

**Pengaruh Ekstrak Tomat terhadap Respon Inflamasi dan
Ekspresi miR-29b-3p pada Tikus dengan Diet Tinggi
Kolesterol**

**The Effect of Tommato Extract Supplementation toward
Inflammation Progresivity and miR-29b-3p Expression in High-
Cholesterol induced Rats**



**Tesis
Untuk memenuhi persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Muchamad Dafip
22010114410003**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2020

TESIS

**Pengaruh Ekstrak Tomat terhadap Respon Inflamasi dan Ekspresi
miR-29b-3p pada Tikus dengan Diet Tinggi Kolesterol**

Disusun oleh:

Muchamad Dafip

22010114410003

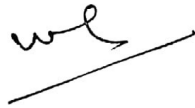
telah dipertahankan di depan Tim Penguji

pada tanggal 25 Februari 2020

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing Pertama



Prof. Dr. dr. Winarto, DMM, Sp.MK., Sp.M(K)
NIP. 19490617 197802 1 001

Pembimbing Kedua



Prof. dr. M. Hussein Gasem, Ph.D., Sp.PD.KPTI
NIP. 19520303 197812 1 001

Penguji Ketua



dr. Nani Maharani, M. Si. Med., Ph. D
NIP. 19811112 200812 2 003

Penguji Anggota



dr. Mochamad Ali Sobirin, Ph. D., Sp. JP., FIHA
NIP 19780613 200812 1 002.

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro



Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko, Sp. B(K) Onk., M. Kes
NIP. 19750124 200801 1 006

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa proposal penelitian ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarisme sebagaimana dimaksud dalam Permendinas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 27 Februari 2020

Muchamad Dafip
22010114410003

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Muchamad Dafip, S. Pd
Tempat/ tanggal lahir : Sragen, 30 Agustus 1990
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-Laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri ! Gemolong : 2003
2. SMP Negeri 1 Gemolong : 2006
3. SMA Negeri 1 Gemolong : 2009
4. Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA UNNES : 2013
5. Magister Ilmu Biomedik PPs UNDIP : 2014-sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2009-2015 : Peneliti dan Fasilitator di Ungaran Mount Conservation Program (UMCP), Metaforma
2. Tahun 2013-2015 : Asisten Manajer, BINTARI Foundation, Semarang,

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ibu : Romlah
Ayah : (alm) Sumarno
2. Nama Saudara : Lestari (Kakak), Sabdo Wardoyo (Adik)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan nikmat serta barokah yang melimpah, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Pengaruh Ekstrak Tomat terhadap Respon Inflamasi dan Ekspresi miR-29b-3p pada Tikus dengan Diet Tinggi Kolesterol”** dengan nikmat yang luar biasa. tesis ini disusun sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Penulis menyadari tesis ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini peneliti bermaksud secara kusus mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar di Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, yang memberikan kesempatan lagi kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan studi.
3. Ketua Program dan Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang memberikan kesempatan dan memperjuangkan nasib penulis untuk menyelesaikan masa belajar di Program Studi Ilmu Biomedik.
4. Prof. Dr. dr. Winarto, DMM, Sp.MK., Sp.M(K), sebagai dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran hingga lima tahun untuk membimbing penulis tesis ini.
5. Prof. dr. M. Hussein Gasem, Ph.D., Sp.PD.K, sebagai dosen pembimbing yang telah sabar dan tidak bosan memberi masukan dan mengajari peneliti hingga lima tahun sehingga peneliti mampu menyelesaikan penelitian.
6. Prof. Dr. Retno Sri Iswari, S. U., yang telah memberikan dorongan, bantuan dan bimbingan baik dari segi moril maupun materil, sehingga penelitian saya dapat berjalan dengan baik.

7. dr. Nani Maharani, M. Si. Med., PhD selaku penguji yang penuh semangat dan perhatian membimbing dan mengarahkan untuk menuntaskan studi
8. dr. Mochamad Ali Sobirin, PhD, Sp. JP., FIHA selaku penguji yang dengan sabar, ramah dan senyum mengarahkan saya dalam menyelesaikan penelitian.
9. Mbak Nata “*the best*” yang telah menyediakan *support system* dan menjadi tempat *sambat* penulis, sehingga dapat menyelesaikan studi.
10. Bos Romlah, yang selalu mendoakan, menjadi *funder*, merawat dan menjadi motivasi hidup peneliti, Lestari yang selalu *ngegas* memotivasi dan sukarela *disambati*, Sabdo Wardoyo yang selalu bertanya “kapan wisuda, Mon?”. Keponakan Om Apip, Tanaya Cahaya Saphirra, Zallica Az-Zahratusita dan Haridz Lizam Lazuardi yang menjadi teman bercerita dan bercanda.
11. Sahabatku yang super, rekan Kontrakan Joglo Ahmad Faris, S. Pd., Dimas Fahrudin, S. Pd., Ganang Iqbal Riska, S. Pd, Khairi Nurokhim, S. Pd., Reno Yuriansyah, S. Si. dan Yanuar Revandi, S. Si. yang menjadi *kanca sambatan*.
12. Teman kuliah Ilmu Biomedis angkatan 2014, terutama mas Angga Ari Wibowo, S. Si., M. Biomed yang telah berjuang bersama hingga akhir.
13. Berbagai pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan pengetahuan, pengalaman, dan waktu. Oleh karena itu, kesempatan ini sekaligus penulis gunakan untuk mengucapkan permohonan maaf atas segala kekurangan yang ada. Kritik dan saran sangat penulis harapkan untuk perbaikan, pengembangan diri serta karir di masa depan. Terima kasih kepada pembaca atas segala perhatian dan waktu untuk mencermati isi tesis ini.

Semarang, 14 Februari 2020

Muchamad Dafip

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I LATAR BELAKANG	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Keaslian Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1. Aterosklerosis.....	12
2.1.1. Patofisiologi Aterosklerosis.....	12
2.1.2. Permodelan Aterosklerosis pada Hewan Coba.....	14
2.1.3. Inflamasi pada Aterosklerosis.....	15
2.2. MicroRNA.....	16
2.2.1. Biogenesis miRNA.....	17
2.2.2. Eksosomal miRNA.....	20
2.2.3. Nomenklatur miRNA.....	21
2.2.4. Genomik dan Fungsi Seluler miR-29b.....	23
2.2.5. Genom Superfamily miR-29.....	24
2.2.6. Fungsi Seluler Ekspresi miR-29b-1 atau miR-29b-3p.....	26
2.3. Kandungan Senyawa Bioaktif Tomat.....	29
2.4. Kerangka Teori.....	32
2.5. Kerangka Konsep.....	33
2.6. Hipotesis.....	33
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	34
3.2. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	34
3.3. Populasi dan Sampel.....	35
3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	35
3.5. Instrumen Penelitian.....	36
3.6. Pelaksanaan Penelitian.....	37
3.6.1. Perijinan and <i>Ethical Clearance</i>	37
3.6.2. Ekstraksi dan Pemberian Likopen Tomat pada Tikus.....	38

3.6.3.	Perlakuan Tikus selama Penelitian.....	39
3.6.4.	Pengambilan Darah dan Pembuatan Plasma.....	41
3.6.5.	Persiapan Sampel untuk Isolasi RNA.....	42
3.6.6.	Isolasi RNA Plasma.....	43
3.6.7.	Pembuatan cDNA.....	46
3.6.8.	<i>Real Time</i> -qPCR.....	48
3.6.9.	Analisis Hasil RT-qPCR.....	49
3.6.10.	Pengujian Senyawa Biokimia Darah.....	49
3.6.11.	Identifikasi Aterosklerosis melalui Analisis Preparat Mikroskopik.....	50
3.7.	Analisis Data.....	51
BAB IV HASIL PENELITIAN		52
4.1.	Hasil Penelitian.....	52
4.1.1.	Ekspresi hsa-miR-29b-3p.....	53
4.1.2.	Sekresi TNF- α , IL-6 dan IL-10.....	55
4.1.3.	Gambaran Histologi Aorta Tikus.....	61
BAB V PEMBAHASAN		64
4.1.4.	Ekspresi miR-29b-3p terkait Sekresi TNF- α , IL-6 dan IL-10.....	64
4.1.5.	Ekspresi dan Peran Fisiologis miR-29b-3p.....	68
4.1.6.	Pengaruh Atorvastatin pada Diet Tinggi Kolesterol.....	69
4.1.7.	Suplementasi Ekstrak Tomat terhadap Ekstrak Tomat.....	71
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....		75
5.1.	Simpulan.....	75
5.2.	Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA.....		76

DAFTAR TABEL

Nomer	Halaman
1. Penelitian terkait profil ekspresi miR-29b-3p serta kaitannya dengan dampak pemberian ekstrak tomat pada progresivitas inflamasi aterosklerosis.....	6
2. Definisi operasional penelitian.....	36
3. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.....	36
4. Rata-rata berat badan tikus dan dosis pemberian kolesterol, atorvastatin 20 mg dan ekstrak tomat setiap minggu.....	40
5. Diet untuk tikus dewasa normal dan induksi aterosklerosis.....	41
6. Campuran komponen <i>mastermix</i> untuk cDNA berdasarkan prosedur miRCURY [®] LNA [®] RT Kit Cat No: 339340.....	47
7. Campuran komponen <i>mastermix</i> untuk cDNA berdasarkan prosedur miRCURY LNA SYVR Green PCR Kit Cat No. 339345.....	48
8. Waktu dan temperature tiap tahapan RT-qPCR sesuai prosedur pabrikan	49
9. Massa dan kadar biomarka lipid pada kelompok perlakuan.....	52
10. Nilai korelasi Bivariate Spearman's rho antara TNF- α terhadap sekresi IL-6, IL-10 dan ekspresi hsa-miR-29b-3p.....	60

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Tahapan ekspresi miRNA di dalam nukleus. ³⁹	18
2.	Contoh sekuen dan mikroproses oleh Drosha dan Dicer sebagai sumber variasi keanekaragaman miRNA. ⁸³	19
3.	Mekanisme pembentukan endosomal-miRNA dalam komunikasi antar sel. ¹⁰⁴	20
4.	Genom <i>superfamily</i> mir-29.....	24
5.	Sekuen <i>mature</i> -miR-29 pada manusia (hsa), mencit (mmu) dan tikus (rno). A) <i>Seed region</i> merupakan area terkonservasi.....	25
6.	Jalur persinyalan sel pada kondisi aterosklerosis yang disebabkan oleh <i>shear stress</i> . Gen <i>TNFR1</i> ditunjukkan oleh anak panah merah.....	27
7.	Kerangka teori penelitian.....	32
8.	Kerangka konsep penelitian.....	33
9.	Alur kerja ekstraksi tomat dengan metode maserasi.....	38
10.	Alur penelitian.....	39
11.	Alur kerja isolasi miRNA.....	43
12.	Efek diet tinggi kolesterol terhadap ekspresi hsa-miR-29b-3p pada kelompok perlakuan, A) minggu ketujuh; B) minggu kedelapan.....	53
13.	Sekresi TNF- α minggu ke-0, ke-7 dan ke-8 pada masing-masing kelompok.....	55
14.	Sekresi IL-6 minggu ke-0, ke-7 dan ke-9 setiap kelompok perlakuan.....	56
15.	Sekresi IL-10 minggu ke-0, ke-7 dan ke-8 setiap kelompok perlakuan....	58
16.	Perbandingan kenaikan titer sitokin dari minggu pertama ke minggu kedelapan di masing-masing kelompok perlakuan. kode diatas diagram batang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok.....	59
17.	Penampang melintang aorta tikus pasca 60 hari perlakuan diet tinggi kolesterol pada kelompok K1 (A-B); K2 (C-D); K3 (E-F); K4 (G-H).....	62
18.	Jalur aktivasi Nf- κ B dan ekspresi miR-29b-3p.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halam
Y	
Lampiran 1 Ethical clearance.....	93
Lampiran 2 Prosedur isolasi RNA dari plasma.....	94
Lampiran 3 Prosedur pembuatan cDNA.....	96
Lampiran 4 Prosedur pelaksanaan RT-qPCR.....	99
Lampiran 5 Prosedur analisis kadar IL-10.....	107
Lampiran 6 Prosedur analisis kadar IL-6.....	108
Lampiran 7 Prosedur analisis kadar TNF- α	114

ABSTRAK**Pengaruh Ekstrak Tomat terhadap Respon Inflamasi dan Ekspresi miR-29b-3p pada Tikus dengan Diet Tinggi Kolesterol****Muchamad Dafip, Winarto, Muhammad Husein Gasem**

Latar Belakang: Kadar kolesterol tinggi memicu aterosklerosis, ditandai dengan tingginya ROS, peradangan dan pelepasan TNF- α , IL-6 dan IL-10 serta kerusakan dinding aorta. Tomat terbukti menurunkan kadar kolesterol darah dan menambat radikal bebas penyebab inflamasi. Aktivitas peradangan dan konsumsi tomat kemungkinan mempengaruhi ekspresi microRNA (miRNA), salah satu miRNA terpenting adalah miR-29-3p yang berhubungan dengan aterosklerosis. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan ekspresi miR-29b-3p dengan TNF- α , IL-6 dan IL-10 pada tikus yang disuplementasi ekstrak tomat.

Metode Penelitian: Penelitian menggunakan *pre-post randomized control design*. Sebanyak 24 ekor tikus Sprague Dawley secara acak dibagi kedalam empat kelompok sama jumlah, yaitu kelompok K1 tikus sehat, K2, K3 dan K4 diinduksi 2 ml kolesterol/ 200 grBB/ hari, kemudian, K2 hanya diberi placebo, K3 disuplementasi dengan atorvastatin 20 mg/ 200 grBB, dan K4 dengan 16 mg/ 200 grBB/ hari. Sebanyak 50 kg tomat diekstraksi menggunakan maserasi bertingkat dengan pelarut utama petroleum eter. Darah diambil pada hari ke-0 dan ke-60, untuk dianalisis ekspresi miR-29b-3p menggunakan qRT-PCR serta TNF- α , IL-6 dan IL-10 menggunakan metode ELISA. Konfirmasi kerusakan intima melalui preparat melintang dan diskripsi kondisi aorta. Data miR-29b-3p diuji beda dengan analisis Kruskal-Walis, sedangkan TNF- α , IL-6 dan IL-10 diuji beda dengan ANOVA satu arah dilanjutkan uji BNT. Hubungan antar parameter dianalisis secara korelasi Pearson's linear dan Regresi.

Hasil dan Pembahasan: Ekspresi miR-29b-3p di kelompok K1 sebesar $0,48 \pm 0,03$ fold change dan mengalami *down-regulated*, sedangkan K2 meningkat hingga $2,48 \times 10^4 \pm 3,58 \times 10^3$, selain itu, di K2 juga menunjukkan peningkatan TNF- α hingga 1270,09%; IL-6 sebesar 59,08%; dan IL-10 hingga 209,21%. Peningkatan tersebut berbeda signifikan dibanding tikus K3 dan K4. Dimana kenaikan TNF- α , IL-6, IL-10, secara berurutan yaitu 98.96%, 21,79%; dan 65.67%. Sedangkan pada K4, TNF- α , meningkat sebesar 59.07%; IL-6 sebesar 23.33%; dan IL-10 sebesar 37.75%. Peningkatan tersebut kemungkinan disebabkan oleh ROS karena memicu aktivasi jalur persinyalan NF-kB sehingga produksi TNF- α mengalami kenaikan, diikuti IL-6, IL-10 dan miR-29b-3p. ekstrak tomat memiliki kandungan likopen, karotenoid, vitamin C dan E yang tinggi, berperan sebagai penambat ROS dan menstabilkan produksi sitokin. Hasil tersebut diperkuat dengan tidak adanya lesi, *rupture* dan plak pada aorta tikus kelompok K1, K3 dan K4.

Kesimpulan: Suplementasi ekstrak tomat dosis 16 mg/ KgMB mampu mencegah pembentukan plak pada dinding aorta tikus yang didukung oleh titer TNF- α , IL-6, IL-10 dan ekspresi miR-29b-3p pada kelompok K4 lebih rendah daripada kelompok K2. Terdapat korelasi negatif antara antara TNF- α IL-6 dan IL-10 dengan miR-29b-3p di semua kelompok.

Kata kunci : aterosklerosis, ekstrak tomat, inflamasi, miR-29b-3p

Abstract

Effect of The Tommato Extract Supplementation toward Inflammation Progressivity and miR29b-3p Expression in High-Cholesterol induced Rats

Muchamad Dafip, Winarto, Muhammad Husein Gasem

Introduction: High cholesterol levels in blood plasma leads atherosclerotic conditions, which characterized by LDL-C oxidation in blood vessels. inflammation and reslease TNF- α , IL-6 and IL-10. Tomatoes reduces cholesterol levels and scavanges free radicals that cause inflammation. Then, inflammation and tomato consumption releases miRNA that can be used as biomarker or therapeutic target of atherosclerosis. One of the important miRNAs in the endothelium is miR-29-3p which is associated with inflammation, LDL-C and IL-6. This study aims to analyze the relationship of miR-29b-3p expression and TNF- α , IL-6 and IL-10.

Research Method: This research was pre-post random control design. A total of 24 Sprague Dawley rats were randomly selected and divided into four groups, equally. The first group, K1 was healthy rats, given only standard feed. Group K2, K3 and K4 were induced with 2 ml of cholesterin/ 200 grBB/ day, then, group K2 was only given a placebo, K3 was supplemented with atorvastatin 20 mg/ 200 grBB, and K4 was supplemented with 16 mg/ 200 grBB/ day. Tomato extract was obtained from 50 kg extracted using multilevel maceration with petroleum ether as the main solvent. Blood was collected on day 0 and day 60. The miR-29b-3p expression analysis was performed by qRT-PCR and TNF- α , IL-6 and IL-10. analyzes were performed using ELISA. Confirmation of intimal damage was done describing the condition of aorta. The miR-29b-3, then analzsed using Kruskal-Walis analysis, whereas TNF- α , IL-6 and IL-10 were analysed using one-way ANOVA continued in the LSD test.

Results and discussion: miR-29b-3p expression in K1 decreased to 0.48 ± 0.03 fold change, while K2 increased to $2.48 \times 10^4 \pm 3.58 \times 10^3$, in addition, in K2 also showed an increase in TNF- α to 1270.09%; IL-6 of 59.08%; and IL-10 up to 209.21%. The increase was significantly different compared to K3 and K4 mice. Where is the increase in TNF- α , IL-6, IL-10, respectively 98.96%, 21.79%; and 65.67%. Whereas in K4, TNF- α , it increased by 59.07%; IL-6 of 23.33%; and IL-10 by 37.75%. The increase is likely due to ROS because it triggers the activation of the NF- κ B signaling pathway so that TNF- α production has increased, followed by IL-6, IL-10 and miR-29b-3p. Tomato extract has a high content of lycopene, carotenoids, vitamins C and E, acts as an inhibitor of ROS and stabilizes the production of cytokines. These results were reinforced by the absence of plaque in the aortic rat group K1, K3 and K4.

Conclusion: Tomato extract supplementation is able to prevent plaque on the aortic wall of rats that supported by TNF- α titers, IL-6, IL-10 and miR-29b-3p expression in the K4 group were lower than the K2 group. Then, TNF- α related on IL-6 and IL-10 miR-29b-3p in all groups.

Keywords: atherosclerosis, tomato extract, inflammation, miR-29b-3p

DAFTAR SINGKATAN

3'UTR	: 3'-untranslated region
9cRA	: 9-c retinoid acid
ABCA1	: ATP-binding cassette transporter 1
ABCG1	: ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
cDNA	: complementary DNA
DGCR8	: DiGeorge syndrome chromosomal [critical] region 8
EGFR	: epidermal growth factor receptor
HLA-DR	: human leukocyte antigen-DR isotype
HMGB1	: high mobility group box 1
HMG-CoA	: hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A
hsa	: Homo sapiens
ICAM-1	: intercellular adhesion molecule-1
IL	: interleukin 1
LDL-C	: low density lipoprotein-cholesterol
LXR	: liver X receptor
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
miRNA	: micro ribo nucleate acid
mmu	: Mus musculus
MMP-2	: matrix metalloproteinase-2
MVB	: multivesicular bodies
NF- κ B	: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of the activated B-cell
NFE2L2	: nuclear factor erythroid 2-related factor 2
ORF	: open reading frame
ox-LDL	: oxidized-low density lipoprotein
p38MAPK	: p38 mitogen-activated protein kinase
PPAR- γ	: peroxisome proliferator activated receptor gamma
RAR	: retinoid acid receptor
RISC	: ribo nucleate acid-induced silencing complex
RNAse	: ribonuclease
rno	: Rattus norvegicus
ROS	: radical oxygen species
RT-qPCR	: real-time polymerase chain reaction
RAR	: retinoid X receptor
SMAD	: small "mothers against decapentaplegic"
TLR4-MD2	: toll like receptor-Lymphocyte antigen 96
TLR4-CD14	: toll like receptor-cluster of differentiation 14
TGF- β	: transforming growth factor-beta
TNF- α	: tumor necrosis factor-alpha
VCAM-1	: vascular cell adhesion molecules-1