

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Aterosklerosis merupakan penyebab utama terjadinya penyakit kardiovaskuler,¹ *stroke*,² kalsifikasi,³ hingga aneurisma aorta^{4,5} serta menyebabkan kematian tertinggi di dunia.⁶ Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018 menunjukkan bahwa 15 dari 1.000 penduduk Indonesia menderita penyakit kardiovaskuler yang menyebabkan 12,9% dari total kematian.⁷

Aterosklerosis disebabkan oleh tingginya konsumsi kolesterol sehingga terjadi penimbunan *low density lipoprotein- cholesterol* (LDL-C) di lapisan tunika dinding pembuluh darah yang kemudian teroksidasi membentuk *oxidized*-LDL (ox-LDL).⁸⁻¹⁰ Proses tersebut memicu pembentukan sel busa melalui mekanisme fagositosis ox-LDL oleh makrofag serta infiltrasi pada sel otot polos.¹¹ Selain itu, ox-LDL melepaskan *radical oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan proliferasi monosit menjadi makrofag *pro-inflammatory*,¹² memicu peradangan dan pelepasan sitokin,¹³⁻¹⁵ seperti interleukin 1 β (IL-1 β),^{16,17} IL-6,^{18,19} serta *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α),^{12,20,21} maupun IL-10²²⁻²⁴ Peradangan tersebut memicu kerusakan dinding pembuluh darah, menyebabkan migrasi otot polos dan memunculkan *plaque* yang menyumbat aliran darah.

Salah satu tindakan preventif dan atau kuratif penyakit aterosklerosis adalah dengan konsumsi obat dari golongan statin seperti simvastatin, atorvastatin, pravastatin atau rosuvastatin.²⁵ Tetapi, konsumsi obat-obatan statin dalam jangka panjang dilaporkan memicu kerusakan hati,²⁶ meningkatkan insiden diabetes

melitus,²⁷ *myalgia* hingga *rhabdomyolysis*.²⁸ Berdasarkan hal tersebut, berbagai penelitian dilakukan untuk menemukan alternatif terapi aterosklerosis yang aman dan efektif, yaitu dengan mengonsumsi tomat.

Konsumsi tomat terbukti mampu menurunkan kadar kolesterol total,^{29,30} trigliserida, LDL-C serta meningkatkan kadar *high density lipoprotein cholesterol* (HDL-C) baik pada tikus model,³¹ maupun manusia.³²⁻³⁴ Secara spesifik kandungan tomat seperti β -karoten, vitamin A dan likopen terlibat secara aktif dalam aktivasi reseptor nukleus *Retinoid Acid Receptor* (RAR) dan *Retinoid X-receptor* (RXR) yang mencegah inflamasi.³⁵ Senyawa bioaktif tomat tersebut juga berperan mengeliminasi radikal bebas pemicu migrasi monosit pada aterosklerosis.^{36,37}

Seluruh aktivitas sel baik normal, pada aterosklerosis maupun mengonsumsi herbal dan obat, melepaskan microRNA (miRNA) yang terlibat dalam komunikasi sel.³⁸ miRNA dapat digunakan untuk menggambarkan patofisiologi tubuh dan kondisi kesehatan sehingga keberadaan miRNA berpotensi digunakan sebagai biomarka deteksi penyakit, termasuk aterosklerosis,^{39,40} atau target terapeutik dalam intervensi patogenesis aterosklerosis.⁴¹⁻⁴³ miRNA kemungkinan juga dapat digunakan untuk mendeteksi proses perbaikan sel endotelial akibat lesi pasca inflamasi pada aterosklerosis.⁴⁴ Salah satu miRNA yang memiliki peran penting dalam aktivitas di endotel adalah miR-29-3p. miRNA tersebut meningkatkan produksi *nitric oxide* (NO) pada sel endotel normal,⁴⁵ tetapi mengalami penurunan ekspresi yang berkorelasi dengan penurunan dilatasi pembuluh darah pada semua kondisi aneurisma aorta.³¹ Namun, miR-29b-3p dilaporkan juga berkorelasi positif dengan ox-LDL,⁴⁶ kejadian inflamasi dan IL-6

yang mengalami peningkatan secara signifikan pada penderita aterosklerosis dibanding orang normal.¹⁹ Hal tersebut dikarenakan miR-29b-3p diekspresi bersamaan dengan aktivasi jalur persinyalan NF- κ B dan SMAD-MAPK yang aktif saat terjadi peningkatan ROS sebagai akibat oksidasi LDL-C di tunika.⁴⁷ Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini penting dilakukan untuk menganalisis dan menjelaskan korelasi ekspresi miR-29b-3p dan TNF- α , IL-6 dan IL-10 pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) kondisi normal, aterosklerosis dan konsumsi tomat atau atorvastatin. Hasil penelitian ini dimaksudkan untuk menjelaskan molekul kandidat model terapeutik intervensi inflamasi aterosklerosis berbasis miR-29b-3p.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dumunculkan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana ekspresi miR-29b-3p pada tikus diet tinggi kolesterol yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin?
2. Bagaimana sekresi TNF- α , IL-6 dan IL-10 pada tikus diet tinggi kolesterol yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin?
3. Bagaimana hubungan antara ekspresi miR-29b-3p dengan TNF- α , IL-6, dan IL-10 pada kelompok tikus aterosklerosis?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menganalisis profil miR-29b-3p pada tikus diet tinggi kolesterol yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin.

2. Menganalisis sekresi TNF- α , IL-6 tikus diet tinggi kolesterol yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin.
3. Menganalisis hubungan antara ekspresi miR-29b-3p dengan kadar sekresi TNF- α , IL-6 dan IL-10 pada tikus diet tinggi kolesterol baik tanpa maupun yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin.

1.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1.4.1. Manfaat bagi Perkembangan Ilmu Pengetahuan

1. Melengkapi data dan informasi miR-29b-3p yang terkait diet tinggi kolesterol dan suplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin.
2. Melengkapi data dan informasi profil miR-29b-3p sebagai referensi dalam mengembangkan deteksi dini dan atau terapi berbasis miRNA yang efektif mencegah terjadinya inflamasi pada aterosklerosis.
3. Melengkapi data terkait gambaran hubungan antara ekspresi miR-29b-3p dan TNF- α , IL-6 dan IL-10 pada tikus diet tinggi kolesterol yang disuplementasi ekstrak tomat atau atorvastatin.

1.4.2. Manfaat bagi Perkembangan Penelitian.

1. Sebagai referensi dalam pengembangan deteksi dini perkembangan inflamasi atherosclerosis akibat konsumsi diet tinggi kolesterol.
2. Sebagai referensi dalam pengembangan molekul yang berpotensi dalam terapeutic atau model intervensi terhadap inflamasi atherosclerosis akibat konsumsi diet tinggi kolesterol.

3. Penelitian dapat dikembangkan untuk melihat peran anti-miR-29b-3p dalam penghambatan miR-29b-3p terkait inflamasi pada aterosklerosis.

1.4.3. Manfaat bagi Peneliti dan Masyarakat

1. Penelitian ini menambah keterampilan peneliti dalam mengidentifikasi miRNA yang berpotensi sebagai biomarka atau terapi intervensi inflamasi aterosklerosis akibat konsumsi diet tinggi kolesterol.
2. Salah satu upaya menemukan molekul yang dapat digunakan sebagai biomarka deteksi dini aterosklerosis dan potensi pengobatan berbasis miRNA.

1.5. Keaslian Penelitian

Tabel 1 Penelitian terkait profil ekspresi miR-29b-3p serta kaitannya dengan dampak pemberian ekstrak tomat pada progresivitas inflamasi aterosklerosis.

Penulis	Tahun	Nama Jurnal/ Buku	Judul	Hasil Penelitian
Michael E. Widlansky, David M. Jensen, Jingli Wang, Yong Liu, Aron M. Geurts, Alison J. Kriegel, Pengyuan Liu, Rong Ying, Guangyuan Zhang, Marc Casati, Chen Chu, Mobin Malik, Amberly Branum, Michael J. Tanner, Sudhi Tyagi, Kristie Usa, Mingyu Liang	2018	EMBO Molecular Medicine. 10 (3): e8046	miR-29 contributes to normal endothelial function and can restore it in cardiometabolic disorders	Induksi anti-miR-29b-3p ke dalam arteriol intraluminal pada manusia non-DM atau tikus normal atau tikus dengan mutasi gen <i>Mir29b-1/a</i> menyebabkan terjadinya gangguan sintesis protein <i>endothelium-dependent vasodilation</i> (EDVD) serta memicu eksaserbasi hipertensi pada tikus. miR-29b-3p mengalami peningkatan ketika anti-miR-29b-3p atau protein <i>Mir29b-1/a</i> mutan menurun, seiiring dengan kadar oksida nitrat dalam arteriol. Mutasi gen <i>Mir29b-1/a</i> menyebabkan ekspresi diferensial preferensial gen yang terkait dengan oksida nitrat termasuk gen <i>Lypla1</i> (gen penyandi enzim <i>lysophospholipases</i> yang berperan dalam multifungsional lisofosfolipid di membrane permukaan sel. Gen <i>Lypla1</i> merupakan target langsung miR-29 dan memberi umpan balik negative berupa menghilangkan efek miR-29 dalam meningkatkan produksi oksida nitrit (NO). Pengobatan dengan <i>Lypla1</i> siRNA meningkatkan produksi NO dan protein EDVD dalam arteriol. Temuan ini menunjukkan miR-29 diperlukan untuk fungsi endotel normal pada manusia dan model hewan dan memiliki potensi terapeutik untuk gangguan kardiometabolik. ⁴⁵
Yu-Qing Huang Jie Li Cheng Huang Ying-Qing Feng	2018	Cellular Physiology and Biochemistry. 50 (2): 452-459	Plasma microRNA-29c levels are associated with carotid intima-media thickness and is a potential biomarker for	Peningkatan kadar miR-29c plasma terkait dengan <i>carotid intima media thickness</i> (CIMT) pada penderita aterosklerosis. Kadar miR-29c plasma terkait dengan penanda inflamasi, <i>C-reactive protein</i> (CRP), yang mengindikasikan bahwa miR-29c kemungkinan berperan

Penulis	Tahun	Nama Jurnal/ Buku	Judul	Hasil Penelitian
			the early detection of atherosclerosis.	penting dalam perkembangan aterosklerosis. Dengan demikian, penanda baru ini mungkin berguna untuk memprediksi perkembangan aterosklerosis subklinis atau aterosklerosis dan selanjutnya dapat berkontribusi pada stratifikasi risiko. ⁴⁸
Yu-qing Huang, Cheng Huang, Jie Li, Ji-yan Chena Ying-Qing, Fenga Ying-Ling Zhou An-Ping Cai	2017	Cellular Physiology and Biochemistry. 44 (4): 1537-1544	The association of circulating miR- 29b and Interleukin-6 with subclinical atherosclerosis.	Kadar miR-29b dan IL-6 yang bersirkulasi meningkat pada pasien dengan aterosklerosis subklinis, dibandingkan dengan individu yang sehat. miR-29b dan IL-6 yang beredar berkorelasi secara independen dengan CIMT. Peningkatan level miR-29b dan IL-6 yang bersirkulasi dapat berfungsi sebagai biomarker baru untuk aterosklerosis subklinis atau klinis dan juga dapat berguna untuk pemantauan klinis tahap awal dalam pengembangan aterosklerosis. ¹⁹
Yu-Qing Huang, An-Ping Cai, Ji-Yan, Chen Cheng, Huang Jie Li, Ying-Qing Feng.	2016	Cellular Physiology and Biochemistry 40 (6): 1521-1528	The relationship of plasma miR-29a and oxidized low density lipoprotein with atherosclerosis.	Kadar miR-29a dan ox-LDL plasma lebih tinggi pada pasien dengan aterosklerosis subklinis dibandingkan dengan populasi yang sehat. Level miR-29a dan ox-LDL keduanya berhubungan positif dengan CIMT. miR-29a dan ox-LDL menunjukkan nilai prediktif yang baik untuk aterosklerosis. Selain itu, penelitian kami menunjukkan kekuatan prediksi yang lebih tinggi untuk aterosklerosis ketika miR-29a dan ox-LDL digunakan bersama-sama. Oleh karena itu, miR-29a dan ox-LDL dapat menjadi biomarker potensial untuk aterosklerosis. ⁴⁶
Branislav Kura, Mihir Parikh, Jan Slezak, and Grant N. Pierce.	2019	Molecules 24 (8): 1509-1525	The influence of diet on microRNAs that impact cardiovascular disease	Senyawa bioaktif seperti <i>polyunsaturated fatty acids</i> (PUFAs), vitamin, serat, likopen dan turunan karotenoid mampu mengubah ekspresi miRNA, sehingga memodulasi jalur penting yang terlibat dalam metabolisme lipid, fungsi endotel, hipertrofi dan atau

Penulis	Tahun	Nama Jurnal/ Buku	Judul	Hasil Penelitian
				fibrosis. Kapasitas nutrisi makanan untuk memodulasi miRNA yang terlibat dalam fungsi dan perkembangan jantung (terutama miRNA-1, -21, -133 dan -155) memberikan alasan lebih lanjut untuk meneliti apakah interaksi antara makanan (termasuk tomat) dan miRNA ini dapat berfungsi sebagai target yang layak untuk pendekatan terapi baru untuk penyakit kardiovaskuler, salah satunya atherosclerosis. ⁴⁹
Mohammad Taherireykandea, Ahmad Saedisomeoliab, Abass A. Gaenina, Zohre Pourahmadi, Lisa G. Woodd	2018	Journal of Nutritional Sciences and Diabetics. 4 (2): 3-9	Effect of tomato juice consumption on the inflammatory biomarkers in male athletes following exhaustive exercise	Konsumsi jus tomat sebanyak 200 ml/ hari selama satu minggu mampu menekan konsentrasi <i>C-reactive protein</i> (terlibat dalam progresitas inflamasi) pasca kelelahan latihan fisik pada atlet, namun tidak berpengaruh terhadap konsentrasi IL-6 dan stres oksidatif. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui efek pemberian jus tomat dengan konsentrasi yang lebih besar dan waktu pemberian yang lebih lama. ⁵⁰
Danbin Li, Lina Chen, Wenran Zhao, Jianbing Hao, Ruihua An	2016	Molecular Medicine Reports. 13 (3): 2708-2714	MicroRNA-let-7f-1 is induced by lycopene and inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in prostate cancer	Hasil penelitian menunjukkan bahwa likopen mengatur ekspresi gen <i>AKT2</i> melalui jalur miR- let-7f-1. Hal tersebut menunjukkan bahwa likopen kemungkinan merupakan senyawa yang juga berperan sebagai antikanker potensial dengan aplikasi terapeutik. ⁵¹
Xavier Deplanque, Delphine Muscente-Paque, Eric Chappuis	2016	Food & Nutrition Research. 60 (1): 32537	Proprietary tomato extract improves metabolic response to high-fat meal in healthy normal weight subjects	Pemberian diet yang dikombinasi dengan <i>carotenoid-rich tomato extract</i> (CRTE) sekali sehari selama 2 minggu pada 50 responden pasien aterosklerosis memiliki efek positif yang menguntungkan pada oksidasi LDL, glukosa, insulin, dan kadar trigliserida postprandial hingga 8 jam. Uji coba tambahan diperlukan untuk membuktikan pengulangan hasil ini pada sub-populasi lain seperti subyek yang berisiko penyakit kardiovaskular. ⁵²

Penulis	Tahun	Nama Jurnal/ Buku	Judul	Hasil Penelitian
Bruna L. B. Pereira, Fernanda C. O. Arruda, Patrícia P. Reis, Tainara F. Felix, Priscila P. Santos, Bruna P. Rafacho, Andrea F. Gonçalves, Renan T. Claro, Paula S. Azevedo, Bertha F. Polegato, Katashi Okoshi, Ana A. H. Fernandes, Sergio A. R. Paiva, Leonardo A. M. Zornoff, and Marcos F. Minicucci.	2015	Nutrients. 7 (11): 9640-9649	Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>) supplementation induces changes in cardiac miRNA expression, reduces oxidative stress and left ventricular mass, and improves diastolic function	Suplementasi tomat secara signifikan mempengaruhi peningkatan ekspresi miR-107 ($p = 0,043$) dan miR-486 ($p = 0,001$) serta menurunkan ekspresi miR-350 ($p = 0,035$) dan miR-872 ($p = 0,037$). Suplementasi tomat secara signifikan juga mengurangi stres oksidatif dan pengurangan CSA dan peningkatan fungsi diastolik. Studi lebih lanjut harus dilakukan untuk menyelidiki target potensial tomat dan likopen dalam pencegahan dan manajemen penyakit kardiovaskular. ⁵³
Mir Hadi Khayat Nouri, Ali Namvaran Abbas Abad	2013	Iranian Red Crescent Medical Journal 15 (4): 287-291	Comparative study of tomato and tomato paste supplementation on the level of serum lipids and lipoproteins levels in rats fed with high cholesterol	Suplementasi tomat dan pasta tomat pada tikus dengan diet tinggi kolesterol terbukti menurunkan, menurunkan jumlah TC, LDL dan TG serta meningkatkan konsentrasi HDL. Efek tersebut disebabkan oleh antioksidan dan senyawa spesifik di dalam tomat, dan mungkin berfungsi dengan menghambat peroksidasi lipid dan mengurangi produksi kolesterol, LDL dan trigliserida. Namun, peran tomat dan pasta to-mato sebagai suplemen untuk pencegahan hiperkolesterolemia pada manusia, perlu diselidiki lebih lanjut. ²⁹
Jiyun Ahn, Hyunjung Lee, Chang Hwa Jung, dan Taeyoul Ha.	2012	Molecular Nutrition and Food Research 56 (11): 1665-1674	Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet	Suplementasi likopen sebesar 0,5 g/kgBB mengurangi steatosis (perlemakan) hati pada tikus yang diberi diet tinggi lemak (49,29% dari total diet harian) dan meningkatkan ekspresi miR-21. Penelitian ini mengungkapkan bahwa miR-21 menghambat akumulasi lipid yang diinduksi asam lemak dalam hepatosit dengan

Penulis	Tahun	Nama Jurnal/ Buku	Judul	Hasil Penelitian
Sankhadeep Pal, Manoranjan Ghosh, Shatadal Ghosh, Sudip Bhattacharyya, dan Parames C. Sil	2015	Food and Chemical Toxicology 85 (2): 36-47	Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways	menurunkan ekspresi <i>fatty acid binding protein-7</i> (FABP7). ⁵⁴ Atorvastatin menyebabkan disfungsi jaringan serta kematian sel hati. Kerusakan jaringan dan sel di hati diinduksi oleh ROS dari mitokondria dan memicu stres oksidatif yang melibatkan caspase dan calpain dengan jalur tergantung pada dosis pemberian obat. ROS secara signifikan meningkatkan protein Bax pro-apoptosis dan menurunkan protein anti-apoptosis, Bcl-2 sehingga meningkatkan pelepasan sitokrom C dalam sitosol serta mitokondria. Pelepasan caspase 3 dan caspase 9 sebagai respon terhadap atorvastatin memodulasi aktivasi <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i> (PARP), menurunkan sintesis ATP sehingga memicu terjadinya apoptosis. ²⁶

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam upaya mencari alternatif terapi dan pengobatan yang efektif untuk menyelesaikan permasalahan penyakit aterosklerosis (Tabel 1). Kajian terkini menunjukkan masih digunakannya obat-obatan golongan statin untuk menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL-C, meskipun dilaporkan memiliki dampak negatif terhadap otot dan hati. Alternatif terapi telah banyak dikembangkan melalui identifikasi kandungan senyawa bioaktif dan penggunaan bahan pangan sebagai anti-aterogenik, salah satunya tomat. Selain itu, penelitian terkini telah mulai melakukan upaya identifikasi dan intervensi gen melalui miRNA baik untuk diagnostik maupun pengobatan aterosklerosis. Kebanyakan peneliti menitikberatkan penelitian miRNA khususnya miR-29a dan miR-29b terhadap metabolisme lipid dan patofisiologi kerusakan endothelial. Masih sedikit penelitian saat ini yang berfokus pada miR-29b-3p serta kaitannya terhadap progresivitas inflamasi aterosklerosis.

Penelitian ini ditujukan untuk menganalisis regulasi miR-29b-3p dari sisi progresivitas inflamasi pada aterosklerosis di hewan coba tikus. Secara spesifik, penelitian ini menitikberatkan pada analisis ekspresi miR-29b-3p baik pada tikus diet tinggi kolesterol baik tanpa maupun yang disuplementasi atorvastatin atau ekstrak tomat. Serta melihat korelasi miR-29b-3p dengan sitokin inflamasi: IL-10, IL-6 dan TNF- α pada progresivitas inflamasi di tikus diet tinggi kolesterol.