.87	+135.82 $\pm$ 24.44 ^e

Keterangan: Rata-rata perubahan berat badan yang diikuti oleh notasi huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan secara signifikan antar dua kelompok (*Mann whitnet test* p=0.05)

Tabel 5.1 menunjukkan rata-rata asupan pakan tikus *Sprague Dawley* tiap kelompok dalam tiap bulannya. Kelompok yang memiliki rata-rata asupan pakan paling rendah adalah kelompok N8 yaitu 18.75 ± 3.83 gram/hari sedangkan kelompok dengan rata-rata asupan pakan paling tinggi adalah kelompok DM16 yaitu 24.05 ± 1.06 gram/hari.



Gambar 5.1 Grafik perubahan berat badan pada awal dan akhir perlakuan pada tiap kelompok. Uji paired T-test menunjukkan signifikansi berat badan akhir perlakuan dibandingkan dengan awal aklimatisasi, tanda (*) menunjukkan $p < 0.05$. *Mann whitney test* menunjukkan signifikansi perubahan berat badan pada masing-masing kelompok, #: $p < 0.05$.

Gambar 5.1 menggambarkan analisis statistik menggunakan *paired t-test* yang menunjukkan bahwa terdapat penurunan berat badan sekitar 19% ($p < 0.05$) pada kelompok normal 8 minggu sedangkan pada kelompok normal 16 minggu terjadi peningkatan berat badan signifikan sebesar 25% ($p < 0.05$). Sedangkan pada kelompok DM menunjukkan adanya peningkatan berat badan yang signifikan sebesar 70% ($p < 0.05$) pada kelompok DM8 minggu dan 134% ($p < 0.05$) pada kelompok 16 minggu. Pada kelompok DMDP

menunjukkan adanya peningkatan berat badan yang signifikan sebesar 117% ($p < 0.05$) pada kelompok DMDP8 dan 135% ($p < 0.05$) pada kelompok DMDP16 minggu. Peningkatan berat badan paling besar ditunjukkan oleh kelompok DMDP16 yaitu sebesar 135% sedangkan paling kecil ditunjukkan oleh kelompok N16 yaitu 25%.

Analisis statistik menggunakan *mann whitney test* yang menunjukkan adanya perubahan berat badan yang signifikan pada kelompok DM8 dibandingkan dengan kelompok N8 ($p < 0.05$) tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna antara peningkatan berat badan pada kelompok DMDP8 dibandingkan dengan DM8 ($p > 0.05$). Pola yang sama ditunjukkan pada kelompok 16 minggu, dimana terdapat peningkatan berat badan yang signifikan pada kelompok DM16 dibandingkan dengan kelompok N16 ($p < 0.05$) tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna antara peningkatan berat badan pada kelompok DMDP16 dibandingkan dengan DM16 ($p > 0.05$) (gambar 5.1).

Peningkatan berat badan pada kelompok tikus yang diberi pakan HFD berbeda signifikan dengan peningkatan berat badan yang terjadi pada tikus yang diberikan pakan normal, dimana pada kelompok normal hanya terjadi peningkatan berat badan sekitar 25% sedangkan pada kelompok yang diberikan pakan HFD mengalami peningkatan berat badan sekitar 70-115%.

5.2 Pengukuran Kadar Glukosa Puasa, Kadar Insulin dan Resistensi Insulin

Untuk mengetahui keberhasilan dalam proses pembuatan tikus model DMT2 maka dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa dan kadar insulin. Kemudian dilakukan penghitungan resistensi insulin dengan menggunakan rumus *homeostatic model assessment-insulin resistance* (HOMA-IR) pada tikus. Resistensi insulin bisa ditegakkan bila nilai HOMA-IR

>1.716. Hasil pengukuran kadar glukosa darah puasa, kadar insulin dan resistensi insulin dapat dilihat pada tabel 5.2 dan 5.3 dan gambar 5.2. Tabel 5.2 memperlihatkan kadar rata-rata glukosa darah puasa, kadar insulin plasma dan resistensi insulin pada minggu ke 5, 1 minggu setelah penyuntikan STZ dosis rendah dan dipastikan tikus mengalami hiperglikemia dan hyperinsulinemia. Tabel 5.3 memperlihatkan kadar rata-rata glukosa darah puasa, insulin dan HOMA-IR di akhir minggu ke 8 atau ke 16 sebelum tikus dibedah.

Tabel 5.2 Rata-Rata Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin dan Resistensi Insulin pada Tiap Kelompok, pada Minggu Ke 5, Sebelum Pemberian Darapladib

Kelompok	Gula Darah Mmol/L)	Insulin Plasma (μU/mL)	HOMA-IR	Interpretasi
N8	7.33	1.23	0.641	N
DM8	8.27	3.41	2.001	R
DMDP8	13.912	1.77	1.747	R
N16	5.9	1.52	0.638	N
DM16	7.87	11.57	6.458	R
DMDP16	18.42	2.34	3.061	R

N: normal, R: resistensi insulin.

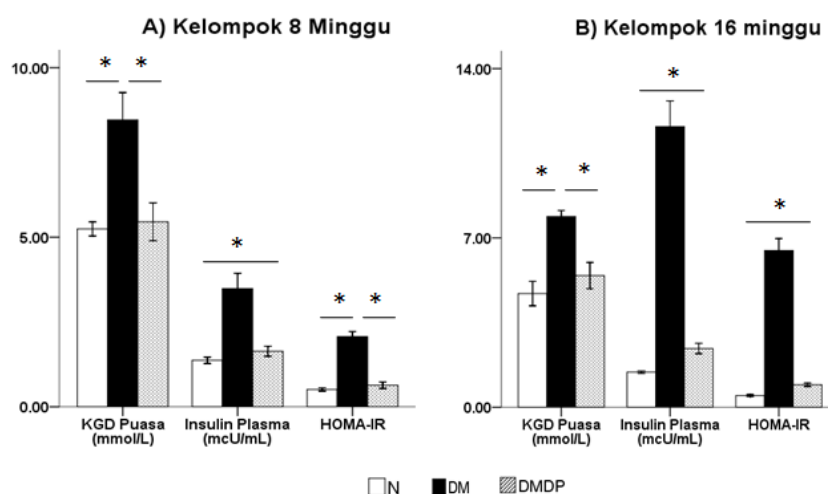
Tabel 5.3 Rata-rata Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin dan Resistensi Insulin pada Tiap Kelompok di Akhir Perlakuan

Kelompok	Gula Darah Mmol/L) (mean±SD)	Insulin Plasma (μU/mL) (Mean±SD)	HOMA-IR (Mean±SD)	Interpretasi
N8	5.24 ± 0.23 ^a	1.37 ± 0.11 ¹	0.51 ± 0.05 ^u	N
DM8	8.46 ± 0.91 ^b	3.48 ± 0.50 ²	2.07 ± 0.16 ^v	R
DMDP8	5.46 ± 0.63 ^a	1.64 ± 0.16 ³	0.64 ± 0.11 ^u	N
N16	4.7 ± 0.56 ^a	1.45 ± 0.06 ¹	0.48 ± 0.05 ^u	N
DM16	7.89 ± 0.28 ^b	11.60 ± 1.19 ⁴	6.48 ± 0.55 ^w	R
DMDP16	5.44 ± 0.60 ^a	2.43 ± 0.24 ⁵	0.93 ± 0.08 ^x	N

Keterangan: Rata-rata kadar glukosa darah puasa, insulin plasma dan HOMA-IR yang diikuti oleh notasi huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan secara signifikan antar dua kelompok (*Mann-whitney test* p=0.05). N: normal, R: resistensi insulin.

Analisis statistik uji normalitas *Saphiro-Wilk* data kadar glukosa darah puasa, insulin plasma dan HOMA-IR diperoleh hasil sebaran data tidak normal ($p < 0.05$) dan uji homogenitas *Levene's Test* menunjukkan sebaran data tidak homogen ($p < 0.05$). Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai $p < 0.05$ yang berarti terdapat perbedaan antara kadar glukosa darah puasa, insulin plasma dan HOMA-IR yang bermakna pada tiap kelompok perlakuan.

Kadar Glukosa Darah Puasa, Kadar Insulin dan HOMA-IR



Gambar 5.2 Grafik Kadar glukosa darah puasa, kadar insulin dan HOMA-IR pada tiap kelompok: (a) 8 minggu, (b) 16 minggu. * menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok dengan $p < 0.05$ (*Mann-Whitney test* $p=0.05$)

Berdasarkan uji analisa *mann-whitney* pada tiap kelompok didapatkan bahwa kelompok DM, baik DM8 maupun DM16 memiliki kadar glukosa darah puasa dan insulin plasma yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok normal ($p < 0.05$). Sedangkan pada kelompok DMDP baik DMDP8 maupun DMDP16 memiliki kadar glukosa darah puasa dan insulin plasma yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok DM ($p < 0.05$).

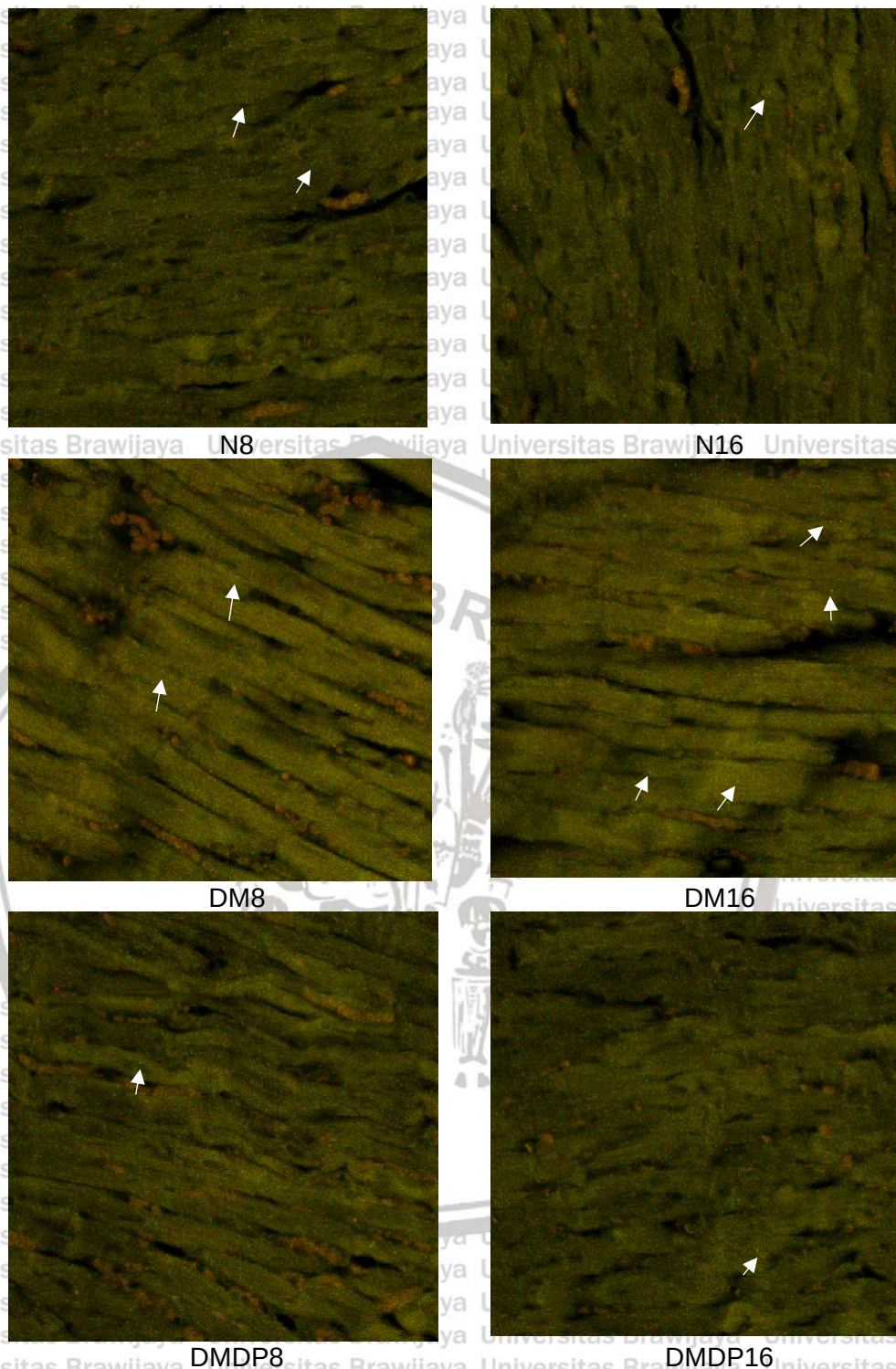
Berdasarkan hasil perhitungan resistensi insulin menggunakan rumus HOMA-IR pada tabel 5.3 dapat dilihat bahwa pada kelompok DM, baik DM8

maupun DM16 sama-sama mengalami resistensi insulin dengan nilai HOMA IR > 1,716 sedangkan pada kelompok DMDP, baik DMDP8 maupun DMDP16 tidak terjadi resistensi insulin dengan nilai HOMA IR < 1,716. Kelompok DM8 dan DM16 memiliki nilai HOMA-IR yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok normal ($p < 0.05$). Sedangkan kelompok DMDP8 dan DMDP16 memiliki nilai HOMA-IR yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan kelompok DM ($p < 0.05$).

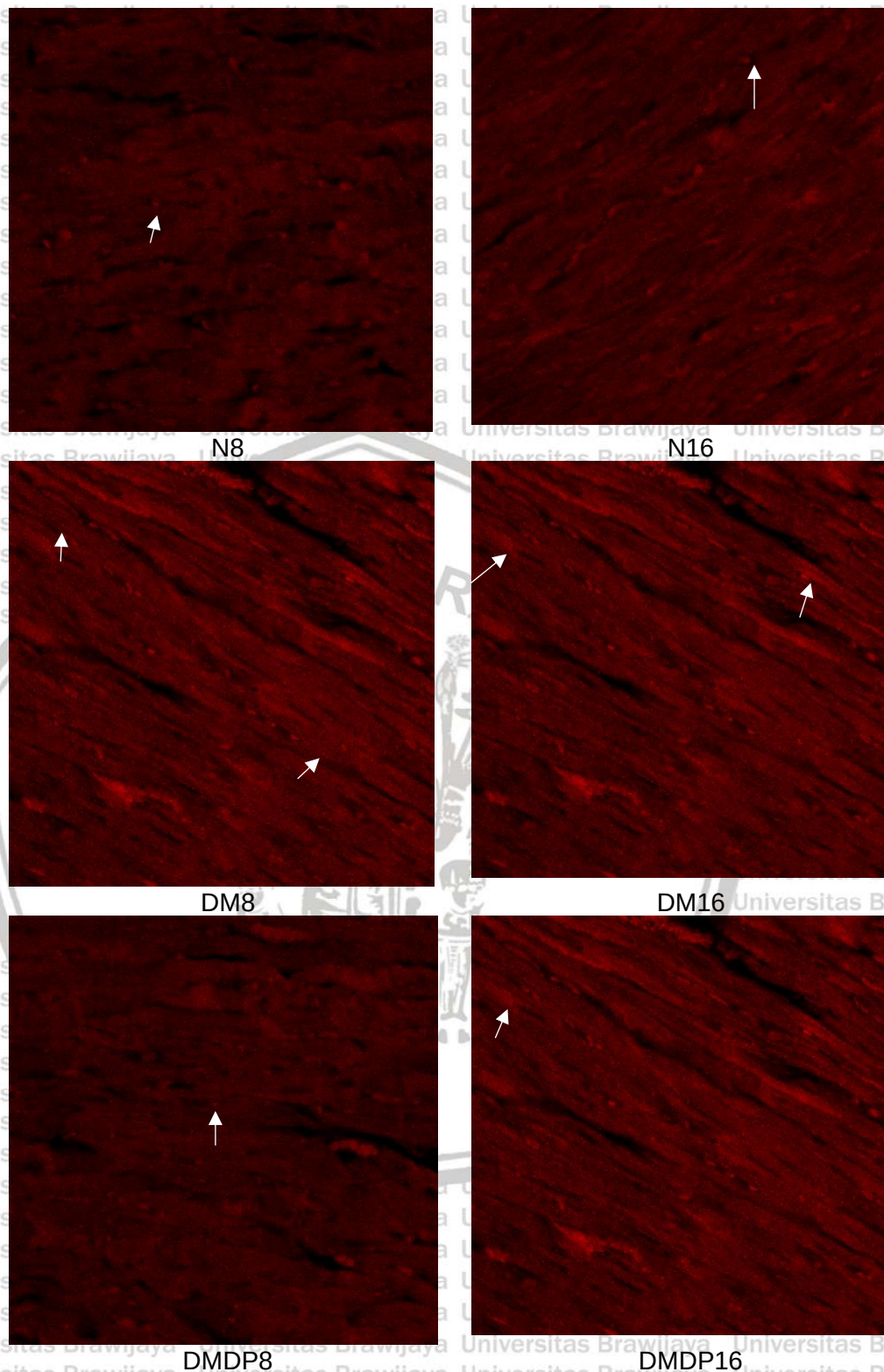
5.3 Analisis Immunofluorescence

Hasil pengecatan *immunofluorescence* yang diamati menggunakan *confocal laser scanning microscope* dapat dilihat pada gambar 5.3 dan gambar 5.5. Pengamatan ekspresi IL-1 β dilakukan dengan menggunakan antibodi sekunder FITC sehingga pendaran berwarna hijau menunjukkan ekspresi aktivasi IL-1 β yang berada di dalam miosit dan pada ruang interstitiel diantara miosit. Sedangkan pengamatan ekspresi IL-6 menggunakan antibodi sekunder rhodamin yang memberikan pendaran berwarna merah.

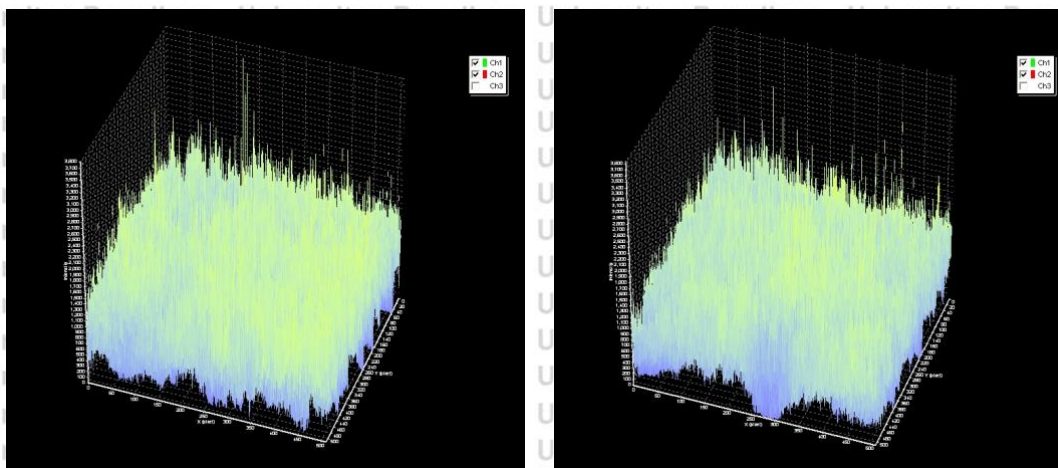
Hasil *Immunofluorescence staining* dikuantifikasi menggunakan *Olympus FluoViewSoftware* (Ver. 1.7A; Olympus Corporation) dan rata-rata masing-masing parameter tiap kelompok yang dapat dilihat pada tabel 5.4 dan gambar 5.6.



Gambar 5.3 Hasil pengecatan Immunofluorescence yang menunjukkan ekspresi IL-1 β pada jantung tikus Sprague-Dawley berbagai kelompok perlakuan (perbesaran 400x). Keterangan: Ekspresi IL-1 β ditunjukkan oleh pendaran berwarna hijau (tanda panah putih). N adalah kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang diberikan diet normal. DM adalah kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diberi HFD-STZ. DMDP adalah kelompok perlakuan yaitu tikus yang diberi HFD-STZ dan darapladib. 8 dan 16 menunjukkan serial waktu perlakuan.



Gambar 5.4 Hasil pengecatan Immunofluorescence yang menunjukkan ekspresi IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley berbagai kelompok perlakuan (perbesaran 400x). Keterangan: Ekspresi IL-6 ditunjukkan oleh pendaran berwarna merah (tanda panah putih). N adalah kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang diberikan diet normal. DM adalah kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diberi HFD-STZ. DMDP adalah kelompok perlakuan yaitu tikus yang diberi HFD-STZ dan dapladiol. 8 dan 16 menunjukkan serial waktu perlakuan.



Gambar 5.5 Hasil analisis pengecatan immunofluoresensi yang menunjukkan ekspresi IL-1β dan IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley menggunakan *software Fluoview v.1.7.A*

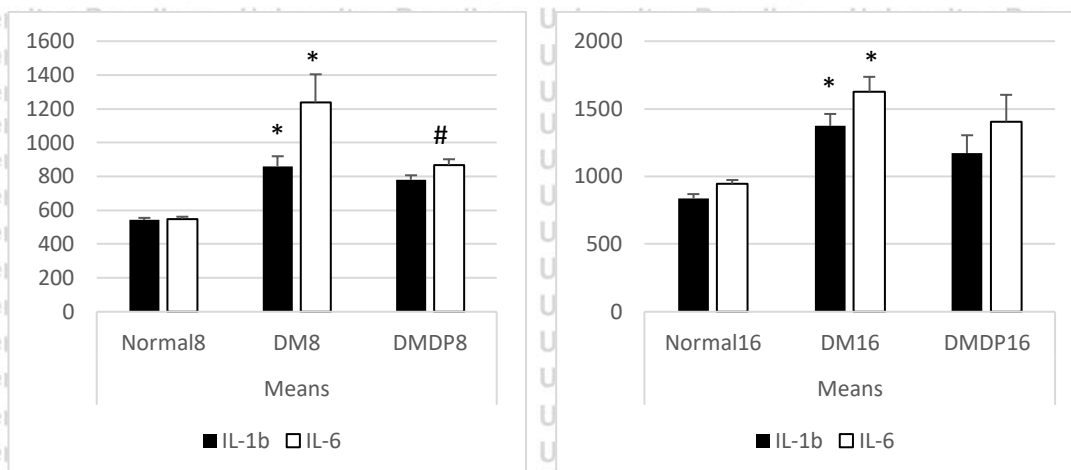
Keterangan: Yang terlihat pada gambar adalah grafik rata-rata intensitas pada *Regio of Interes* (kiri) kelompok Normal (kanan) Kelompok DM

Tabel 5.4 Rata-rata ekspresi IL-1β dan IL-6 jantung

Variabel	Kelompok (n=5)	8 minggu	16 minggu
		Rata-rata ± SD	Rata-rata ± SD
IL-1β (pg/mL)	N	542.35 ± 28.92 ^a	838.71 ± 69.35 ^a
	DM	859.93 ± 133.62 ^b	1373.74 ± 197.96 ^b
	DMDP	780.51 ± 59.28 ^b	1173.86 ± 292.44 ^b
IL-6 (pg/mL)	N	549.50 ± 28.92 ¹	946.52 ± 61.79 ¹
	DM	1237.91 ± 372.06 ²	1627.52 ± 243.84 ²
	DMDP	867.83 ± 76.18 ³	1406.52 ± 440.62 ²

Keterangan: Rata-rata nilai sitokin yang diikuti oleh notasi huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan secara signifikan antar dua kelompok (Anova dan *Post Hoc Duncan* multiple range test p=0.05)

Berdasarkan uji normalitas menggunakan uji *saphiro wilk* didapatkan sebaran data normal dengan nilai p = 0.402 untuk parameter IL-1β dan p = 0.020 untuk parameter IL-6 (p > 0.05). Dari hasil uji ANOVA diperoleh nilai p = 0.000 dan p = 0.001 untuk parameter IL-1β dan IL-6 (p < 0.05) sehingga dapat disimpulkan bahwa “terdapat sedikitnya dua kelompok data yang mempunyai perbedaan ekspresi IL-1β dan IL-6 secara bermakna”. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.



Gambar 5.6 Grafik rata-rata IL-1 β dan IL-6 pada Jantung Tikus Sprague Dawley Model Diabetes Mellitus tipe 2. (Grafik kiri) waktu perlakuan 8 minggu. Tanda * menunjukkan signifikansi jika dibandingkan dengan kelompok Normal, tanda # menunjukkan signifikansi jika dibandingkan dengan kelompok DM. (Grafik kanan) Tanda * menunjukkan signifikansi jika dibandingkan dengan kelompok Normal

Pada kelompok perlakuan 8 minggu, didapatkan hasil yang signifikan dari efek Darapladib terhadap ekspresi IL-1 β dengan $p < 0.05$ untuk ketiga kelompok [$F(2,12) = 18.45, p = 0.000$]; dan juga terdapat efek yang signifikan dari pemberian Darapladib terhadap ekspresi IL-6 jantung tikus untuk tiga kelompok perlakuan [$F(2,12) = 12.28, p = 0.001$]. Karena ditemukan hasil yang secara statistik signifikan, maka perlu dilakukan uji *Post Hoc*. Uji *Post Hoc* menggunakan metode Duncan mengindikasikan bahwa nilai rata-rata dari ekspresi IL-1 β pada kelompok N8 ($M = 542.35, SD = 28.92$) secara signifikan berbeda dengan ekspresi IL- β pada kelompok DM8 ($M = 859.93, SD = 133.62$). Tetapi ekspresi IL-1 β pada kelompok DM8P8 ($M = 780.51, SD = 59.28$) tidak berbeda secara signifikan dari kelompok DM8.

Sementara nilai rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok N8 ($M = 549.50, SD = 28.92$) berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan ekspresi IL-6 pada kelompok DM8 ($M = 1237.91, SD = 372.06$), begitu juga ekspresi IL-6 pada kelompok DM8P8 ($M = 867.83, SD = 76.18$) juga berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan ekspresi IL-6 pada kelompok DM.

Untuk kelompok perlakuan 16 minggu, terdapat nilai signifikan dari efek pemberian Darapladib terhadap ekspresi IL- β pada jantung tikus di 3 kelompok, dengan nilai $p < 0.05$ [$F(2,12) = 8.47$, $p = 0.005$]; dan juga terdapat nilai yang signifikan dari pemberian Darapladib terhadap ekspresi IL-6 pada ketiga kelompok [$F(2,12) = 7.03$, $p = 0.010$]. Uji komparasi *Post Hoc* menggunakan metode Duncan mengindikasikan bahwa nilai rata-rata dari ekspresi IL-1 β pada kelompok N16 ($M = 838.71$, $SD = 69.35$) berbeda secara signifikan terhadap ekspresi IL-1 β pada jantung tikus kelompok DM16 ($M = 1373.74$, $SD = 197.96$). Tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok DMDP16 ($M = 1173.86$, $SD = 292.44$) jika dibandingkan dengan kelompok DM16.

Ekspresi IL-6 pada kelompok N16 ($M = 946.52$, $SD = 61.79$) berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan ekspresi IL-6 pada kelompok DM16 ($M = 1627.52$, $SD = 243.84$). Tetapi ekspresi IL-6 pada kelompok DMDP16 ($M = 1406.52$, $SD = 440.62$) tidak berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok DM16.



BAB 6

PEMBAHASAN

Diabetes mellitus tipe 2 (*Type 2 Diabetes Mellitus-T2DM*) merupakan suatu kondisi pro-inflamasi dan dapat meningkatkan resiko terkena penyakit jantung koroner (Duncan *et al.*, 2003; Klover *et al.*, 2003; Kolb and Mandrup-Poulsen, 2005). Resistensi insulin, yang merupakan penanda dari diabetes mellitus tipe 2 juga merupakan resiko dari terjadinya gagal jantung, yang merupakan penyebab kematian utama pada diabetes mellitus tipe 2 (Palomer *et al.*, 2013).

Respon utama yang muncul pada jantung terhadap kondisi diabetes adalah stress oksidatif, inflamasi, disfungsi endotel, fibrosis kardial, hipertrofi dan apoptosis, dimana pada keseluruhannya terdapat peran dari *Nuclear Factor* (NF)- κ B. Inflamasi pada jantung adalah hal yang muncul dan terlihat pada awal respon terhadap diabetes dan secara aktif terlibat dalam perkembangan terjadinya gagal jantung pada kardiomiopati diabetik (Lorenzo, Picatoste and Ares-Carrasco, 2011). Beberapa sitokin pro-inflamasi yang diketahui meningkat kadarnya di sirkulasi pada pasien obesitas dan diabetes, adalah *Tumor Necrosis Factor/TNF- α* dan Interleukin-6 (IL-6), yang berperan dalam proses fisiologis yang berkaitan dengan obesitas dan resistensi insulin di dalam jantung (Gray and Kim, 2011).

Interleukin diperkirakan memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit yang mengenai otot jantung (Han *et al.*, 1991). Sitokin-sitokin ini mungkin sintesis dan dilepaskan secara lokal di dalam miokardium oleh limfosit dan makrofag (Francis *et al.*, 1998).

Penelitian oleh Han, *et al.* (1991) menemukan bahwa interleukin yang diekspresikan oleh sel-sel non-sirkulatorik (IL-1 β , IL-4 dan IL-8) ditemukan terdeteksi dalam sampel jaringan jantung manusia. Di dalam miokardium, IL-1 β mRNA dan proteinnya ditemukan di dalam sel-sel endothelial di dalam pembuluh darah kecil, di regio intersitiel diantara miosit dan di dalam miosit jantung itu sendiri. Hal ini mendukung teori bahwa produksi IL-1 β didalam miokardium dan arteri koronaria dapat merupakan faktor penting dalam terjadinya disfungsi miokard pada kardiomiopati dan kemungkinan kondisi lain dimana sel-sel inflamasi menginvasi jaringan jantung (Francis *et al.*, 1998).

Interleukin-6 (IL-6) diketahui juga merupakan penanda inflamasi. Peningkatan kadar IL-6 juga berperan dalam patogenesis resistensi insulin. Pada jantung, IL-6 menginduksi faktor transkripsi STAT1 dan STAT3, yang mentargetkan gen yang mengkode protein yang diaktivasi dibawah kondisi stress seperti misalnya pada infark miokard akut dan stimulus hipertrofi (Boengler *et al.*, 2008).

Lp-PLA2 menghidrolisis LDL teroksidasi (ox-LDL) menjadi lisofosfatidilkolin (LysoPC) dan mengoksidasi asam lemak (MacPhee *et al.*, 1999). LysoPC menginduksi sitokin-sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , IL-6 dan (TNF- α) (Carlquist, Muhlestein and Anderson, 2007). Proses inflamasi sendiri telah lama dikenal sebagai komponen penting dari patogenesis sindroma metabolik (Koh, Han and Quon, 2005) dan Lp-PLA2 telah dilaporkan berkorelasi dengan beberapa komponen dari sindroma metabolik (Ballantyne *et al.*, 2004; Persson *et al.*, 2007).

6.1 Pemberian HFD dan STZ dalam menginduksi DMT2

Pada penelitian ini digunakan komposisi pakan yang berbeda pada masing-masing kelompok untuk melihat efek pemberian HFD terhadap kondisi DMT2. Banyak penelitian yang menyatakan bahwa pada tikus yang diberikan pakan tinggi lemak (*high fat diet/HFD*) akan memicu terjadi kondisi resistensi insulin, tetapi tidak memicu kondisi hiperglikemia atau diabetes (Tanaka *et al.*, 2007; Flanagan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian pakan tinggi lemak dapat menginisiasi kondisi resistensi insulin yang merupakan ciri utama dari diabetes mellitus tipe 2.

Pada saat yang sama, streptozotolin (STZ) juga banyak digunakan untuk memproduksi model diabetes mellitus yang dependen insulin ataupun model non dependen insulin, dengan menginduksi kematian sel β melalui proses alkilasi DNA (Szkudelski, 2001). Pemberian STZ dosis rendah diketahui dapat menginduksi gangguan sekresi insulin ringan yang merupakan kondisi yang sama dengan diabetes mellitus tipe 2 (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005). Pemberian HFD dan STZ yang digunakan untuk memicu terjadinya DMT2 pada penelitian ini disebabkan beberapa penelitian menyebutkan bahwa pembuatan hewan coba dengan menggabungkan kedua metode tersebut dapat meniru kondisi alamiah dari karakter metabolisme pada DMT2 (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005), melalui beberapa mekanisme yaitu resistensi insulin, dislipidemia dan perlemakan organ (Skovsø *et al.*, 2015).

6.1.1 Pemberian HFD dan STZ dalam Menginduksi Peningkatan Berat Badan

Grafik 5.1 menunjukkan jumlah pakan per hari yang dikonsumsi oleh masing-masing kelompok tikus. Kelompok kontrol negatif

mengonsumsi jumlah pakan yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif maupun kelompok perlakuan. Hal ini berakibat pada turunnya berat badan tikus kelompok N8 pada akhir perlakuan dibandingkan berat di awal perlakuan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh masih perlunya adaptasi lebih lanjut untuk tikus kelompok 8 minggu, sedangkan kelompok 16 minggu sudah dapat beradaptasi dengan lingkungan dan pakannya.

Peningkatan berat badan pada pemberian pakan HFD selama 16 minggu berkisar antara 70% hingga 117% sedangkan pada pemberian pakan HFD selama 24 minggu terjadi peningkatan berat badan antara 134% hingga 135%. Peningkatan berat badan pada kelompok tikus yang diberi pakan HFD berbeda signifikan dengan peningkatan berat badan yang terjadi pada tikus yang diberikan pakan normal, dimana pada kelompok normal hanya terjadi peningkatan berat badan sekitar 25%. Penelitian yang dilakukan oleh Umami dan Nugroho (2015) pada tikus Wistar yang diinduksi oleh STZ dan HFD selama 8 minggu memiliki rerata asupan pakan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dengan pakan normal. Penelitian yang dilakukan oleh Srinivastan *et al.* (2005) menggunakan tikus *Sprague-Dawley* yang diberi pakan HFD selama 2 minggu dan diinduksi oleh STZ dosis rendah 35mg/kgBB intraperitoneal juga menunjukkan peningkatan berat badan yang signifikan. Pada penelitian yang dilakukan Skovsø *et al.* (2015) menyebutkan pemberian pakan *high fat/high sucrose* (HF/HS) selama 5 minggu dapat menginduksi peningkatan prosentase lemak tubuh. Penelitian oleh Zhang *et al.* (2008) menggunakan tikus wistar yang diberikan HFD selama 4 minggu diikuti oleh injeksi STZ multipel dosis rendah 30 mg/kgBB memiliki intake kalori yang lebih

besar secara signifikan dibandingkan kelompok normal dan mengalami peningkatan berat badan yang tidak signifikan dibandingkan kelompok normal.

Klasifikasi kelebihan berat badan dan obesitas pada manusia bergantung pada pengukuran indeks masa tubuh yang memiliki makna akumulasi lemak berlebihan dan dapat mengganggu kesehatan.

Namun, masih belum ada definisi dan standard yang jelas mengenai obesitas pada hewan coba, khususnya tikus (Skovsø *et al.*, 2015).

Komposisi diet dan durasi pemberian diet akan mempengaruhi kondisi tikus. Kelompok tikus yang diinduksi HFD dan STZ akan menunjukkan jumlah asupan pakan yang lebih tinggi karena adanya gangguan metabolisme glukosa dimana glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga tikus tersebut akan terus merasa lapar (Umami and Nugroho, 2015). Penelitian menunjukkan pemberian regimen diet HFD yang mengandung 58% kalori berasal dari lemak, bila diberikan dalam waktu singkat (2 minggu) dapat menginduksi resistensi insulin dan/atau intoleransi glukosa sedangkan pada pemberian diet yang lebih panjang (5 minggu) dapat juga menginduksi peningkatan prosentase lemak tubuh. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian diet dalam jangka waktu pendek menyerupai kondisi prediabetes pada manusia sedangkan pemberian dalam waktu yang lebih panjang akan meningkatkan berat badan secara signifikan dan menyerupai keadaan obesitas yang sesungguhnya (Reed *et al.*, 2000; Skovsø *et al.*, 2015).

Peningkatan berat badan yang ditemukan pada tikus yang diberikan HFD kemungkinan terjadi karena konsumsi makanan kaya energi dalam bentuk lemak jenuh (lemak babi) yang dideposisi dalam berbagai bantalan lemak tubuh dan penurunan pengeluaran energi

bila dibandingkan dengan hewan yang mengkonsumsi diet normal (Srinivasan *et al.*, 2005). Hal inilah yang menyebabkan peningkatan berat badan yang bermakna pada kelompok tikus yang diberikan HFD dengan STZ selama 8 minggu dan 16 minggu pada penelitian ini.

6.1.2 Pemberian HFD dan STZ dalam Menginduksi Hiperglikemia, Hiperinsulinemia dan Resistensi Insulin

Pengukuran kadar glukosa darah puasa dan insulin plasma digunakan untuk menghitung rumus HOMA-IR yang telah dimodifikasi untuk tikus sehingga dapat menentukan kondisi resistensi insulin.

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa pada kelompok DM8 dan DM16 mengalami peningkatan kadar glukosa darah puasa, insulin plasma dan terjadi resistensi insulin, dengan masing-masing parameter tersebut berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok normal.

Reed *et al.* (2000) meneliti pemberian diet yang mengandung 40% kcal lemak selama 2 minggu pada tikus *Sprague dawley* ternyata menunjukkan keadaan resistensi insulin disertai dengan pemberian STZ selama 3 hari dengan dosis 50mg/kgBB menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Pada penelitian yang dilakukan Skovso *et al.* (2015)

didapatkan pemberian *high fat/high sucrose* (HF/HS) selama 5 minggu dapat menginduksi terjadinya toleransi glukosa terganggu disertai hiperinsulinemia. Hasil yang serupa ditunjukkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Saleh *et al.* (2014) yang memberikan pakan HFD sebanyak 10% dari berat badan tikus wistar dan air yang mengandung 20% fruktosa selama 8 minggu. Pada minggu ke 8 tikus diberikan injeksi STZ dosis tunggal 35 mg/kgBB. Setelah 1 minggu pemberian STZ, tikus tersebut mengalami obesitas (berat badan 250 ± 20 gram),

hiperglikemia persisten lebih dari 300mg/dL, hiperinsulinemia dan dislipidemia sehingga ditegakkan sebagai tikus DMT2. Studi oleh Schaal et al. (2009) menggunakan HFD/fruktosa/STZ pada tikus wistar dapat meningkatkan glukosa darah puasa, *fructosamine*, insulin, HOMA, TG, kolesterol total, LDL, dan penurunan HDL.

Peningkatan berat badan dan terjadinya dislipidemia mendukung terjadinya obesitas yang berperan utama dalam keadaan resistensi insulin. Peningkatan insulin plasma dan kadar glukosa puasa juga berperan dalam meningkatkan kejadian resistensi insulin (Shaw, Sicree and Zimmet, 2010). Dalam keadaan fisiologis, reseptor insulin pada seluruh sel dapat menurun apabila terjadi *down regulation* akibat kondisi tingginya kandungan glukosa dalam darah. Apabila hal ini terjadi secara terus menerus, maka akan terjadi desensitisasi reseptor insulin dimana pada kondisi tersebut dibutuhkan insulin dalam plasma yang lebih tinggi untuk dapat memasukkan glukosa ke dalam sel. Hewan coba model DMT2 yang diberikan kombinasi diet tinggi lemak dan glukosa dapat menginduksi terjadinya hiperinsulinemia, resistensi insulin dan/atau intoleransi glukosa yang dilanjutkan dengan STZ yang toksik terhadap sel beta dan akan menyebabkan penurunan masa sel beta yang fungsional. Kedua stresor ini didesain untuk menyerupai patologi dari DMT2 pada waktu yang lebih singkat dibandingkan yang terjadi pada manusia (Zhang et al., 2008; Skovsø et al., 2015).

Resistensi insulin merupakan tanda khas dari DMT2 dan biasanya disertai dengan kelainan metabolik dan kardiovaskuler seperti dislipidemia, hipertensi, obesitas visceral, intoleransi glukosa dan disfungsi endotel yang keseluruhan hal ini merupakan faktor resiko dari penyakit kardiovaskuler. Gangguan sinyal insulin melalui jalur PI3k

menunjukkan adanya perubahan struktural serta akumulasi TG (Ouwens *et al.*, 2005).

Park *et al.* (2005) menyebutkan bahwa metabolisme glukosa jantung yang distimulasi oleh insulin, tereduksi signifikan setelah pemberian pakan tinggi lemak (HFD) selama 1.5 minggu (10 hari). HFD akan menyebabkan adanya akumulasi AGE (*Advanced glycation end products*) dan aktivasi dari RAGE (*receptor for AGEs*) yang dapat menyebabkan terjadinya jejas dan inflamasi pada jantung (Tikellis *et al.*, 2008).

Penelitian oleh Hwi, *et al.* (2009) menyebutkan bahwa asam lemak dapat bertindak sebagai nutrisi penyebab stress yang menginduksi terjadinya inflamasi pada jantung dengan mengaktivasi sinyal TLR4 dan meningkatkan kadar makrofag serta sitokin lokal pada jantung. Dibawah stimulus patologis, miokard akan mensekresikan sejumlah sitokin dan kemokin pro-inflamasi, seperti TNF- α , MCP-1, dan IL-6 (Ancey *et al.*, 2003), yang akan memberikan beberapa efek autokrin pada sel-sel jantung. Peningkatan kadar sitokin dan kemokin pro-inflamasi ini berhubungan dengan inflamasi miokard.

Ekspresi sitokin pro-inflamasi berada di bawah kontrol NF- κ B yang akan teraktivasi dalam kondisi miokarditis. Beberapa stimulus eksogen dan endogen dapat menginduksi NF- κ B, terutama adalah sitokin pro-inflamasi sendiri, kondisi hiperglikemia, peningkatan kadar asam lemak bebas di plasma, ROS, lipoprotein dan anoksia (Palomer *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini, kondisi inflamasi pada jantung tikus model DMT2 dapat dilihat dengan meningkatnya ekspresi sitokin pro-inflamasi IL-1 β dan IL-6 pada perlakuan 8 minggu dan 16 minggu. Hal ini sesuai

dengan penelitian yang dilakukan oleh Hwi, *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa sitokin-sitokin pro-inflamasi meningkat kadarnya pada kondisi menurunnya metabolisme glukosa kardial pada tikus obese yang diinduksi diet tinggi lemak.

6.1.3.1 Ekspresi IL-1 β pada Jantung Tikus Sprague Dawley model DMT2

IL-1 telah banyak dihubungkan dengan pathogenesis beberapa disfungsi miokard pada manusia. Kebanyakan dari penelitian ini menghubungkan kadar IL-1 di sirkulasi dengan sindroma penyakit jantung dan pembuluh darah (Long, 2001).

Beberapa penelitian mengukur adanya ekspresi IL-1 pada jantung yang mengalami kelainan, seperti penelitian yang dilakukan oleh Han, *et al.* (1991) dan Francis, *et al.* (1998) yang menemukan adanya peningkatan ekspresi IL-1 β pada jantung pasien dengan kardiomiopati dilatasi. IL-1 juga ditemukan pada jantung pasien dengan miokarditis viral (Matsumori, 2002).

Banyak peneliti yang menyatakan bahwa adanya gangguan fungsi jantung yang ada pada kondisi miokarditis dan kardiomiopati dilatasi dimediasi oleh pelepasan interleukin diantara miokardium (Han *et al.*, 1991).

IL-1 sendiri diproduksi oleh sel-sel miokard sebagai respon terhadap terjadinya jejas (Long, 2001), IL-1 diproduksi oleh beberapa tipe sel termasuk oleh makrofag, dan tampaknya berperan dalam menurunkan kontraktilitas miosit dengan menstimulasi *nitric oxide synthase* (NOS) (Francis *et al.*, 1998).

Penelitian yang dilakukan oleh Francis, *et al.* (1998) menunjukkan bahwa mRNA IL-1 β dan proteinnya ditemukan berada pada makrofag yang menginfiltrasi regio interstitial antara miosit, dan pada beberapa sel miosit itu sendiri.

Pada penelitian ini nilai rata-rata ekspresi IL-1 β pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 meningkat signifikan jika dibandingkan dengan ekspresi IL-1 β pada jantung tikus Sprague-Dawley yang diberi diet normal, baik pada waktu perlakuan 8 maupun 16 minggu. Ekspresi IL-1 β tertinggi ditemukan pada kelompok DM 16 minggu. Hal ini disebabkan karena pakan tinggi lemak (HFD) dapat menginduksi terjadinya stress pada jantung dan mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jantung (Hwi *et al.*, 2009). Selain itu, HFD juga dapat meningkatkan oksidasi lipid, menyebabkan terjadinya akumulasi TG intramiokardial (Ouwens *et al.*, 2005; Palomer *et al.*, 2013).

Sementara itu, injeksi STZ dosis rendah akan merusak sel beta pankreas, dan berakibat pada terjadinya resistensi insulin, yang menyerupai kondisi DMT2 pada manusia (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005). Resistensi insulin jika mengenai jantung maka akan mengakibatkan pergantian sumber energi jantung, dari glukosa menjadi oksidasi FA (Iliadis, Kadoglou and Didangelos, 2011). Jika kondisi ini berlangsung terus menerus, maka akan memicu terbentuknya ROS yang selanjutnya akan terjadi kondisi stress oksidatif (Duncan *et al.*, 2007) dan memicu terjadinya inflamasi pada jantung. ROS lebih lanjut dapat mengaktivasi *inflammasome* sehingga menginduksi pelepasan

IL-1 β dan inflamasi lebih lanjut (Dinarelli, 2011), sehingga makin lama periode perlakuan, maka makin banyak ekspresi IL-1 β yang didapat pada jantung yang mengalami inflamasi.

6.1.3.2 Ekspresi IL-6 pada Jantung Tikus Sprague Dawley model DMT2

Hasil yang serupa pada penelitian ditunjukkan oleh ekspresi IL-6 pada tabel 5.4, dimana kelompok tikus DM memiliki peningkatan ekspresi IL-6 pada jantung yang bermakna dibandingkan dengan kelompok normal ($p < 0.05$), sedangkan ekspresi IL-6 tertinggi juga ditemukan pada kelompok DM 16 minggu. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Tikellis, *et al.* (Tikellis *et al.*, 2008) yang menunjukkan adanya peningkatan signifikan dari ekspresi IL-6 dan TNF- α pada jantung tikus yang diinduksi oleh diet tinggi lemak. Penelitian oleh Hwi, *et al.* (2009) juga menunjukkan bahwa kadar IL-6 lokal pada jantung tikus yang diberi diet tinggi lemak meningkat 40% dibandingkan dengan tikus yang diberi pakan standar. Hal ini menunjukkan bahwa diet tinggi lemak dapat menginduksi terjadinya inflamasi miokardial, dan bahwa peningkatan sitokin lokal mungkin disebabkan adanya produksi dari sel setempat seperti kardiomyosit atau makrofag yang menginfiltrasi miokard IL-6 merupakan anggota sitokin pro-inflamasi dan dapat diekspresikan pada miokardium di bawah kondisi stress, serta mampu menginduksi hipertrofi, apoptosis, dan kardiomiopati pada miosit (Haugen *et al.*, 2007). Penelitian yang dilakukan

oleh Plenz, *et al.* (2001) menemukan bahwa miosit dan sel-sel endothelial mikrovaskuler adalah tipe sel pada jantung yang mengekspresikan IL-6. Produksi IL-6 juga dideteksi pada supernatant dari hasil isolasi kardiomiosit (Zhang *et al.*, 2007). IL-6 mengakibatkan terjadinya *down-regulation* dari metabolisme glukosa miokardial dan menyebabkan resistensi insulin pada jantung dengan mensupresi AMPK dan sinyal insulin pada jantung. Karena aktivasi AMPK dan metabolisme glukosa adalah sumber utama dari energi untuk jantung dalam kondisi stress seperti iskemia, inflamasi jantung yang diinduksi oleh obesitas dan defek pada metabolisme glukosa jantung, memainkan peran penting dalam pathogenesis penyakit jantung diabetik (Hwi *et al.*, 2009).

Seperti yang telah dijelaskan di atas, pemberian HFD pada tikus akan menginduksi terjadinya resistensi insulin pada miokard dan menurunkan metabolisme glukosa, melalui suatu proses yang berhubungan dengan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi, seperti IL-6, MCP-1, dan TNF- α (Haugen *et al.*, 2007; Hwi *et al.*, 2009). Molekul-molekul ini memicu efek autokrin pada sel jantung melalui aktivasi *downstream* dari NF- $\kappa\beta$, yang berkontribusi pada suatu kondisi yang berkaitan dengan inflamasi pada jantung (Takano *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2006). Beberapa stimulus eksogen dan endogen dapat menginduksi NF- $\kappa\beta$, terutama adalah sitokin pro-inflamasi sendiri, kondisi hiperglikemia, peningkatan FA dalam darah dan ROS (Palomer *et al.*, 2013). Hal ini menjelaskan mengapa

ekspresi IL-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 lebih tinggi pada waktu perlakuan 16 minggu dibandingkan 8 minggu.

6.2 Pengaruh Darapladib pada Tikus *Sprague dawley* Model DMT2 yang Diinduksi HFD-STZ

6.2.1 Pengaruh Darapladib pada Glukosa Darah, Insulin Plasma dan HOMA-IR

Kelompok yang diberikan HFD-STZ kemudian ditambahkan darapladib pada serial waktu 8 minggu dan 16 minggu memiliki perbedaan parameter yang signifikan dibandingkan dengan kelompok DM. Kelompok perlakuan darapladib memiliki kadar glukosa darah puasa dan insulin plasma yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DM. Berdasarkan nilai HOMA-IRnya, kelompok darapladib terbukti tidak mengalami resistensi insulin sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian darapladib dapat memperbaiki kondisi resistensi insulin yang terjadi pada tikus model DMT2. Penelitian yang dilakukan pada 5474 orang dengan DM menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara aktivitas Lp-PLA2 plasma dengan resistensi insulin dan dapat digunakan untuk memprediksi insidensi DMT2 pada orang dewasa dengan faktor resiko DM (Nelson *et al.*, 2012). Studi lain pada pasien dengan DMT2 yang baru terdiagnosis dan belum diterapi menunjukkan adanya hubungan positif antara Lp-PLA2 dengan kadar glukosa darah puasa dan oxLDL (Garg, Madhu and Suneja, 2015). Fortunato *et al.* (2014) menyebutkan bahwa level Lp-PLA2 mengalami peningkatan yang signifikan, yaitu 5 kali lebih

tinggi pada DMT2 dibandingkan dengan non-diabetik (Fortunato *et al.*, 2014).

Terdapat beberapa mekanisme yang menghubungkan Lp-PLA2 dengan diabetes, di antaranya adalah adanya peningkatan kondisi inflamasi yang berhubungan dengan peningkatan aktivitas Lp-PLA2 dalam menghidrolisis *oxidized phospholipid* (ox-PL) yang dapat menginduksi terjadinya resistensi insulin dan meningkatkan resiko terkena DMT2. Selain itu, peningkatan Lp-PLA2 dihubungkan sebagai marker inflamasi pada jaringan adiposa dan peningkatan FA maupun adipokin yang mendasari terjadinya resistensi insulin dan kegagalan sel beta pankreas. Meskipun beberapa penelitian banyak menghubungkan Lp-PLA2 dengan penyakit kardiovaskuler, beberapa studi mendukung hubungan aktivitas Lp-PLA2 dengan diabetes melitus khususnya DMT2. Infiltrasi monosit atau makrofag pada jaringan adiposa dapat meningkatkan produksi Lp-PLA2 secara lokal. Namun, terdapat hubungan yang lemah antara Lp-PLA2 dengan marker inflamasi non spesifik seperti CRP. Hal ini menunjukkan bahwa Lp-PLA2 merefleksikan jalur diabetogenik yang independen dengan marker inflamasi lain, dimana Lp-PLA2 lebih spesifik berperan pada jalur inflamasi yang diperantarai oleh *lysophosphatidylcholine* (LysoPC) dan *oxidized non esterified fatty acid* (oxNEFA) (Nelson *et al.*, 2012).

Lp-PLA2 dapat berperan sebagai produk maupun secara langsung berkontribusi terhadap inflamasi jaringan adiposa. Lin *et al.* (2016) menyebutkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 sebagai anti atau pro inflamasi bergantung pada distribusinya pada LDL atau

HDL. HDL merupakan pembawa Lp-PLA2 di plasma yang memiliki efek antiinflamasi, berlawanan dengan Lp-PLA2 yang terikat pada LDL. Perubahan distribusi Lp-PLA2 terjadi pada individu dengan DMT2, dimana terdapat peningkatan ikatan antara Lp-PLA2 dan LDL sehingga berkontribusi dalam peningkatan aktivitas enzim ini sebagai pro inflamasi. Selain itu, inflamasi jaringan adiposa turut menyebabkan resistensi sel lemak terhadap insulin sehingga berperan dalam peningkatan hidrolisis trigliserida dan peningkatan katabolisme HDL.

Garg, Madhu and Suneja (2015) menyebutkan bahwa hiperglikemia dapat mempengaruhi aktivitas Lp-PLA2 dengan adanya korelasi antara OxLDL dan level glukosa plasma. Hatoum *et al.* (2010) menyebutkan bahwa HbA1c berkorelasi positif dengan aktivitas Lp-PLA2 pada wanita. Nelson *et al.* (2012) menghubungkan HOMA-IR dengan aktivitas Lp-PLA2 pada individu dengan DMT2 dan menyimpulkan adanya jalur baru yang potensial antara Lp-PLA2 dengan resistensi insulin dan etiologi DMT2. Studi pada pasien DMT2 yang sudah menjalani pengobatan hipoglikemi menunjukkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 masih meningkat pada individu tersebut sehingga aktivitas enzim ini tidak dipengaruhi oleh obat-obatan diabetes. Namun, status glikemik HbA1C yang membaik dapat menurunkan aktivitas Lp-PLA2. Pentingnya terapi hiperglikemia pada tahap awal dapat menurunkan aktivitas Lp-PLA2 dan dapat menurunkan insiden PJK pada pasien diabetes (Nelson *et al.*, 2012). Hasil dari penelitian ini mendukung teori yang menyebutkan bahwa aktivitas Lp-PLA2 memiliki hubungan dengan hiperglikemia-

hiperinsulinemia dan resistensi insulin, dimana penghambatan aktivitas Lp-PLA2 secara dini oleh darapladib yaitu sejak 8 minggu atau 16 minggu pemberian HFD dapat menyebabkan normoglikemia, normoinsulinemia dan penurunan kadar HOMA-IR pada tikus model DMT2.

6.2.2 Peran Darapladib pada Inflamasi pada Jantung

Darapladib adalah penyekat selektif dari Lp-PLA2. Lp-PLA2 sendiri adalah suatu enzim yang mungkin menghubungkan antara metabolisme lipid dan inflamasi. Percobaan klinis fase 2 untuk Darapladib menunjukkan adanya inhibisi Lp-PLA2 dan efek yang menjanjikan pada marker inflamasi dan stabilitas plak (Riley and Corson, 2009). Penelitian oleh Bhagwat, Yadav and Gupte (2016) menunjukkan peran Lp-PLA2 sebagai penanda jantung yang independen untuk prediksi kejadian penyakit jantung koroner. Konsentrasi Lp-PLA2 dihubungkan dengan resiko penyakit kardiovaskuler (Mohler *et al.*, 2008) dan juga memiliki hubungan dengan DMT2 serta merupakan faktor yang berhubungan dengan pathogenesis diabetes, terutama inflamasi (Nelson *et al.*, 2012).

Pasien dengan kelainan metabolik diabetes memiliki jumlah *small dense* LDL yang lebih tinggi, yang dapat berpotensi meningkatkan transport Lp-PLA2 di sirkulasi. Garg, Madhu and Suneja (2015) menyebutkan bahwa *small dense* LDL (sdLDL) lebih mudah dioksidasi dan diambil oleh makrofag di area makrovaskuler dan menyebabkan aterogenesis. Aktivitas Lp-PLA2 meningkat pada pasien dengan DMT2 pada fase awal penyakit. Pada DMT2, level LDL termodifikasi meningkat karena

mudah mengalami oksidasi. Lp-PLA2 menghidrolisis fosfolipid dari oxLDL untuk memproduksi LysoPC dan oxNEFA. Kedua produk ini bersifat pro-inflamasi dan aterogenik dan merupakan kontributor penting terjadinya resiko PJK (Garg, Madhu and Suneja, 2015).

Jalur NF- κ B dan MAPK berhubungan erat dengan respon inflamasi pada sel. Penelitian menyebutkan bahwa jalur NF- κ B Dan MAPK berhubungan dengan regulasi Lp-PLA2 (Han *et al.*, 2015). Tabit, Chung and Vita (2010) menyebutkan bahwa jalur sinyal NF- κ B dapat mengganggu sinyal insulin melalui inhibisi *insulin receptor substrate 1*, Akt (protein kinase B) dan fosforilasi eNOS yang menyebabkan penurunan produksi NO, meningkatkan kejadian inflamasi dan disfungsi endotel.

Peran Lp-PLA2 yang berproses dengan ox-LDL dan inflamasi memperlihatkan bahwa inhibisi dari enzim ini dapat memainkan peran positif dalam terapi penyakit kardiovaskuler (Hu *et al.*, 2011). Inhibisi Lp-PLA2 oleh Darapladib tidak mencegah oksidasi LDL tetapi menginhibisi pelepasan LysoPC yang tampaknya berperan dalam sitotoksitas dan induksi apoptosis oleh ox-LDL pada makrofag (Szmitko *et al.*, 2003). Tetapi saat ini kebanyakan penelitian yang menggunakan Darapladib mengukur penanda inflamasi yang ada di dalam sirkulasi, dan belum ada yang menghubungkan kemampuan Darapladib sebagai penyekat selektif Lp-PLA2, dengan penanda inflamasi pada jaringan jantung.

6.2.2.1 Peran Darapladib terhadap Ekspresi IL-1 β pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2

Pada kondisi diabetes atau obesitas, asam lemak disimpan dalam bentuk TG dan fosfolipid di dalam kardiomyosit (Park et al., 2005). Makrofag dapat menginisiasi produksi IL-1 β melalui *inflammasome* sebagai responnya terhadap akumulasi kolesterol (Bäck and Hansson, 2015). Jika hal ini berlangsung terus menerus, maka jantung akan mulai membentuk *intermediate lipid* yang toksik bagi jantung (Burkart et al., 2007). Di bawah stimulus patologis ini, miokard akan mensekresikan sejumlah sitokin dan kemokin pro-inflamasi, seperti TNF- α , MCP-1 dan IL-6 (Pagano et al., 2008).

Lp-PLA2 yang utamanya berikatan dengan kolesterol LDL, dapat dihambat aktivitasnya di plasma dan arteri oleh darapladib selaku penekat selektif Lp-PLA2 (Bäck and Hansson, 2015). Belum ada penelitian yang menunjukkan efek inhibisi dari aktivitas Lp-PLA2 lokal pada kondisi inflamasi pada jantung, khususnya pada DMT2, tetapi diharapkan Darapladib juga dapat menghambat aktivitas Lp-PLA2 untuk berikatan dengan ox-LDL pada jaringan jantung.

Tabel 5.4 menunjukkan rentang ekspresi IL-1 β dan IL-6 pada masing-masing kelompok perlakuan. Terdapat penurunan ekspresi IL-1 β yang tidak signifikan pada

jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 yang diberi darapladib selama 8 dan 16 minggu, jika dibandingkan dengan kelompok DM ($p > 0.05$). Hal ini kemungkinan disebabkan karena Darapladib sebagai penyekat selektif enzim Lp-PLA2 tidak memiliki efek lokal pada jaringan jantung, khususnya terhadap mediator inflamasi IL-1 β , sehingga kurang efektif bertindak sebagai agen anti inflamasi pada jantung tikus model DMT2

6.2.2.2 Peran Darapladib terhadap Ekspresi IL-6 pada Jantung Tikus Sprague-Dawley Model DMT2

Sejalan dengan penurunan ekspresi IL-1 β pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 yang diterapi dengan Darapladib, kelompok ini juga mengalami penurunan ekspresi IL-6. Kelompok DM yang diberikan darapladib selama 8 minggu mengalami penurunan ekspresi IL-6 secara signifikan dibandingkan dengan kelompok DM yang tidak diterapi Darapladib ($p < 0.05$). Sementara kelompok DM yang diberikan Darapladib selama 16 minggu tampak mengalami pola penurunan ekspresi IL-6 pada jantung walaupun tidak signifikan, jika dibandingkan dengan kelompok DM yang tidak diberi Darapladib.

Pada percobaan klinis, pemberian Darapladib oral dapat menginduksi penurunan plasma IL-6 yang signifikan (Mohler *et al.*, 2008; Heriansyah, Siswanto, *et al.*, 2016;

Heriansyah, Andri, *et al.*, 2017). Penelitian oleh Paik *et al.* (2015) menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara Lp-PLA2 dan IL-6 pada wanita yang mengalami kelebihan berat badan dan obesitas. Akumulasi lemak visceral berperan dalam peningkatan oksidasi LDL dan berhubungan dengan ukuran partikel LDL yang lebih kecil. Ox-LDL memodifikasi sekresi IL-6 dan menstimulasi ekspresi Lp-PLA2. Lp-PLA2 akan memecah oxPC yang terdapat pada ox-LDL menjadi 2 mediator inflamasi yaitu LysoPC dan oxFA. LysoPC dapat menginduksi ekspresi sitokin inflamasi seperti IL-1 β dan IL-6 (Paik *et al.*, 2015).

Belum ada penelitian yang menunjukkan efek inhibisi dari aktivitas Lp-PLA2 lokal pada kondisi inflamasi pada jantung, khususnya pada DMT2. Apabila melihat hasil bahwa Darapladib dapat menurunkan secara signifikan ekspresi IL-6 pada jantung tikus DMT2 pada periode perlakuan 8 minggu, maka kemungkinan Darapladib bekerja pada fase awal terjadinya inflamasi pada jantung tikus model DMT2. Hal ini masih harus dibuktikan lebih lanjut dengan mengukur ekspresi dan aktivitas Lp-PLA2 di jaringan jantung.

6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Pengaruh inhibitor selektif Lp-PLA2 pada proses inflamasi jantung pada DMT2 dapat dibuktikan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan adanya penurunan ekspresi IL-6 yang signifikan pada jantung tikus model

DMT2 dengan pemberian darapladib, pada serial waktu 8 minggu. Hal ini disebabkan kemampuan darapladib yang berperan dalam pencegahan inflamasi melalui hambatan enzim Lp-PLA2 untuk menghidrolisis kolesterol LDL sehingga mengurangi jumlah OxNEFA dan lysoPC yang berperan dalam proses inflamasi. Lp-PLA2 sendiri berhubungan dengan terjadinya resistensi insulin (Nelson *et al.*, 2012) dan peningkatan kadarnya pada fase awal diabetes dihubungkan dengan resiko terkena penyakit jantung dan pembuluh darah pada DMT2 (Garg, Madhu and Suneja, 2015). Hal ini menjelaskan mengapa hasil penurunan IL-6 yang signifikan hanya didapatkan pada serial waktu 8 minggu. Darapladib kemungkinan hanya bekerja pada fase awal inflamasi pada DMT2, dan mungkin juga merupakan penyebab gagalnya *clincical trial* fase 3 untuk Darapladib; dimana pada fase 3 telah menggunakan subyek penelitian individu dengan riwayat penyakit kronis; yaitu penderita penyakit jantung koroner (*Stability Study*) dan individu yang dirawat dengan Sindroma Koroner Akut (ACS/*Acute Coronary Syndrome*). Namun, masih belum ada penelitian mengenai pengaruh darapladib yang spesifik terhadap pencegahan terjadinya inflamasi pada jantung pada individu yang terkena DMT2. Untuk itu masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai peran darapladib dalam DMT2 selain sebagai inhibitor aktivitas Lp-PLA2 untuk mencegah inflamasi jantung pada DMT2.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian mengenai efek darapladib sebagai penyekat selektif Lp-PLA2 terhadap ekspresi interleukin-1 β dan interleukin-6 pada jantung tikus Sprague-Dawley model DMT2 dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) tidak dapat menurunkan ekspresi Interleukin-1B (IL-1 β) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2.
2. Darapladib sebagai penyekat selektif enzim *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2* (Lp-PLA2) dapat menurunkan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada jantung tikus Sprague-Dawley model diabetes mellitus tipe 2 pada periode perlakuan 8 minggu.

7.2 Saran

Saran yang diberikan sehubungan dengan penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek pemberian penyekat selektif Lp-PLA2 (Darapladib) secara lokal pada jaringan jantung, dengan cara melihat ekspresi dan aktivitas enzim Lp-PLA2 pada jaringan jantung, khususnya pada model DMT2, dan hubungannya dengan ekspresi penanda inflamasi lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Ancey, Cecile; Menet, Emmanuelle; Corbi, Pierre; Fredj, Sandra; Garcia, Martine; Rücker-Martin, Catherine; Bescond, Jocelyn; Morel, Franck; Wijdenes, John; Lecron, Jean-claude; Potreau, Daniel. 2003. Human Cardiomyocyte Hypertrophy Induced In Vitro By Gp130 Stimulation. *Cardiovascular research*. **59**(1): 78–85.
- Bäck, M. and Hansson, G. K. 2015. Anti-Inflammatory Therapies For Atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. **12**(4): 199–211.
- Ball, R. Y.; Stowers, E. C.; Burton, J. H.; Cary, N. R.; Skepper, J. N.; Mitchinson, M. J. 1995. Evidence That The Death Of Macrophage Foam Cells Contributes To The Lipid Core Of Atheroma. *Atherosclerosis*. **114**(1): 45–54.
- Ballantyne, Christie M.; Hoogeveen, Ron C.; Bang, Heejung; Coresh, Josef; Folsom, Aaron R.; Heiss, Gerardo; Sharrett, A. Richey. 2004. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, High-Sensitivity C-Reactive Protein, And Risk For Incident Coronary Heart Disease In Middle-Aged Men And Women In The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation*. **109**(7): 837–842.
- Basu, Ananda; Jensen, Michael; McCann, Frances; Nandy, Debashis; Mukhopadhyay, Debabrata; McConnell, Joseph; Rizza, Robert. 2007. Lack of an Effect of Pioglitazone or Glipizide on Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 in Type 2 Diabetes. *Endocrine Practice*. **13**(2): 147–152.
- Beaglehole, R., Saracci, R. and Panico, S. 2001. Cardiovascular Diseases: Causes, Surveillance And Prevention. *International journal of epidemiology*. **30** Suppl 1: S1-4.
- Benítez, Sonia; Sánchez-Quesada, José Luis; Ribas, Vicent; Jorba, Oscar; Blanco-Vaca, Francisco; González-Sastre, Francesc; Ordóñez-Llanos, Jordi. 2003. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Is Mainly Associated With Electronegative Low-Density Lipoprotein Subfraction. *Circulation*. **108**(1): 92–96.
- Benjamin, Emelia J.; Blaha, Michael J.; Chiuve, Stephanie E.; Cushman, Mary; Das, Sandeep R.; Deo, Rajat; de Ferranti, Sarah D.; Floyd, James; Fornage, Myriam; Gillespie, Cathleen; Isasi, Carmen R.; Jiménez, Monik C.; Jordan, Lori Chaffin; Judd, Suzanne E.; Lackland, Daniel; Lichtman, Judith H.; Lisabeth, Lynda; Liu, Simin; Longenecker, Chris T.; Mackey, Rachel H.; Matsushita, Kunihiro; Mozaffarian, Dariush; Mussolino, Michael E.; Nasir, Khurram; Neumar, Robert W.; Palaniappan, Latha; Pandey, Dilip K.; Thiagarajan, Ravi R.; Reeves, Mathew J.; Ritchey, Matthew; Rodriguez, Carlos J.; Roth, Gregory A.; Rosamond, Wayne D.; Sasson, Comilla; Towfighi, Amytis; Tsao, Connie W.; Turner, Melanie B.; Virani, Salim S.; Voeks, Jenifer H.; Willey, Joshua Z.; Wilkins, John T.; Wu, Jason HY.; Alger, Heather M.; Wong, Sally S.; Muntner, Paul. 2017. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. **135**(10): e146–e603.

Bennet, Anna M.; Prince, Jonathan A.; Fei, Guo-Zhong; Lyrenas, Louise; Huang, YiHui; Wiman, Bjorn; Frostegard, Johan; de Faire, Ulf. 2003. Interleukin-6 Serum Levels And Genotypes Influence The Risk For Myocardial Infarction. *Atherosclerosis*. **171**(2): 359–367.

Berger, Jeffrey S.; Ballantyne, Christie M.; Davidson, Michael H.; Johnson, Joel L.; Tarka, Elizabeth A.; Lawrence, Denise; Trivedi, Trupti; Zalewski, Andrew; Mohler, Emile R. 2011. Peripheral Artery Disease, Biomarkers, And Darapladib. *American Heart Journal*. **161**(5): 972–978.

Bhagwat, R. P., Yadav, K. S. and Gupte, A. M. 2016. PREDICTIVE VALUES OF LP-PLA2, hs-CRP AND LIPIDOGRAM IN CORONARY HEART DISEASE. *World Journal of Pharmaceutical Research*. **5**(3): 640–645.

Biasucci, Luigi M.; Liuzzo, Giovanna; Fantuzzi, Giamila; Caligiuri, Giuseppina; Rebuzzi, Antonio G.; Ginnetti, Francesca; Dinarello, Charles A.; Maseri, Attilio. 1999. Increasing Levels Of Interleukin (IL)-1Ra And IL-6 During The First 2 Days Of Hospitalization In Unstable Angina Are Associated With Increased Risk Of In-Hospital Coronary Events. *Circulation*. **99**(16): 2079–84.

Biologi, G. 2016. *Anatomi, Morfologi dan Klasifikasi Mencit (Mus musculus)*. Available at: <http://www.generasibiologi.com/2016/12/anatomi-morfologi-fisiologi-klasifikasi-nama-ilmiah-latin-mencit-mus-musculus.html>. Diakses tanggal 1 Januari 2018.

Biologycorner. tanpa tahun. *Rat-Circulatory*. Available at: https://www.biologycorner.com/worksheets/rat_circulatory.html. Diakses tanggal 1 Januari 2018.

Blake, G. J. and Ridker, P. M. 2001. Novel Clinical Markers of Vascular Wall Inflammation. *Circulation Research*. **89**(9): 763–771.

Boengler, Kerstin; Hilfiker-Kleiner, Denise; Drexler, Helmut; Heusch, Gerd; Schulz, Rainer. 2008. The Myocardial JAK/STAT Pathway: From Protection To Failure. *Pharmacology and Therapeutics*. **120**(2): 172–185.

Böni-Schnetzler, Marianne; Thorne, Jeffrey; Parnaud, Géraldine; Marselli, Lorella; Ehses, Jan A.; Kerr-Conte, Julie; Pattou, Francois; Halban, Philippe A.; Weir, Gordon C.; Donath, Marc Y. 2008. Increased Interleukin (IL)-1 β Messenger Ribonucleic Acid Expression In B-Cells Of Individuals With Type 2 Diabetes And Regulation Of IL-1 β In Human Islets By Glucose And Autostimulation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **93**(10): 4065–4074.

Böni-Schnetzler, Marianne; Boller, Simone; Debray, Sarah; Bouzakri, Karim; Meier, Daniel T.; Prazak, Richard; Kerr-Conte, Julie; Pattou, Francois; Ehses, Jan A.; Schuit, Frans C.; Donath, Marc Y. 2009. Free Fatty Acids Induce A Proinflammatory Response In Islets Via The Abundantly Expressed Interleukin-1 Receptor I'. *Endocrinology*. **150**(12): 5218–5229.

Burkart, Eileen M.; Sambandam, Nandakumar; Han, Xianlin; Gross, Richard W.; Courtois, Michael; Gierasch, Carolyn M.; Shoghi, Kooresh; Welch, Michael J.; Kelly, Daniel P. 2007. Nuclear Receptors Ppar β/Δ And Ppar α Direct Distinct Metabolic Regulatory Programs In The Mouse Heart. *Journal of Clinical Investigation*. **117**(12): 3920–3939.

Cain, Brian S.; Meldrum, Daniel R.; Dinarello, Charles A.; Meng, Xianzhong; Joo, Kyung S.; Banerjee, Anirban; Harken, Alden. 1999. Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interleukin-1 Beta Synergistically Depress Human Myocardial Function. *Crit Care Med*. **27**(7): 1309–1318.

Carlquist, J. F., Muhlestein, J. B. and Anderson, J. L. 2007. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: A New Biomarker For Cardiovascular Risk Assessment And Potential Therapeutic Target. *Expert Rev Mol Diagn*. **7**(5): 511–517.

de Carvalho, C. and Thomazini, J. 2013. Macroscopic Anatomy Of The Surface Of The Heart Of Albino Wistar Rats. *J. Morphol. Sci*. **30**(4): 299–303.

Charo, I. F. and Taub, R. 2011. Anti-Inflammatory Therapeutics For The Treatment Of Atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. **10**(5): 365–376.

Chen, Junqin; Saxena, Geetu; Mungrue, Imran N.; Lusi, Aldons J.; Shalev, Anath. 2008. Thioredoxin-Interacting Protein-A Critical Link Between Glucose Toxicity and β -Cell Apoptosis. *Diabetes*. **57**(April): 938–944.

Christopher Glass, A. K. and Witztum, J. L. 2001. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. **104**: 503–516.

Collaboration, The Lp-PLA2 Studies. 2010. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 And Risk Of Coronary Disease, Stroke, And Mortality: Collaborative Analysis Of 32 Prospective Studies. *The Lancet*. **375**(9725): 1536–1544.

Constantinos, C. T. and Tselepis, A. D. 2014. Pathophysiological Role and Clinical Significance of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) Bound to LDL and HDL. *Current Pharmaceutical Design*. **20**(40): 6256–6269.

Dave, Mehul; Nash, Mike; Young, Graeme C.; Ellens, Harma; Magee, Mindy H.; Roberts, Andrew D.; Taylor, Maxine A.; Greenhill, Robert W.; Boyle, Gary W. 2014. Disposition and Metabolism of Darapladib , a Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Inhibitor, in Humans. *Drug Metab Dispos*. **42**(March): 415–430.

Deng, Mario C.; Erren, Michael; Roeder, Norbert; Dreimann, Volker; Günther, Franziska; Kerber, Sebastian; Baba, Hideo A.; Schmidt, Christoph; Breithardt, Günter; Scheld, Hans H. 1998. T-Cell And Monocyte Subsets, Inflammatory Molecules, Rejection, And Hemodynamics Early After Cardiac Transplantation. *Transplantation*. **65**(9): 1255–1261.

Dewberry, R.; Holden, H.; Crossman, D.; Francis, S. 2000. Interleukin-1 Receptor Antagonist Expression In Human Endothelial Cells And Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **20**(11): 2394–2400.

van Dijk, T. H.; Laskewitz, A. J.; Greffhorst, A.; Boer, T. S.; Bloks, V. W.; Kuipers, F.; Groen, A. K.; Reijngoud, D. J. 2013. A Novel Approach To Monitor Glucose Metabolism Using Stable Isotopically Labelled Glucose In Longitudinal Studies In Mice. *Laboratory Animals*. **47**(2): 79–88.

Dinarello, C. 2011. Interleukin-1 In The Pathogenesis And Treatment Of Inflammatory Diseases. *Blood*. **117**(14): 3720–3733.

Dinarello, C. A. 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. **27**(1): 519–550.

Dinarello, C. A., Donath, M. Y. and Mandrup-Poulsen, T. 2010. Role Of IL-1 β In Type 2 Diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. **17**: 314–321.

Ding, Guoliang; Cheng, Lihong; Qin, Qianhong; Frontin, Sonya; Yang, Qinglin. 2006. PPARdelta Modulates Lipopolysaccharide-Induced TNFalpha Inflammation Signaling In Cultured Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **40**(6): 821–828.

Duncan, Bruce B.; Schmidt, M. I.; Pankow, James S.; Ballantyne, Christie M.; Couper, David; Vigo, Alvaro; Hoogeveen, Ron; Folsom, Aaron R.; Heiss, Gerardo. 2003. Low-Grade Systemic Inflammation and the Development of Type 2 Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes*. **52**(7): 1799–1805.

Duncan, Jennifer G.; Fong, Juliet L.; Medeiros, Denis M.; Finck, Brian N.; Kelly, Daniel P. 2007. Insulin-Resistant Heart Exhibits A Mitochondrial Biogenic Response Driven By The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha/PGC-1alpha Gene Regulatory Pathway. *Circulation*. **115**(7): 909–917.

Epelman, S., Liu, P. P. and Mann, D. L. 2015. Role Of Innate And Adaptive Immune Mechanisms In Cardiac Injury And Repair. *Nature Reviews Immunology*. **15**(2): 117–129.

Eroschenko, V. P. 2003. *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. edisi 9. Jakarta: EGC.

Fadok, V. A., Bratton, D. L. and Henson, P. M. 2001. Phagocyte Receptors For Apoptotic Cells: Recognition, Uptake, And Consequences. *J Clin Invest*. **108**: 957–962.

Federer, W. T. 1966. Randomization and Sample Size in Experimentation', in *Food and Drug Administration Statistics Seminar*, pp. 1–14.

Finck, B. N. and Kelly, D. P. 2002. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (Pparalpha) Signaling In The Gene Regulatory Control Of Energy Metabolism In The Normal And Diseased Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **34**(10): 1249–1257.

Finet, G.; Ohayon, J.; Rioufol, G.; Lefloch, S.; Tracqui, P.; Dubreuil, O.; Tabib, A. 2007. Morphological And Biomechanical Aspects Of Vulnerable Coronary Plaque. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **100**: 547–553.

Flanagan, Anne M.; Brown, Jackie L.; Santiago, Consuelo A.; Aad, Pauline Y.; Spicer, Leon J.; Spicer, Maria T. 2008. High-Fat Diets Promote Insulin Resistance Through Cytokine Gene Expression In Growing Female Rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **19**(8): 505–513.

Fortunato, J.; Bláha, V.; Bis, J.; Štásek, J.; Andrys, C.; Vojáček, J.; Jurašková, B.; Sobotka, L.; Polanský, P.; Brtko, M. 2014. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ Mass Level Is Increased In Elderly Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of diabetes research.* **2014**: 278063.

Francis, S E.; Holden, H.; Holt, C M.; Duff, G W. 1998. Interleukin-1 In Myocardium And Coronary Arteries Of Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* **30**(2): 215–223.

Furberg, C.D.; Nelson, Jeanenne J.; Solomon, C.; Cushman, M.; Jenny, N.S.; Psaty, B.M. 2008. Distribution And Correlates Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ In An Elderly Cohort: The Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc.* **56**: 792–799.

Gabay, C. and Kushner, I. 1999. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine.* **340**(6): 448–454.

Galis, Z. S. et al. (1994) 'Increased Expression Of Matrix Metalloproteinases And Matrix Degrading Activity In Vulnerable Regions Of Human Atherosclerotic Plaques. *J Clin Invest.* **94**: 2493–2503.

Garg, S., Madhu, S. V. and Suneja, S. 2015. Lipoprotein Associated Phospholipase A₂ Activity & Its Correlation With Oxidized LDL & Glycaemic Status In Early Stages Of Type-2 Diabetes Mellitus. *Indian Journal of Medical Research, Supplement.* **141**(JAN 2015): 107–114.

Gray, S. and Kim, J. K. 2011. New Insights Into Insulin Resistance In The Diabetic Heart. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* **22**(10): 394–403.

Haffner, S. M. 2006. Risk Constellations In Patients With The Metabolic Syndrome: Epidemiology, Diagnosis, And Treatment Patterns. *American Journal of Medicine.* **119**(5 SUPPL. 1): 3–9.

Hakkinen, T.; Luoma, J S.; Hiltunen, M O.; Macphee, C H.; Milliner, K J.; Patel, L.; Rice, S Q.; Tew, D G.; Karkola, K.; Yli-Herttuala, S. 1999. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Is Expressed By Macrophages In Human And Rabbit Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19**(12): 2909–2917.

Han, Richard O.; Ray, Philip E.; Baughman, Kenneth L.; Feldman, Arthur M. 1991. Detection of Interleukin and Interleukin-Receptor mRNA in Human Heart

by Polymerase Chain Reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **175**(2): 872–879.

Han, Xiaolei; Wang, Tiedong; Zhang, Jifeng; Liu, Xingxing; Li, Zhuang; Wang, Gangqi; Song, Qi; Pang, Daxin; Ouyang, Hongsheng; Tang, Xiaochun. 2015. Apolipoprotein CIII Regulates Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Expression Via The MAPK And Nfkb Pathways. *Biology open*. **4**(5): 661–5.

Hara, A. and Takeomi, T. 1990. Characterization And Change In Phospholipids In The Aorta Of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit. *Jpn J Exp Med*. **60**: 311–318.

Hassan, M. 2015. STABILITY and SOLID-TIMI 52: Lipoprotein Associated Phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) As A Biomarker Or Risk Factor For Cardiovascular Diseases. *Global Cardiology Science and Practice*. **2015**(1): 6.

Hatoum, Ida J.; Jeanenne, J. Nelson; Cook, Nancy R.; Hu, Frank B.; Rimm, Eric B. 2010. Dietary, Lifestyle, And Clinical Predictors Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity In Individuals Without Coronary Artery Disease. *Am J Clin Nutr*. **91**(3): 786–793.

Haugen, E.; Chen, J.; Wikström, J.; Grönros, J.; Gan, L. M.; Fu, L. X.M. 2007. Parallel Gene Expressions Of IL-6 And BNP During Cardiac Hypertrophy Complicated With Diastolic Dysfunction In Spontaneously Hypertensive Rats. *International Journal of Cardiology*. **115**(1): 24–28.

Heery, James M.; Kozak, Mark; Stafforini, Diana M.; Jones, David A.; Zimmerman, Guy A.; McIntyre, Thomas M.; Prescott, Stephen M. 1995. Oxidatively Modified LDL Contains Phospholipids With Platelet-Activating Factor-Like Activity And Stimulates The Growth Of Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation*. **96**(5): 2322–2330.

Heriansyah, Teuku; Wihastuti, Titin Andri; Anita, Kenty Wantri; Iskandar, Agustin; Suhendra, Riski Bagus; Setiabudi, Patan Ahmad; Sishartami, Lintang Widya. 2016. Atherogenesis Inhibition By Darapladib Administration In Dyslipidemia Model Sprague-Dawley Rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*. **6**(1): 52–58.

Heriansyah, Teuku; Siswanto, Bambang Budi; Santoso, Anwar; Sargowo, Djanggan; Subekti, Imam; Aulani'am; Sukmawan, Renan; Siregar, Nurjati Hairani. 2016. IL-6 Expression Level and Foam Cell Number with Darapladib Treatment in Early Development of Atherosclerosis : In Vivo Study for Type 2 Diabetes Mellitus Model. *J HK Coll Cardiol*. **24**(October): 64–73.

Heriansyah, Teuku; Adam, Aditya Angela; Wihastuti, Titin Andri; Rohman, Mohammad Saifur. 2017. Elaborate Evaluation Of Serum And Tissue Oxidized LDL Level With Darapladib Therapy: A Feasible Diagnostic Marker For Early Atherogenesis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **7**(2): 134–138.

Heriansyah, Teuku; Andri, Wihastuti Titin; Siswanto, Bambang Budi; Santoso, Anwar; Sukmawan, Renan; Sargowo, Djanggan; Subekti, Imam; Siregar, Nurjati Chairani; Bordosono, Saptawati. 2017. Lowering Inflammation Level by Lp-PLA2 Inhibitor (Darapladib) in Early Atherosclerosis Development: in vivo Rat Type 2 Diabetes Mellitus Model. *J. Cardiovasc Disease Res.* **8**(2): 50–55.

Hu, Miao Miao; Zhang, Jie; Wang, Wen Yi; Wu, Wen Yu; Ma, Yan Ling; Chen, Wei Hai; Wang, Yi Ping. 2011. The Inhibition Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Exerts Beneficial Effects Against Atherosclerosis In LDLR-Deficient Mice. *Acta Pharmacologica Sinica.* **32**(10): 1253–1258.

Huber, S. A.; Sakkinen, P.; Conze, D.; Hardin, N.; Tracy, R. 1999. Interleukin-6 Exacerbates Early Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **19**(10): 2364–2367.

Hwi, Jin Ko; Zhang, Zhiyou; Dae, Young Jung; Jun, John Y.; Ma, Zhexi; Jones, Kelly E.; Chan, Sook Y.; Kim, Jason K. 2009. Nutrient Stress Activates Inflammation And Reduces Glucose Metabolism By Suppressing AMP-Activated Protein Kinase In The Heart. *Diabetes.* **58**(11): 2536–2546.

Iliadis, F., Kadooglou, N. and Didangelos, T. 2011. Insulin And The Heart. *Diabetes Research and Clinical Practice.* **93**(SUPPL. 1): S86–S91.

Isomaa, B.; Almgren, P.; Tuomi, T.; Forsén, B.; Lahti, K.; Nissén, M.; Taskinen, M. R.; Groop, L. 2001. Cardiovascular Morbidity And Mortality Associated With The Metabolic Syndrome. *Diabetes care.* **24**(4): 683–9.

Itabe, H. 1998. Oxidized Phospholipids As A New Landmark In Atherosclerosis. *Progress in Lipid Research.* **37**(2–3): 181–207.

Iwase, M.; Sonoki, K.; Sasaki, N.; Ohdo, S.; Higuchi, S.; Hattori, H.; Iida, M. 2008. Lysophosphatidylcholine Contents In Plasma LDL In Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Relation With Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 And Effects Of Simvastatin Treatment. *Atherosclerosis.* **196**: 931–936.

Kanda, T. and Takahashi, T. 2004. Interleukin-6 and Cardiovascular Diseases. *Japanese Heart Journal.* **45**(2): 183–193.

Karabina, S A.; Liapikos, T A.; Grekas, G.; Goudevenos, J.; Tselepis, A D. 1994. Distribution Of PAF-Acetylhydrolase Activity In Human Plasma Low-Density Lipoprotein Subfractions. *Biochimica et biophysica acta.* **1213**(1): 34–8.

Kirii, Hirokazu; Niwa, Tamikazu; Yamada, Yasuhiro; Wada, Hisayasu; Saito, Kuniaki; Iwakura, Yoichiro; Asano, Masahide; Moriwaki, Hisataka; Seishima, Mitsuru. 2003. Lack Of Interleukin-1 β Decreases The Severity Of Atherosclerosis In ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **23**(4): 656–660.

Klover, Peter J.; Zimmers A, Teresa; Koniaris, Leonidas G.; Mooney, Robert A. 2003. Chronic Exposure to Interleukin-6 Causes Hepatic Insulin Resistance in Mice. *Diabetes.* **52**(November): 2784–2789.

Koenen, Tim B.; Stienstra, Rinke; Van Tits, Lambertus J.; De Graaf, Jacqueline; Stalenhoef, Anton F.H.; Joosten, Leo A.B.; Tack, Cees J.; Netea, Mihai G. 2011. Hyperglycemia Activates Caspase-1 And TXNIP-Mediated IL-1 β Transcription In Human Adipose Tissue. *Diabetes*. **60**(2): 517–524.

Koenig, Wolfgang; Khuseyinova, Natalie; Löwel, Hannelore; Trischler, Gerlinde; Meisinger, Christa. 2004. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Adds To Risk Prediction Of Incident Coronary Events By C-Reactive Protein In Apparently Healthy Middle-Aged Men From The General Population: Results From The 14-Year Follow-Up Of A Large Cohort From Southern Germany. *Circulation*. **110**(14): 1903–1908.

Koh, K. K. 2000. Effects Of Statins On Vascular Wall: Vasomotor Function, Inflammation, And Plaque Stability. *Cardiovascular Research*. **47**(4): 648–657.

Koh, K. K., Han, S. H. and Quon, M. J. 2005. Inflammatory Markers And The Metabolic Syndrome: Insights From Therapeutic Interventions. *Journal of the American College of Cardiology*. **46**(11): 1978–1985.

Kolb, H. and Mandrup-Poulsen, T. 2005. An Immune Origin Of Type 2 Diabetes?. *Diabetologia*. **48**(6): 1038–1050.

Kolodgie, Frank D.; Burke, Allen P.; Skorija, Kristi S.; Ladich, Elena; Kutys, Robert; Makuria, Addisalem Taye; Virmani, Renu. 2006. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Protein Expression In The Natural Progression Of Human Coronary Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **26**(11): 2523–2529.

Kudolo, G. B., Bressler, P. and DeFronzo, R. A. 1997. Plasma PAF Acetylhydrolase In Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus And Obesity: Effect Of Hyperinsulinemia And Lovastatin Treatment. *J Lipid Mediat Cell Signal*. **17**: 97–113.

Lavi, Shazar; McConnell, Joseph P.; Rihal, Charanjit S.; Prasad, Abhiram; Mathew, Verghese; Lerman, Lilach O.; Lerman, Amir. 2007. Local Production Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 And Lysophosphatidylcholine In The Coronary Circulation: Association With Early Coronary Atherosclerosis And Endothelial Dysfunction In Humans. *Circulation*. **115**(21): 2715–2721.

Libby, P. 1998. The Interface Of Atherosclerosis And Thrombosis: Basic Mechanisms. *Vascular medicine (London, England)*. **3**(3): 225–229.

Libby, P. 2002. Inflammation In Atherosclerosis. *Nature*. **420**: 868–874.

Libby, Peter; Tabas, Ira; Fredman, Gabrielle; Fisher, Edward A. 2014. Inflammation and Its Resolution as Determinants of Acute Coronary Syndrome. *Circ res*. **114**(12): 1867–1879.

Libby, P., Ridker, P. M. and Maseri, A. 2002. Inflammation And Atherosclerosis. *Circulation*. **105**(9): 1135–1143.

Lin, Xiu-Hong; Xu, Ming-Tong; Tang, Jv-Ying; Mai, Li-Fang; Wang, Xiao-Yi; Ren, Meng; Yan, Li. 2016. Effect Of Intensive Insulin Treatment On Plasma Levels Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 And Secretory Phospholipase A2 In Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Lipids in health and disease*. **15**(1): 203.

Little, W. C.; Constantinescu, M.; Applegate, R. J.; Kutcher, M. A.; Burrows, M. T.; Kahl, F. R.; Santamore, W. P. 1988. Can Coronary Angiography Predict The Site Of A Subsequent Myocardial Infarction. In Patients With Mild-To-Moderate Coronary Artery Disease?. *Circulation*. **78**(5 Pt 1): 1157–1166.

Long, C. S. 2001. The Role Of Interleukin-1 In The Failing Heart. *Heart failure reviews*. **6**(2): 81–94.

Lorenzo, O., Picatoste, B. and Ares-Carrasco, S. 2011. Potential Role Of Nuclear Factor Kappab In Diabetic Cardiomyopathy. *Mediators Inflamm*. **2011**: 652097.

Lourida, Evangelia S.; Papathanasiou, Athanasios I.; Goudevenos, John A.; Tselepis, Alexandros D. 2006. The Low-Density Lipoprotein (LDL)-Associated PAF-Acetylhydrolase Activity And The Extent Of LDL Oxidation Are Important Determinants Of The Autoantibody Titers Against Oxidized LDL In Patients With Coronary Artery Disease. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **75**(2): 117–126.

MacPhee, Colin H.; Moores, Kitty E.; Boyd, Helen F.; Dhanak, Dash; IFE, Robert J.; Leach, Colin A.; Lake, David S.; Milliner, Kevin J.; Patterson, Rebecca A.; Suckling, Keith E.; Tew, David G.; Hickey, Deirdre M.B. 1999. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Generates Two Bioactive Products During The Oxidation Of Low-Density Lipoprotein: Use Of A Novel Inhibitor. *Biochemical Journal*. **338**(2): 479.

Maedler, Kathrin; Sergeev, Pavel; Ris, Frédéric; Oberholzer, José; Joller-jemelka, Helen I.; Spinas, Giatgen A.; Kaiser, Nurit.; Halban, Philippe A.; Donath, Marc Y. 2002. Glucose-Induced Beta Cell Production Of IL-1 Beta Contributes To Glucotoxicity In Human Pancreatic Islets. *Journal of Clinical Investigation*. **110**(6): 851–860.

Maedler, Kathrin; Sergeev, Pavel; Ehses, Jan A.; Mathe, Zoltan; Bosco, Domenico; Berney, Thierry; Dayer, Jean-Michel; Reinecke, Manfred; Halban, Philippe A.; Donath, Marc Y. 2004. Leptin Modulates Beta Cell Expression Of IL-1 Receptor Antagonist And Release Of IL-1beta In Human Islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**: 8138–8143.

Maedler, Kathrin; Dharmadhikari, Gitanjali; Schumann, Desiree M.; Storling, Joachim. 2011. *Diabetes - Perspectives in Drug Therapy, Handbook of experimental pharmacology*. Edited by M. Schwanstecher. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology).

Mahmooda, Syed S.; Levy, Daniel; Vasan, Ramachandran S.; Wang, Thomas J. 2014. The Framingham Heart Study And The Epidemiology Of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. *Lancet*. **383**(9921): 1933–1945.

Mandrup-Poulsen, T.; Bendtzen, K.; Nerup, J.; Dinarello, C. A.; Svenson, M.; Nielsen, J. H. 1986. Affinity-Purified Human Interleukin I Is Cytotoxic To Isolated Islets Of Langerhans. *Diabetologia*. **29**(1): 63–67.

Manitoba, University. tanpa tahun. Circulatory System of The Rat in *Campbell 6-7th ed chapter 42*. Available at: http://umanitoba.ca/Biology/BIOL1030/Lab4/biolab4_7.html. Diakses tanggal 1 Januari 2018.

Matsumori, A. 2002. Cytokines In Myocarditis And Dilated Cardiomyopathy. *European Heart Journal, Supplement*. **4**(1): 42–45.

McCullough, P. A. 2009. Darapladib and Atherosclerotic Plaque: Should Lipoprotein- Associated Phospholipase A2 Be a Therapeutic Target?. *Current Atherosclerosis Reports*. **11**: 334–337.

Mello, Ana Paula Queiroz; da Silva, Isis Tande; Abdalla, Dulcinea Saes Parra; Damasceno, Nágila Raquel Teixeira. 2011. Electronegative Low-Density Lipoprotein: Origin And Impact On Health And Disease. *Atherosclerosis*. **215**(2): 257–265.

Mertens, a and Holvoet, P. 2001. Oxidized LDL And HDL: Antagonists In Atherothrombosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **15**(12): 2073–84.

Mohler, Emile R 3rd; Ballantyne, Christie M.; Davidson, Michael H.; Hanefeld, Markolf; Ruilope, Luis M.; Johnson, Joel L.; Harm, P D.; Zalewski, Andrew. (Darapladib Investigators). 2008. The Effect of Darapladib on Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Activity and Cardiovascular Biomarkers in Patients With Stable Coronary Heart Disease or Coronary Heart Disease Risk Equivalent. *PLoS*. **51**(17).

Moore, K. J. and Tabas, I. 2011. Macrophages In The Pathogenesis Of Atherosclerosis. *Cell*. **114**: 45–54.

Moore, K. L., Dalley, A. F. and Agur, A. M. R. 2010. *Clinically Oriented Anatomy*. 6th edn. Edited by C. Taylor. Philadelphia, United States of America: Lippincott Williams & Wilkins.

Naito, R. 2015. Coronary Artery Disease In Type 2 Diabetes Mellitus: Recent Treatment Strategies And Future Perspectives. *World Journal of Cardiology*. **7**(3): 119.

el Nawawy, A.; Soliman, A T.; el Azzouni, O.; Abbassy, A A.; Massoud, M N.; Marzouk, S.; Ibrahim, F.; Helal, L. 1996. Interleukin-1-Beta, Tumour Necrosis Factor-Alpha, Islet-Cell Antibody, And Insulin Secretion In Children With Thalassemia Major On Long-Term Blood Transfusion. *Journal of tropical pediatrics*. **42**(6): 362–364.

Nelson, T. L.; Biggs, M. L.; Kizer, J. R.; Cushman, M.; Hokanson, J. E.; Furberg, C. D.; Mukamal, K. J. 2012. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) And Future Risk Of Type 2 Diabetes: Results From The Cardiovascular Health Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **97**(5): 1695–1701.

Netea, M. G., Nold-Petry, C. A. and Nold, M. F. 2009. Differential Requirement For The Activation Of The Inflammasome For Processing And Release Of IL-1 β In Monocytes And Macrophages. *Blood*. **113**(10): 2324–2335.

Noto, Hiroshi; Hara, Masumi; Karasawa, Ken; Iso-O, Naoyuki; Satoh, Hiroaki; Togo, Masako; Hashimoto, Yoshiaki; Yamada, Yoshiji; Kosaka, Tetsuya; Kawamura, Mitsunobu; Kimura, Satoshi; Tsukamoto, Kazuhisa. 2003. Human Plasma Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Binds To All The Murine Lipoproteins, Conferring Protection Against Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **23**(5): 829–835.

Noto, H., Chitkara, P. and Raskin, P. 2006. The Role Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 In The Metabolic Syndrome And Diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. **20**(6): 343–348.

O'Donoghue, Michelle L.; Braunwald, Eugene; White, Harvey D.; Steen, Dylan P.; Lukas, Mary Ann; Tarka, Elizabeth; Steg, P. Gabriel; Hochman, Judith S.; Bode, Christoph; Maggioni, Aldo P.; Im, Kyung Ah; Shannon, Jennifer B.; Davies, Richard Y.; Murphy, Sabina A.; Crugnale, Sharon E.; Wiviott, Stephen D.; Bonaca, Marc P.; Watson, David F.; Weaver, W. Douglas; Serruys, Patrick W.; Cannon, Christopher P. 2014. Effect Of Darapladib On Major Coronary Events After An Acute Coronary Syndrome: The SOLID-TIMI 52 Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. **312**(10): 1006–1015.

Oei, H.-H. S. 2005. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Is Associated With Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke: The Rotterdam Study. *Circulation*. **111**(5): 570–575.

Okamura, Keisuke; Miura, Shin-ichiro; Zhang, Bo; Uehara, Yoshinari; Matsuo, Kunihiro; Kumagai, Koichiro; Saku, Keijiro. 2007. Factor Acetylhydrolase may be a Marker. *Circulation Journal*. **71**(February): 214–219.

Ouwens, D. M.; Boer, C.; Fodor, M.; De Galan, P.; Heine, R. J.; Maassen, J. A.; Diamant, M. 2005. Cardiac Dysfunction Induced By High-Fat Diet Is Associated With Altered Myocardial Insulin Signalling In Rats. *Diabetologia*. **48**(6): 1229–1237.

Packard, Chris J.; O'Reilly, Denis SJ.; Caslake, Muriel J.; McMahon, Alex D.; Ford, Ian; Cooney, Josephine; Mcphee, Colin H. 2000. Predictor of Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*. **343**: 1148–55.

Pagano, Claudio; Calcagno, Alessandra; Granzotto, Marnie; Calabrese, Fiorella; Thiene, Gaetano; Federspil, Giovanni; Vettor, Roberto. 2008. Heart Lipid Accumulation In Obese Non-Diabetic Rats: Effect Of Weight Loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. **18**(3): 189–197.

Paik, Jean Kyung; Kim, Minkyung; Kim, Minjoo; Yen, Yuna; Ahn, Hyeon Yeong; Lee, Sang-Hyun; Lee, Jong Ho. 2015. Circulating Lp-PLA(2) Activity Correlates With Oxidative Stress And Cytokines In Overweight/Obese Postmenopausal Women Not Using Hormone Replacement Therapy. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. **37**(2): 32.

Palomer, Xavier; Salvadó, Laia; Barroso, Emma; Vázquez-Carrera, Manuel. 2013. An Overview Of The Crosstalk Between Inflammatory Processes And Metabolic Dysregulation During Diabetic Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*. **168**(4): 3160–3172.

Papanicolaou, Dimitris A.; Wilder, Ronald L.; Manolagas, Stavros C.; Chrousos, George P. 1998. The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease. *Annals of Internal Medicine*. **128**(2): 127–137.

Park, So-Young Y.; Cho, You-Ree R.; Kim, Hyo-jeong J.; Higashimori, Takamasa; Danton, Cheryl; Lee, Mi-kyung K.; Dey, Asim; Rothermel, Beverly; Kim, Young-bum B.; Kalinowski, April; Russell, Kerry S.; Kim, Jason K. 2005. Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin in C57BL / 6 Mice. *Diabetes*. **54**(December): 3530–3540.

Persson, Margaretha; Hedblad, Bo; Nelson, Jeanenne J.; Berglund, Göran. 2007. Elevated Lp-PLA2 Levels Add Prognostic Information To The Metabolic Syndrome On Incidence Of Cardiovascular Events Among Middle-Aged Nondiabetic Subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **27**(6): 1411–1416.

Plenz, Gabriele; Eschert, Heike; Erren, Michael; Wichter, Thomas; Böhm, Michael; Flesch, Markus; Scheld, Hans H.; Deng, Mario C. 2002. The Interleukin-6/Interleukin-6-Receptor System Is Activated In Donor Hearts. *Journal of the American College of Cardiology*. **39**(9): 1508–1512.

Plenz, G., Fang, S. Z. and Tjan, T. D. 2001. Activation Of The Cardiac Interleukin-6 System In Advanced Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. **3**: 415–421.

Rabe, Katja; Lehrke, Michael; Parhofer, Klaus; Broedl, Lili C. 2008. Adipokines and Insulin Resistance. *Molecular Medicine*. **14**(11–12): 1.

Rajavashisth, T.; Qiao, J.H.; Tripathi, S.; Tripathi, J.; Mishra, N.; Hua, M.; Wang, X.P.; Loussararian, A.; Clintob, S.; Libby, P.; Lusis, A. 1998. Heterozygous Osteopetrotic (Op) Mutation Reduces Atherosclerosis In LDL Receptor-Deficient Mice. *J Clin Invest*. **101**: 2702–2710.

Rajavashisth, T. B.; Xu, X.-P.; Jovinge, S.; Meisel, S.; Xu, X.-O.; Chai, N.-N.; Fishbein, M. C.; Kaul, S.; Cercek, B.; Sharifi, B.; Shah, P. K. 1999. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for Activation by Proinflammatory Mediators. *Circulation*. **99**(24): 3103–3109.

Reaven, Gary. 2005. Insulin Resistance, Type 2 Diabetes Mellitus, And Cardiovascular Disease: The End Of The Beginning. *Circulation*. **112**(20): 3030–3032.

Reed, M. J.; Meszaros, K.; Entes, L. J.; Claypool, M. D.; Pinkett, J. G.; Gadbois, T. M.; Reaven, G. M. 2000. A New Rat Model Of Type 2 Diabetes: The Fat-Fed, Streptozotocin-Treated Rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*. **49**(11): 1390–1394.

Remick, Daniel G.; Bolgos, Gerald; Copeland, Shannon; Siddiqui, Javed. 2005. Role Of Interleukin-6 In Mortality From And Physiologic Response To Sepsis. *Infection and Immunity*. **73**(5): 2751–2757.

Ridker, Paul M.; Hennekens, Charles H.; Buring, Julie E.; Rifai, Nader. 2000. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *New England Journal of Medicine*. **342**(12): 836–843.

Ridker, Paul M.; Rifai, Nader; Stampfer, M. J.; Hennekens, Charles H. 2000. Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men. *Circulation*. **101**(15): 1767–1772.

Ridker, P. M. and Luscher, T. F. 2014. Anti-Inflammatory Therapies For Cardiovascular Disease. *European Heart Journal*. **35**(27): 1782–1791.

Riedemann, Niels C.; Neff, Thomas A.; Guo, R.-F.; Bernacki, Kurt D.; Laudes, Ines J.; Sarma, J. V.; Lambris, John D.; Ward, Peter A. 2003. Protective Effects of IL-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression. *The Journal of Immunology*. **170**(1): 503–507.

Riley, R. F. and Corson, M. A. 2009. Darapladib, A Reversible Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ Inhibitor, For The Oral Treatment Of Atherosclerosis And Coronary Artery Disease. *IDrugs: the investigational drugs journal*. **12**(10): 648–55.

Robertson, R Paul; Harmon, Jamie; Tran, Phuong Oanh T; Poitout, Vincent. 2004. Beta-Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, And Chronic Oxidative Stress In Type 2 Diabetes. *Diabetes*. **53 Suppl 1**(February 2004): S119–24.

Rosamund, W. D., Folsom, A. R. and Chambless, L. E. 2001. Coronary Heart Disease Trends In Four United States Communities. *Int J Epidemiol*. **30**(Suppl 1): S17–S22.

Rosenson, R. S. and Hurt-Camejo, E. 2012. Phospholipase A₂ Enzymes And The Risk Of Atherosclerosis. *European Heart Journal*. **33**(23): 2899–2909.

Rosenson, R. S. and Stafforini, D. M. 2012. Modulation Of Oxidative Stress, Inflammation, And Atherosclerosis By Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂. *Journal of Lipid Research*. **53**(9): 1767–1782.

Ross, R. 1999. Inflammation or Atherogenesis. *The New England Journal of Medicine*. **340**(2): 115–126.

Saleh, Samira; El-Maraghy, Nabila; Reda, Enji; Barakat, Waleed. 2014. Modulation Of Diabetes And Dyslipidemia In Diabetic Insulin-Resistant

- Rats By Mangiferin: Role Of Adiponectin And TNF-A. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. **86**(4): 1935–1947.
- Savoia, C. and Schiffrin, E. L. 2007. Vascular Inflammation In Hypertension And Diabetes: Molecular Mechanisms And Therapeutic Interventions: Figure 1. *Clinical Science*. **112**(7): 375–384.
- Schaalan, Mona; El-Abhar, Hanan S.; Barakat, Maged; El-Denshary, Ezzedin S. 2009. Westernized-Like-Diet-Fed Rats: Effect On Glucose Homeostasis, Lipid Profile, And Adipocyte Hormones And Their Modulation By Rosiglitazone And Glimepiride. *Journal of Diabetes and its Complications*. **23**(3): 199–208.
- Schmitz, G. and Ruebsaamen, K. 2010. Metabolism And Atherogenic Disease Association Of Lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*. **208**(1): 10–18.
- Serban, M.; Tanaseanu, C.; Kosaka, T.; Vidulescu, C.; Stoian, I.; Marta, D.S.; Tanaseanu, S.; Moldoveanu, E. 2002. Significance of platelet-Activating Factor Acetylhydrolase In Patients With Non-Insulin-Dependent (Type 2) Diabetes Mellitus. *J Cell Mol Med*. **6**: 643–647.
- Serruys, Patrick W.; García-García, Héctor M.; Buszman, Pawel; Erne, Paul; Verheye, Stefan; Aschermann, Michael; Duckers, Henrikus; Bleie, Oyvind; Dudek, Dariusz; Bøtker, Hans Erik; Von Birgelen, Clemens; D'Amico, Don; Hutchinson, Tammy; Zambanini, Andrew; Mastik, Frits; Van Es, Gerrit Anne; Van Der Steen, Antonius F W.; Vince, D. Geoffrey; Ganz, Peter; Hamm, Christian W.; Wijns, William; Zalewski, Andrew. 2008. Effects Of The Direct Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Inhibitor Darapladib On Human Coronary Atherosclerotic Plaque. *Circulation*. **118**(11): 1172–1182.
- Shalev, Anath; Pise-Masison, Cynthia A.; Radonovich, Michael; Hoffmann, Steven C.; Hirshberg, Boaz; Brady, John N.; Harlan, David M. 2002. Oligonucleotide Microarray Analysis Of Intact Human Pancreatic Islets: Identification Of Glucose-Responsive Genes And A Highly Regulated TGF- β Signaling Pathway. *Endocrinology*. **143**(9): 3695–3698.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A. and Zimmet, P. Z. 2010. Global Estimates Of The Prevalence Of Diabetes For 2010 And 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **87**(1): 4–14.
- Silva, I. T., Mello, A. P. Q. and Damasceno, N. R. T. 2011. Antioxidant And Inflammatory Aspects Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2): A Review. *Lipids in Health and Disease*. **10**(1): 170.
- Skovsø, S.; Damgaard, J.; Fels, J. J.; Olsen, G. S.; Wolf, X. A.; Rolin, B.; Holst, J. J. 2015. Effects Of Insulin Therapy On Weight Gain And Fat Distribution In The HF/HS-STZ Rat Model Of Type 2 Diabetes. *International Journal of Obesity*. **39**(10): 1531–1538.
- Spranger, Joachim; Kroke, Anja; Möhlig, Matthias; Hoffmann, Kurt; Bergmann, Manuela M.; Ristow, Michael; Boeing, Heiner; Pfeiffer, Andreas F H. 2003. Inflammatory Cytokines And The Risk To Develop Type 2 Diabetes:

- Results Of The Prospective Population-Based European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. **52**(3): 812–817.
- Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, Lydia; Kaul, C. L.; Ramarao, P. 2005. Combination Of High-Fat Diet-Fed And Low-Dose Streptozotocin-Treated Rat: A Model For Type 2 Diabetes And Pharmacological Screening. *Pharmacological Research*. **52**(4): 313–320.
- Stafforini, D. M. and Zimmerman, G. A. 2014. Unraveling The PAF-AH/Lp-PLA₂ Controversy. *Journal of Lipid Research*. **55**(9): 1811–1814.
- Stamler, J., Stamler, R. and Neaton, J. D. 1999. Low Risk-Factor Profile And Long-Term Cardiovascular And Non-Cardiovascular Mortality And Life Expectancy. Findings For 5 Large Cohorts Of Young Adult And Middle-Aged Men And Women. *JAMA*. **282**: 2012–2018.
- Steen, D. L. and O'Donoghue, M. L. 2013. Lp-PLA₂ Inhibitors for the Reduction of Cardiovascular Events. *Cardiology and Therapy*. **2**(2): 125–134.
- Steinberg, D. 2002. Atherogenesis In Perspective: Hypercholesterolemia And Inflammation As Partners In Crime. *Nat Med*. **8**: 1211–1217.
- Stutz, A., Golenbock, D. T. and Latz, E. 2009. Inflammasomes: Too big to miss. *Journal of Clinical Investigation*. **119**(12): 3502–3511.
- Su, Dongfang; Li, Zhongxia; Li, Xinrui; Chen, Yuming; Zhang, Yuan; Ding, Ding; Deng, Xueqing; Xia, Min; Qiu, Jian; Ling, Wenhua. 2013. Association between Serum Interleukin-6 Concentration and Mortality in Patients with Coronary Artery Disease. *Mediators of Inflammation*. **2013**: 1–7.
- Supranto, J. 2000. Teknik Sampling untuk Survey dan Eksperimen. P.T Rineka Cipta: Jakarta.
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In B Cells Of The Rat Pancreas. *Physiological Research*. **50**(6): 537–546.
- Szmitko, Paul E.; Wang, Chao Hung; Weisel, Richard D.; Jeffries, Greg A.; Anderson, Todd J.; Verma, Subodh. 2003. Biomarkers of Vascular Disease Linking Inflammation to Endothelial Activation Part II. *Circulation*. **108**(17): 2041–2048.
- Tabas, I. 2005. Consequences And Therapeutic Implications Of Macrophage Apop- Tosis In Atherosclerosis: The Importance Of Lesion Stage And Phagocytic Ef- Ciency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **25**: 2255–2264.
- Tabit, C. E., Chung, W. B. and Vita, J. A. 2010. Endothelial Dysfunction In Diabetes Mellitus : Molecular Mechanisms And Clinical Implications. *Rev endocrine metabolism disorder*. **11**(1): 61–74.
- Takano, Hiroyuki; Nagai, Toshio; Asakawa, Masayuki; Toyozaki, Tetsuya; Oka, Toru; Komuro, Issei Takano. 2000. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis

- Factor-Alpha Expression In Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circ res.* **87**(7): 596–602.
- Tanaka, Satsuki; Hayashi, Tatsuya; Toyoda, Taro; Hamada, Taku; Shimizu, Yohei; Hirata, Masakazu; Ebihara, Ken; Masuzaki, Hiroaki; Hosoda, Kiminori; Fushiki, Tohru; Nakao, Kazuwa. 2007. High-Fat Diet Impairs The Effects Of A Single Bout Of Endurance Exercise On Glucose Transport And Insulin Sensitivity In Rat Skeletal Muscle. *Metabolism: Clinical and Experimental.* **56**(12): 1719–1728.
- Van Tassell, Benjamin W.; Toldo, Stefano; Mezzaroma, Eleonora; Abbate, Antonio. 2013. Targeting Interleukin-1 In Heart Disease. *Circulation.* **128**(17): 1910–1923.
- Thorp, E., Subramanian, M. and Tabas, I. 2011. The Role Of Macrophages And Dendritic Cells In The Clearance Of Apoptotic Cells In Advanced Atherosclerosis. *Eur J Immunol.* **41**: 2515–2518.
- Von der Thusen, J. H. 2003. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews.* **55**(1): 133–166.
- Tikellis, Christos; Thomas, Merlin C.; Harcourt, Brooke E.; Coughlan, Melinda T.; Pete, Josepha; Bialkowski, Katarzyna; Tan, Adeline; Bierhaus, Angelika; Cooper, Mark E.; Forbes, Josephine M. Cardiac Forbes J M. 2008. Cardiac Inflammation Associated With A Western Diet Is Mediated Via Activation Of RAGE By Ages. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **295**: 323–330.
- Tjoelker, Larry W.; Wilder, Cheryl; Eberhardt, Chris; Stafforini, Diana M.; Dietsch, Greg; Schimpf, Brian; Hooper, Shawn; Trong, Hai Le; Cousens, Lawrence S.; Zimmerman, Guy A.; Yamada, Yoshiji; McIntyre, Thomas M
- Prescott, Stephen M.; Gray, Patrick W. 1995. Anti-Inflammatory Properties Of A Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. *Nature.* **374**(6522): 549–553.
- Tjoelker, L. W. and Stafforini, D. M. 2000. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolases In Health And Disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* **1488**(1–2): 102–123.
- Tousoulis, D.; Koutsogiannis, M.; Papageorgiou, N.; Siasos, G.; Antoniadis, C.; Tsiamis, E.; Stefanadis, C. 2010. Endothelial Dysfunction: Potential Clinical Implications. *Minerva Medica.* **101**(4): 271–283.
- Tracy, R. 1997. Atherosclerosis, Thrombosis And Inflammation: A Question Of Linkage. *Fibrinol Proteolysis.* **11**(Suppl 1): 137–142.
- Tsutamoto, Takayoshi; Hisanaga, Tomoko; Wada, Atsuyuki; Maeda, Keiko; Ohnishi, Masato; Fukai, Daisuke; Mabuchi, Naoko; Sawaki, Masahide; Kinoshita, Masahiko. 1998. Interleukin-6 Spillover In The Peripheral Circulation Increases With The Severity Of Heart Failure, And The High Plasma Level Of Interleukin-6 Is An Important Prognostic Predictor In Patients With Congestive Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology.* **31**(2): 391–398.
- Umami, Z. and Nugroho, F. A. 2015. EFEK PEMBERIAN SUSU SAPI BUBUK

TERHADAP KADAR SERUM HDL (HIGH DENSITY LIPOPROTEIN) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2. *J. Gizi Pangan*. **10**(1): 1–8.

Vicenová, B.; Vopálenský, V.; Burýšek, L.; Pospíšek, M. 2009. Emerging Role of Interleukin-1 in Cardiovascular Diseases. *Physiological Research*. **58**: 481–498.

Vincent, M. a, Montagnani, M. and Quon, M. J. 2003. Molecular And Physiologic Actions Of Insulin Related To Production Of Nitric Oxide In Vascular Endothelium. *Current diabetes reports*. **3**(4): 279–288.

Wæhre, Torgun;Yndestad, Arne; Smith, Camilla; Haug, Terje; Tunheim, Siv Haugen; Gullestad, Lars; Frøland, Stig S.; Semb, Anne G.; Aukrust, Pål; Damås, Jan K. 2004. Increased Expression of Interleukin-1 in Coronary Artery Disease with Downregulatory Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Circulation*. **109**(16): 1966–1972.

van der Wal, A. C.; Becker, A. E.; van der Loos, C. M.; Das, P. K. 1994. Site Of Intimal Rupture Or Erosion Of Thrombosed Coronary Atherosclerotic Plaques Is Characterized By An Inflammatory Process Irrespective Of The Dominant Plaque Morphology. *Circulation*. **89**(1): 36–44.

Walter, Mary F.; Jacob, Robert F.; Jeffers, Barrett; Ghadanfar, Mathieu M.; Preston, Gregory M.; Buch, Jan; Mason, R. Preston. 2004. Serum Levels Of Thiobarbituric Acid Reactive Substances Predict Cardiovascular Events In Patients With Stable Coronary Artery Disease: A Longitudinal Analysis Of The PREVENT Study. *Journal of the American College of Cardiology*. **44**(10): 1996–2002.

Wang, Wen yi; Zhang, Jie; Wu, Wen yu; Li, Jie; Ma, Yan ling; Chen, Wei hai; Yan, Hong; Wang, Kai; Xu, Wen wei; Shen, Jian hua; Wang, Yi ping. 2011. Inhibition Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Ameliorates Inflammation And Decreases Atherosclerotic Plaque Formation In Apoe-Deficient Mice. *PLoS ONE*. **6**(8): e23425.

Wang, Zhu; Yang, Yuexin; Xiang, Xuesong; Zhu, Yuming; Men, Jianhua; He, Mei. 2010. Estimation Of The Normal Range Of Blood Glucose In Rats. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. **39**(2): 133–7, 142.

Watson, A. D.; Navab, M.; Hama, S. Y.; Sevanian, A.; Prescott, S. M.; Stafforini, D. M.; McIntyre, T. M.; La Du, B. N.; Fogelman, A. M.; Berliner, J. A. 1995. Effect Of Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase On The Formation And Action Of Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*. **95**(2): 774–782.

Watson, A.D.; Leitinger, N.; Navab, M.; Faull, K.F.; Horkko, S.; Witztum, J.L.; Palinsky, W.; Schwenke, D.; Salomon, R.G.; Sha, W.; Subbanagounder, G.; Fogelman, A.M.; Berliner, J.A. 1997. Structural Identification By Mass Spec-Trometry Of Oxidized Phospholipids In Minimally Oxidized Low Density Lipoproteins That Induce Monocyte/Endothelial Interactions And Evidence For Their Presence In Vivo. *J. Biol. Chem*. **272**: 13597–13603.

Weksler-Zangen, Sarah; Raz, Itamar; Lenzen, Sigurd; Jöns, Anne; Ehrenfeld, Shira; Amir, Gail; Oprescu, Andrei; Yagil, Yoram; Yagil, Chana; Zangen, David H.; Kaiser, Nurit. 2008. Impaired Glucose-Stimulated Insulin Secretion Is Coupled With Exocrine Pancreatic Lesions In The Cohen Diabetic Rat. *Diabetes*. **57**(2): 279–287.

WHO, 2014. 2014. WHO | The top 10 causes of death. *Fact sheet N°310 (Updated May 2014)*. doi: [/entity/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html](https://doi.org/10.1181/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html). Diakses tanggal 28 Desember 2017.

Wilensky, Robert L.; Shi, Yi; Mohler, Emile R.; Hamamdzcic, Damir; Burgert, Mark E.; Li, Jun; Postle, Anthony; Fenning, Robert S.; Bollinger, James G.; Hoffman, Bryan E.; Pelchovitz, Daniel J.; Yang, Jisheng; Mirabile, Rosanna C.; Webb, Christine L.; Zhang, LeFeng; Zhang, Ping; Gelb, Michael H.; Walker, Max C.; Zalewski, Andrew; Macphee, Colin H. 2008. Inhibition Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Reduces Complex Coronary Atherosclerotic Plaque Development. *Nature medicine*. **14**(10): 1059–1066.

Willerson, J. T. 2004. Inflammation as a Cardiovascular Risk Factor. *Circulation*. **109**(21_suppl_1): II-2-II-10.

Xing, Zhou; Gauldie, Jack; Cox, Gerard; Baumann, Heinz; Jordana, Manel; Lei, Xue-Feng; Achong, Michelle K. 1998. Enhanced Acute Inflammatory Responses in IL-6-deficient Mice IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. *J. Clin. Invest.* **101**(2): 311–320.

Zalewski, A. and Macphee, C. 2005. Role Of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 In Atherosclerosis: Biology, Epidemiology, And Possible Therapeutic Target. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **25**(5): 923–931.

Zhang, Hongchao; Wang, Huan-You; Bassel-Duby, Rhonda; Maass, David L.; Johnston, William E.; Horton, Jureta W.; Tao, Wei-ke. 2007. Role Of Interleukin-6 In Cardiac Inflammation And Dysfunction After Burn Complicated By Sepsis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. **292**(5): H2408–H2416.

Zhang, J. et al. (2016) 'Darapladib, a Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Inhibitor, Reduces Rho Kinase Activity in Atherosclerosis.', *Yonsei medical journal*, 57(2), pp. 321–7. doi: 10.3349/ymj.2016.57.2.321.

Zhang, Juan; Xu, Dong Ling; Liu, Xiao Bo; Bi, Shao Jie; Zhao, Tong; Sui, Shu Jian; Ji, Xiao Ping; Lu, Qing Hua. 2008. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model', *Experimental Diabetes Research*. **2008**: 1–9.

Zhao, S.; Chu, Y.; Zhang, C.; Lin, Y.; Xu, K.; Yang, P.; Fan, J.; Liu, E. 2008. Diet-Induced Central Obesity And Insulin Resistance In Rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **92**(1): 105–111.

Zhou, Rongbin; Tardivel, Aubry; Thorens, Bernard; Choi, Inpyo; Tschopp, Jürg.
2010. Thioredoxin-Interacting Protein Links Oxidative Stress To
Inflammasome Activation. *Nature Immunology*. **11**(2): 136–140.

Zhu, H. A. 2016. Lp-PLA2, a Novel Potential Biomarker Predicting Cardiovascular
Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Medical & Clinical Reviews*. **2**(2): 9–
12.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rata-Rata Data Berat Badan Tikus

Identitas	Berat Badan Awal (gram)	Berat Badan Akhir (gram)	Perubahan Berat Badan (%)
N8-1	205.0	181.0	-11.70
N8-2	212.0	174.0	-17.92
N8-3	195.0	145.0	-25.64
N8-4	220.0	169.0	-23.18
N8-5	208.0	166.0	-20.19
DM8-1	160.0	249.0	55.62
DM8-2	161.0	300.0	86.33
DM8-3	163.0	282.0	73.00
DM8-4	211.0	358.0	69.66
DM8-5	185.0	315.0	70.27
DMDP8-1	146.0	330.0	126.02
DMDP8-2	160.0	313.0	95.62
DMDP8-3	168.0	331.0	97.02
DMDP8-4	142.0	392.0	176.05
DMDP8-5	224.0	435.0	94.19
N16-1	202.0	247.0	22.27
N16-2	231.0	274.0	18.61
N16-3	214.0	291.0	35.98
N16-4	213.0	266.0	24.88
N16-5	215.0	267.0	24.18
DM16-1	137.0	407.0	197.08
DM16-2	179.0	375.0	109.49
DM16-3	141.0	357.0	153.19
DM16-4	193.0	366.0	89.63
DM16-5	136.0	300.0	120.58
DMDP16-1	197.0	380.0	92.89
DMDP16-2	155.0	390.0	151.61
DMDP16-3	152.0	380.0	150.0
DMDP16-4	160.0	390.0	143.75
DMDP16-5	142.0	342.0	140.84

Data Berat Badan Tikus Tiap Minggu

Identitas	Berat Badan (gram) Pada minggu ke...								
	Awal	2	4	6	8	10	12	14	16
N8-1	205	211	202	191	181				
N8-2	212	184	211	203	174				
N8-3	195	186	204	185	145				
N8-4	220	193	214	187	169				
N8-5	208	184	211	175	166				
DM8-1	160	245	274	260	249				
DM8-2	161	240	269	289	300				
DM8-3	163	255	280	280	282				
DM8-4	211	303	331	343	358				
DM8-5	185	286	298	302	315				
DMDP8-1	146	235	282	305	330				
DMDP8-2	160	260	318	315	313				
DMDP8-3	168	228	257	287	331				
DMDP8-4	142	278	320	367	392				
DMDP8-5	224	330	350	391	435				
N16-1	202	317	337	347	350	365	393	263	247
N16-2	231	181	190	201	205	243	251	263	274
N16-3	214	183	185	185	216	234	252	279	291
N16-4	213	189	195	204	237	235	234	254	266
N16-5	215	183	201	225	235	241	252	256	267
DM16-1	137	258	265	265	301	327	355	370	407
DM16-2	179	264	287	287	305	316	325	366	375
DM16-3	141	230	261	261	269	275	295	290	357
DM16-4	193	275	290	290	305	304	308	336	366
DM16-5	136	254	284	284	303	316	332	370	300
DMDP16-1	197	305	340	340	372	351	318	334	380
DMDP16-2	155	264	300	300	320	343	359	392	390
DMDP16-3	152	223	236	236	225	219	225	224	380
DMDP16-4	160	260	318	318	349	365	380	417	390
DMDP16-5	142	231	252	252	275	290	304	315	342

Tes Normalitas Perubahan Berat Badan

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
bw_gain	.095	30	.200*	.958	30	.278

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tes Homogenitas Perubahan Berat Badan

Test of Homogeneity of Variances

bw_gain

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.208	5	24	.007

Tes Kruskal Wallis Perubahan Berat Badan

Test Statistics^{a,b}

	bw_gain
Chi-Square	25.145
df	5
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

Tes Mann Whitney Perubahan Berat badan

	N8	DM8	DMDP8	N16	DM16	DMDP16
N8		0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
DM8			0.009	0.009	0.009	0.009
DMDP8				0.009	0.602	0.465
N16					0.009	0.009
DM16						0.009
DMDP16						

Keterangan : signifikan, $p < 0.05$

 : tidak signifikan, $p > 0.05$

Paired-T Test untuk analisa Perubahan Berat badan awal dan akhir perlakuan

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	N8 - N8	4.10000E1	1.09545E1	4.89898E0	27.39825	54.60175	8.369	4	.001
Pair 2	DM8 - DM8	-1.24800E2	2.25655E1	1.00916E1	-152.81872	-96.78128	-12.367	4	.000
Pair 3	DMDP8 - DMDP8	-1.92200E2	3.92135E1	1.75368E1	-240.89001	-143.50999	-10.960	4	.000
Pair 4	N16 - N16	-5.40000E1	1.35647E1	6.06630E0	-70.84275	-37.15725	-8.902	4	.001
Pair 5	DM16 - DM16	-2.03800E2	4.22043E1	1.88743E1	-256.20352	-151.39648	-10.798	4	.000
Pair 6	DMDP16 - DMDP16	-2.15200E2	2.25987E1	1.01064E1	-243.25996	-187.14004	-21.293	4	.000



Lampiran 2. Kadar Glukosa Puasa, Insulin dan HOMA-IR Pada Minggu ke 5, 1 Minggu setelah Penyuntikan Streptozototin

Identitas	Glukosa Darah (mmol/L)	Insulin (µIU/mL)	HOMA-IR	Interpretasi
N8	7.33	1.23	0.641	Normal
DM8	8.27	3.41	2.001	Resistensi insulin
DMDP8	13.912	1.77	1.747	Resistensi insulin
N16	5.9	1.52	0.638	Normal
DM16	7.87	11.57	6.458	Resistensi insulin
DMDP16	18.42	2.34	3.061	Resistensi insulin

Kadar Glukosa Darah Sebelum Pemberian STZ, 7 Hari Setelah Pemberian STZ dan Pada Akhir Perlakuan

Identitas	Glukosa Darah (mg/dL)		Glukosa akhir perlakuan (mg/dL)	
	Minggu 4	Minggu 5	Minggu 8	Minggu 16
N8-1	93		89	
N8-2	82		92	
N8-3	102		96	
N8-4	90		95	
N8-5	82		100	
DM8-1	123	132	139	
DM8-2	132	139	150	
DM8-3	121	146	156	
DM8-4	118	154	178	
DM8-5	126	136	138	
DMDP8-1	136	205	95	
DMDP8-2	151	175	117	
DMDP8-3	103	136	99	
DMDP8-4	165	333	88	
DMDP8-5	104	165	92	
N16-1	122			85
N16-2	90			90
N16-3	100			98
N16-4	118			78
N16-5	77			72
DM16-1	88	148	164	148
DM16-2	122	139	184	139
DM16-3	118	137	162	136
DM16-4	114	138	153	141
DM16-5	130	146	133	146
DMDP16-1	191	456	191	95
DMDP16-2	118	230	118	83
DMDP16-3	294	462	294	112
DMDP16-4	114	175	114	96
DMDP16-5	171	335	171	104

Lampiran 3. Rata-rata Kadar Glukosa Puasa, Insulin dan HOMA-IR Akhir perlakuan

Identitas	Glukosa Darah (mg/mL)	Glukosa Darah (mmol/L)	Insulin (ng/dL)	Insulin (μIU/mL)	HOMA-IR
N8-1	89.0	4.94	4.18	1.20	0.42
N8-2	92.0	5.11	4.81	1.38	0.50
N8-3	96.0	5.33	5.04	1.45	0.54
N8-4	95.0	5.27	5.09	1.46	0.54
N8-5	100.0	5.55	4.68	1.34	0.53
DM8-1	139.0	7.72	14.85	4.27	2.34
DM8-2	150.0	8.33	11.3	3.25	1.92
DM8-3	156.0	8.66	11.43	3.29	2.02
DM8-4	178.0	9.88	10.27	2.95	2.07
DM8-5	138.0	7.66	12.61	3.63	1.97
DMDP8-1	95.0	5.27	6.59	1.89	0.71
DMDP8-2	117.0	6.5	5.8	1.67	0.77
DMDP8-3	99.0	5.5	5.61	1.61	0.63
DMDP8-4	88.0	4.88	5.34	1.53	0.53
DMDP8-5	92.0	5.11	5.08	1.46	0.53
N16-1	85.0	4.72	4.77	1.37	0.46
N16-2	90.0	5.0	5.17	1.48	0.52
N16-3	98.0	5.44	4.89	1.40	0.54
N16-4	78.0	4.33	5.13	1.47	0.45
N16-5	72.0	4.0	5.23	1.50	0.42
DM16-1	148.0	8.22	41.12	11.85	6.91
DM16-2	139.0	7.72	41.67	12.00	6.57
DM16-3	136.0	7.55	45.86	13.21	7.08
DM16-4	141.0	7.83	37.45	10.79	5.99
DM16-5	146.0	8.11	35.12	10.12	5.82
DMDP16-1	95.0	5.27	8.12	2.34	0.87
DMDP16-2	83.0	4.61	9.23	2.65	0.86
DMDP16-3	112.0	6.22	7.98	2.29	1.01
DMDP16-4	96.0	5.33	9.35	2.69	1.01
DMDP16-5	104.0	5.77	7.45	2.14	0.87

Tes Normalitas kadar glukosa puasa, insulin dan HOMA-IR

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kgd_mmol	.228	30	.000	.893	30	.006
insulin_mcU	.306	30	.000	.640	30	.000
HOMAIR	.315	30	.000	.651	30	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Tes Homogenitas kadar glukosa puasa, insulin dan HOMA-IR

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
kgd_mmol	1.378	5	24	.268
insulin_mcU	6.766	5	24	.000
HOMAIR	12.280	5	24	.000

Kruskal Wallis Test pada kadar glukosa puasa, insulin dan HOMA-IR

Test Statistics^{a,b}

	kgd_mmol	insulin_mcU	HOMAIR
Chi-Square	21.511	27.080	26.440
df	5	5	5
Asymp. Sig.	.001	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Tes Mann Whitney kadar glukosa puasa, insulin dan HOMA-IR

Kadar glukosa darah puasa

(a)	N8	DM8	DMDP8	N16	DM16	DMDP16
N8		0.009	0.916	0.117	0.009	0.462
DM8			0.009	0.009	0.295	0.009
DMDP8				0.076	0.009	0.834
N16					0.009	0.117
DM16						0.009
DMDP16						

Insulin Puasa

(a)	N8	DM8	DMDP8	N16	DM16	DMDP16
N8		0.009	0.016	0.117	0.009	0.009
DM8			0.009	0.009	0.009	0.008
DMDP8				0.047	0.009	0.009
N16					0.009	0.009
DM16						0.009
DMDP16						

a.
HOMAIR

(a)	N8	DM8	DMDP8	N16	DM16	DMDP16
N8		0.009	0.117	0.347	0.009	0.016
DM8			0.009	0.009	0.009	0.009
DMDP8				0.028	0.009	0.009
N16					0.009	0.009
DM16						0.009
DMDP16						

Keterangan : signifikan, $p < 0.05$

 : tidak signifikan, $p > 0.05$



Lampiran 4. Ekspresi IL-1 β dan IL-6 Jantung Tikus Sprague-Dawley

Identitas	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
N8-1	555.74	574.36
N8-2	491.11	505.84
N8-3	555.75	561.97
N8-4	560.15	567.84
N8-5	549.01	537.51
DM8-1	700.89	804.68
DM8-2	820.08	1277.55
DM8-3	1030.06	1586.58
DM8-4	787.21	912.60
DM8-5	961.41	1608.15
DMDP8-1	724.61	772.89
DMDP8-2	774.15	897.21
DMDP8-3	880.58	972.53
DMDP8-4	752.55	819.87
DMDP8-5	770.66	876.64
N16-1	925.02	1039.41
N16-2	870.85	957.30
N16-3	845.86	920.88
N16-4	813.45	945.08
N16-5	738.36	869.91
DM16-1	1315.06	1236.15
DM16-2	1667.21	1902.69
DM16-3	1372.59	1625.86
DM16-4	1115.69	1718.03
DM16-5	1398.15	1654.89
DMDP16-1	931.58	1036.40
DMDP16-2	979.07	1096.18
DMDP16-3	1125.23	1323.63
DMDP16-4	1166.58	1438.15
DMDP16-5	1166.84	2138.23

Tes Normalitas Ekspresi IL-1 β dan IL-6 periode perlakuan 8 minggu

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL1b	.184	15	.181	.942	15	.402
IL6	.203	15	.098	.855	15	.020

a. Lilliefors Significance Correction

Tes Homogenitas Ekspresi IL-1 β dan IL-6 periode perlakuan 8 minggu

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IL1b	6.532	2	12	.012
IL6	13.953	2	12	.001

Tes ANOVA Pengaruh Pemberian Darapladib selama 8 minggu pada ekspresi IL-1 β dan IL-6 Jantung Tikus Sprague-Dawley model DMT2

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IL1b	Between Groups	273136.940	2	136568.470	18.452	.000
	Within Groups	88815.735	12	7401.311		
	Total	361952.675	14			
IL6	Between Groups	1186990.619	2	593495.310	12.277	.001
	Within Groups	580103.229	12	48341.936		
	Total	1767093.848	14			

Tes Post Hoc Tukey Method

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference	Std. Error	Sig.
				(I-J)		
IL1b	Tukey HSD	1.00	3.00	-317.57740*	54.41070	.000
			5.00	-238.15827*	54.41070	.002
		3.00	1.00	317.57740*	54.41070	.000
			5.00	79.41913	54.41070	.344
			5.00	238.15827*	54.41070	.002

IL6	Tukey HSD	1.00	3.00	-79.41913	54.41070	.344
			3.00	-688.40640*	139.05673	.001
			5.00	-318.32547	139.05673	.096
		3.00	1.00	688.40640*	139.05673	.001
			5.00	370.08093	139.05673	.051
			1.00	318.32547	139.05673	.096
		5.00	3.00	-370.08093	139.05673	.051

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) kelompok	(J) kelompok	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
IL1b	Tukey HSD	1.00	3.00	-462.7377	-172.4171
			5.00	-383.3186	-92.9979
			3.00	172.4171	462.7377
		3.00	1.00	172.4171	462.7377
			5.00	-65.7412	224.5795
			5.00	92.9979	383.3186
IL6	Tukey HSD	1.00	3.00	-1059.3908	-317.4220
			5.00	-689.3099	52.6589
			3.00	317.4220	1059.3908
		3.00	1.00	317.4220	1059.3908
			5.00	-.9035	741.0653
			5.00	-52.6589	689.3099
		5.00	3.00	-741.0653	.9035

Tes Normalitas Ekspresi IL-1 β dan IL-6 periode perlakuan 16 minggu

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL1b	.184	15	.181	.942	15	.402
IL6	.203	15	.098	.855	15	.020

Tes Homogenitas Ekspresi IL-1 β dan IL-6 periode perlakuan 16 minggu

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IL1b	1.408	2	12	.282
IL6	2.433	2	12	.130

Tes ANOVA Pengaruh Pemberian Darapladib selama 16 minggu pada ekspresi IL-1 β dan IL-6 Jantung Tikus Sprague-Dawley model DMT2

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IL1b	Between Groups	730897.473	2	365448.737	8.465	.005
	Within Groups	518081.331	12	43173.444		
	Total	1248978.804	14			
IL6	Between Groups	1207023.444	2	603511.722	7.033	.010
	Within Groups	1029674.788	12	85806.232		
	Total	2236698.232	14			

Test Post Hoc Tukey Method

Multiple Comparisons

				Mean Difference	Std. Error	Sig.
Dependent Variable		(I) kelompok	(J) kelompok	(I-J)		
IL1b	Tukey HSD	2.00	4.00	-535.03160*	131.41300	.004
			6.00	-335.15553	131.41300	.061
		4.00	2.00	535.03160*	131.41300	.004
			6.00	199.87606	131.41300	.316
		6.00	2.00	335.15553	131.41300	.061
			4.00	-199.87606	131.41300	.316
IL6	Tukey HSD	2.00	4.00	-681.00600*	185.26331	.008
			6.00	-460.00260	185.26331	.069
		4.00	2.00	681.00600*	185.26331	.008
			6.00	221.00340	185.26331	.479
		6.00	2.00	460.00260	185.26331	.069
			4.00	-221.00340	185.26331	.479

95% Confidence Interval

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5. Surat Pernyataan Kelaikan Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

No: 229-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	PERUBAHAN EKSPRESI <i>Lipoprotein Associated Phospholipase A2 Dan Lysophosphatidylcholine</i> DALAM PERKEMBANGAN AWAL ATROSKLEROSIS PADA MODEL DIABETES MELLITUS TIPE 2 DAN DISLIPIDEMIA
PENELITI UTAMA	: TEUKU HERIANSYAH
ANGGOTA	: TITIN ANDRI WIHASTUTI ROSARIA DIAN L YUNI HENDRATI SULFIA ZUHROTUS SHOLICAH NURUL CHOLIFAH LUTFIANA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 4 Agustus 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 6. Bukti Acceptance Jurnal Internasional

From: **PARIAL** <editorparial@gmail.com>

Date: 5 November 2017 at 12:31

Subject: Re: Online Submission Request

Dear Author

Department of Biomedicine, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang, Veteran street 1, Malang, East Java, Indonesia 65145

Subject: Acceptance letter of article manuscript Number (JPR_17_425)

The Editorial Board of Journal of Pharmacy Research is pleased to inform you that your manuscript Number (JPR_17_425) entitled

THE EFFECT OF DARAPLADIB AS AN LP-PLA2 INHIBITOR TO INTERLEUKIN-1 β AND INTERLEUKIN-6 ON DIABETES MELLITUS SPRAGUE-DAWLEY RAT MODEL: A NEW THERAPEUTIC TARGET OF DIABETES MELLITUS TO DECREASE CARDIOVASCULAR RISK

is acceptable for publication in Journal of Pharmacy Research (<http://jpr solutions.info/>).

And your article is scheduled to publish in Nov issue 2017; to expedite the process of online publication of your article please deposit or remit the publication charge **[150 USD]** and (send back the payment details through return mail once payment is made). You can send us the payment by Western Union money transfer in the name of

Name : Susmita Parial

Proof of Identity : PAN CARD (issued by income tax office ,Govt of India)

Father name : S K Mukherjee

Address: JPR solutions,42 First floor,Maa Shimla Homes.Kharar-140301,Punjab,India

With regards,

EDITORIAL TEAM

Journal of Pharmacy Research

<http://jpr solutions.info/>

Prof. Swapnadeep Parial

PARIAL



RIWAYAT HIDUP

Rosaria Dian Lestari, lahir pada tanggal 6 Februari 1985 di Surabaya, merupakan anak pertama dari Bapak Ir. H. Midyansyah Baslan dan Ibu Hj. Sri Lestari Fatima. Lulus dari SDN Lowokwaru IV Malang pada tahun 1997, lulus dari SMPN 5 Malang pada tahun 2000, dan lulus dari SMUN 3 Malang pada tahun 2003. Pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan lulus dengan mendapatkan gelar dokter (dr.) pada tahun 2009. Pada tahun 2016 mengambil Program Magister Ilmu Biomedik pada Universitas Brawijaya Malang dan selesai ujian akhir pada tanggal 6 Januari 2018. Bekerja sebagai dokter umum pada RSUD Prasetya Husada, BLK Lawang, dan tim Telemedicine FKUB Malang pada tahun 2010-2011. Sejak tahun 2011-saat ini bekerja sebagai dosen pada Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Malang, Februari 2018

