

KADAR ENZIM LIPOPROTEIN-PHOSPHOLIPASE A₂ (Lp-PLA₂) DALAM SERUM DARAH DAN JARINGAN AORTA PADA BERBAGAI USIA TIKUS (*Rattus norvegicus*) WISTAR JANTAN

Retno Susilowati

Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Jl. Gajayana 50 Malang Tlp/Fax. 0341 558933
E-mail Corresponding Author: susilowatiretno_pd@yahoo.com

ABSTRACT

*The aims of this study are to determine the effect of age on levels of Lp-PLA₂ plasma and aortic tissue rat (**Rattus norvegicus**) Wistar males. This research was conducted using a quasi-experimental methods, measurement of Lp-PLA₂ levels and cell count performed in rats aged 12, 14, 18 and 22 weeks. Levels of Lp-PLA₂ serum or tissue is determined using the Elisa method Elisa kit produce by Cusabio. Observation of foam cells was conducted using frozen slices with oil red O staining to determine the effect of treatment. Data were analyzed using ANOVA followed by LSD test and correlation analysis. The results showed that age affects the serum levels of Lp-PLA₂ very significantly ($p < 0.01$) and significant effect on levels in aortic tissues ($p < 0.05$). Levels of Lp-PLA₂ serum and aortic tissue increases with increasing age of rats. Levels of Lp-PLA₂ plasma and aorta in rats age 12, 14, 18 and 22 weeks in aortic tissue was 129.142 ng/ml; 139.646 ng/ml; 166.428 ng/ml; 193.786 ng/dl and in blood serum is 125.146 ng/dl; 175.788 ng/ml; 230.214 ng/dl and 228.786 ng/ml respectively. Levels of Lp-PLA₂ in serum and aortic tissue correlated positively with the number of foam cells in aortic tissue.*

Keywords: Lp-PLA₂, Aorta, Serum, Age, *Rattus norvegicus*.

PENGANTAR

Penuaan ditandai oleh adanya penurunan fungsi dan remodeling system tubuh. Sistem imun dan system endokrin sangat terpengaruh oleh umur karena terjadi peningkatan sekresi sitokin dan penurunan system umpan balik antiinflamasi. Inflamasi kronik dikenal sebagai *inflammaging*, menimbulkan banyak gangguan yang bersama-sama meningkatkan mortalitas dan morbiditas. Perilaku sakit meningkat mulai dari proses inflamasi sampai adanya efek samping munculnya penyakit kronis, hal ini akan menurunkan kualitas hidup dan menurunnya kesejahteraan secara individual.

Penuaan berkaitan dengan besarnya kejadian dari sejumlah besar kondisi degenerasi, termasuk penyakit alzheimer's, parkinson's, aterosklerosis dan infark miokardial. Semua kondisi ini berkaitan dengan inflamasi kronik tanpa diketahui penyebab yang jelas dan mungkin sekali

berkaitan dengan patogenesis suatu penyakit (McGeer, 2004).

Usia merupakan faktor risiko utama aterosklerosis melebihi hiperkolesterol, terbukti sebanyak 35-40% penderita aterosklerosis memiliki kadar kolesterol normal, aterosklerosis umum diderita pada usia diatas 55 tahun, namun pada akhir-akhir ini terjadi pergeseran usia penderita kearah usia lebih muda, oleh karena itu perlu reorientasi marker aterogenesis menggunakan biomarker yang tepat dan akurat.

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang diawali oleh adanya disfungsi endotel. *Lipoprotein associated phospholipase A₂* (Lp-PLA₂) sebelumnya dikenal sebagai PAF-AH plasma yang ternyata terikat pada lipoprotein, tepatnya terikat pada ujung karbonil dari apoB pada LDL manusia (Stafforini, 1999; Wilensky dan Macphee, 2009). Kedapatannya diserum, sebanyak 80% Lp-PLA₂ terikat pada LDL dan

sisanya terikat pada apoB dari VLDL dan HDL (Irribarren, 2006; Caslake et al., 2000). Enzim Lp-PLA₂ merupakan anggota kelompok enzim phospholipase A₂ superfamili yang merupakan kelompok enzim penghidrolisis asam lemak pada posisi sn2. Secara invivo, posisi sn2 dari fosfolipid sering ditempati oleh PUFA. Hidrolisis oleh PLA₂ menyebabkan lepasnya asam lemak bebas dan 2-lysophospholipid dari fosfolipid (Burke dan Dennis, 2008; Boilard, et al., 2003), pada kadar berlebih dapat memacu terjadinya disfungsi endotel.

Sintesis Lp-PLA₂ dipengaruhi oleh oxLDL (Shi, et al., 2007). Gangguan metabolisme lemak meningkat sesuai dengan usia (Murray, 2006), demikian juga tingkat stress oksidasi juga meningkat pada usia tua (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Selain itu, Lp-PLA₂ merupakan marker stress oksidasi terkait dengan sebagian besar faktor risiko klasik aterosklerosis seperti hiperkolesterol, stress oksidasi, diabetes, hiperhomosistein serta penyakit degenerasi seperti alzeimer. Dengan demikian, penelitian ini akan mengamati dinamika kadar Lp-PLA₂ dalam serum darah dan aorta serta melihat korelasinya dengan jumlah sel busa dalam aorta sebagai marker awal aterogenesis pada berbagai usia tikus. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gambaran perkembangan awal aterosklerosis dengan menggunakan umur sebagai faktor risiko klasik dan kadar enzim Lp-PLA₂ serum sebagai faktor risiko terbaru aterosklerosis saat ini serta mengkaji korelasinya dengan perkembangan struktur jaringan aorta pada awal perkembangan aterosklerosis.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan.

Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode kuasi eksperimental yang dilakukan pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan. Pengukuran kadar Lp-PLA₂ pada serum dan aorta maupun jumlah sel busa dalam aorta dilakukan pada empat usia tikus wistar yang

berbeda, yaitu usia 12, 14, 18 dan 22 minggu. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus dikorbankan dengan anestetik eter, kemudian dilakukan pengambilan darah melalui jantung. Penyiapan serum dengan sentrifugasi darah dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pembuluh darah aorta diisolasi untuk mendapatkan lisat jaringan aorta serta untuk preparasi irisan beku aorta. Pengukuran kadar enzim Lp-PLA₂ dilakukan dengan metode Elisa menggunakan Elisa Kit Lp-PLA₂ produk PT. Cusabio, dan untuk pengamatan sel busa dilakukan pada perbesaran 10x40 menggunakan pengecatan oil red O. Data hasil pengamatan uji statistik menggunakan uji Anova dan uji lanjut Tukey HSD, sedangkan uji korelasi antara kadar enzim Lp-PLA₂ dengan jumlah sel busa dilakukan dengan uji korelasi Pearson.

HASIL

Hasil Anova menunjukkan bahwa usia tikus sangat berpengaruh terhadap kadar Lp-PLA₂ serum darah tikus ($p < 0,01$), diperkuat oleh hasil uji berganda Tukey HSD (Tabel 1) menunjukkan bahwa pada usia 18 minggu, serum darah tikus mengalami peningkatan kadar Lp-PLA₂ secara signifikan berbeda dengan saat usia 10 minggu, namun demikian kadar enzim tersebut tidak mengalami peningkatan secara signifikan sampai akhir penelitian usia 22 minggu.

Tabel 1. Hasil Uji Perbandingan Berganda Pada LP-PLA₂ Serum Darah Tikus

| Usia (minggu) | Rata-rata (ng/mL) |
|---------------|------------------------|
| 12 minggu | 125,1460 ^a |
| 14 minggu | 175,7880 ^{ab} |
| 18 minggu | 230,2140 ^b |
| 22 minggu | 228,0000 ^b |

Keterangan : Rata-rata dengan notasi huruf yang sama berarti berbeda tidak nyata pada $\alpha = 0,05$.

Hasil Anova menunjukkan bahwa kadar Lp-PLA₂ dalam aorta tikus dipengaruhi oleh usia ($p < 0,05$), diperkuat oleh hasil uji

berganda Tukey HSD (Tabel 2) menunjukkan bahwa pada usia 22 minggu, jaringan aorta tikus mengalami peningkatan kadar Lp-PLA₂ secara signifikan berbeda dengan saat usia 10 dan 12 minggu.

Hasil Anova menunjukkan bahwa jumlah sel busa dalam aorta sangat dipengaruhi oleh usia tikus ($p < 0,01$), diperkuat oleh hasil uji berganda Tukey HSD (Tabel 3) menunjukkan bahwa pada usia 14 minggu, jaringan aorta tikus mengalami peningkatan jumlah sel busa secara signifikan berbeda dengan saat usia 10 minggu, namun demikian kadar enzim tersebut tidak mengalami peningkatan secara signifikan sampai akhir penelitian usia 22 minggu.

Tabel 2. Hasil Uji Perbandingan Berganda Pada LP-PLA₂ Aorta Darah Tikus

| Usia (minggu) | Rata-rata (ng/mL) |
|---------------|------------------------|
| 12 minggu | 129,1420 ^a |
| 14 minggu | 139,6460 ^a |
| 18 minggu | 166,4280 ^{ab} |
| 22 minggu | 193,7860 ^b |

Keterangan : Rata-rata dengan notasi huruf yang sama berarti berbeda tidak nyata pada $\alpha = 0,05$.

Tabel 3. Hasil Uji Perbandingan Berganda Pada jumlah sel busa dalam jaringan aorta Tikus

| Usia (minggu) | Rata-rata jumlah sel busa (sel) |
|---------------|----------------------------------|
| 12 minggu | 2,130 ^a |
| 14 minggu | 6,122 ^b |
| 18 minggu | 6,91 ^b |
| 22 minggu | 9,67 ^b |

Keterangan : Rata-rata dengan notasi huruf yang sama berarti berbeda tidak nyata pada $\alpha = 0,05$.

Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa kadar enzim Lp-PLA₂ baik dalam plasma maupun dalam jaringan aorta berkorelasi positif dengan jumlah sel busa ($p < 0,01$), koefisien korelasi dengan kadar Lp-PLA₂ serum sebesar 0,689 sedangkan koefisien

korelasinya dengan kadar Lp-PLA₂ jaringan aorta sebesar 0,669

PEMBAHASAN

Usia bertambah mengikuti fungsi waktu yang merupakan factor eksternal makhluk hidup yang tidak dapat diubah ataupun dihambat. Namun, usia sebagai fungsi waktu memiliki implikasi pada perubahan struktur maupun proses fisiologi makhluk hidup. Sel-sel dalam tubuh makhluk hidup memiliki masa hidup (*life span*) berbeda-beda. Hal ini karena sel tersusun oleh makromolekul yang terus terpapar pada lingkungan mikro yang seringkali bersifat merusak seperti halnya peningkatan ROS yang merupakan produk sel selama aktivitas kehidupannya. Dengan demikian makromolekul mengalami kerusakan, fungsi sel mengalami penurunan dan sel serta individu mengalami penuaan.

Sel dan jaringan mamalia mengalami peningkatan metabolisme lemak (Muray, 2006). Produksi ROS juga akan meningkat seiring dengan meningkatnya kadar lemak di dalam tubuh, sehingga jika tidak disertai penambahan antioksidan eksogen, tubuh tidak bias mencegah terjadinya oksidasi serta tidak dapat mengeliminasi produk oksidasi secara maksimal sehingga menimbulkan kondisi yang dikenal sebagai stress oksidasi.

Penigkatan LDL juga meningkatkan infiltrasi ke ruang sub endotel, didalam sub endotel LDL akan rentan mengalami oksidasi, menghasilkan oxLDL (Stocker dan Keaney, 2004). oxLDL dapat berfungsi sebagai kemoatraktan bagi monosit sehingga monosit bermigrasi dari sirkulasi ke sub endotel dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Baik monosit maupun makrofag dapat distimulasi mensintesis enzim Lp-PLA₂ sebagai respon terhadap peningkatan oxLDL (Shi, *et al.*, 2007) di sub endotel. yang merupakan substrat kerja enzim Lp-PLA₂. Dengan demikian kadar Lp-PLA₂ dalam jaringan aortapun meningkat sesuai usia.

LDL teroksidasi kadarnya akan meningkat sesuai dengan tingkat stress oksidasi yang terjadi. oxLDL khususnya oxPC merupakan substrat reaksi hidrolisis oleh Lp-

PLA₂ sehingga pada akhirnya usia mempengaruhi jumlah enzim Lp-PLA₂ yang diproduksi dan disekresikan sel. Lp-PLA₂ terikat pada LDL sehingga peningkatan Lp-PLA₂ juga teramati dalam plasma sesuai dengan bertambahnya usia.

Jumlah sel busa dalam jaringan aorta juga meningkat sesuai dengan usia. Hal ini diduga karena LysoPC sebagai produk hidrolisis PC oleh Lp-PLA₂ mampu menginduksi respon inflamasi yang ditunjukkan oleh peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6 dan TNF- α sebanding dengan konsentrasi lyso-PC pada media kultur Periferal Blood Monocyte Cells (PBMC) (Shi, et al., 2007), lebih lanjut menyebabkan percepatan peningkatan migrasi monosit dan makrofag sebagai produsen Lp-PLA₂. Makrofag akan memfagosit oxLDL sehingga terbentuk sel busa di sub endotel yang juga meningkat sesuai usia tikus. Adanya keterkaitan serta hubungan stimulus respon antara peningkatan Lp-PLA₂ serum dan dalam aorta serta peningkatan pembentukan sel busa dalam jaringan aorta, hal ini menjelaskan adanya korelasi antara kadar Lp-PLA₂ dalam serum dengan kadarnya dalam plasma serta korelasinya dengan jumlah sel busa.

KEPUSTAKAAN

- Boilard, E., Bourgoin, SG., Bernatchez, C., Poubelle, PE., and Surrete, ME. 2003. Interaction of Low Molecular Weight Group IIA Phospholipase A₂ with Apoptotic Human T Cells: Role of Heparan Sulfate Proteoglycans, *The FASEB Journal* **17** June: 1068- 1080.
- Burke, JE., Dennis, EA. 2008. *Phospholipase A₂ Structure/Function, Mechanism and Signaling*, Department of Chemistry and Biochemistry and Department of Pharmacology, School of Medicine, University of California, Sandiago, La Jolla, California 92093-0601: 1-7.
- Caslake, MJ., Packard, CJ., Sukling, KE., Dolmes, SD., Chamerlain, P. and Macphee, CH. 2000. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease, *Atherosclerosis* .150:413-419.
- Halliwel and Guteridge. 1999. *Free Radical in Biology Medicine*. Oxford University.
- Iribarren, C. 2006. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ and Cardiovascular Risk State of the evidence and Future Directions. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* (26): 5-6.
- McGeer P and McGeer EG. 2004. *Inflammation and the Degenerative Diseases of Aging*. New York Acedemy of Science. 1035: 104-116.
- Murray,R., Granner, DK. And Rodwell, VW. 2006. *Harper's Illustrated Biochemistry*. MC. Hill.
- Shi, Y., Zhang, P., Zhang, L., Osman, H., Mohler, ER., Macphee, C., Zalewski, A., Postle, A., Wilensky. 2007. Role of Lipoprotein-associated Phospholipase A₂ in Leukocyte Activation and Inflammatory Responses. *Atherosclerosis* **191**: 54-
- Stafforini DM, Tjoelkert LW, McCormick S, Vainkus D. 1999. Molecular Basis of the Interaction between Plaams Platelet-activating Factor Acetylhydrolase and Low Density Lipoprotein. *The Journal of Biological Chesmistry*. 274: 7018-7024.
- Stocker R. and Keaney JF. 2005. Oxidative Stress and Atherosclerosis. In Localzo J. (ed) *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*. Taylor &Francis. London-New York. Pp. 82-114.
- Wilensky RI and Macphee. 2009. Lipoprotein-associated Phospholipase A₂ And Atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 20: 415-420.