

Aktivitas Makrofag Meningkat Pada Aorta Tikus Hiperkolesterolemia

Neng Fisher Kurniati,¹ Maritsa Nurfatwa,^{1,2} Aluicia Anita Artarini³

¹Farmakologi-Farmasi Klinik, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Indonesia ²Program Studi Farmasi, STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya, ³Farmasetika, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung, Indonesia

Abstrak

Aterosklerosis merupakan, kondisi inflamasi kronik, faktor resiko penyakit kardiovaskular disebabkan oleh tingginya kadar kolesterol. Tujuan penelitian ini mengevaluasi peran mieloperoksidase (MPO) dan makrofag di aorta dan jantung tikus yang diinduksi hiperkolesterolemia. Penelitian ini dilakukan pada Maret–Agustus 2016 di Laboratorium Farmakologi dan Bioteknologi Institut Teknologi Bandung. Tikus dikelompokkan menjadi kelompok normal dan hiperkolesterolemia. Induksi hiperkolesterolemia dilakukan dengan pemberian pakan tinggi kolesterol, kolesterol murni, asam kolat dan propiltiourasil (KKT) selama 5 bulan. Kolesterol total diukur sebelum induksi, pertengahan, dan setelah induksi. HDL, trigliserida (TG), LDL, indeks aterogenik (IA), jumlah sel darah merah dan sel darah putih diukur setelah induksi. Deteksi ekspresi mieloperoksidase (MPO) dan CD68 pada aorta dan jantung dilakukan dengan metode *dot blot* dan ELISA. Induksi hiperkolesterolemia selama 5 bulan menghasilkan kadar kolesterol total ($364,10 \pm 148,46$ mg/dL), HDL ($7,90 \pm 1,29$ mg/dL), LDL ($307,47 \pm 116,91$ mg/dL), dan Indeks Aterogenik ($1,04 \pm 0,23$). Kadar kolesterol yang tinggi meningkatkan jumlah sel darah putih yang bersirkulasi namun tidak mempengaruhi jumlah sel darah merah. Jumlah makrofag yang berada di jaringan aorta dan jantung kelompok hiperkolesterolemia meningkat secara signifikan dibanding dengan kelompok normal. Namun, peningkatan aktivitas makrofag yang diukur dari ekspresi MPO hanya teramati pada aorta hewan hiperkolesterolemia, tidak pada jantung. Simpulan, aktivitas makrofag meningkat hanya pada aorta hewan hiperkolesterolemia diduga berperan dalam pembentukan plak ateroma di aorta.

Kata kunci: Aorta, CD68, hiperkolesterolemia, makrofag, mieloperoksidase

Macrophage Activity Increases in Hypercholesterolemia Rat Aorta

Abstract

Atherosclerosis, which is an inflammatory chronic condition, is one of the major risk factors of cardiovascular disease caused by hypercholesterolemia. This study aimed to evaluate role of myeloperoxidase (MPO) and macrophage in aorta and heart of rat hypercholesterolemia. This research was conducted in March–August 2016 at Pharmacology and Biotechnology Laboratory of Institut Teknologi Bandung. Rats were divided into normal and hypercholesterolemia groups. Hypercholesterolemia was induced by cholesterol feeding and CCT (cholesterol, cholic acid and propiltiourasil) oral administration for 5 months. Total cholesterol was measured before induction (T0), in the middle (T2.5), and after induction (T5). HDL, triglyceride (TG), LDL, aterogenic index (IA), red blood, and white blood cell count was measured after induction (T5). Success of induction was proven by the elevation of cholesterol total value of hypercholesterolemia group compared to normal group. Myeloperoxidase (MPO) and CD68 in aorta and heart hypercholesterolemia rat was detected by dot blot and ELISA method. Hypercholesterolemia group showed significant differences in total cholesterol value (364.10 ± 148.46 mg/dL), HDL value (7.90 ± 1.29 mg/dL), LDL value (307.47 ± 116.91) and Atherogenic Index (1.04 ± 0.23). High level of cholesterol increases circulating white blood cells but have no effect on circulating red blood cells. Macrophage in the hypercholesterolemia group increased significantly compared to the normal group. However, the increase in macrophage activity identified through MPO expression was only seen in hypercholesterolemic aorta but not in the heart. It is concluded that macrophage activities increase in the aortic tissue, but not in the heart tissue of the hypercholesterolemia group, which may contribute to the formation of atheroma plaque in aorta.

Key words: Aorta, CD68, hypercholesterolemia, macrophage, myeloperoxidase

Korespondensi: Maritsa Nurfatwa, M.Si., Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada Tasikmalaya Program Studi Farmasi, Jalan Cilolohan No. 36 Tasikmalaya, *E-mail:* maritsa.nurfatwa@gmail.com

Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia. Setiap tahunnya lebih dari 36 juta orang meninggal karena penyakit tidak menular (63% dari seluruh kematian). Lebih dari 9 juta kematian yang disebabkan oleh penyakit tidak menular terjadi sebelum usia 60 tahun. Secara global penyakit tidak menular penyebab kematian nomor satu setiap tahunnya adalah penyakit kardiovaskular. Penyakit kardiovaskular adalah penyakit yang disebabkan oleh gangguan fungsi jantung dan pembuluh darah, seperti: penyakit jantung koroner, penyakit gagal jantung, hipertensi dan stroke.¹

Aterosklerosis merupakan penyebab utama penyakit kardiovaskular. Aterosklerosis ialah suatu proses inflamasi kronik pada dinding arteri ditandai dengan disfungsi endotel dan pembentukan sel busa pada plak aterosklerosis. Faktor-faktor yang memiliki pengaruh terhadap perkembangan aterosklerosis tersebut termasuk pada usia, hipertensi, jenis kelamin, diabetes melitus, merokok, obesitas, dan dislipidemia.² Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi karena makrofag yang berasal dari monosit dan limfosit merupakan hasil dari proses inflamasi. Sel imun mendominasi lesi aterosklerosis awal dan juga molekul efektor sel imun mempercepat progresi lesi.³

Inflamasi berperan dalam setiap tahapan aterosklerosis mulai dari perkembangan plak sampai plak pecah yang dapat menyebabkan trombosis. Plak aterosklerosis dapat stabil, namun dapat juga tidak stabil. Plak yang pecah akan dapat menyebabkan komplikasi penyakit kardiovaskular. Pembentukan aterosklerosis terdiri atas beberapa fase. Fase awal terjadi akumulasi serta modifikasi lipid (oksidasi, agregasi, dan proteolisis) dalam dinding arteri dan selanjutnya terjadi rekrutmen elemen-elemen inflamasi seperti monosit ke dalam tunika intima dinding pembuluh darah arteri. Monosit yang telah memasuki dinding arteri akan berdiferensiasi menjadi makrofag dan mengambil *Low density lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi melalui reseptor *scavenger*. Hasil fagositosis makrofag akan membentuk sel busa yang selanjutnya akan menjadi "*fatty streak*".

Low density lipoprotein atau lipoprotein densitas rendah yang teroksidasi merupakan faktor yang sangat penting dalam pembentukan aterosklerosis. LDL yang telah teroksidasi dapat dikenali oleh reseptor *scavenger* makrofag tetapi tidak dikenali oleh reseptor LDL. Pengambilan

LDL yang termodifikasi oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* dapat mengakibatkan akumulasi kolesterol yang selanjutnya tersimpan di dalam bentuk titik-titik lemak sehingga makrofag berubah menjadi sel-sel menyerupai sel busa.⁴ CD68 telah digunakan secara luas untuk mengidentifikasi sel monosit/makrofag pada kondisi normal dan patologi.⁵ CD68 telah digunakan secara umum sebagai penanda untuk sel monosit/makrofag origin pada diagnosis menggunakan analisis imunohistokimia. CD68 adalah penanda makrofag yang sering digunakan pada pengujian aterosklerosis pada murin.⁶

Mieloperoksidase (MPO) merupakan enzim yang terekspresi pada granula primer subspecies leukosit termasuk neutrofil dan juga makrofag. Mieloperoksidase ialah enzim yang mengkatalisis pembentukan beberapa *reactive oxidant species* berkontribusi terhadap kerusakan jaringan pada saat terjadi inflamasi. Reaksi yang dikatalisis MPO dikaitkan terhadap aktivitas proaterogenik selama evolusi penyakit kardiovaskular, pada tahap inisiasi, propagasi, dan juga komplikasi akut proses aterosklerosis. Mieloperoksidase atau MPO mewakili target untuk prognostik serta intervensi terapeutik dalam penanganan penyakit kardiovaskular yang diakibatkan oleh aterosklerosis.⁷ Penelitian ini bertujuan mengevaluasi ekspresi MPO serta makrofag melalui glikoprotein yang diekspresikannya, yaitu CD68 di aorta dan jantung tikus yang diinduksi hiperkolesterolemia selama 5 bulan sebagai pembentuk model hewan aterosklerosis.

Metode

Hewan uji didapatkan dari laboratorium hewan Institut Teknologi Bandung. Digunakan tikus wistar jantan berusia 10–12 minggu dengan berat badan rata-rata 300–400 g sebanyak 18 ekor. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret–Agustus 2016 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Bioteknologi Institut Teknologi Bandung dan telah disetujui oleh komisi etik penggunaan hewan percobaan Institut Teknologi Bandung No. 05/KEPHP-ITB/08-2016. Hewan uji dibagi menjadi dua kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus. Kelompok normal tidak diberi perlakuan apapun kecuali pemberian pakan normal. Kelompok hiperkolesterolemia diberikan pakan yang tinggi kolesterol serta asam kolat, kolesterol murni, dan propiltiourasil.

Hewan induksi hiperkolesterolemia diberikan pakan tinggi kolesterol dan air minum secara *ad*

libitum, propiltiourasil (PTU) 12,5 mg/kg bobot tikus, kolesterol murni 200 mg/kg bb tikus, dan asam kolat 0,1% (dari asumsi berat makanan 15 g/200 g bobot tikus) selama 5 bulan.

Kadar kolesterol total diukur dari serum hewan uji. Serum sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga dan ditambahkan 500 µL reagen kolesterol total (PT Rajawali Nusindo). Kadar kolesterol total tersebut diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.

Kadar trigliserida diukur memakai serum hewan uji sebanyak 5 µL ke dalam tabung mikrosentrifuga kemudian ditambahkan 500 µL reagen trigliserida (PT Rajawali Nusindo). Kadar trigliserida tersebut diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm. Pengukuran kadar HDL dilakukan dengan serum sebanyak 50 µL ke dalam tabung mikrosentrifuga dan juga ditambahkan dengan 100 µL reagen HDL (PT Rajawali Nusindo). Tabung mikrosentrifuga itu lalu dihomogenisasi menggunakan vortex serta diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya, tabung mikrosentrifuga disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan 50 µL dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan 500 µL reagen kolesterol. Kadar HDL diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm. Penentuan kadar LDL dilakukan menggunakan rumus Friedewald:

$$LDL-c = (Total-c) - (HDL-c) - (TG/5)$$

Indeks Aterogenik Plasma dihitung dengan rumus:

$$IAP = \text{Log} (TG/HDL)$$

Jumlah sel darah merah dan sel darah putih dihitung menggunakan *hemacytometer*. Darah hewan uji diencerkan dengan penambahan natrium sitrat 2,5% (1:200), lalu diteteskan ke atas *hemacytometer* dan jumlah sel darah merah dihitung di bawah mikroskop. Darah hewan uji diencerkan dengan penambahan asam asetat 0,1% (1:20) lalu diteteskan ke atas *hemacytometer* dan jumlah sel darah putih dihitung di bawah mikroskop. Hewan diisolasi aorta dan jantungnya dalam keadaan dingin. Aorta dan juga jantung diletakkan pada tabung mikrosentrifuga, lalu dimasukkan ke dalam nitrogen cair.

Aorta dan jantung yang telah beku digerus dan ditambahkan 300 µL PBS. Sampel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20 °C untuk

dilakukan pengujian mempergunakan metode ELISA.

Mikroplat (bioassay technology laboratory) telah dilapisi antibodi yang dapat berikatan dengan CD68 makrofag. Seri standar (28 ng/mL, 14 ng/mL, 7 ng/mL, 3,5 ng/mL, dan 1,75 ng/mL) dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada mikroplat sebanyak 50 µL. Sampel dimasukkan ke dalam mikroplat sebanyak 40 µL, ditambahkan 10 µL antibody anti CD68 ke dalam sumur tiap-tiap sampel. Ditambahkan 50 µL Streptavidin-HRP pada sumur berisi standar dan sampel. Mikroplat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Mikroplat dicuci menggunakan *wash buffer* sebanyak 5 kali. *Chromogen A* dan *B* ditambahkan pada setiap sumur di tempat terlindung dari cahaya dan diinkubasi selama 10 menit pada 37 °C. *Stop solution* 50 µL ditambahkan ke dalam sumur. *Optical Density* (OD) standar dan sampel diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi didapatkan dari hasil plot kurva OD pada sumbu y dan konsentrasi pada sumbu x.

Aorta dan jantung yang telah beku diambil 5 mg, lalu dimasukkan ke dalam *cryotube* dan ditambahkan 300 µL bufer lisis (50 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 1 mM PMSF). Sampel dihomogenisasi dengan sonikator selama 5 menit dengan siklus 30 detik *on-off*. Sampel dipindahkan ke dalam tabung dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan disimpan pada suhu -20°C.

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan uji Bradford. Reagen Bradford diencerkan dalam PBS dengan perbandingan 1:4. Protein standar BSA dalam berbagai konsentrasi (200, 400, 600, 800, 1.250, 1.500, 2.000 ng/µL) disiapkan dalam PBS. Sebanyak 5 µL berbagai konsentrasi standar dan sampel dimasukkan ke dalam mikroplat lalu ditambahkan 200 µL reagen Bradford dalam PBS. Mikroplat diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada 595 nm. Konsentrasi protein diperoleh dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap absorbansi standar.

Sampel protein total dari aorta dan jantung sebanyak 8 µg masing-masing ditotolkan pada membran nitroselulosa. Membran nitroselulosa direndam pada *blocking solution* (5% susu skim dan 0,1% *tween 20* dalam TBS) selama 30 menit pada *shaker* suhu ruang (25 °C) kecepatan yang rendah (75 rpm). Antibodi primer MPO (1:1.000) ditambahkan pada *blocking solution* dan diinkubasi selama 3 jam pada inkubator goyang pada suhu 25 °C. Membran nitroselulosa

dicuci menggunakan larutan *tris-buffered saline-tween* (TBS-T) (TBS ditambahkan dengan 0,1% tween 20) sebanyak 3 kali di mana yang ketiga kalinya selama 5 menit dalam inkubator goyang. Membran nitroselulosa kemudian diinkubasi dalam antibodi sekunder dalam *blocking solution* (1:4.000) selama 1 jam pada inkubator goyang suhu 25 °C. Lalu dilakukan pencucian membran dengan cara yang sama menggunakan larutan TBS-T. Visualisasi membran dilakukan menggunakan larutan NBT (3,3 mg) dalam 70% DMF dan BCIP (1,65 mg) dalam 100% DMF yang dilarutkan dalam 10 mL bufer alkalin fosfatase (0,1 M Tris HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; dan 5 mM MgCl₂ dalam aquadest) dan terlindung dari cahaya. Reaksi pewarnaan dihentikan dengan cara menambahkan 20 mM EDTA dalam 10 mL TBS.

Hasil data percobaan dianalisis menggunakan SPSS 21.0. Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata ± standar deviasi. Perbandingan data antarkelompok dianalisis memakai *student t-test* dengan tingkat kepercayaan 95%. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan secara bermakna dan nilai $p > 0,05$ memperlihatkan perbedaan tidak bermakna.

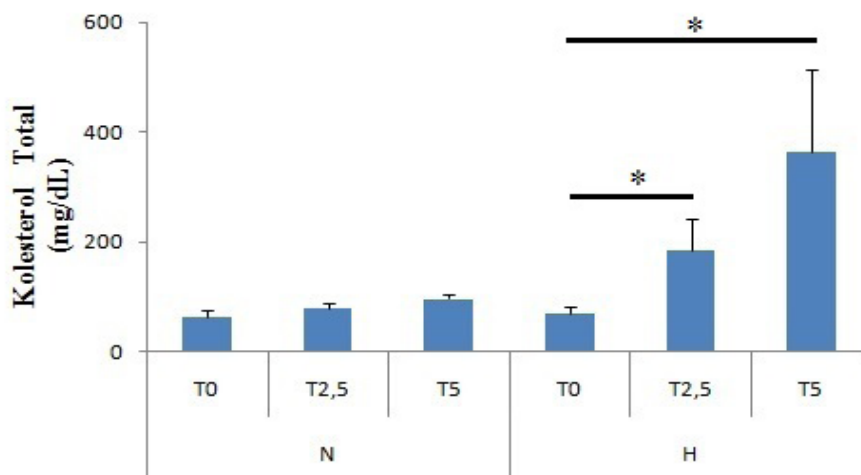
Hasil

Pada Gambar 1 menunjukkan perubahan kadar kolesterol total pada kelompok normal dan kelompok hiperkolesterolemia pada sebelum

induksi, 2,5 bulan dan 5 bulan setelah induksi. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar kolesterol total kelompok normal selama periode penelitian. Terjadi peningkatan yang signifikan terhadap kadar kolesterol kelompok hiperkolesterolemia. Kadar kolesterol total yang semakin meningkat dengan semakin lamanya periode pemberian induksi hiperkolesterolemia. Kadar kolesterol total yang paling tinggi didapatkan dari induksi setelah 5 bulan pada kelompok hiperkolesterolemia. Peningkatan kadar kolesterol total tersebut menandakan keberhasilan dari induksi selama kurun waktu 5 bulan.

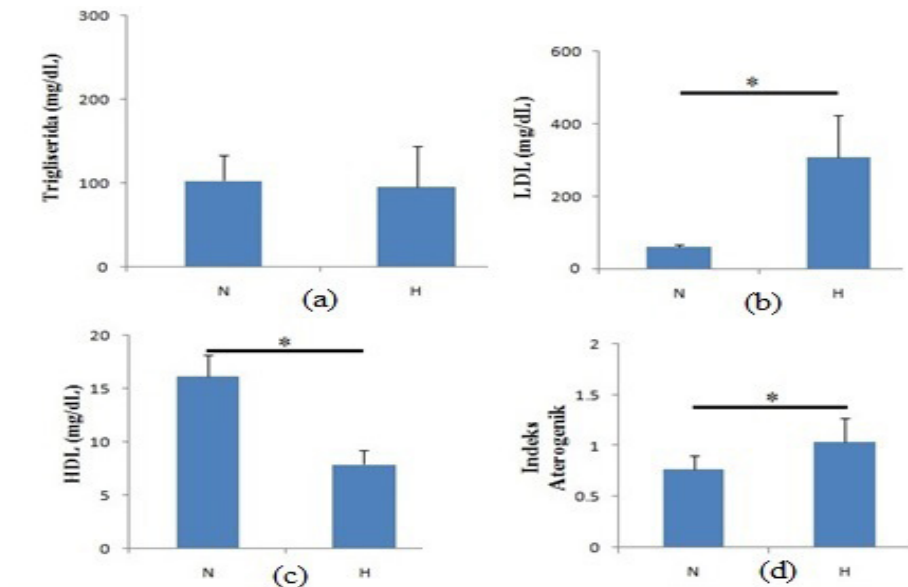
Pada Gambar 2 menunjukkan perbandingan kadar TG, LDL, HDL dan IAP pada kelompok normal dan hiperkolesterolemia setelah periode penelitian 5 bulan. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar TG kelompok hiperkolesterolemia dibanding dengan kelompok normal. Didapatkan kadar LDL dan nilai IAP yang lebih tinggi pada kelompok hiperkolesterolemia dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok normal. Namun, telah didapatkan kadar HDL yang lebih rendah daripada kelompok hiperkolesterolemia dan tetap berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok normal. Induksi selama 5 bulan mampu meningkatkan kadar LDL dan IAP, namun menurunkan kadar HDL kelompok hiperkolesterolemia.

Gambar 3 memperlihatkan tentang kadar makrofag di aorta serta jantung kelompok hiperkolesterolemia apabila dibanding dengan



Gambar 1 Profil Kolesterol Total Normal (n); Hiperkolesterolemia (H).

Sebelum Induksi (T0); 2,5 bulan (T2,5); 5 bulan (T5). n=8-10. Student T-Test; * $p < 0,005$. Terjadi Peningkatan Kadar Koleksterol Total yang Signifikan Setelah 2,5 dan 5 Bulan Induksi Pada Kelompok Hiperkolesterolemia



Gambar 2 Profil TG(a); LDL (b); HDL (c); IA (d)

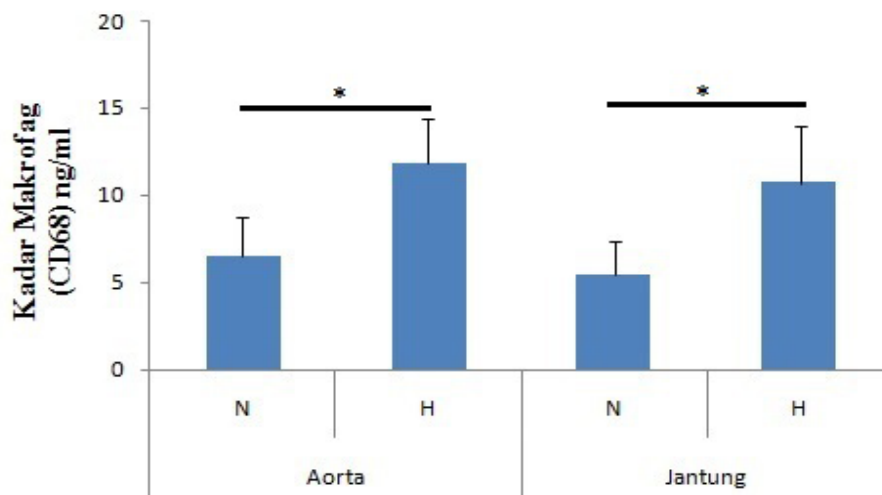
Kelompok normal (N) hiperkolesterolemia (H); n=8-10; Student t-test; *p<0,05.

Terjadi Peningkatan Kadar LDL dan Indeks Aterogenik, serta Penurunan Kadar HDL yang Signifikan Pada Kelompok Hiperkolesterolemia

kelompok normal setelah lima bulan periode penelitian. Kadar makrofag baik pada aorta maupun jantung kelompok hiperkolesterolemia didapatkan lebih tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok normal.

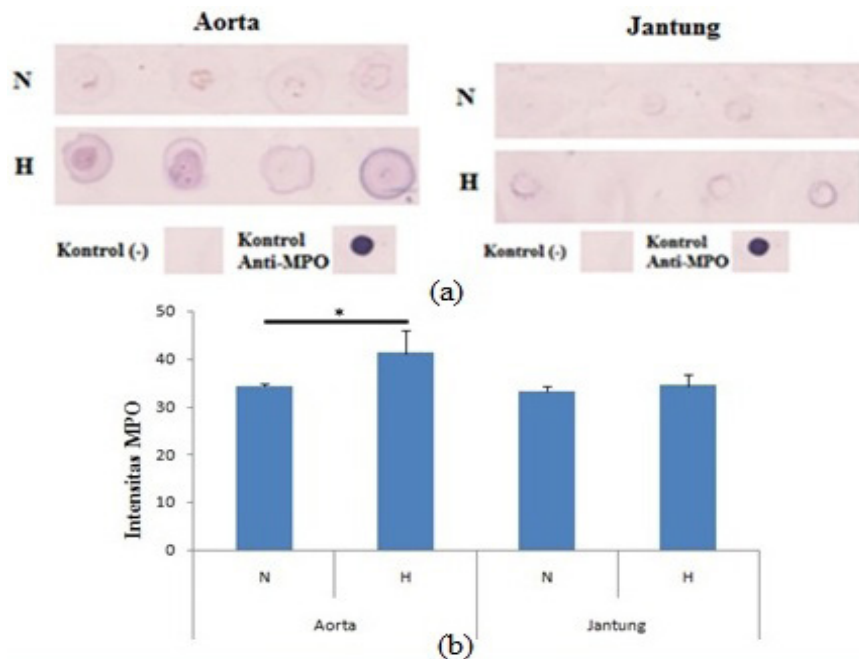
Pembahasan

Penelitian Kurniati dkk.⁹ menyatakan model aterosklerosis dengan induksi pakan tinggi kolesterol dan KKT dengan siklus tiga minggu



Gambar 3 Kadar Magrofah di Aorta dan Jantung Kelompk Normal (n) dan Hiperkolesterolemia (H) Setelah 5 Bulan Induksi.

n=4_5; Student t-test; *p<0,05. Terjadi Peningkatan Jumlah Makrofag yang Signifikan pada Aorta dan Jantung Kelompok Hiperkolesterolemia



Gambar 4 Ekspresi MPO dengan Metode Dot Blot (a) Kuantifikasi Ekspresi MPO dengan ImageJ (B) pada Kelompok Normal (n) dan Hiperkolesterolemia (H) Setelah 5 Bulan Induksi.

n=4_5; Student t-test; *p<0,05. Hanya Terjadi Peningkatan Ekspresi MPO yang Signifikan di Aorta Kelompok Hiperkolesterolemia

induksi, 1–2 minggu induksi dihentikan, lalu dilanjutkan induksi 3 minggu lagi hingga 3 siklus dapat menyebabkan penebalan pada dinding aorta (tahap awal pembentukan aterosklerosis). Penambahan asam kolat dapat meningkatkan absorpsi kolesterol dan juga lemak, menekan perubahan kolesterol menjadi asam empedu sehingga akan menurunkan eliminasi kolesterol dan meningkatkan kadar kolesterol dalam darah karena tikus memiliki proporsi HDL yang lebih besar dibandingkan dengan LDL.¹⁰ Propiltiourasil adalah inhibitor sintesis hormon tiroid yang dapat menurunkan ekspresi reseptor LDL dan menjaga LDL tetap bersirkulasi dalam darah.¹¹ KKT yang diberikan terdiri dari asam kolat 0,2% dari berat makanan, kolesterol murni 200 mg/kg bobot, dan propiltiourasil 12,5 mg/kg bobot. Maka pemberian pakan tinggi kolesterol disertai KKT yang sama dengan penelitian sebelumnya, kecuali asam kolat yang diturunkan menjadi 0,1% untuk menghindari penurunan berat badan yang drastis pada hewan uji selama 5 bulan diharapkan dapat meningkatkan tahapan perkembangan aterosklerosis pada hewan uji.

Induksi pada kelompok hiperkolesterolemia selama 2,5 bulan (T2,5) dan 5 bulan (T5) sudah

dapat menghasilkan perbedaan yang bermakna bila dibanding dengan kadar kolesterol total kelompok hiperkolesterolemia sebelum induksi (T0).

Kadar LDL (T5) kelompok hiperkolesterolemia berbeda bermakna dengan kadar LDL kelompok normal. Manifestasi klinis dari aterosklerosis berkaitan langsung dengan LDL teroksidasi yang menginisiasi respon inflamasi dan menyebabkan perkembangan *fatty streak*. Progresi lesi berkaitan dengan kalsifikasi yang mengubah karakteristik dinding pembuluh darah arteri dan memengaruhi pecahnya plak pada tempat infiltrasi monosit. Aterosklerosis terinduksi pada beberapa spesies oleh mutasi yang melibatkan gen tunggal reseptor LDL dan menegaskan bahwa peningkatan kadar LDL cukup untuk menginduksi semua komponen yang menyebabkan pembentukan aterosklerosis.¹²

Perbedaan yang bermakna kadar HDL hewan uji setelah 5 bulan dengan kadar HDL kelompok normal ($16,17 \pm 2,04$) lebih tinggi dan juga berbeda bermakna dengan kelompok hiperkolesterolemia ($7,90 \pm 1,29$) menunjukkan keberhasilan induksi (Gambar 2). HDL adalah kolesterol utama yang bersirkulasi terhadap

tikus, sedangkan LDL adalah kolesterol utama yang bersirkulasi pada manusia. Tikus tidak secara signifikan mengabsorpsi pakan tinggi kolesterol bila dibanding dengan manusia yang mengabsorpsi sekitar 50% makanan tinggi kolesterol.¹¹

Indeks aterogenik (IA) didapatkan dari perhitungan $\log(TG/HDL)$. Indeks aterogenik pada kelompok hiperkolesterolemia ($1,04 \pm 0,23$) lebih tinggi dan berbeda bermakna dengan IA kelompok normal ($0,77 \pm 0,13$) menunjukkan kelompok hiperkolesterolemia itu mempunyai resiko yang cukup tinggi untuk mengalami penyakit kardiovaskular. Indeks aterogenik (IA) didapatkan dari perhitungan $\log(TG/HDL)$. Terdapat korelasi antara nilai indeks aterogenik plasma dan kecepatan esterifikasi kolesterol pada apoB-lipoprotein dan ukuran partikel lipoprotein dapat dijadikan penanda aterogenisitas plasma.¹³

Tidak terdapat variasi yang signifikan jumlah sel darah merah. Terdapat perbedaan bermakna pada jumlah sel darah putih pada kelompok normal ($35,45 \pm 7,13$) dengan kelompok hiperkolesterolemia ($27,72 \pm 5,36$). Jumlah sel darah putih kelompok hiperkolesterolemia yang lebih kecil daripada kelompok normal berkaitan dengan hiperkolesterolemia mempunyai efek penurunan terhadap monosit yang bersirkulasi dalam pembuluh darah yang berkaitan dengan efek proaterogenik, yaitu perpindahan monosit dari sirkulasi ke dinding endotelium pembuluh darah.¹⁴

Kadar makrofag yang sudah diidentifikasi melalui glikoprotein CD68 itu memperlihatkan perbedaan bermakna pada aorta kelompok hiperkolesterolemia ($11,86 \pm 2,58$ ng/mL) apabila dibanding dengan kelompok normal ($6,52 \pm 2,28$ ng/mL). Makrofag yang mati setelah mengeliminasi LDL yang teroksidasi akan membentuk sel busa yang pada akhirnya akan membentuk lapisan lemak.¹⁵ Sel busa merupakan penanda aterosklerosis maka kadar makrofag pada aorta kelompok hiperkolesterolemia yang tinggi dapat dikaitkan dengan kejadian aterosklerosis.

Kadar makrofag pada jantung kelompok hiperkolesterolemia ($10,71 \pm 3,31$ ng/mL) juga menunjukkan hasil yang sama seperti pada aorta yaitu dengan kadar yang lebih tinggi dan berbeda bermakna dengan kelompok normal ($5,40 \pm 1,94$ ng/mL). Monosit dan juga makrofag terdapat dan terakumulasi pada jantung yang sehat dan terluka, beberapa bagian berperan pada proses inflamasi dan beberapa bagian yang lain membantu perbaikan jaringan, nilainya

meningkat pada saat terjadi penyakit.¹⁶

Deteksi ekspresi MPO pada aorta kelompok hiperkolesterolemia mempergunakan metode *dot blot* menunjukkan intensitas yang berbeda bermakna dengan kelompok normal (Gambar 5). Kadar MPO yang tinggi sering dikaitkan dengan kejadian akut kardiovaskular karena MPO mengkatalisis klorat, tiosianat, dan NO menjadi MPO-derived reactive species (MDRS) yang akan mengoksidasi LDL dan mengoksidasi HDL yang berperan dalam mengangkut kelebihan kolesterol dari jaringan.¹⁷

Deteksi ekspresi MPO pada jantung kelompok hiperkolesterolemia itu tidak dapat menunjukkan intensitas yang berbeda bermakna dengan kelompok normal. Jantung kelompok hiperkolesterolemia tidak mengalami inflamasi karena MPO, yang berperan dalam kondisi inflamasi atau berperan dalam pertahanan melawan patogen pada keadaan normal tidak memiliki nilai yang berbeda bermakna dengan MPO pada jantung kelompok normal.

Simpulan, aktivitas makrofag meningkat pada jaringan aorta, tidak pada jaringan jantung hewan hiperkolesterolemia sehingga diduga berperan dalam pembentukan plak ateroskleroma di aorta. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jumlah dan peran LDL teroksidasi di aorta dan jantung serta kaitannya dengan pembentukan plak ateroskleroma.

Daftar Pustaka

1. Pusat Data dan Informasi. Situasi Kesehatan Jantung. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2014.
2. Frohlich ED, Quinlan PJ. Coronary heart disease risk factors: public impact of initial and later-announced risks. *Ochsner J*. 2014; 14(4):532-7.
3. Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the Role of Immune Cells. *World J Clin Cases*. 2015;3(4):345-52.
4. Chellan B, Reardon CA, Getz GS, Bowmann MAH. Enzymatically modified low-density lipoprotein promotes foam cell formation in smooth muscle cells via macropinocytosis and enhances receptor-mediated uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(6):1101-13.
5. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(7):1506-16.

6. Gautier EL, Shay T, Miller J. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underline the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13(11):1118–28.
7. Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Report.* 2016;22(2):51–73.
8. Devi J, Johanna R. Effect of Ambrex (A Herbal Formulation) on Hematological Variables in Hyperlipidemic Rats. *Pakistan J Biol Sci.* 2014;17(5):740–3.
9. Kurniati NF, Permatasari A, Artarini AA. The Effect of Simvastatin, Aspirin, and Their Combination in Reduction of Atheroma Plaque. *AIP Conference Proceedings.* 2015;1677(1):1–5.
10. Meaney S. Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. *Frontiers in Genetics.* 2014;5(311):1–10.
11. Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Ultz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal model of atherosclerosis. *World J Clin Cases.* 2014;2(5):126–32.
12. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *National Institutes of Health.* 2012;40(1):195–211.
13. Kajingulu MF, Lepira BF, Mbutiwi INF, Makulo JRR, Bieleli E, Nseka MN. The atherogenic dyslipidemia ratio log (tg)/HdL-C was not associated with urinary albumin excretion rate (uaer) and increased cardiovascular risk in black patients with type 2 diabetes. *World J Cardiovasc Dis.* 2016;6(1):14–20.
14. Kim HS, Ullevig SL, Zamora D, Lee CF, Asmis R. redox regulation of mapk phosphatase 1 controls monocyte migration and macrophage recruitment. *PNAS.* 2012;109(4):16422–23.
15. Patel KM, Strong A, Tohyama J, Jin X, Morales CR, Billheimer J, dkk. Macrophage sortilin promotes ldl uptake, foam cell formation and atherosclerosis. *Circulation Res.* 2015; 116(5):789–96.
16. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation Res.* 2013;112(12):1624–33.
17. Scharnagl H, Kleber ME, Genser B, Kickmaier S, Renner W, Weihrauch G, dkk. Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography-the luric study. *Int J Cardiol.* 2014;174(1):96–105.