

DISERTASI

**PERAN *MICRO-RNA (miRNA)* 126 DAN 146a, POLIMORFISME GEN
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) DAN POLIMORFISME
GEN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)* PADA
TERBENTUKNYA EDEMA MAKULA DIABETIK**



WIMBO SASONO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**PERAN *MICRO-RNA (miRNA)* 126 DAN 146a, POLIMORFISME GEN
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) DAN POLIMORFISME
GEN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)* PADA
TERBENTUKNYA EDEMA MAKULA DIABETIK**

WIMBO SASONO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**PERAN *MICRO-RNA (miRNA)* 126 DAN 146a, POLIMORFISME GEN
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) DAN POLIMORFISME
GEN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)* PADA
TERBENTUKNYA EDEMA MAKULA DIABETIK**

**DISERTASI
Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
dan dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)
Pada hari : Selasa
Tanggal : 4 Agustus 2020
Pukul : 10.00 – 12.00 WIB**

Oleh :

**WIMBO SASONO
011217017342**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

PERAN *MICRO-RNA (miRNA)* 126 DAN 146a, POLIMORFISME GEN
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) DAN POLIMORFISME GEN
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PADA
TERBENTUKNYA EDEMA MAKULA DIABETIK

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 4 AGUSTUS 2020

Oleh
Promotor

Prof. Dr. Aryati, dr., MS., Sp.PK(K)
NIP. 196308151990022001

Kopromotor

Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., Sp.M(KVR)
NIP. 194602122016036101

Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)
pada tanggal 29 Juni 2020

Panitia Penguji

Ketua : 1. Dr. Nurwasis, dr., SpM(K)
Anggota : 2. Prof. Dr. Aryati, dr., MS., SpPK(K)
3. Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM(K)
4. Prof. Arief S. Kartasasmita, dr., SpM(K), MM,M.kes, Ph.D
5. Dr. Windhu Purnomo, dr., MS
6. Dr. Sony Wibisosno M, dr., SpPD., K-EMD., FINASIM
7. Dr. Ali Rohman, Drs., M.Si., Ph.D

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 224/UN3.1.1/HK.04/2020
Tanggal : 29 Juni 2020

UCAPAN TERIMAKASIH

ALHAMDULILLAHIROBBILALAMIIN segala puji bagi Allah SWT, atas segala rahmat dan karunianya sehingga penyusunan disertasi ini dapat terselesaikan.

Penasehat akademik, promotor, kopromotor, dan konsultan yang selalu memberikan arahan, motivasi serta saran. Oleh karena itu pada kesempatan ini, perkenankan saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr. Aryati, dr.,MS., Sp.PK(K), sebagai Promotor dan Penasehat Akademik, serta guru saya yang tidak pernah lelah dengan tulus ikhlas, penuh perhatian dantesabaran memberikan arahan, bimbingan, motivasi, teladan, serta wawasannya yang luas sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., Sp.M(KVR) atas kesediaan beliau menjadi Kopromotor yang telah memberi semangat, dorongan dan memberi saran dalam penyusunan disertasi sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas arahan, wawasan, dan pemikiran yang diberikan dalam penelitian dan penulisan disertasi ini.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Moh. Nasih, SE, MT, AK., CMA atas fasilitas pendidikan dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan gelar Doktor pada program Studi Ilmu kedokteran jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. David S. Perdanakusuma, dr., Sp.BP-RE(K) selaku Wadek I, Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) selaku Wadek II dan Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS, Sp.MK(K) selaku Wadek III dan jajaran atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menimba ilmu, belajar, dan menyelesaikan gelar Doktor pada program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR sebagai KPS Ilmu kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas motivasi dan fasilitas yang diberikan kepada saya dalam menjalani dan menyelesaikan setiap tahapan pendidikan doktor pada program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Tim penguji mulai dari ujian kualifikasi, usulan penelitian dan penilaian naskah disertasi: Prof. Dr. Aryati, dr., MS., SpPK(K), Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM(K), Prof. Arief S. Kartasasmita, dr., SpM(K), MM,M.kes, Ph.D, Dr. Windhu Purnomo, dr., MS, Dr. Nurwasis, dr., SpM(K), Dr. Sony Wibisosno M, dr., SpPD., K-EMD., FINASIM, Dr. Ali Rohman, Drs., M.Si., Ph.D

Staf pengajar program studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof.Dr.Suhartono Taat Putra, dr, MS; Prof. Dr. Harjanto J.M, dr., AIF; Prof. Dr. Zainuddin, Apt; Widodo JP, dr, MPH, Dr. PhD; Siti Pariani, dr, MS, MSc, PhD; Dr.Soenaryo, dr., MS, MSc; Dr. F Sustini, dr, MS; Dr. Hj. Susilowati Andajani, dr., MS; Dr. H. Budi Utomo, dr., MS; Prof. Dr. I Ketut Suidiana, DRS., Drh; Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., SpPar(K); Prof. Dr. Retno Handayani, dr, MS, PhD; Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes; Toetik Koesbardiati, Dra, Ph.D; Dr. Gondo Mastutik, drh, M.Kes; Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh; Dr. Ferdiansyah, dr, Sp.OT dan para staf pengajar lainnya yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang sangat berharga bagi peneliti dalam menyelesaikan penelitian dan disertasi.

Dr. Windhu Purnomo, dr., MS, sebagai konsultan dibidang metodologi penelitian dan statistik yang telah membimbing saya dalam membuka wawasan saya tentang metodologi penelitian dan analisa statistik serta aplikasinya dalam penelitian saya.

Prof. Arief S. Kartasmita, dr., SpM(K), MM,M.Kes, Ph.D selaku penguji eksternal yang telah bersedia menjadi penguji di tengah kesibukan beliau sehingga dapat memberikan masukan dan bimbingan dalam penulisan disertasi ini.

Dr. Joni Wahyuhadi, dr., Sp.BS(K) selaku Direktur Utama, beserta segenap Pimpinan Rumah Sakit RSUD Dr.Soetomo Surabaya, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas untuk melakukan penelitian di RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Prof. Dr. Nasronudin, dr.,Sp.PD, KPTI, FINASIM selaku Direktur Rumah Sakit Unair Khusus Infeksi – Rumah Sakit Universitas Airlangga, atas fasilitas laboratorium yang diberikan pada penelitian ini.

Prof. Maria Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D selaku Direktur ITD Universitas Airlangga, atas fasilitas laboratorium yang diberikan pada penelitian ini.

Dr. Nurwasis, dr., SpM(K) sebagai Kepala Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr.Soetomo Surabaya yang telah memberikan motivasi dan bimbingan.

Segenap Staf Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr.Soetomo Surabaya, khususnya Divisi Vitreoretina, Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM(KVR); Moestidjab, dr., SpM(KVR); Muhammad Firmansjah, dr., SpM(K); Sauli Ari Widjaja, dr., SpM(K); Ima Yustiarini, dr., SpM dan Ady Dwi Prakosa, dr., SpM, atas bantuan dan motivasi dalam penelitian dan penulisan disertasi ini.

Dr. Soebagjo Adi S., dr., Sp.PD, K-EMD, FINASIM sebagai Kepala Departemen/SMF Ilmu Penyakit Dalam, serta segenap Staf Divisi Endokrin dan Metabolik Departemen/SMF Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran

Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, atas kerjasama dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

Dr. Yetti Hernaningsih, dr., SpPK(K), sebagai Kepala Departemen/SMF Patologi Klinik, serta segenap Staf Departemen/SMF Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, atas bantuan dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

Trisiswati Indranarum, dr., Sp.KK selaku Kepala Instansi Rawat Jalan, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas untuk melakukan penelitian di Instalasi Rawat Jalan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Para staf administrasi di tata usaha program studi ilmu kedokteran jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Adhdriyani, Fitriya Diah Isnaini, Pramita Kurniasari dan Sobkhi Mafakhir yang telah membantu saya selama pendidikan sampai terselesikannya disertasi ini.

Tim Pelaksana Lintas Departemen dan Instansi, Agus, Nita (Patologi Klinik), Irma, Ika (Sekretaris Divisi Vitreoretina), Ibu Susi (Kepala IRJ Penyakit Dalam), Bapak Huda, Bapak Basuki, dan Bapak Eko, Nurul (RSKI), Amin (ITD) yang telah membantu saya selama penelitian.

Rekan-rekan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor angkatan 2012 dan rekan-rekan peserta MKPD, berkat semangat kebersamaan, dukungan dan doanya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Istri tercinta Rahmadewi, dr., SpKK (K), yang mendampingi dengan sabar dan penuh cinta, memberikan semangat, mendorong dan memahami kesibukan selama pendidikan jenjang doktor ini dan serta kedua buah hatiku tercinta dr. Diandra Astaridewi dan ananda Ilhan yang memacu semangat untuk menyelesaikan sekolah.

Ucapan terimakasih saya ucapkan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah membantu dalam penelitian dan penulisan disertasi.

Akhir kata semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu kedokteran khususnya Ilmu Kesehatan Mata, Perkembangan ilmu di Indonesia serta terapi pasien diabetes. Semoga Allah SWT selalu memberikan rahmatnya kepada kita semua.

Amin Yaa Robbal Alamin.

Penulis

RINGKASAN

Retinopati diabetik adalah salah satu penyebab utama kebutaan pada usia kerja dan populasi lanjut usia. Edema makula diabetik/*Diabetic Macular Edema* (DME), suatu komplikasi lanjutan dari DR, dapat mengenai hingga 7% dari penderita diabetes mellitus.

Peranan genetika dipertimbangkan sebagai faktor resiko retinopati diabetik (DR) karena dari beberapa pengamatan didapatkan bahwa pengendalian kadar glukosa darah, dislipidemia dan tekanan darah saja ternyata tidak cukup dalam mengendalikan perkembangan DR.

Polimorfisme pada gen yang meng-*encoding Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) sangat potensial untuk merubah kepekaan diabetes melitus (DM) terhadap terjadinya DR.

Gen dari *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) juga telah diteliti secara ekstensif keterkaitannya secara potensial dengan terjadinya DR.

MikroRNA (miRNA) memainkan peran penting dalam proses patologi retinopati diabetik, termasuk respon peradangan, pensinyalan insulin, dan angiogenesis.

Patogenesis DME meliputi edema sitotoksik dan vasogenik. Pada edema makula, akumulasi cairan dapat terjadi dalam ruang intraseluler atau ekstraseluler.

Faktor utama yang berpengaruh terhadap terjadinya edema makula adalah permeabilitas *blood retinal barrier* (BRB), tekanan hidrostatik kapiler, tekanan hidrostatik jaringan, tekanan osmotik jaringan dan tekanan osmotik plasma

Optical Coherence Tomography (OCT) merupakan parameter kuantitatif terbanyak saat ini yang digunakan adalah untuk mengukur ketebalan retina mulai lapisan *internal limiting membrane* (ILM) sampai ke lapisan *retinal pigment epithelium* (RPE).

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan seberapa besar peranan masing-masing atau bersamaan antara polimorfisme gen ACE/VEGF dan microRNA (miRNA) 126 dan 146a pada terjadinya edema makula diabetik

Jenis Penelitian ini adalah studi observasional analitik dengan rancang bangun studi *case control (human model)*. Unit penelitian ini adalah cairan darah perifer penderita retinopati diabetik yang diambil dengan *total sampling* variabel bebas penelitian ini adalah polimorfisme pada gen VEGF, polimorfisme pada gen ACE, kadar ACE, kadar VEGF dan miRNA, variabel terikat penelitian ini adalah keadaan edema makula diabetik yang tergambarkan secara kuantitatif dalam ketebalan makula sentral. Seleksi sampel dilakukan di URJ Penyakit Dalam dan Mata RSUD Dr Soetomo sejak awal 2020. Pengambilan sampel darah dan analisa dilakukan di laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr Soetomo. Analisa biomolekuler dan genetika dilakukan di Laboratorium ITD dan Rumah Sakit Khusus Infeksi (RSKI) Universitas Airlangga. Data yang terkumpul pada penelitian ini terdiri dari data kuantitatif dari hasil pemeriksaan immune histo kimia, *Optical Coherence Tomography* merek Heidelberg, Pemeriksaan ELISA, Pemeriksaan PCR dan *sequencing* DNA Pemeriksaan RT-qPCR. Penelitian ini telah lolos Telaah Etik Protokol Penelitian (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dengan Surat Hasil Telaah Etik Protokol Penelitian No. 1941/KEPK/IV/2020.

Jumlah sampel yang terkumpul sebanyak 108, dengan perincian 55 pasien dengan edema makula (kasus) dan 53 pasien tanpa edema makula (kontrol), yang dalam pemeriksaan lanjutan mengalami penyusutan menjadi 54 kasus dan 50 kontrol.

Untuk pembagian retinopati diabetik kelompok kasus dan kontrol (CASTROL), kelompok kasus dengan edema makula dan kelompok kontrol adalah tanpa edema makula. Penghitungan hasil rerata untuk ketebalan retina tepatnya di daerah makula, didapatkan untuk kelompok DME sebesar 453,13 μm dan untuk kelompok non-DME 242,17 μm

Lebih rendahnya angka polimorfisme pada kelompok DME (gen ACE maupun gen VEGF) menyebabkan dugaan kurang berperannya polimorfisme pada kejadian DME dan dari hasil uji statistik dengan uji Logistik Regresi ternyata hanya kadar VEGF saja yang berkorelasi positif bermakna dengan edema makula.

Hasil uji Logistik Regresi antara kadar ACE dengan kadar VEGF menunjukkan adanya korelasi potensial ($p=0,078$). Kadar ACE juga dipengaruhi oleh miRNA 126 meskipun secara uji statistik kurang bermakna ($p=0,087$).

Dari hasil uji statistik didapatkan adanya korelasi positif antara miRNA 126 dengan terjadinya edema makula, meski uji statistik dengan kadar VEGF menunjukkan hasil korelasi yang tidak bermakna. Hal ini menunjukkan adanya mekanisme lain dari miRNA dalam proses terjadinya edema makula diluar jalur VEGF.

Dalam kaitan dengan mekanisme terjadinya edema makula, kadar VEGF, ($p=0,082$) dan miRNA 126 ($p= 0,069$) mempunyai potensi untuk terjadinya edema makula. Kadar ACE sekalipun tidak signifikan, namun mempunyai potensi yang cukup untuk mempengaruhi kadar VEGF. MiRNA 126 tidak signifikan mempengaruhi kadar ACE ($p= 0,087$), tetapi cukup potensial untuk mempengaruhi meningkatnya kadar ACE.

Polimorfisme sendiri tidak menunjukkan korelasi yang positif bermakna dengan produknya. VEGF sebagai titik temu beberapa mekanisme mempunyai korelasi positif dan berpotensi untuk terjadinya edema makula diabetik ($p=0,082$).

Sebagai kesimpulan penelitian ini adalah potensi terjadinya edema makula diabetik akan menjadi lebih besar jika mikroRNA 126 dan ACE bergabung dengan VEGF dalam mekanisme pembentukan edema makula diabetik.

Sebagai kesimpulan penelitian ini adalah miRNA 126 mempunyai korelasi terkuat dalam proses pembentukan edema makula diabetik dengan utamanya melalui jalur ACE dan potensi ini diperbesar pada kadar polimorfisme genotype ACE yang rendah.

Selain fungsi pengaturan pada ekspresi gen dan polimorfisme, miRNA dianggap sebagai target terapi potensial, serta penanda diagnostik untuk banyak penyakit. Pemahaman tentang mekanisme patologis yang mendasari retinopati diabetik masih belum lengkap dan investigasi tambahan diperlukan untuk mengembangkan strategi terapi baru.

SUMMARY

Diabetic retinopathy (DR) is one of the main causes of blindness in the working age and elderly population. Diabetic macular edema (DME), an advanced complication of DR, can affect up to 7% of people with diabetes mellitus.

The role of genetics as risk factors for Diabetic Retinopathy (DR) is considered, related to several observations that found blood glucose levels, dyslipidemia and blood pressure alone was apparently not enough to control the development of DR.

Polymorphisms in genes that encode Angiotensin Converting Enzyme (ACE) are very potential to change the sensitivity of Diabetes Melitus (DM) to the occurrence of DR. The gene from Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has also been extensively investigated for its potential association with the occurrence of DR. MicroRNA (miRNA) plays an important role in the pathological process of diabetic retinopathy, including the inflammatory response, insulin signaling, and angiogenesis. Pathogenesis of DME includes cytotoxic and vasogenic edema. In macular edema, fluid accumulation can occur in intracellular or extracellular spaces. The main factors that influence macular edema are blood retinal barrier (BRB) permeability, capillary hydrostatic pressure, tissue hydrostatic pressure, tissue osmotic pressure and plasma osmotic pressure.

Optical Coherence Tomography (OCT) is widely used parameter currently to measure the thickness of the retina from the internal limiting membrane (ILM) to the retinal pigment epithelium (RPE) layer quantitatively.

The purpose of this study is to prove the role of ACE/VEGF gene polymorphism and microRNA (miRNA) 126 and 146a as single or combination factors in the occurrence of diabetic macular edema.

This type of research is an analytic observational study with case control study design (human model). This unit sample is collected from peripheral blood in patient with diabetic retinopathy. The independent variables of this study are polymorphisms in the VEGF gene, polymorphisms in the ACE gene, ACE levels, VEGF levels and miRNA, while the dependent variable of this study is the condition of diabetic macular edema described quantitatively in central macular thickness. Sample selection was carried out at the Internal Medicine and Ophthalmology Outpatient Clinic Dr. Soetomo Hospital Surabaya, since the begin of 2020. Blood sampling and analysis was carried out in the Clinical Pathology Laboratory of Dr. Soetomo Hospital. Biomolecular and genetic analysis was performed at the Institute of Tropical Disease (ITD) and Infection Diseases Hospital (RSKI) Universitas Airlangga. The data collected in this study consisted of quantitative data from the results of the histo-chemical immune examination, Heidelberg Optical Coherence Tomography, ELISA Examination, RT-qPCR Examination and DNA sequencing. The study protocol was approved by The Ethics Commission of Health Research Dr. Soetomo Hospital Surabaya, with Research Protocol Study Ethics Letter No. 1941 / KEPK / IV / 2020.

The number of samples collected was 108, consist of 55 patients of cases group and 53 patients of control group, which in the follow-up examination had decreased to 54 in cases group and 50 in control group.

The subjects was divided into case and control groups (CASTROL) Case group waa subjects presenting macular edema and the control group was without

macular edema. The mean results for retinal thickness precisely in the macula area was obtained for the DME group of 453.13 μm and for the non-DME group 242.17 μm

The lower rate of polymorphism (ACE gene and VEGF gene) in the cases group causes the alleged lack of polymorphism role in the occurrence of DME and from the results of statistical tests, it turns out that only VEGF levels are positively correlated significantly with macular edema.

Logistic Regression test results between ACE levels and VEGF levels showed a potential correlation ($p = 0.078$). ACE levels were also influenced by miRNA 126 although statistically less significant ($p = 0.087$).

From the results of statistical tests found a positive correlation between miRNA 126 with macular edema, although statistical tests with VEGF levels showed no significant correlation results. This shows the existence of other mechanisms of miRNA in the process of macular edema outside the VEGF pathway.

In relation to the mechanism of diabetic macular edema, VEGF levels ($p = 0.082$) and miRNA 126 ($p = 0.069$) have the potential for macular edema. Even ACE levels are not significant, but have enough potential to affect VEGF levels. MiRNA 126 did not significantly affect ACE levels ($p = 0.087$), but it was potential enough to influence increasing ACE levels.

Polymorphism itself does not show a significant positive correlation with the product. VEGF as a meeting point for several mechanisms has a positive correlation and has the potential for diabetic macular edema ($p = 0.082$).

The conclusion of this study is that miRNA 126 has the strongest correlation in the process of diabetic macular edema formation primarily through the ACE pathway and this potential is magnified at low levels of ACE genotype polymorphism.

In addition to the regulatory function in gene expression and polymorphism, miRNA is considered a potential therapeutic target, as well as a diagnostic marker for many diseases. An understanding of the pathological mechanisms underlying diabetic retinopathy is still incomplete and additional investigations are needed to develop new therapeutic strategies.

ABSTRAK

Peran *Micro-RNA (miRNA)* 126 Dan 146a, Polimorfisme Gen *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* Dan Polimorfisme Gen *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* Pada Terbentuknya Edema Makula Diabetik

Wimbo Sasono

Pendahuluan Untuk mempelajari hubungan antara edema makula diabetik (DME) dan *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE), polimorfisme gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan mikroRNA (miRNA) di rawat jalan Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya. Pengambilan sampel darah dan analisis dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Dr. Soetomo. Analisis biomolekuler dan evaluasi genetika dilakukan di Laboratorium ITD dan Rumah Sakit Infeksi Khusus (RSKI) Universitas Airlangga.

Metode Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan desain studi kasus kontrol (model manusia). Cairan darah perifer diambil dengan metode sampel total yang terdiri dari 108 pasien diabetes dan dengan kriteria inklusi, 54 dengan edema makula diabetik (DME) dan 50 tanpa pasien DME terlibat. Semua pasien diperiksa dengan *Optical Coherence Tomography* (OCT), pemeriksaan darah diabetes rutin (termasuk HbA1C), *Polymerase chain reaction* dan RT-qPCR *sequencing*. Variabel independen dari penelitian ini adalah polimorfisme pada gen VEGF, polimorfisme pada gen ACE, kadar ACE, kadar VEGF dan miRNA, sedangkan variabel dependen dari penelitian ini adalah keadaan edema makula diabetik yang dijelaskan secara kuantitatif dalam ketebalan makula sentral.

Hasil Sehubungan dengan mekanisme edema makula, kadar VEGF ($p = 0,082$), miRNA 126 ($p = 0,069$) memiliki korelasi potensial positif untuk mempengaruhi terjadinya edema makula. Level ACE memiliki potensi yang cukup kuat untuk mempengaruhi level VEGF walaupun uji statistiknya kurang signifikan. MiRNA 126 tidak secara signifikan mempengaruhi level ACE ($p = 0,087$), tetapi cukup potensial untuk mempengaruhi peningkatan level ACE. Dari hasil uji statistik dengan uji Regresi Logistik ditemukan bahwa ada korelasi potensial tidak signifikan tetapi positif antara miRNA 126 dengan terjadinya edema makula meskipun uji korelasi statistik dengan tingkat VEGF menunjukkan tidak ada hasil korelasi yang signifikan. Uji statistik ini menunjukkan adanya mekanisme miRNA 126 lainnya dalam proses edema makula di samping jalur VEGF. VEGF memiliki korelasi potensial positif tetapi tidak ada korelasi yang signifikan dengan terjadinya edema makula diabetik ($p = 0,082$).

Kesimpulan MikroRNA 126 dan ACE-VEGF secara kombinasi memiliki potensi positif dalam mekanisme edema makula diabetik dan akan lebih besar dalam kondisi yang kurang polimorfik.

Kata Kunci Edema Makula Diabetik, miRNA126, miRNA146a, Polimorfisme ACE & Polimorfisme VEGF.

ABSTRACT

The Role of Micro-RNA (miRNA) 126 And 146a, Polymorphism Of Angiotensin Converting Enzyme (ACE), And Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) In Pathogenesis Of Diabetic Macular Edema

Wimbo Sasono

Introduction To investigated the relationship between diabetic macular edema (DME) and angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gene polymorphism and microRNA (miRNA) in outpatient of Dr Soetomo Hospital Surabaya. Blood sampling and analysis were performed in the Clinical Pathology Laboratory of Dr. Soetomo Hospital. Biomolecular analysis and genetics evaluation were carried out at the ITD Laboratory and the Special Infection Hospital (RSKI) of Airlangga University.

Methods This type of research is an analytic observational study with case control study design (human model). Peripheral blood fluid was taken with total sample method consist of 108 diabetes pasien and after inclusion criteria, 54 with diabetic macular edema (DME) and 50 with no DME patients were involved. All of the patient was examined with optical Coherence Tomography (OCT), routine diabetes parameter (include HbA1C), Polymerase chain reaction and RT-qPCR sequencing. The independent variables of this study are polymorphisms in the VEGF gene, polymorphisms in the ACE gene, ACE levels, VEGF levels and miRNA, while the dependent variable of this study is diabetic macular edema which described quantitatively in central macular thickness.

Result In relation to the mechanism of macular edema, VEGF levels ($p=0,082$), miRNA 126 ($p=0.069$) have a positive potential correlation to influence the occurrence of macular edema. ACE levels have a strong enough potential to affect VEGF levels even though the statistical tests are less significant. MiRNA 126 did not significantly affect ACE levels ($p=0.087$), but it was potential enough to influence the increase in ACE levels. From the results of the statistical test with the Regression Logistic test it was found that there was a no-significant but positive potential correlation between the miRNA 126 with the occurrence of macular edema even though the statistical correlation test with VEGF levels showed no significant correlation results. This statistical test indicated the existence of other mechanisms of miRNA 126 in the process of macular edema beside the VEGF pathway. VEGF has a positive potential correlation but no significant correlation with the occurrence of diabetic macular edema ($p=0.082$).

Conclusion The microRNA 126 and ACE-VEGF in combination have a positive potential for diabetic macular edema mechanism and will be greater in a less polymorphic condition.

Keywords Diabetic Macular Edema, miRNA126, miRNA146a, Polymorphism of ACE & Polymorphism of VEGF.

DAFTAR ISI

Sampul Dalam	i
Lembar Awal Disertasi	ii
Lembar Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	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	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Retinopati Diabetik	8
2.2 Edema Makula Diabetik	9
2.2.1 <i>External-Blood Retinal Barrier (e-BRB) dan Retinal Pigment Epithelium (RPE)</i>	12
2.2.2 <i>Inner-Blood Retinal Barrier (i-BRB)</i>	12
2.2.3 Peran <i>Tight Junction</i> , Sel Muller dan Sel Mikroglial	13
2.2.4 Kerusakan BRB	16
2.2.5 Patogenesis DME	17
2.3 Sistem Renin Angiotensin	19
2.4 Polimorfisme Gen <i>Angiotensin Converting Enzyme (ACE)</i>	23
2.5 Sistem <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i>	24
2.6 Polimorfisme Gen VEGF	26
2.7 Jalur Mikro RNA	27
2.8 Analisis Kuantitatif <i>Optical Coherence Tomography (OCT)</i>	36
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	39
3.1 Kerangka Konseptual	39
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	40
3.3 Hipotesis Penelitian	43
BAB 4 METODE PENELITIAN	45
4.1 Jenis Penelitian	45
4.2 Unit Penelitian dan Besar Sampel	45

4.3	Kriteria Inklusi, Eksklusi dan <i>Drop-Out</i>	45
4.4	Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional	46
4.4.1	Variabel Bebas	46
4.4.2	Variabel Terikat	46
4.4.3	Variabel Kendali	46
4.4.4	Definisi Operasional	46
4.5	Lokasi Dan Waktu Penelitian	49
4.6	Prosedur Penelitian	49
4.6.1	Prosedur Penelitian Awal	49
4.6.2	Prosedur Penelitian Biomolekular	50
4.6.2.1	Penentuan Genotipe VEGF	50
4.6.2.2	Penentuan Genotipe ACE	51
4.6.2.3	Pemeriksaan VEGF	52
4.6.2.4	Pemeriksaan ACE	52
4.6.2.5	Pemeriksaan miRNA	52
4.7	Kerangka Operasional Penelitian	55
4.8	Analisis Data	56
4.9	Analisis Jalur	56
4.10	Kelayakan Etik	56
BAB 5	HASIL PENELITIAN	57
5.1	Data Penelitian	57
5.1.1	Data Demografi Subjek Penelitian	58
5.1.2	Karakteristik HbA1C Subjek Penelitian	62
5.1.3	Karakteristik Polimorfisme Gen ACE	62
5.1.4	Karakteristik Polimorfisme Gen VEGF	65
5.1.5	Karakteristik Ekspresi miRNA	67
5.2	Analisis Dan Hasil Penelitian	69
BAB 6	PEMBAHASAN	75
6.1	Genotip Gen ACE	76
6.2.	Hubungan miRNA Dengan Jalur ACE dan Jalur VEGF	80
6.3	Hubungan antara ACE dan VEGF	84
6.4	Peranan miRNA Pada Terjadinya Edema Makula Diabetik	85
6.5	MikroRNA Sebagai Biomarker Retinopati Diabetik	91
6.6	Penggunaan ACE inhibitor & Anti Receptor β Blocker (ARB) Dalam Aplikasi Klinis	92
6.7	Nilai Kebaruan Penelitian	94
6.8	Keterbatasan Penelitian	95
BAB 7	PENUTUP	97
7.1	Kesimpulan	97
7.2	Saran	98
DAFTAR PUSTAKA		99

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Karakteristik Subjek Penelitian Berdaraskan Jenis Kelamin	58
Tabel 5.2	Karakteristik Subjek Penelitian Berdasarkan Rerata Usia	58
Tabel 5.3	Karakteristik subjek penelitian berdasarkan rerata tajam penglihatan	59
Tabel 5.4	Karakteristik subjek penelitian berdasarkan lama menderita diabetes	59
Tabel 5.5	Karakteristik subjek penelitian berdasarkan tebal makula	60
Tabel 5.6	Karakteristik subjek penelitian berdasarkan kadar HbA1C	62
Tabel 5.7	Distribusi Polimorfisme Gen ACE	63
Tabel 5.8	Distribusi Genotipe ACE Dan Alel ACE	63
Tabel 5.9	Distribusi Polimorfisme Gen VEGF	65
Tabel 5.10	Distribusi Genotipe VEGF Dan Alel VEGF	66
Tabel 5.11	Karakteristik subjek penelitian berdasarkan pemeriksaan miRNA	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Interaksi sistem kallikrein/kinin (KKS) plasma dengan sistem renin-angiotensin (RAS)	22
Gambar 2.2	Produksi MikroRNA	31
Gambar 2.3	Maturasi dan Fungsi miRNA	33
Gambar 2.4	Gambar <i>multicolor fundus photography</i>	37
Gambar 2.5	Gambar <i>spectral domain OCT</i>	38
Gambar 5.1	Distribusi subjek penelitian berdasar umur dan jenis kelamin	59
Gambar 5.2	Distribusi subjek penelitian berdasar berdasar lama diabetes	60
Gambar 5.3	Distribusi subjek penelitian tebal retina	60
Gambar 5.4	Gambar contoh hasil pemeriksaan foto fondus dan OCT penderita DME	61
Gambar 5.5	Distribusi subjek penelitian berdasar kadar HbA1C	62
Gambar 5.6	Distribusi Polimorfisme Gen ACE	63
Gambar 5.7	Gambar hasil pemeriksaan PCR primer gen ACE	64
Gambar 5.8	Distribusi Polimorfisme Gen VEGF	66
Gambar 5.9	Gambar hasil pemeriksaan PCR primer gen VEGF	66
Gambar 5.10	Gambar Hasil <i>Sequencing</i> homologi Gen VEGF	67
Gambar 5.11	Gambar RT-qPCR kurva amplikasi <i>hsa-mir-126</i> (A) dan <i>melting curve</i> (B)	68
Gambar 5.12	Gambar RT-qPCR kurva amplikasi <i>hsa-mir-146a</i> (A) dan <i>melting curve</i> (B)	69
Gambar 5.17	Gambar analisis jalur hasil penelitian	74
Gambar 6.1	Gambar analisis jalur teori kebaruan penelitian	95

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Sertifikat Layak Etik	107
Lampiran 2	Penjelasan Informasi (<i>Information for consent</i>)	108
Lampiran 3	Pernyataan persetujuan (<i>Informed consent</i>)	112
Lampiran 4	Hasil Uji Statistik	113

DAFTAR SINGKATAN

ACEi	: <i>ACE inhibitor</i>
ACE	: <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
Ang 1-2	: <i>Angiotensin 1-2</i>
ANG	: <i>Angiotensin</i>
ANG II	: <i>Angiotensin II</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
BK	: <i>Bradykinin</i>
BRB	: <i>Blood Retinal Barrier</i>
CME	: <i>Cystoid Macular Edema</i>
Ct	: <i>Cycle threshold</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DR	: <i>Diabetic Retinopathy (Retinopati Diabetik)</i>
DME	: <i>Diabetic Macular Edema</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ETDRS	: <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
Fc	: <i>Fold change</i>
GCL	: <i>Ganglion Cell Layer</i>
HB-EGF	: <i>Heparin Binding Epidermal Growth Factor</i>
HREc	: <i>Human Retinal Epithelial Cells</i>
ICAM -1	: <i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
INL	: <i>Inner Nuclear Layer</i>
IPL	: <i>Inner Plexiform Layer</i>
KKS	: <i>Kallikrein-Kinin System</i>
LK	: <i>Low Molecule</i>
lncRNA	: <i>long non-coding Ribonucleic Acid</i>
MetS	: <i>Metabolic Syndrome</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
miRNA	: <i>micro Ribonucleic Acid</i>
MMP	: <i>Maytrix Metalloproteinase</i>
ncRNA	: <i>non-coding Ribonucleic Acid</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
NPDR	: <i>Non Proliferative Diabetik Retinopathy (Retinopati Diabetik Non-Proliferatif)</i>
OCT	: <i>Optical Coherence Tomography</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDR	: <i>Proliferative Diabetic Retinopathy (Retinopati Diabetik Proliferatif)</i>
PK	: <i>Plasma Kininogen</i>
PRCP	: <i>Prolyl Carboxy Peptidase</i>
RAS	: <i>Renin-Angiotensin System</i>
REC	: <i>Retinal Endothelial Cell</i>
RISC	: <i>Ribonucleic Acid induced Silencing Complex</i>

RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPE	: <i>Retinal Pigment Epithelial</i>
SnP	: <i>Single nucleotide Polymorphidm</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer & Activator of Transcription 3</i>
T1DM	: <i>Type-1 Diabetes Mellitus</i>
T2DM	: <i>Type-2 Diabetes Mellitus</i>
TK	: <i>Tissue Kallikrein</i>
TLR4	: <i>Toll Liked Receptor 4</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
tPA	: <i>Tissue Plasminogen Activator</i>
UTR	: <i>Untranslated Region</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>