

2018

Pengaruh Pemberian Evoo Terhadap Kadar MDA Plasma dan Ekspresi Protein Hsp70, Bcl-2 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting Model Preeklampsia

Irianti, Evi

Universitas Sumatera Utara

<http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/12057>

Downloaded from Repositori Institusi USU, Universitas Sumatera Utara

**PENGARUH PEMBERIAN EVOO TERHADAP KADAR MDA
PLASMA DAN EKSPRESI PROTEIN HSP70, BCL-2
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
BUNTING MODEL PREEKLAMPSIA**

DISERTASI

**EVI IRIANTI
138109005**



**PROGRAM PASCA SARJANA BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
MEDAN
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EVOO TERHADAP KADAR MDA
PLASMA DAN EKSPRESI PROTEIN HSP70, BCL-2
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
BUNTING MODEL PREEKLAMPSIA**

DISERTASI

DIAJUKAN SEBAGAI SYARAT UNTUK MEMPEROLEH GELAR DOKTOR
DALAM PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU BIOLOGI DI BAWAH
PIMPINAN REKTOR UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
PROF. DR. RUNTUNG SITEPU, S.H., M.Hum.
DIPERTAHANKAN PADA TANGGAL
24 AGUSTUS 2017 DI MEDAN
SUMATERA UTARA

**EVI IRIANTI
138109005**



**PROGRAM PASCA SARJANA BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
MEDAN
2018**

PERNYATAAN ORISINALITAS

PENGARUH PEMBERIAN EVOO TERHADAP KADAR MDA PLASMA DAN EKSPRESI PROTEIN HSP70, BCL-2 PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) BUNTING MODEL PREEKLAMPSIA

DISERTASI

Saya menyatakan bahwa disertasi ini adalah hasil karya sendiri, kecuali beberapa kutipan dan ringkasan yang masing-masing disebutkan sumbernya.

Medan, 24 Agustus 2017

Evi Irianti
138109005

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademika Universitas Sumatera Utara, saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Evi Irianti
Nomor Induk Mahasiswa : 138109005
Program Studi : Ilmu Biologi
Jenis Karya Ilmiah : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (Non-Exclusive Royalty Free Right) atas disertasi saya yang berjudul :

Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar MDA Plasma Dan Ekspresi Protein Hsp70, Bcl-2 Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting Model Preeklampsia.

Beserta perangkat yang ada, dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini, Universitas Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media, menformat, mengelola dalam bentuk data-base, merawat dan mempublikasikan Disertasi saya tanpa meminta izin dari saya selama mencantumkan nama saya sebagai penulis dan sebagai pemegang dan atau sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya.

Medan, 24 Agustus 2017

Evi Irianti

PENGESAHAN DISERTASI

Judul : Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar MDA
Plasma dan Ekspresi Protein Hsp70, Bcl-2 pada
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting Model
Preeklampsia

Kategori : Disertasi

Nama : Evi Irianti

Nomor Induk Mahasiswa : 138109005

Program Studi : Doktor Ilmu Biologi

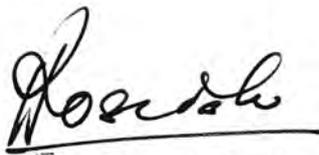
Fakultas : MIPA – Universitas Sumatera Utara

Disetujui Oleh
Komisi Pembimbing
Tanggal lulus : 24 Agustus 2017

Promotor


Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed
NIP. 196602091992031003

Co-promotor

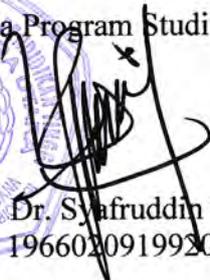


Prof. Dr. Rosidah, M.Si., Apt
NIP. 195103261978022001

Co-promotor



Dr. Salomo Hutahaean, M.Si
NIP. 196510111995011001

Ketua Program Studi

Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed
NIP. 196602091992031003

Dekan

Dr. Kerista Sebayang, M.S
NIP. 195806231986011001

Telah diuji dan dinyatakan lulus pada

Tanggal : 24 Agustus 2017

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Pimpinan Sidang	: Prof. Dr. Runtung Sitepu, S.H., M.Hum	Rektor USU
Ketua	: Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M. Biomed	USU Medan
Anggota	: Prof. Dr. Rosidah, M.Si., Apt	USU Medan
	Dr. Salomo Hutahaean, M.Si	USU Medan
	Prof. Dr. Ramlan Silaban, M.Si	Unimed Medan
	Dr. Suci Rahayu, M.Si	USU Medan

PENGARUH PEMBERIAN EVOO TERHADAP KADAR MDA
PLASMA DAN EKSPRESI PROTEIN HSP70, BCL-2
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
BUNTING MODEL PREEKLAMPSIA

ABSTRAK

Preeklampsia atau hipertensi dalam kehamilan merupakan salah satu penyebab kematian ibu, sampai saat ini cenderung meningkat. Salah satu penyebab preeklampsia adalah ketidak seimbangan antioksidan di dalam tubuh dan dapat dicegah dengan pemberian EVOO. Pemberian EVOO yang kaya akan kandungan *tokoferol* bertujuan untuk mencegah ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan antioksidan khususnya pada kondisi hamil. Rancangan penelitian ini *pre and post test with control group design* di laboratorium. Subyek tikus putih betina bunting, galur *Sprague Dawley*, BB \pm 200g. Total sampel 25 ekor terdiri atas kelompok kontrol (P0) dan 4 kelompok perlakuan sebagai model preeklampsia (P1, P2, P3, P4). Model preeklampsia dilakukan dengan injeksi NaCl 6% 3 ml/hari pada hari ke 6 – 12 periode kebuntingan dan stres akut hari ke18 sekali saja. Seluruh kelompok perlakuan diberi EVOO kecuali P1, dari hari ke 13 - 19. Hari ke 20, seluruh tikus dieksekusi. Rerata MDA plasma menurun secara signifikan setelah pemberian EVOO dan beda nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan (*P value* = 0,036). Ekspresi Bcl-2 meningkat cukup kuat secara signifikan, khususnya pada kelompok perlakuan yang mendapat EVOO (*P value* = 0,009). Rerata TD sistole menurun secara signifikan, khususnya kelompok perlakuan yang diberi EVOO dari sebelumnya, dan penurunan tersebut beda nyata dengan kontrol pada hari ke 20 (*P value* = 0,010). BBL dan PB kelompok perlakuan yang diberi EVOO dosis rendah maupun sedang tidak beda dengan kontrol, 71,43% fetus mati pada kelompok P1, dan 41,94% pada P4. Kesimpulan EVOO mampu menekan radikal bebas dalam darah. Disarankan untuk mengukur antioksidan alami lainnya seperti GPx, GSH serta vitamin E untuk mengetahui peranan dalam mereduksi peroksida lemak setelah pemberian EVOO.

Kata kunci : *Bcl-2, EVOO, Hsp70, Kadar MDA plasma, preeklampsia*

*EFFECT OF ADMINISTRATION EVOO TO PLASMA MDA LEVELS AND
EXPRESSION OF HSP70, BCL-2 PROTEIN AT MODEL
OF PREECLAMPSIA PREGNANT
WHITE RAT (*Rattus norvegicus*)*

ABSTRACT

Preeclampsia or hypertension in pregnancy is one of the causes of maternal death, and it tends increasing. One of the causes of preeclampsia is an imbalance of antioxidants in the body and can be prevented by giving EVOO. Giving EVOO rich in tocopherol to prevent imbalance between the production of free radicals and antioxidants, especially in pregnant conditions. The design of this research is pre and post test with control group design in laboratory. Subject of female pregnant white rat, Sprague Dawley strain, BW ± 200g. The total of 25 samples consisted of control group (P0) and 4 treatment groups as preeclampsia model (P1, P2, P3, P4). The preeclamptic model was performed with 6% 3 ml / day NaCl injection on 6th to 12th day of the pregnancy period and acute stress of the 18th day only once. All treatment groups were given EVOO except P1, from 13th to 19th day. 20th day, all subject were executed. Plasma MDA rates decreased significantly after administration of EVOO and significant differences between control and treatment groups (P value = 0.036). Bcl-2 expression increased significantly, especially in the treatment groups were received EVOO (P value = 0.009). The mean TD systole decreased significantly, especially the treatment groups were given EVOO from before, and the decrease was significantly different with control on day 20th (P value = 0,010). BBW and LB on treatment groups were given low or moderate dose of EVOO not different from control, 71.43% of fetuses died in P1, and 41.94% in P4. Conclusions EVOO able to suppress free radicals in the blood. It is recommended to measure other natural antioxidants such as GPx, GSH and vitamin E to determine the role in reducing lipid peroxide after administration of EVOO.

Keywords: Bcl-2, EVOO, Hsp70, Kadar MDA plasma, preeclampsia

PRAKATA

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah banyak memberikan anugerah-Nya, sehingga Disertasi dapat diselesaikan dengan baik.

Disertasi dengan judul : Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar MDA Plasma dan Ekspresi Protein Hsp70, Bcl-2 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting Model Preeklampsia adalah merupakan syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Pascasarjana Biologi FMIPA USU.

Keberhasilan dari penelitian dan penulisan Disertasi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung dan telah memberikan dukungan secara moril maupun materil. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tidak terhingga kepada :

1. Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M. Biomed selaku Promotor, Prof. Dr. Rosidah, M.Si. Apt, dan Dr. Salomo Hutahaean, M.Si, sebagai Anggota Komisi Pembimbing atas masukan dan bimbingannya serta dukungan moril sejak penulisan proposal sampai penelitian ini selesai.
2. Prof. Dr. Ramlan Silaban, M.Si dan Dr. Suci Rahayu M.Si selaku Tim Penguji luar komisi yang telah banyak memberikan saran dan masukan demi kelancaran penelitian dan penulisan disertasi ini.
3. Rektor Universitas Sumatera Utara, Prof. Dr. Runtung Sitepu, SH., M.Hum dan Rektor juga Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Dr. Kerista Sebayang, M.S yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program S3 Biologi Fakultas MIPA Univeristias Sumatera Utara.
4. Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed, Dr. Etti Sartina Siregar, S.Si., selaku ketua dan sekretaris Program Studi Doktor (S3) Ilmu Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara beserta staf pegawai yang telah memberikan bantuan dan motivasi untuk menyelesaikan perkuliahan dan disertasi ini.
5. Kepala Laboratorium Pemeliharaan Hewan Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Bandung, Kepala Laboratorium Genetika dan Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Bandung, Kepala Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera

Utara beserta seluruh staf dan pegawai yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis selama pelaksanaan penelitian.

6. Direktur Politeknik Kesehatan Kemenkes Medan Dra. Ida Nurhayati, M. Kes, Ketua Jurusan Kebidanan Medan Poltekkes Kemenkes Medan Betty Mangkuji, SST, M. Keb, juga seluruh teman sejawat beserta staf akademis yang telah memberi kesempatan dan motivasi kepada penulis untuk mengikuti tugas belajar di Program Studi S3 Ilmu Biologi FMIPA USU.
7. Terimakasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua dan suami (Ridesman, SH, M.Kes) juga kedua putri tercinta (dr. Sarah A Mardhiyah, Namira Z Mardhiyah) yang telah menjadi penyemangat penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan disertasi.

Medan, 24 Agustus 2017

Evi Irianti

DAFTAR ISI

	Halaman
PENGESAHAN DISERTASI	i
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesa Penelitian	5
1.5 Novelty	5
1.6 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pengertian Preeklampsia	7
2.2 Patofisiologi Preeklampsia	7
2.3 Peranan MDA pada Preeklampsia	10
2.4 Peranan Ekspresi Hsp70 pada Preeklampsia	15
2.5 Peranan Apoptosis pada Preeklampsia	19
2.6 Peranan Ekspresi Bcl-2 pada Kejadian Preeklampsia	26
2.7 Perubahan Sistem dan Organ pada Preeklampsia	29
2.8 Pengaruh PE Terhadap Janin	35
2.9 Pencegahan Preeklampsia	36
2.10 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	49
2.11 Kajian hewan Coba Tikus Model Preeklampsia	51
2.12 Kerangka Teori Penelitian	53
BAB 3 METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	54
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.	54
3.3 Rancangan Penelitian	56
3.4 Pelaksanaan Penelitian	57
3.5 Variabel Penelitian	59
3.6 Subyek Penelitian	62

	Halaman
3.7 Besar Sampel Penelitian	62
3.8 Etika Penelitian	62
3.9 Analisis Data	62
3.10 Alur Penelitian	63
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pengaruh EVOO Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus Putih Bunting	64
4.2 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Ekspresi Protein Hsp70 Tikus Putih Bunting	71
4.3 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Apoptosis Indek Plasenta Tikus Putih Bunting	78
4.4 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Ekspresi Protein Bcl-2 Tikus Putih Bunting	83
4.5 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Tekanan Darah Tikus Putih Bunting	85
4.6 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar Proteinuria Tikus Putih Bunting	89
4.7 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar Asam Urat Darah Tikus Putih Bunting	92
4.8 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Nilai Hematokrit Tikus Putih Bunting	95
4.9 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Morfometri Fetus (Berat Badan, Panjang Badan) dan Jumlah Implantasi (Fetus Hidup atau Mati)	98
4.10 Mekanisme EVOO Untuk Mencegah Preeklampsia	110
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	113
5.2 Saran	114
DAFTAR PUSTAKA	115
LAMPIRAN	130

DAFTAR GAMBAR

No Gambar	Judul	Halaman
2.1	Plasenta pada kehamilan normotensi dan PE	8
2.2	Mekanisme MDA (peroksida lipid) pada PE	13
2.3	Dua jalur mekanisme terjadinya apoptosis	23
2.4	Penilaian proteinuria dengan urin dipstick	32
2.5	Cara kerja antioksidan	38
2.6	Struktur daun dan buah zaitun	40
2.7	Skema kerangka teori penelitian	53
3.1	Skema kerangka konsep penelitian	59
3.2	Skema alur penelitian	63
4.1	Pengaruh pemberian EVOO terhadap kadar MDA plasma tikus putih bunting.	64
4.2	Hubungan kadar MDA plasma setelah pemberian NaCl 6% dengan tekanan darah sistole hari ke 13	68
4.3	Hubungan berat badan lahir dengan kadar MDA plasma	69
4.4	Pengaruh pemberian EVOO terhadap ekspresi protein Hsp70 tikus putih bunting	73
4.5	Hubungan kadar MDA plasma dan ekspresi Hsp70	76
4.6	Pengaruh EVOO terhadap apoptosis indeks plasenta kelompok kontrol dan perlakuan	79
4.7	Pengaruh EVOO terhadap ekspresi protein Bcl-2 jaringan plasenta tikus putih bunting.	84
4.8	Pengaruh EVOO terhadap proteinuria tikus putih bunting	91
4.9	Pengaruh pemberian EVOO terhadap rerata kadar asam urat (mg/dl) tikus putih bunting	93
4.10	Pengaruh pemberian EVOO terhadap rerata kadar hematokrit (%) tikus putih bunting.	96
4.11	Hubungan peningkatan tekanan darah hari ke 13 dengan nilai hematocrit	98
4.12	Pengaruh EVOO terhadap BBL dan berat plasenta fetus tikus putih.	100
4.13	Hubungan BBL fetus tikus putih dan berat plasenta	101
4.14	Pengaruh EVOO terhadap PB (cm) fetus tikus putih.	107
4.15	Pengaruh EVOO terhadap jumlah fetus tikus putih	109
4.16	Skema mekanisme EVOO dalam menurunkan preeklampsia	112

DAFTAR LAMPIRAN

No Lampiran	Judul	Halaman
1	Konversi Perhitungan Dosis Untuk Beberapa Hewan dan Manusia	130
2	Laporan Hasil Pengujian Kimia Makanan	131
3	Izin Penelitian ke Laboratorium Hewan Dep. Farmakologi dan Terapi	132
4	Izin Penelitian ke Fakultas Kedokteran Unpad	133
5	Rekomendasi Persetujuan Etik Penelitian Kesehatan	134
6	Surat Keterangan Penelitian dari Dep. Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran UNPAD	135
7	Surat Keterangan Telah Melakukan Penelitian dari Lab. PA FK USU	136
8	Surat Keterangan dari Lab. Genetika Molekular FK. UNPAD	137
9	Hasil Uji Kadar MDA Plasma	138
10	Hasil Uji Ekspresi Hsp70 Serum	140
11	Hasil Uji Apoptosis Indeks	140
12	Hasil Uji Ekspresi Bcl-2	141
13	Hasil Uji Tekanan Darah	142
14	Hasil Uji Proteinuria	144
15	Hasil Uji Asam Urat	145
16	Hasil Uji Hematokrit	145
17	Hasil Uji Morfometri Dan Implantasi	146
18	Perhitungan Dosis Pemberian EVOO	149
19	Pembuatan Pakan Ain93-M	151
20	Perhitungan Besar Sampel Berdasarkan Rumus Federer	152
21	Alat yang Digunakan dalam Penelitian	153

DAFTAR SINGKATAN

ACE	: Angiotensin-Converting Enzim
AIF	: Apoptosis Inducing Factor
AIN	: American Institute of Nutrition
Am J Clin Nutr	: The American Journal of Clinical Nutrition
Apaf-1	: Apoptosis-activating faktor-1
AT	: Angiotensin
ATF	: Activating Transcription Factor
ATF6	: Activating Transcription Factor 6
ATP	: Adenosin Tri Pospat
Bad	: Bel-2 associated death-only death promoter
Bak	: Bel2-antagonist /killer)
Bax	: Bel-2-associated X protein
Bcl	: B-cell lymphoma
Bcl-xl	: B-cell lymphoma-extra large
BH3	: Bel-2 homology
BH4	: Tetrahydrobiopterin
BHT	: Butylated Hydroxytoulene
Bid	: BH3 domain only death agonist
Bik	: Bel-2 interacting killer
BMI	: Body Mass Index
BNIP3	: Bel-2 interacting protein 3
Ca ²⁺	: Ion calcium
CAT	: Katalase
CD95	: Cluster of differentiation 95
Ced4	: Cell death protein-4
cGMP	: Cycilic guanosine monophospate
CI	: confidence interval
CO ₂	: Karbon dioksida
COX-2	: siklooksigenase-2
CTB	: Cytotrophoblast
Cu	: Cuprum
DAB	: Diamino Benzidine
dB	: Decibel
Diablo	: Direct IAP (Inhibitor of Apoptosis)-Binding protein with low PL (Pectate lyase)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DOCA	: Deoxycorticosterone acetate
EDHF	: Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factor

EDRF	: Endothelial-Derived Relaxing Factor
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic Acid
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	: endothelial Nitric Oxide Synthase
EPHB2	: Ephrin-B2
EPHB4	: Ephrin-B4
Erk ½	: Extracellular signal-regulated kinases
ET-1	: Endothelin-1
EVT	: Endovascular transformation
FADD	: Fas-associated death domain
FAD	: Flavin adenine dinucleotide
FMN	: Flavin adenine mononucleotide
FasL	: Fas ligan
Fe	: Ferrum
FFA	: Free Fatty Acid
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GnRH	: Gonadotropin-Releasing Hormone
GPx	: Gluthathion Peroksidase
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HCA	: Heterocyclic amines
HDL	: High Density Lipid
HLA-G	: Human Leukocyte Antigen Protein G
Hrk	: Harakiri, Bcl-2 interacting protein
HRP	: Horseradish-peroxidase
Hsp	: Heat shock protein
HB4	: Tetrahydrobiopterin
Ht	: Hematokrit
IAP	: Inhibitor of Apoptosis Protein
IC	: Intra cardiaca
IFN	: Interferon
IgA	: Immunoglobulin A
IL	: Interleukin
IUG	: Intra Uterine Growth Restriction
JNK	: Jun N Terminal Kinase
kDal	: Kilo Dalton
KMK	: Kecil Masa Kehamilan
LDL	: Low Density Lipoprotein
LH	: Luteinizing Hormone
limfosit Tc	: Limfosit T sitotoksik
LMWP	: Low Molecular Weight Protein
LOO-	: Radikal peroksilipid
LSD	: Least Significant Differences

MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
Mcl-1	: Myeloid cell leukemia- 1
MDA	: Malondialdehyde
MGO	: Methylglyoxal
Mir	: Micro RNA
mmHg	: milimetre of mercury (simbol)
Mmol	: Millimoles
mRNA	: messenger- Ribonucleic acid
mtHsp70	: Mitochondrial Hsp70
MUFA	: Monounsaturated Fatty Acid
NaCl	: Natrium klorida
NF- κ B	: Nuclear Factor Kappa B
Ng	: Nanogram
NK	: Natural Killer
Nm	: Nanometer
NO	: Nitric Oxide
NOxa	: NADPH (Adenin dinukleotida fospat) -oxidase activator-1
NOS	: Nitric Oxide Synthase
O ₂ ⁻	: Superoksida
OH ⁻	: Radikal bebas hidroksil
ONOO ⁻	: nitrat trioksida
Ox-LDL	: Oxidized- Low Density Lipoprotein
PAF	: Platelet Activating Factor
PARP	: Poly-ADP (Adenosine disphopate) Ribose Polimerase
PBS	: Fospat Buffered Saline
PDGF-2	: Platelet-Derived Growth Faktor A
PERK- eIF	: Protein Endoplasmic Reticulum Kinase – Eucaryotic Initiation Factor
PGE2	: Prostaglandin E2
PGI2	: Prostaglandin
Pm	: Pikometer
pO ₂	: Tekanan Parsial Oksigen
PPM	: Pearson Product Moment
PTP	: Permeability Transition Pore
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acid
Puma	: p53 upregulated modulator of apoptosis
RCOO ⁻	: Radikal Peroksil
RE	: Retikulum Endoplasma
ROO-	: Radikal peroksil
ROS	: Reactive Oxygen Spesies

SC	: Sub-cutan
SDS	: Sodium Deodecyl Sulphate
Smac	: Second mitochondria-derived activator of caspases
SNI	: Standar Nasional Indonesia
SOD	: Superoksida Dismutase
TAP	: Tocopherol associated protein
TBA	: Titrasi Bebas Air
TBARs	: Thiobarbituric Acid Reactive substances
TBHQ	: Tersier Butil Hidroquinon
TBS	: Tris Buffered Saline
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α
TRAF-1	: TNF receptor associated factor 1
TRAF-2	: TNF receptor associated factor 2
TRAIL	: TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP (deoxyuridine Triphosphate) nick end labeling
TXA2	: Thromboxane A2
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
α -TocH	: α -tokoferol
μ l	: Microliter

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka Kematian Ibu (AKI) merupakan salah satu indikator penting dari derajat kesehatan masyarakat. Pada tahun 2015 AKI di Indonesia masih salah satu yang tertinggi di antara negara - negara di kawasan Asia Tenggara yaitu sekitar 315/100.000 kelahiran hidup. Sebagian besar kematian maternal (94,4%) merupakan kematian obstetrik langsung sebagai akibat dari kehamilan, persalinan dan nifas, yang disebabkan oleh perdarahan, preeklampsia/eklampsia, penyebab lain dan infeksi/sepsis (Kemenkes RI, 2015). Begitu juga di Propinsi Sumatera Utara jumlah AKI masih tinggi sekitar 249/100.000 kelahiran hidup (Dinkes Sumut, 2015), sedangkan berdasarkan target dari *Millineium Development Goals* (MDGs) tahun 2015, bahwa AKI harus dapat diturunkan mencapai 102/100.000 kelahiran hidup.

Kematian ibu di Indonesia disebabkan oleh tiga penyebab utama yaitu perdarahan, hipertensi dalam kehamilan dan infeksi, akan tetapi proporsinya telah berubah saat ini, dimana perdarahan dan infeksi cenderung menurun, sedangkan hipertensi dalam kehamilan mengalami peningkatan. Lebih dari 25% AKI di Indonesia pada tahun 2013 disebabkan oleh preeklampsia/eklampsia (Kemenkes RI, 2015).

Preeklampsia merupakan sindroma pada kehamilan yang awalnya sehat, ditandai oleh hipertensi gestasional dan proteinuria (meskipun saat ini diagnosis preeklampsia tidak tergantung pada proteinuria), terjadi setelah usia kehamilan 20 minggu (Robert *et al.*, 2003; Yusniar, 2004; Matsubara *et al.*, 2015), merupakan salah satu penyebab kematian ibu. Preeklampsia juga merupakan salah satu penyulit kehamilan yang dapat menyebabkan terjadinya komplikasi persalinan, berkisar antara 5-15% dari kehamilan, hal ini mengakibatkan mortalitas dan morbiditas maternal serta perinatal menjadi tinggi (Angsar, 2013).

Menurut penelitian Chen bao dan Wang (2013) salah satu penyebab preeklampsia karena adanya ketidakseimbangan antara antioksidan dengan radikal bebas, akibat terjadinya kegagalan *remodeling arteri spiralis*. Kegagalan *remodeling arteri spiralis* mengakibatkan plasenta mengalami iskemia dan hipoksia sehingga menghasilkan

radikal hidroksil yang sangat toksik, pada akhirnya akan merusak membran sel endotel yang kaya akan kandungan asam lemak tidak jenuh menjadi lipid peroksida dan produk akhirnya adalah *Malondialdehyde* (MDA), hal ini menyebabkan stres oksidatif (Hung, 2007). Salah satu penanda terjadinya stres oksidatif pada penderita preeklampsia adalah meningkatnya kadar lipid peroksida/*Malondialdehyde* (MDA) (Hung, 2007).

Kondisi stres oksidatif dapat merusak kerja enzim-enzim mitokondria yang dapat menimbulkan destabilisasi dan agregasi protein-protein intraseluler, hal ini merupakan awal dari proses apoptosis (Barton dan Sibai, 2007). Akibat keadaan tersebut, maka *heat shock protein* (Hsp) berusaha untuk melindungi sel dari stres oksidatif, dalam hal ini pada beberapa kasus preeklampsia ditemukan adanya peningkatan ekspresi Hsp, terutama Hsp70 (merupakan salah satu turunan dari Hsp) di plasenta (Ekambaram dan Geetha, 2008).

Peningkatan ekspresi Hsp70 bertujuan untuk mencegah apoptosis sel yang berlebihan di plasenta akibat hipoksia. Hipoksia yang terjadi memediasi mir210 untuk menginduksi ekspresi gen target antiapoptotic Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) sehingga dapat mengurangi apoptosis yang terjadi secara berlebihan (Chio *et al.*, 2013). Selain itu hipoksia pada plasenta dengan preeklampsia dapat menimbulkan apoptosis, terutama melalui jalur intrinsik yaitu mitokondria (Ishihara *et al.*, 2002). Studi lain mengungkapkan bahwa pada preeklampsia terjadi peningkatan apoptosis indeks (Teguh *et al.*, 2010). Preeklampsia menyebabkan apoptosis terjadi secara berlebihan dan penurunan ekspresi Bcl-2 (Ishihara *et al.*, 2002). Studi lain juga mengungkapkan bahwa peningkatan apoptosis diikuti dengan penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-xl pada kehamilan preeklampsia berat dibandingkan kehamilan normotensi (Arianto, 2015).

Lipid peroksida akan beredar di dalam aliran darah dan merusak sel endotel menyebabkan penurunan produksi nitric oxide dan peningkatan tekanan darah (Kadirvelu *et al.*, 2002; Angsar, 2012). Kondisi abnormalitas PE menyebabkan hipovolemia mengakibatkan penurunan filtrasi glomerulus menyebabkan proteinuria. Selain itu dapat menimbulkan peningkatan atau penurunan asam urat serum tergantung dari berat ringannya preeklampsia tersebut. Hematokrit juga meningkat karena hipovolemia yang menggambarkan beratnya preeklampsia (Brown, 2003).

Preeklampsia dapat memberi pengaruh buruk untuk kesehatan janin (Brown, 2003), sehingga meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas janin (Abdulsid *et al.*, 2013).

Oleh karena itu perlu upaya pencegahan PE, salah satunya adalah dengan pemberian antioksidan seperti suplemen kombinasi antara vitamin C dan vitamin E, ternyata secara signifikan dapat menurunkan kejadian preeklampsia (Takiuti *et al.*, 2000). Salah satu jenis antioksidan yang telah diketahui yaitu *extra virgin olive oil* (EVOO), kaya akan kandungan antioksidan yaitu *tokoferol* (Nakbi *et al.*, 2010). Telah banyak penelitian tentang EVOO, beberapa diantaranya mengungkapkan bahwa hidrokstirosol terbukti efektif meningkatkan aktivitas antioksidan dalam plasma serta melindungi terhadap oksidasi LDL (*lipid density low*). Tirosol beserta antioksidan fenolik lainnya mampu mengikat LDL, sehingga dapat menunda proses *aterosklerosis* (Lopez *et al.*, 2008).

Selain itu, minyak zaitun dapat mencegah stroke telah terbukti secara ilmiah pada pasien berusia 64 - 71 tahun dapat menurunkan total kolesterol setelah diberi dua sendok makan minyak zaitun setiap hari (Kinanthi, 2009). Kinanthi (2009) dan Tortosa *et al* (1999) juga mengungkapkan bahwa EVOO merupakan jenis minyak zaitun paling baik untuk mencegah gula darah dan oksidasi serta resistensi LDL yang mengalami penyakit jantung dan pembuluh darah. EVOO juga mampu memperbaiki fungsi endotelial pada tikus yang dimanipulasi menjadi diabetes (Keita *et al.*, 2013), selain itu EVOO juga mampu mengubah struktur biokimia pada otak dan perilaku tikus (Pitozzi *et al.*, 2010).

Manfaat EVOO lainnya adalah untuk melindungi jaringan hepar dari kerusakan oleh karena proses oksidasi dengan mencegah aktivitas lipid peroksida dengan cara meningkatkan pembentukan MUFA (*monounsaturated fatty acid*)/asam lemak tak jenuh serta mempertahankan marker enzim-enzim pada serum, juga aktivitas enzim-enzim antioksidan hepar pada konsentrasi mendekati normal. Selain itu, fraksi/bagian hidrofilik dari minyak zaitun ternyata terbukti efektif dalam mengurangi stres oksidatif dan dalam hal ini ekstra hidrofilik itulah yang sangat potensial memberikan efek antioksidan langsung pada sel-sel hepar (Nakbi *et al.*, 2010). Penelitian lain juga mendapatkan bahwa dengan mengkonsumsi EVOO tiga kali sehari dapat mengurangi stres oksidatif pada pankreas (Lopez *et al.*, 2008).

Berdasarkan uraian di atas telah diketahui tentang manfaat EVOO sebagai antioksidan, akan tetapi sepanjang pengetahuan penulis belum ada penelitiannya pada kasus preeklampsia. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian EVOO dalam rangka mencegah stres oksidatif yang terjadi pada preeklampsia. Berdasarkan pertimbangan etika dan keamanan bahan yang dipakai terhadap ibu dan fetus, kesulitan mendapatkan relawan, serta faktor eksternal (misalnya nutrisi) yang tidak mudah dikendalikan maka diperlukan model hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting pada penelitian ini. Alasan pemilihan tikus putih karena spesies ini mudah dikendalikan, darahnya dapat diambil dalam jumlah lebih banyak daripada mencit, selain itu organ-organ tubuhnya relatif besar sehingga materi dapat diberikan dengan mudah melalui berbagai rute (Kusumawati, 2004).

Sebelum pelaksanaan penelitian dilakukan uji coba pada tikus putih bunting sebagai model PE dengan pemberian NaCl 6% 3 mL/hari selama seminggu dan stres akut hanya sekali (30 menit). Tikus putih terdiri atas kelompok kontrol dan perlakuan, masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Hasil pengukuran tekanan darah sistole pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari kontrol (kelompok perlakuan $143,80\text{mmHg}\pm 14,77$, sedangkan kontrol $115,80\text{mmHg}\pm 10,69$). Setelah pemberian stres akut terjadi peningkatan tekanan darah sistole pada kelompok perlakuan yaitu $141,60\text{mmHg}\pm 10,50$, sementara kontrol $118\text{mmHg}\pm 8,29$. Kajian ini dilakukan berdasarkan yang telah diungkapkan oleh Yudomustopo (2015) bahwa pemberian NaCl 6% dapat meningkatkan tekanan darah serta merusak membrane sel sehingga terjadi peningkatan jumlah peroksida lipid, juga stres akut dapat meningkatkan tekanan darah (Arcana dan Sugiritama, 2009; Irawiraman *et al.*, 2010). Pemberian EVOO juga diujicoba pada tikus putih bunting lainnya (berjumlah tiga ekor) dengan dosis pemberian yang telah ditentukan. Hasil pengamatan ternyata semua fetus yang dilahirkan hidup dengan BBL antara 3 - 4 gram, dan jumlah fetus 8-12 ekor.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian EVOO terhadap kadar MDA plasma dan ekspresi protein Hsp70, Bcl-2 pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) bunting model preeklampsia.

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Untuk mengetahui perbedaan rerata kadar MDA plasma pada tikus putih bunting sebelum dan sesudah pemberian EVOO.
- 1.3.2 Untuk mengetahui rerata ekspresi protein Hsp70 dan Bcl-2 pada tikus putih bunting sesudah pemberian EVOO.
- 1.3.3 Untuk mengetahui apoptosis indeks plasenta tikus putih bunting.
- 1.3.4 Untuk mengetahui rerata tekanan darah, kadar proteinuria, asam urat dan hematokrit pada tikus putih bunting sebelum dan sesudah pemberian EVOO.
- 1.3.5 Untuk mengetahui morfometri fetus (berat badan, tinggi badan) dan jumlah implantasi (fetus hidup atau mati) tikus putih

1.4 Hipotesa Penelitian

- 1.4.1 Terjadi penurunan rerata kadar MDA plasma pada tikus putih bunting sesudah pemberian EVOO.
- 1.4.2 Terjadi peningkatan rerata ekspresi protein Hsp70, Bcl-2 pada tikus putih bunting sesudah pemberian EVOO.
- 1.4.3 Apoptosis indeks pada plasenta dalam batas normal pada tikus putih bunting setelah pemberian EVOO.
- 1.4.4 Terjadi penurunan rerata tekanan darah, kadar proteinuria, asam urat dan hematokrit pada tikus putih bunting sebelum dan sesudah pemberian EVOO
- 1.4.5 Ukuran morfometri dan jumlah implantasi fetus tikus putih yang diberi EVOO dalam batas normal.

1.5 Novelty

- 1.5.1 EVOO mempengaruhi terhadap penurunan kadar MDA plasma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia.
- 1.5.2 EVOO mempengaruhi terhadap peningkatan ekspresi Hsp70 serum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia.
- 1.5.3 EVOO dapat mengontrol apoptosis yang terjadi pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia tidak berlebihan.
- 1.5.4 EVOO dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia.

- 1.5.5 EVOO dapat mengendalikan fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia tidak BBLR.
- 1.5.6 EVOO dapat mengontrol tekanan darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting model preeklampsia.

1.6. Manfaat Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian ini diharapkan EVOO yang merupakan antioksidan alami dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan preeklampsia pada ibu hamil beresiko tinggi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Preeklampsia

Preeklampsia atau PE adalah hipertensi dalam kehamilan dengan tekanan darah sistolik dan diastolik $\geq 140/90$ mmHg yang terjadi pada kehamilan > 20 minggu (Robert *et al.*, 2003; Yusniar, 2004; Matsubara *et al.*, 2015). Pengukuran tekanan darah sekurang-kurangnya dilakukan 2 kali selang 4 jam. Gejala klinis PE selain hipertensi juga dapat disertai dengan dengan proteinuria yaitu terdapatnya protein dalam urin selama 24 jam sekitar 300 mg atau $\geq 1+$ *dipstick* (Angsar, 2012).

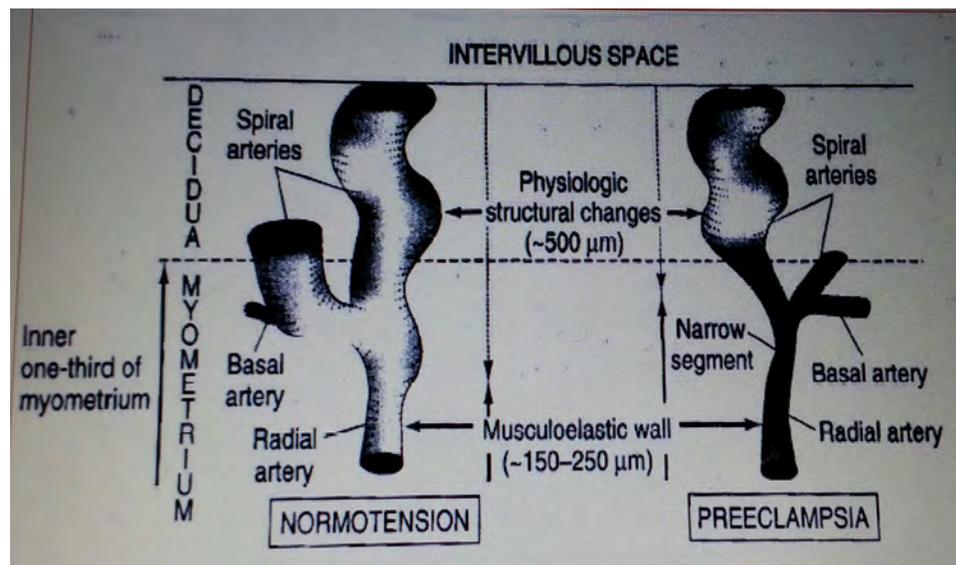
2.2 Patofisiologi Preeklampsia.

Salah satu penyebab PE adalah akibat ketidakseimbangan antara kadar oksidan dan antioksidan yang bermula karena terjadinya kegagalan *remodeling arteri spiralis*. Kegagalan *remodeling arteri spiralis* diduga karena ada keterlibatan ekspresi miR17 (micro RNA17) yang belum diketahui penyebabnya. Seperti diketahui bahwa pada kehamilan normal, miR17 hanya bersirkulasi dalam kadar yang rendah, hal ini memungkinkan ekspresi EPHB4 dan EPHB2 di plasenta. EPHB4 dan EPHB2 diduga dapat menginduksi perubahan CTB menjadi EVT untuk menginvasi desidua dan me-remodeling arteri spiralis uterus. Arteri spiral adalah arteri dengan tahanan perifer yang lebih rendah yang memungkinkan aliran darah bolak-balik antara maternal-fetal untuk pertukaran nutrisi dan gas serta pengeluaran sisa metabolik fetus, namun pada kehamilan PE ternyata ekspresi miR17 justru meningkat, mensupresi ekspresi EPHB4/EPHB2 yang akan menghambat transformasi CTB menjadi EVT sehingga terjadi kegagalan remodeling arteri spiralis, dan hal inilah yang menghambat aliran darah maternal fetal serta merupakan patogenesis dari PE itu sendiri (Chen bao dan Wang, 2013).

Secara fisiologi pada kehamilan normal, rahim dan plasenta mendapat aliran darah dari cabang-cabang arteri uterina dan arteria ovarika. Kedua pembuluh darah tersebut menembus miometrium menjadi arteri arkuata yang bercabang ke arteria radialis. Arteria radialis menembus endometrium menjadi arteri basalis yang bercabang ke arteri basalis memberi cabang arteria spiralis. Invasi trofoblas ke dalam

lapisan otot arteria spiralis, menimbulkan degenerasi lapisan otot tersebut sehingga terjadi dilatasi arteri spiralis. Invasi trofoblas juga memasuki jaringan sekitar arteri spiralis, sehingga jaringan matriks menjadi gembur dan memudahkan lumen arteri spiralis mengalami distensi dan dilatasi. Distensi dan vasodilatasi lumen arteri spiralis ini memberi dampak penurunan tekanan darah, penurunan resistensi vaskular, dan peningkatan aliran darah pada daerah utero plasenta. Akibatnya, aliran darah ke janin cukup banyak dan perfusi jaringan juga meningkat, sehingga dapat menjamin pertumbuhan janin dengan baik. Proses ini disebut dengan *remodeling arteri spiralis* (Walker, 2000; Cunningham, 2005; Angsar, 2012).

Kondisi kegagalan *remodeling arteri spiralis* disebabkan karena tidak terjadi invasi sel-sel trofoblas dalam lapisan otot arteri spiralis dan jaringan matriks sekitarnya. Lapisan otot arteri spiralis menjadi tetap kaku dan keras sehingga lumen arteri spiralis tidak memungkinkan mengalami distensi dan vasodilatasi, akibatnya arteri spiralis relatif mengalami vasokonstriksi, sehingga aliran darah utero-plasenta menurun, dan terjadilah hipoksia dan iskemia plasenta. Diameter rata-rata arteri spiralis pada hamil normal adalah 500 mikron, sedangkan pada PE rata-rata 200 mikron (Gambar 2.1). Pada hamil normal vasodilatasi lumen arteri spiralis dapat meningkatkan 10 kali aliran darah ke utero plasenta (Cunningham, 2005).



Gambar 2.1 Plasenta pada kehamilan normotensi dan PE

Kegagalan *remodeling arteri spiralis* ini menyebabkan plasenta mengalami iskemia. Plasenta yang mengalami iskemia dan hipoksia akan menghasilkan oksidan (disebut juga radikal bebas). Oksidan atau radikal bebas adalah senyawa penerima elektron atau atom/molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Salah satu oksidan penting yang dihasilkan plasenta iskemia adalah radikal hidroksil yang sangat toksis, khususnya terhadap membran sel endotel pembuluh darah. Sebenarnya produksi oksidan pada manusia adalah suatu proses normal, karena oksidan memang dibutuhkan untuk perlindungan tubuh. Adanya radikal hidroksil dalam darah mungkin dahulu dianggap sebagai bahan toksin yang beredar dalam darah, maka dulu PE disebut ‘toksemia kehamilan’. Radikal hidroksil akan merusak membran sel, yang mengandung banyak asam lemak tidak jenuh menjadi peroksida lemak. Peroksida lemak selain akan merusak membran sel, juga akan merusak nukleus dan protein sel endotel. Produksi oksidan (radikal bebas) dalam tubuh yang bersifat toksis, selalu diimbangi dengan produksi antioksidan (Hubel, 1989; Zeeman, 1992; Kadirvelu *et al.*, 2002)

Preeklampsia dibuktikan dengan kadar oksidan, khususnya peroksida lemak meningkat, sedangkan antioksidan misalnya vitamin E menurun, sehingga terjadi dominasi kadar oksidan peroksida lemak yang relatif tinggi. Peroksida lemak sebagai oksidan/radikal bebas yang sangat toksis ini akan beredar di seluruh tubuh dalam aliran darah dan akan merusak membran sel endotel. Membran sel endotel lebih mudah mengalami kerusakan oleh peroksida lemak, karena letaknya langsung berhubungan dengan aliran darah dan mengandung banyak asam lemak tidak jenuh. Asam lemak tidak jenuh sangat rentan terhadap oksidan radikal hidroksil, yang akan berubah menjadi peroksida lemak (lipid peroksida). Akibat sel endotel terpapar terhadap peroksida lemak, maka terjadi kerusakan sel endotel, yang kerusakannya dimulai dari membran sel endotel. Kerusakan membran sel endotel mengakibatkan terganggunya fungsi endotel, bahkan rusaknya seluruh struktur sel endotel. Keadaan ini disebut disfungsi endotel (Higgins, 2001). Redman (2002), menyatakan bahwa disfungsi endotel pada PE akibat produksi debris trofoblas plasenta berlebihan tersebut di atas mengakibatkan “aktivitas leukosit yang sangat tinggi” pada sirkulasi ibu. Peristiwa ini oleh Redman (2002) disebut sebagai “kekacauan adaptasi dari

proses inflamasi intravaskular pada kehamilan” yang biasanya berlangsung normal dan menyeluruh.

Disfungsi endotel dipicu oleh peningkatan stres oksidatif akibat bahan asing dari debris trofoblas dalam jumlah yang banyak sehingga merangsang timbulnya proses inflamasi. Hal ini karena proses apoptosis akibat peningkatan stres oksidatif, sehingga produksi debris apoptosis dan nekrotik trofoblas juga meningkat. Makin banyak sel trofoblas plasenta misalnya pada plasenta besar, hamil ganda, maka reaksi stres oksidatif akan sangat meningkat sehingga jumlah sisa debris trofoblas juga makin meningkat (Redman, 2002; Martin *et al.*, 2003).

Selain karena ketidakseimbangan antioksidan tersebut, teori lain menjelaskan adanya intoleransi imunologik antara ibu dan janin. Pada kehamilan normal, respons imun tidak menolak adanya “hasil konsepsi” yang bersifat asing. Hal ini disebabkan adanya *human leukocyte antigen protein G* (HLA-G), yang berperan penting dalam modulasi respons imun, sehingga ibu tidak menolak hasil konsepsi (plasenta) (Boutiller dan Mallet, 1997). Keberadaan HLA-G pada plasenta dapat melindungi trofoblas janin dari lisis oleh sel *Natural Killer* (NK). Selain itu, HLA-G akan mempermudah invasi trofoblas ke dalam jaringan desidua. Jadi HLA-G merupakan prakondisi untuk terjadinya invasi trofoblas ke dalam jaringan desidua, di samping untuk menghadapi sel NK (Angsar, 2012).

Akan tetapi pada kondisi PE, penurunan ekspresi HLA-G di desidua plasenta menghambat invasi trofoblas ke dalam desidua. Invasi trofoblas sangat penting agar jaringan desidua menjadi lunak, dan gembur sehingga memudahkan terjadinya dilatasi arteri spiralis. Penurunan HLA-G akan merangsang produksi sitikon, menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi, dan diduga menjadi penyebab *Immune Maladaptation* (Angsar, 2012).

2.3 Peranan MDA pada Preeklampsia

2.3.1. Kadar Malondialdehid (MDA) Sebagai Indikator Peroksida Lipid

Peroksidatif (auto-oksidatif) lipid khususnya asam lemak tak jenuh ganda adalah suatu reaksi berantai radikal bebas (Suryohudoyo, 2000). Radikal bebas itu sebenarnya merupakan atom atau molekul yang memiliki sebuah elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya (Suryohudoyo, 2000; Hendromartono, 2000). Zat ini

sangat reaktif, dan struktur yang demikian membuat radikal bebas cenderung “mencuri” atau mengekstraksi satu elektron dari molekul lain di dekatnya untuk melengkapi dan selanjutnya mencetuskan reaksi berantai yang dapat mengakibatkan cedera sel (Suryohudoyo, 2000; Hendromartono, 2000).

Reaksi tersebut dicetuskan oleh sebuah senyawa radikal bebas, yaitu radikal hidroksil (OH^\cdot) yang mengekstraksi satu hidrogen dari lemak *polyunsaturated* (PUFA) sehingga terbentuk radikal lemak yang setelah melalui beberapa proses maka terbentuklah MDA (*Malondialdehyde*), 9-hidroksi-nonenal, etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}) suatu radikal bebas yang merupakan metabolit reaktif peroksidatif lipid sehingga dapat digunakan sebagai indeks peroksidatif lipid (Langseth, 1994; De Zwart *et al.*, 1998; Suryohudoyo, 2000; Droge, 2003).

MDA adalah suatu senyawa yang sangat reaktif yang merupakan produk akhir dari peroksidatif lipid, dan biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidatif lipid untuk menilai stres oksidatif. MDA adalah senyawa aldehida yang merupakan produk akhir peroksida lipid di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon, dengan rumus molekul $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$. MDA juga merupakan produk dekomposisi dari asam amino, karbohidrat kompleks, pentose dan heksosa. Selain itu, MDA juga merupakan produk yang dihasilkan oleh radikal bebas melalui reaksi ionisasi dalam tubuh dan produk sampah biosintesis prostaglandin yang merupakan produk akhir oksidatif lipid membran (De Zwart *et al.*, 1998; Droge, 2003).

Menurut Helliwell dan Gutteridge (1999), MDA merupakan produk oksidatif asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Di samping itu, MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidatif dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar MDA.

Pengukuran MDA mudah dilakukan baik secara spektrofotometrik atau flurometrik. Karena MDA tidak stabil maka cara penyimpanan sampel harus terlindung dari cahaya, dan bila tidak segera diperiksa harus disimpan pada suhu -70°C , penyimpanan -20°C tidak memadai (Mates 2000). Uji TBARs merupakan salah satu uji yang paling lama dan paling sering digunakan untuk mengukur proses peroksidatif lipid asam lemak tidak jenuh. Uji TBARs dapat menilai stres oksidatif berdasarkan reaksi asam tiobarbiturat dengan malondialdehid (MDA). Supernatan

plasma (setelah protein diendapkan) direaksikan dengan asam tiobarbiturat menghasilkan kromofor berwarna merah muda yang dibaca pada panjang gelombang 530 nm. Hasilnya dibandingkan dengan kurva standar memakai tetraetoksipropiran.

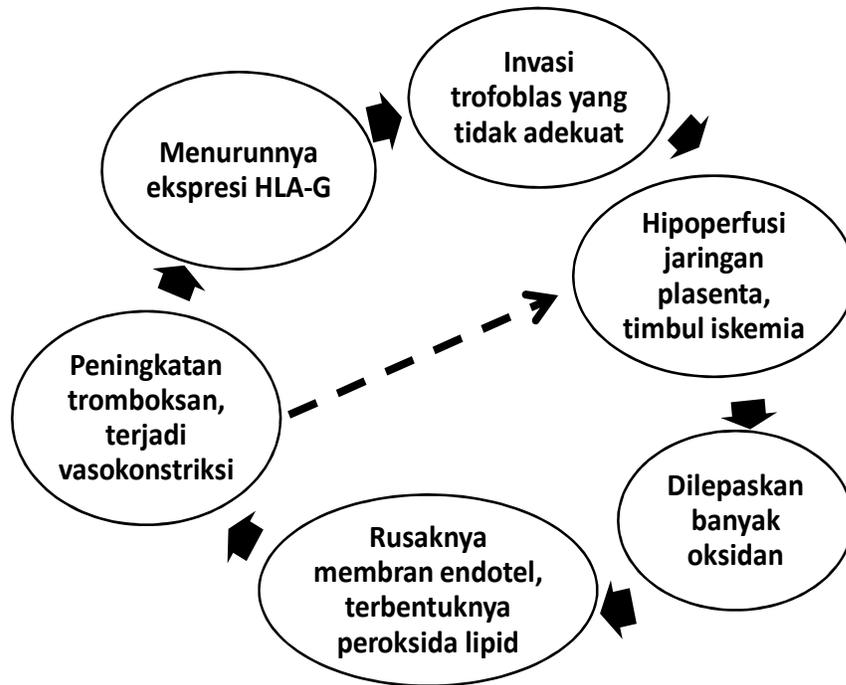
2.3.2 Mekanisme MDA pada Preeklampsia

Beberapa penelitian telah dilakukan yang bertujuan agar dapat mencegah penyakit PE, namun belum banyak membuahkan hasil. Hal ini disebabkan oleh etiologi dan patogenesis PE yang belum jelas (Matsubara *et al.*, 2015). Gambaran PE ditandai adanya vasospasme dan peningkatan tahanan perifer yang mengurangi perfusi ke organ. Etiologi dari fenomena ini berhubungan dengan perubahan fisiologis arteri spiralis yang tidak sempurna (Ekambaram dan Geetha, 2008). Pada kehamilan normal, respon imun tidak menolak hasil konsepsi oleh karena adanya HLA-G pada plasenta yang melindungi trofoblas dari lisis yang disebabkan sel NK ibu. Invasi trofoblas yang adekuat sangat penting agar jaringan menjadi lebih lunak dan memudahkan dilatasi arteri spiralis sehingga perfusi ke arteri spiralis semakin lancar.

Namun pada PE, terjadi penurunan ekspresi HLA-G yang menyebabkan hambatan invasi trofoblas dalam desidua (Abdulsid *et al.*, 2013). Keadaan ini kemudian menimbulkan terjadinya hipoperfusi utero-plasenta, menginduksi terjadinya iskemia jaringan plasenta yang kemudian meningkatkan produksi radikal bebas (Yung *et al.*, 2014). Radikal bebas, terutama spesies oksigen reaktif, menyebabkan penurunan antioksidan dalam sel dan menjadi kunci terjadinya kerusakan endotel maternal (Giuliano *et al.*, 2011).

Plasenta yang mengalami iskemia akan melepaskan radikal penting yaitu radikal hidroksil yang sangat toksis. Radikal hidroksil kemudian akan merusak membran sel endotel yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh menjadi peroksida lipid (Gambar 2.2). Peroksida lipid inilah yang kemudian akan merusak struktur sel lainnya, seperti protein membran dan nukleus. Selain merusak struktur, peroksida lipid menghambat secara selektif terhadap prostasiklin sintetase dan meningkatkan kerja enzim siklooksigenase yang dapat meningkatkan produksi tromboksan, sehingga terjadi vasokonstriksi pembuluh darah (Yung *et al.*, 2014). Oleh karena itu, peningkatan peroksida lipid dapat menjadi penanda stres oksidatif yang dapat diukur

melalui senyawa malondialdehid (MDA), produk akhir dari proses peroksidatif lipid (Yung *et al.*, 2014; Giuliano *et al.*, 2011).



Gambar 2.2 Mekanisme MDA (peroksida lipid) pada PE

Seperti yang telah diuraikan sebelumnya, patogenesis PE dimulai dengan terjadinya kegagalan invasi sel-sel sitotrofoblas ke arteri spiralis yang disinyalir berhubungan dengan maladaptasi sistem imun antara ibu dan fetus juga keterlibatan ekspresi mir17 yang meningkat. Kegagalan ini menyebabkan terhambatnya perfusi ke plasenta yang menimbulkan hipoksia. Hipoksia plasenta menimbulkan pertumbuhan intra uterin yang terhambat pada fetus, selain itu pada ibu dapat mengakibatkan kerusakan multi-organ yang timbul akibat dilepaskannya berbagai sitokin, produk peroksida lipid (malondialdehid), debris trofoblas (mikrofragmen sinsitiotrofoblas, sitokeratin) oleh plasenta yang hipoksia ke sirkulasi maternal. Keadaan hipoksia juga menimbulkan aktivasi sel-sel imun, terutama neutrofil dan sel dendritik menghasilkan lebih banyak sitokin yang menginduksi terbentuknya ROS yang berlebihan sehingga memperburuk keadaan sirkulasi maternal, juga resistensi perifer serta disfungsi endotel (Yung *et al.*, 2014).

Ketika terjadi kehamilan normal, peningkatan aliran darah utero-plasenta dikompensasi oleh adanya estrogen yang menginduksi vasodilatasi pembuluh darah

melalui NO. Selain sebagai vasodilator, NO berperan mencegah timbulnya perlekatan leukosit dan molekul adhesi lainnya, serta menghambat agregasi platelet. NO adalah vasodilator alami yang terbentuk melalui aktivasi enzim eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*). Namun pada keadaan PE, peningkatan ROS menyebabkan terbentuknya ONOO^- (*nitrat trioksida*) yang menghambat BH4 sehingga struktur eNOS menjadi tidak stabil dan tidak mampu menghasilkan NO secara maksimal. Di sisi lain, ONOO^- juga berperan dalam merusak DNA (asam deoksiribonukleat), protein, struktur lipid membran dan menghambat aktivitas prostaglandin sintase yang menyebabkan konstriksi pembuluh darah dan agregasi platelet. Peningkatan ROS yang tidak dapat diimbangi oleh pembentukan NO inilah yang menimbulkan kondisi stres oksidatif (Ekambaram *et al.*, 2009).

Kondisi stres oksidatif tentunya juga berpengaruh langsung terhadap integritas organel sel, seperti mitokondria. Terjadinya disfungsi mitokondria sebagai generator energi sel tubuh akan menyebabkan penurunan produksi ATP yang pada akhirnya menghambat kerja enzim-enzim mitokondria, menimbulkan destabilisasi dan agregasi protein-protein intraselular yang merupakan awal dari proses apoptosis (Barton dan Sibai, 2007). Selain berpengaruh terhadap integritas membran dalam mitokondria, keadaan stres oksidatif juga menimbulkan kerusakan pada *retikulum endoplasma* (RE) yang merupakan tempat biosintesis hormon-hormon polipeptid, faktor-faktor pertumbuhan, dan protein-protein plasma membran beserta hasil modifikasi post-transisionalnya. Keadaan ini mengaktifkan beberapa jalur-jalur (*pathway*) *caspase*, seperti PERK - eIF-2 α (*Protein Endoplasmic Reticulum Kinase – Eucaryotic Initiation Factor*) dan ATF-6 (*Activating Transcription Factor 6*) yang meningkatkan pembentukan *misfolded proteins* yang berujung pada degradasi protein-protein intrasel (Lopez *et al.*, 2008). Dalam hal ini peranan Hsp70 dibutuhkan untuk tidak terjadi apoptosis yang berlebihan, sehingga dapat menjaga homeostasis sel. Selanjutnya akan dibahas tentang Hsp70 meliputi peranannya dalam kasus PE.

2.4 Peranan Ekspresi Hsp70 pada Preeklampsia

2.4.1. Fisiologi Hsp70

Pertama kali Hsp70 ditemukan secara tidak disengaja oleh FM Ritossa pada tahun 1960 ketika menginkubasi lalat buah (*Drosophila*) dengan adanya peningkatan transkripsi gen protein yang tidak diketahui pada kromosomnya. Hal inilah yang digambarkan sebagai heat shock respon, dan kemudian diterminasikan sebagai HSPs, sehingga diketahui bahwa peningkatannya ini dapat disebabkan oleh *heat stress* dan *toxic chemicals*, khususnya logam-logam berat seperti arsenic, cadmium, mercury dan lain-lain (Ekambaram dan Geetha, 2008).

Hsp70 adalah *Heat Shock Protein* berukuran 70 k-Da dan dikoding oleh gen Hsp70. Secara fisiologis Hsp70 membantu berbagai proses pelipatan protein, meliputi pelipatan dan perakitan sintesis protein baru, melipat kembali kesalahan pelipatan dan agregasi protein, translokasi membran organel dan mengontrol aktivitas pengaturan protein. Hsp70 berfungsi sebagai kontrol kualitas struktur protein dan memperbaiki kesalahan pelipatan dalam sel (Mayer dan Bukau, 2005).

Hsp70 terdapat di dua lokasi yang berbeda yaitu intrasel dan ekstrasel. Hsp70 intrasel mempunyai fungsi sebagai protein sitoproteksi melawan berbagai macam stres. Hsp70 ekstrasel berfungsi sebagai *chaperokin* yang menstimulasi sintesis sitokin proinflamasi, kemokin, meningkatkan ekspresi molekul antigen pada *antigen presenting cell* (APC) dan meningkatkan migrasi sel NK (Mayer dan Bukau, 2005; Kaur *et al.*, 2010).

Pelepasan Hsp70 ke lingkungan ekstrasel dapat terjadi melalui sekresi aktif dan pelepasan pasif. Hsp70 dilepaskan secara pasif dari sel yang apoptosis, nekrosis atau sel yang rusak akibat terinfeksi virus (Amorim dan Moseley, 2010). Hsp70 dilepaskan secara aktif ke ekstrasel melalui eksosom ketika distimulasi dengan sitokin inflamasi tertentu (IFN- γ , IL-10) (Bausero *et al.*, 2005). Hsp70 dapat ditemukan di sirkulasi perifer pada individu sehat dan meningkat sebagai respon stresor dan penyakit-penyakit tertentu (Wright *et al.*, 2000; Pockley *et al.*, 2003).

Pada sel manusia Hsp70 ikut serta pada regulasi siklus sel dan diketahui membantu melipat protein dalam keadaan kondisi stres dengan cara memperbanyak jumlah ikatan peptida dan peptida kompleks yang stabil (Ekambaram, 2011). Interaksi Hsp70 dengan beberapa jalur regulator transduksi sinyal menimbulkan

kemampuan untuk mengendalikan homeostasis sel, proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Interaksi Hsp70 dengan protein regulator tersebut terus berlanjut dalam siklus aktivasi dan melibatkan Hsp90 serta sejumlah co-chaperone. Regulator protein tersebut dikenal sebagai klien, disimpan dalam keadaan tidak aktif, nantinya mereka akan diaktifkan dengan cepat oleh sinyal yang tepat. Berkaitan dengan hal ini Hsp70 dan Hsp90 akan mengendalikan aktivasi penuh setelah jalur transduksi sinyal diaktifkan (Mayer dan Bukau, 2005).

Peranan Hsp70 yang dapat memperbaiki protein gagal lipat timbul akibat tekanan internal atau eksternal. Gangguan dari sistem selular yang disebabkan oleh proses lingkungan dan perkembangan patologis dapat diatasi oleh Hsp70 bersama jalur transduksi sinyal tersebut. Maka dengan memahami interaksi Hsp70 dan jalur transduksinya tersebut dapat diketahui bahwa respon stres dan apoptosis terkait satu sama lain. Hsp70 menghambat apoptosis bekerja pada jalur caspase dependent (kematian sel karena apoptosis) dan independent (kematian sel non apoptosis atau necrosis). Kelebihan Hsp70 menyebabkan peningkatan resistensi terhadap induksi agen apoptosis seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), sementara itu regulasi Hsp70 yang rendah oleh antisense menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap agen ini. Pengamatan ini berkaitan dengan banyak proses patologis seperti onkogenesis, neurodegeneration dan penuaan. Sejumlah sel-sel tumor yang diamati terjadi peningkatan kadar Hsp70, hal ini berkorelasi dengan peningkatan keganasan tumor dan resistensi terhadap terapi. Namun jika terjadi penurunan kadar Hsp70 pada sel-sel tumor akan menginduksi diferensiasi dan kematian sel. Penyakit neurodegeneratif seperti alzheimer, parkinson, huntington corea dan spinocerebellar ataksia ditandai dengan apoptosis berlebihan (Mayer dan Bukau, 2005).

2.4.2. Ekspresi Hsp70 pada Preeklampsia

Pada kehamilan normal, diketahui bahwa ada peningkatan produksi radikal bebas dan peroksida lipid pada akhir kehamilan jika dibandingkan dengan wanita yang tidak hamil. Pada waktu yang bersamaan, biasanya terjadi juga peningkatan antioksidan selama masa kehamilan, bertujuan untuk menjaga keseimbangan oksidan selama masa kehamilan, akan tetapi kehamilan patologi seperti PE faktanya terjadi kelebihan produksi ROS yang diduga menjadi salah satu penyebab utama terjadinya kegagalan reperfusi pada perkembangan plasenta, hal inilah yang menjadi

akumulasi debris-debris plasenta pada jalur apoptosis (Ekambaram dan Geetha, 2008).

Oleh karena itu sel harus dilindungi dari sitotoksik yang merupakan golongan protein, mudah diinduksi dan beberapa diantaranya secara berurutan diekspresikan serta meningkat pada respon stres, walaupun ada juga hanya diekspresikan setelah kejadian stres. Perlindungan sel tersebut dilakukan oleh Hsp. Protein-protein yang diekspresikan secara berurutan tersebut bekerja sebagai *chaperon* (protein yang membantu protein untuk melipat/gagal melipat dan merakit atau tidak merakit makro-molekular penyusun lainnya) protein seluler lainnya, mengikat polypeptida yang baru untuk mencegah protein melipat prematur dan untuk memindahkan protein ke dalam organella. Induksi protein ini (HSPs) bertujuan untuk mencegah kerusakan sel akibat induksi stres dengan cara mencegah denaturasi protein dan atau memperbaiki kerusakan tersebut (Ekambaram dan Geetha, 2008).

Salah satu protein yang diinduksi HSP adalah Hsp70, bertujuan untuk melindungi sel dari apoptosis yang berlebihan pada PE sebagai respon stres oksidatif, dan banyak diekspresikan terutama pada plasenta. Penelitian tentang peningkatan Hsp70 pada serum dan jaringan plasenta, serta sel endotel plasenta pada kasus PE telah banyak dilakukan dan didapatkan suatu kesimpulan bahwa Hsp 70 mempunyai peranan dalam menghadapi keadaan stres oksidatif (Ekambaram, 2011).

Penelitian lain melaporkan bahwa terjadi peningkatan Hsp70 pada PE dengan infeksi *Ureaplasma urealyticum* (Ekambaram *et al.*, 2009). Penelitian lainnya menunjukkan adanya genotip yang spesifik dalam ekspresi Hsp70 pada kondisi PE (Fekete *et al.*, 2006). Mitochondria Hsp70 (mtHsp70) juga mempunyai peranan penting untuk membawa praprotein melewati membran mitokondria masuk ke dalam matriks. Proses ini juga untuk mempertahankan membran potensial pada mitokondria yang merupakan motor pembentukan protein dalam mitokondria. Sekarang telah diketahui bahwa peningkatan mtHsp70 seiring dengan respon peningkatan terhadap oksidasi mitokondria dan stres nitrat selama penurunan status antioksidan pada PE (Ekambaram *et al.*, 2009). Terjadinya penurunan aktivasi enzim kompleks respiratori mitokondria yang bekerja merupakan stimulus pertama untuk menginduksi ekspresi mtHsp70 (Ekambaram *et al.*, 2009).

Oleh karena itu peningkatan mtHsp70 (mitochondrial Hsp70) juga dalam rangka mencegah NO yang sangat bergantung pada peningkatan zat besi bebas (ferro atau Fe^{+}) dalam seluler dari hasil kompleks respiratori mitokondria, dengan demikian dapat mempertahankan integritasnya. mtHsp70 dapat menekan produksi ROS pada mitokondria dengan cara menstabilkan *sitokrom-c* dan komponen penting lainnya seperti rantai transport elektron juga ditambah dengan peningkatan mekanisme antioksidan mitokondria (Ekambaran *et al.*, 2009; Volobueva *et al.*, 2008).

Penurunan antioksidan pada jaringan plasenta ditambah lagi dengan kondisi stres oksidatif sehingga menyebabkan dalam jaringan ini terjadi peningkatan apoptosis bahkan pada akhirnya akan mengalami nekrosis. Berkurangnya atau buruknya fungsi plasenta pada PE menyebabkan peningkatan apoptosis, oleh karena itu fungsi dari HSP khususnya Hsp 70 berperan juga sebagai anti apoptosis yaitu dengan cara menghambat aktivasi Bax (*Bcl-2-associated X protein*) untuk mencegah pelepasan proapoptosis faktor seperti *sitokrom-c* dari mitokondria (Ekambaran dan Lavanya, 2011). Dalam hal ini Hsp70 juga menghambat kejadian stres pada sel membran permeabel mitokondria dengan mengontrol kapan sel perlu dimatikan, tetapi tidak ikut campur pada kematian sel jika kondisi ini telah terjadi (Ekambaran, 2011). Melalui peningkatan ekspresi Hsp70, ternyata dapat memblokir proses kematian sel, atau yang lebih ekstrimnya lagi dapat mendukung atau mengurangi pertumbuhan sel tersebut, hal inilah yang mungkin menyebabkan peningkatan komplikasi maternal dan fetal, sehingga membutuhkan pengembangan terapi yang tepat, salah satunya adalah dengan pemberian berbagai macam antioksidan seperti vitamin E, β -carotene, asam askorbit dan glutathione bersama dengan penurunan aktivasi ikatan zat besi bebas telah banyak diujicobakan pada kasus PE (Ekambaran, 2011).

Vitamin E ternyata mampu mempengaruhi sinyal sitokin pada trofoblast plasenta dan juga mempunyai efek pada sel imun maternal pada awal maupun akhir kehamilan (Ekambaran, 2011). Penelitian lain juga mengungkapkan bahwa peningkatan serum Hsp70 pada PE sepertinya mencerminkan terjadinya inflamasi sistemik, stres oksidatif, kerusakan sel-sel hepar, dan ternyata hal ini tidak ada berhubungan dengan karakteristik pasien seperti umur, paritas, BMI (*body mass Index*), tekanan darah, umur kehamilan, dan berat badan lahir dan beberapa parameter laboratorium lainnya (Molvarec *et al.*, 2009).

Untuk mengetahui ekspresi Hsp70 telah banyak diteliti dengan menggunakan metode *Western Blot* (Ekambaram dan Geetha, 2008; Abdulsid *et al.*, 2013). Pencuplikan sampel plasenta dilakukan di tiga bagian yang berbeda dari plasenta yaitu bagian dalam, tengah dan pinggir, diambil dari ibu melahirkan dengan PE dan normal. Hasilnya ternyata ada perbedaan yang signifikan peningkatan ekspresi Hsp 70 pada sampel plasenta yang dicuplik dari bagian tengah kedua kelompok penelitian tersebut. Demikian juga pada penelitian Ekambaram dan Geetha (2008), namun peneliti ini tidak membedakan tempat pencuplikan sampel plasenta, akan tetapi hasil penelitiannya menunjukkan perbedaan yang signifikan antara ibu melahirkan dengan PE dan normal. Sementara itu untuk mengukur kadar Hsp70 serum dapat dilakukan dengan menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Molvarec *et al.*, 2009).

2.5 Peranan Apoptosis pada Preeklampsia

Apoptosis berasal dari bahasa Yunani, yang berarti gugurnya putik bunga atau daun dari batangnya. Apoptosis adalah mekanisme fisiologis dari kematian sel. Ada 2 mekanisme kematian sel yaitu apoptosis dan nekrosis. Apoptosis berbeda dengan nekrosis. Apoptosis pada umumnya berlangsung seumur hidup dan bersifat menguntungkan bagi tubuh. Bila sel kehilangan kemampuan melakukan apoptosis maka sel tersebut dapat membelah secara tak terbatas dan akhirnya menjadi kanker. Apoptosis itu sendiri sering dihubungkan dengan kematian sel terprogram (Sujatmiko *et al.*, 2015).

Nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel secara akut. Dikatakan nekrosis bila terjadi perubahan morfologi sel diikuti dengan kematian sel pada jaringan hidup, pada umumnya disebabkan oleh aksi degradasi enzim pada kerusakan sel yang letal. Sel-sel yang dimusnahkan karena cedera akibat mekanikal, terinfeksi oleh toksik. Pada nekrosis terjadi perubahan di inti yang pada akhirnya dapat menyebabkan inti menjadi lisis dan membran plasma menjadi rupture (Sujatmiko *et al.*, 2015). Nekrosis secara histologi terjadi pada kerusakan oleh karena lingkungan eksternal yang ireversibel. Karakter sel yang mengalami kerusakan ini ditandai dengan sel dan organelnya seperti mitokondria membengkak (oleh karena rusaknya kemampuan membran plasma untuk mengatur pengeluaran ion dan cairan),

cairan sel keluar, dan inflamasi disekitar jaringan (Kanfman dan Hengartner, 2001; Kumar V *et al.*, 2005). Apoptosis berfungsi sebagai:

1. Terminasi sel, keputusan untuk apoptosis dapat berasal dari sel itu sendiri, atau jaringan sekitarnya maupun dari sel yang berasal dari sistem imun. Hal ini fungsi apoptosis adalah untuk mengangkat sel yang rusak, mencegah sel menjadi lemah atau kurangnya nutrisi dan mencegah penyebaran virus.
2. Mempertahankan homeostasis, artinya jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan harus berada dalam keadaan yang relatif konstan, hal ini dapat dicapai jika kecepatan mitosis seimbang dengan kematian sel.
3. Perkembangan embrional: pada masa embrio perkembangan suatu jaringan atau organ didahului oleh pembelahan dan diferensiasi sel dan kemudian dikoreksi melalui apoptosis.
4. Interaksi limfosit: perkembangan limfosit B dan limfosit T pada tubuh manusia merupakan suatu yang kompleks, yang akan membuang sel-sel yang berpotensi menjadi rusak. Sitotoksik T dapat menginduksi apoptosis secara langsung pada sel melalui terbukanya suatu celah pada target membran dan pelepasan zat-zat kimia untuk mengawali proses apoptosis.
5. Involusi hormonal pada usia dewasa, misalnya pada pelepasan sel endometrium selama siklus menstruasi, regresi pada payudara setelah masa menyusui dan atresia folikel pada menopause.

Apoptosis merupakan jalur kematian sel yang dipicu oleh mekanisme pengaturan intraseluler dimana sel yang akan mati mengaktifkan enzim yang akan mendegradasi DNA nukleus sel dan protein sitoplasma. Apoptosis pada kondisi fisiologis berfungsi untuk mengatur jumlah sel, proliferasi dan menghilangkan sel yang sudah tidak berguna lagi sebagai suatu perkembangan normal dari sel, seperti pada embriogenesis, *hormone-dependent involution* pada siklus menstruasi dan atresia folikel pada menopause, delesi sel pada proliferasi sel epitel, eliminasi sel reaktif limfosit yang berlebihan, kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik pada infeksi virus dan perkembangan tumor (Sujatmiko *et al.*, 2015).

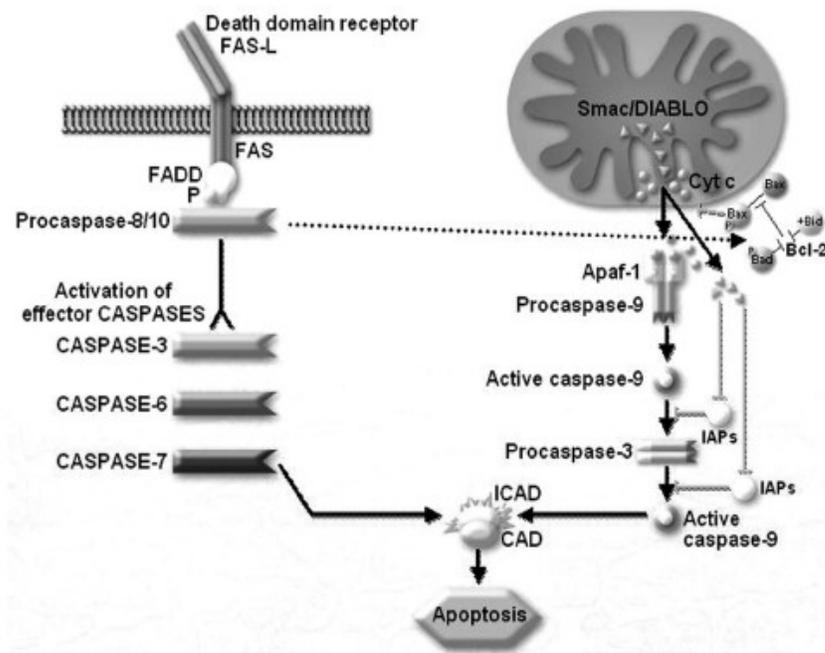
Apoptosis dapat terjadi dalam kondisi patologi, dimana apoptosis bertanggung jawab atas kematian sel seperti stimulasi kerusakan eksternal pada radiasi, obat sitotoksik anti-kanker, infeksi virus, atrofi patologi organ parenkim karena obstruksi

saluran di pankreas dan ginjal, juga kematian sel pada tumor. Disregulasi proses kematian sel ini mempunyai peranan pada patogenesis dari penyakit. Penilaian jumlah sel yang mengalami kematian karena apoptosis dinyatakan dalam indeks apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005; Kumar V *et al.*, 2005; Kaufmann dan Hengartner, 2001).

Terdapat 2 jalur apoptosis (Gambar 2.3) yaitu jalur ekstrinsik (jalur sitoplasma) atau *Death Receptor Pathway*, dipicu melalui Fas *death receptor* merupakan bagian dari TNF *receptor superfamily* dan jalur intrinsik (jalur mitokondria) yang timbul oleh adanya stimulasi sehingga memacu pelepasan sitokrom-c dari mitokondria dan pada akhirnya akan mengaktifasi signal kematian sel (Keman, 2009), lebih rinci dijelaskan sebagai berikut :

1. Jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*) diinisiasi oleh pengikatan reseptor kematian pada permukaan berbagai sel. Reseptor kematian merupakan bagian dari reseptor tumor nekrosis faktor yang terdiri dari sitoplasmik domain, berfungsi untuk mengirimkan sinyal apoptotik. Reseptor kematian yang diketahui antara lain TNF reseptor tipe 1 yang dihubungkan dengan protein Fas (CD95). Pada saat Fas berikatan dengan ligandnya, dari membran menuju ligand (FasL), maka tiga atau lebih molekul Fas bergabung menjadi FADD (Fas-associated death domain). FADD ini melekat pada reseptor kematian dan mulai berikatan dengan bentuk inaktif dari caspase 8. Molekul procaspase 8 ini kemudian dibawa ke atas dan pecah menjadi caspase 8 aktif. Enzim ini kemudian mencetuskan cascade proteolisis selanjutnya mengaktifkan procaspase (prekursor inactive) lainnya menjadi enzim proteolisis (caspase) mediator fase eksekusi (apoptosis).
2. Jalur intrinsik (*mitochondira pathway*) akan menghasilkan peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan dari molekul proapoptosis (death inducers) ke dalam sitoplasma. Mitokondria mengandung protein seperti sitokrom-c yang penting bagi kehidupan, tetapi bila beberapa protein sejenis terlepas ke dalam sitoplasma (merupakan indikasi bahwa sel tersebut tidak sehat), menginisiasi program “bunuh diri” dari apoptosis. Pelepasan protein mitokondria ini dikontrol secara seimbang melalui anggota keluarga protein Bcl antara pro dan antiapoptosis. Salah satu yang utama adalah Bcl-2, Bcl-x dan Mcl-1. Normalnya protein ini terdapat pada sitoplasma dan membran mitokondria, mereka

mengontrol permeabilitas mitokondria dan mencegah kebocoran protein mitokondria yang nantinya memiliki kemampuan untuk mencetuskan kematian. Bila sel kehilangan sinyal bertahan/survival, terjadi kerusakan DNA atau kesalahan sintesis protein maka akan merangsang stres RE, sensor dari kerusakan atau stres akan diaktifkan. Sensor kemudian akan mengaktifkan dua kritikal (proapoptosis) efektor, Bax dan Bak, yang membentuk oligomers yang kemudian masuk ke dalam membran mitokondria dan membuat saluran/channel yang menyebabkan protein dari membran dalam mitokondria menjadi bocor sehingga masuk ke dalam sitoplasma. BH3 (bagian dari Bcl-2 family, homolog dengan Bax) juga mengikat dan memblokir fungsi dari Bcl-2 juga Bcl-x. Saat yang bersamaan sintesis dari Bcl-2 dan Bcl-x menurun. Hasil aktivasi tersebut disertai dengan hilangnya fungsi perlindungan dari anggota keluarga Bcl antiapoptosis, maka terjadi pelepasan beberapa protein mitokondria ke dalam sitoplasma yang akan mengaktifkan alur caspase. Salah satu protein tersebut adalah sitokrom-c (pada mitokondria berfungsi sebagai alat transfer elektron dalam ruang antar membran yang larut dalam air). Sekali terlepas ke dalam sitosol, sitokrom-c mengikat protein yang dinamakan Apaf-1 (apoptosis-activating faktor-1, homolog dari Ced-4 pada *C elegans*), yang kemudian akan membentuk hexamer berbentuk seperti roda yang disebut apoptosom. Komplek ini dapat mengikat caspase-9, inisiator caspase yang penting dari alur mitokondria dan enzim akan memecah molekul caspase-9 yang berdekatan, sehingga membentuk sebuah proses autoamplifikasi. Protein mitokondria lainnya, seperti Smac/Diablo akan memasuki sitoplasma, kemudian mengikat dan menetralkan protein sitoplasma yang berfungsi sebagai inhibitor fisiologis apoptosis. Fungsi normal dari inhibitor fisiologis apoptosis adalah untuk memblokir aktivasi caspase, termasuk caspase-3 dan menjaga sel-sel tetap hidup, netralisasi dari IAP ini merupakan inisiasi dari alur caspase (Ghobrial *et al.*, 2005; Keman, 2009).



Gambar 2.3 Dua jalur mekanisme terjadinya apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005).

Regulasi apoptosis diatur oleh beberapa gen, diantara gen tersebut, yang termasuk dalam faktor penting adalah golongan gen Bcl-2. Bcl-2 merupakan gen anti-apoptosis yang pertama kali diidentifikasi pada limfoma non-hodgkin (kanker yang tumbuh pada sistem limfatik tubuh). Gen tersebut memiliki kemampuan menghambat berbagai macam sinyal apoptosis, dan ekspresi dari gen ini telah ditemukan meningkat pada neoplasma, termasuk keganasan mammae, prostat, tiroid, dan karsinoma sel paru. Bax merupakan gen lain dari Bcl-2, tetapi berlawanan dengan Bcl-2, gen ini cenderung menginduksi terjadinya apoptosis. Gen-gen yang merupakan golongan dari kelompok Bcl-2 dapat membentuk homo atau heterodimer (kompleks dari dua molekul yang berbeda) satu sama lain (Ghobrial *et al.*, 2005; Kumar V *et al.*, 2005; Kanfmann dan Hengartner, 2001). Efek antagonis dari gen Bcl-2 telah dipengaruhi sebagian oleh Bcl-2 Bax heterodimer yang mencegah terbentuknya Bax-homodimer. Telah diduga bahwa rasio selular dari Bcl-2/Bax merupakan faktor kunci penting yang membuat sel resisten terhadap stimulus apoptosis, sedangkan rasio yang rendah menginduksi kematian sel (Teguh *et al.*, 2010). TNF- α merupakan sitokin yang menginduksi apoptosis melalui reseptor spesifik. Aktivasi dari reseptor TNF memicu aktivasi dari enzim proteolitik cascade yang bertanggung jawab terhadap eksekusi dari apoptosis. Bagaimanapun untuk

menunjang apoptosis, TNF- α dapat mengawali sinyal lain termasuk mengaktivasi NF- κ B, sebuah faktor transkriptase yang terlibat dalam regulasi dari gen pada respon imun perkembangan embrionik, onkogenesis dan apoptosis. Sedangkan beberapa penelitian telah menduga fungsi NF- κ B yaitu untuk menginduksi sejumlah protein anti-apoptosis pada beberapa jenis sel. NF- κ B terlibat dalam transkriptase dari beberapa gen anti-apoptosis, termasuk faktor yang terkait dengan reseptor TNF yaitu TRAF-1 dan TRAF-2, yang merupakan golongan dari penghambat gen apoptosis. NF- κ B terdapat pada endometrium selama siklus menstruasi, tetapi hubungannya dengan apoptosis jaringan belum diketahui (Ghobrial *et al.*, 2005; Kumar V *et al.*, 2005. Kanfmann dan Hengartner, 2001).

Tahap pelaksanaan apoptosis dimulai dari fase degradasi atau eksekusi. Dalam hal ini sel yang mulai apoptosis, secara mikroskopis akan mengalami perubahan, sel mengerut dan lebih besar, sitoplasma tampak lebih padat, kromatin menjadi kondensasi dan fragmentasi pada membran inti (pyknotik), kromatin berkelompok di bagian perifer, DNA yang ada di dalamnya pecah menjadi fragmen-fragmen, membran sel memperlihatkan tonjolan-tonjolan yang irreguler (*membran blebbing*), sel yang terpecah menjadi beberapa fragmen (*apoptotic bodies*). Selanjutnya apoptotic bodies ini akan difagosit oleh sel yang berada di sekitarnya. Adanya sel-sel fagosit ini dapat menjamin tidak menimbulkan respon inflamasi setelah terjadinya apoptosis.

Preeklampsia terjadi salah satunya karena kegagalan sel trofoblas melakukan remodeling arteri spiralis akibat proses apoptosis yang berlebihan menyebabkan terjadinya iskemia uteroplasenta dan kerusakan sel endotel yang menimbulkan manifestasi klinis preeklampsia terutama terjadi melalui jalur intrinsik intraseluler di mana Bax dan Bak adalah gen-gen yang berperan sebagai regulator apoptosis pada sel (sebagai pro apoptosis). Mereka terletak di dalam mitokondria dan retikulum endoplasma dan bekerja mengaktifkan caspase sehingga terjadi proses kematian sel (Sujatmiko *et al.*, 2015).

Sementara itu terjadi juga penurunan antioksidan pada jaringan plasenta ditambah lagi dengan kondisi stres oksidatif sehingga menyebabkan dalam jaringan ini terjadi peningkatan apoptosis bahkan pada akhirnya akan mengalami nekrosis. Berkurangnya atau buruknya fungsi plasenta pada PE menyebabkan peningkatan

apoptosis, dalam hal ini Hsp 70 berperan juga sebagai anti apoptosis yaitu dengan cara menghambat aktivasi Bax untuk mencegah pelepasan proapoptosis faktor seperti *sitokrom-c* dari mitokondria (Ekambaram dan Lavanya, 2011).

Pada PE terjadi kegagalan adaptasi imunologik yang tidak terlalu kuat, maka konsepsi tetap berjalan tetapi sel-sel trofoblas tidak mampu melakukan invasi arteri spiralis supaya berdilatasi, sehingga tonus pembuluh darah tetap tinggi dan terjadi vasokonstriksi. Keadaan ini menyebabkan pembuluh darah maternal tidak dapat memenuhi kebutuhan darah sirkulasi, sehingga akan terjadi iskemia dan merangsang terjadinya apoptosis plasenta (Keman, 2009)

Kegagalan invasi trofoblas, vaskulitis, trombosis dan iskemia dari plasenta menyebabkan preeklampsia. Plasenta yang iskemia menyebabkan hipoksia sehingga terjadi disfungsi sel endotel. Trofoblas yang terpapar hipoksia secara invitro menyebabkan terjadinya proses apoptosis yang berlebihan, sehingga invasi sitotrofoblas ke dalam miometrium menjadi dangkal dan remodeling arteri spiralis pada uterus terjadi tidak lengkap. Pada akhirnya akan menimbulkan iskemia uteroplasenta. Hipoksia pada plasenta ini juga menimbulkan apoptosis, terutama melalui jalur intrinsik (Ishihara *et al.*, 2002).

Hipoksia menyebabkan aktifitas antiapoptosis Bcl-2 famili terhambat sehingga mengaktifkan peran dari protein Bax yang meningkatkan permeabilitas membran mitokondria terhadap sitokrom-c yang selanjutnya berikatan dengan APAF-1 dan membentuk apoptosome yang akan mengaktifkan caspase 9. Caspase 9 selanjutnya akan mengaktifkan caspase 3 sehingga terjadilah proses kematian sel (Ishihara *et al.*, 2002).

Pada kondisi normal dapat terjadi apoptosis sel sinsitiotrofoblas yang dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron berupa gambaran khas, seperti hilangnya mikrovili dan mengembungnya membran plasenta. Proses apoptosis ini berperan dalam pergantian sitotrofoblas dan pembaruan permukaan sinsitium dari vili korialis. Proses apoptosis selain terjadi pada sinsitiotrofoblas juga pada sitotrofoblas. Proses ini mulai meningkat dengan makin tuanya usia kehamilan karena adanya penurunan ekspresi protein Bcl-2 (Ishihara *et al.*, 2002). Tingginya kadar ekspresi protein Bcl-2 pada sinsitiotrofoblas dapat mencegah proses apoptosis pada trofoblas (Allaire *et al.*, 2000).

Studi lain mengungkapkan bahwa pada kelompok preeklampsia dengan apoptosis indeks meningkat terdapat komplikasi yaitu 1 kasus KMK (Kecil Masa Kehamilan) dan pada AI positif terdapat 3 kasus KMK (Teguh *et al.*, 2010). Peneliti lain juga melaporkan bahwa preeklampsia dapat terjadi peningkatan AI di plasenta dibanding kehamilan normal, namun tidak terdapat perbedaan ekspresi Bax atau Bcl-2 (Allaire *et al.*, 2000). Teguh *et al.* (2010) juga melaporkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara AI dengan peningkatan tekanan darah dan BB lahir bayi pada penderita preeklampsia dan kehamilan normal.

Pemeriksaan patologi anatomi plasenta pada PE memperlihatkan adanya infark dan sklerotik yang menyebabkan penyempitan pembuluh darah arteri dan arteriole dengan karakteristik kurangnya invasi endovaskuler sitotrofoblas dan remodeling arteri spiralis yang tidak sempurna. Hal ini disebabkan oleh proses apoptosis yang terjadi berlebihan pada perkembangan dan diferensiasi trofoblas (Teguh, 2010).

Sel yang mengalami apoptosis ditemukan juga pada plasenta kehamilan normal baik pada sisi maternal maupun sisi fetus. Proses apoptosis berperan pada terjadinya penempelan dan invasi trofoblas, proses transformasi arteri spiralis, diferensiasi trofoblas, dan proses toleransi imun pada antigen paternal yang diekspresikan oleh sel trofoblas (Teguh, 2010).

2.6 Peranan Ekspresi Bcl-2 pada Kejadian Preeklampsia

Bcl-2 merupakan B-cell lymphoma/leukemia-2 dan protein kedua dari berbagai protein yang ditemukan pada limfoma. Sesuai dengan namanya, gen ini ditemukan karena keterlibatannya dalam keganasan sel-B, dimana terjadi translokasi kromosomal yang kemudian mengaktifkan sebagian besar gen pada non-Hodgkin's sel-B limfoma folikuler (Teguh, 2010).

Gen Bcl-2 memiliki lebih dari 230 kb dari DNA dan terdiri dari tiga exons yang mana exon ke-2 dan sebagian kecil dari exon ke-3 mengkode protein. Bcl-2 mengkode 2 mRNA, yaitu Bcl-2 α dan Bcl-2 β , yang mana hanya Bcl-2 α yang sepertinya memiliki relevansi biologis. Protein Bcl-2 merupakan membran protein yang memiliki berat molekul 26kDa terletak pada bagian sitosol dari pembungkus nuklear, retikulum endoplasma dan bagian luar membran mitokondria dan sitoplasma (Palupi, 2013). Berdasarkan dari struktur dan fungsi, protein Bcl-2 adalah suatu

regulator utama pada proses apoptosis meliputi antiapoptosis dan proapoptosis. Saat ini ada 18 anggota family Bcl-2 yang telah diidentifikasi dan dibagi ke dalam 3 kelompok (Palupi, 2013) yaitu:

1. *The anti apoptotic channel-forming* protein meliputi Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1.
2. *The proapoptotic channel-forming* protein diwakili Bax (Bcl-2 associated x protein) dan Bak (Bcl-2 associated killer), aktifitas dari kelompok sub grup ini bersifat menstimulasi pelepasan sitokrom-c dari membran mitokondria.
3. *The proapoptotic channel-forming* protein yaitu Bid (BH3 domain only death agonist), Bik, NOxa, Puma, Hrk, BNIP3, Bad (Bcl-2 associated death-only death promoter) merupakan molekul proapoptosis. Protein kelompok ini mendorong kematian sel sebagai protein adaptor yang terikat pada jalur upstream untuk memutuskan berlangsungnya program apoptosis.

Mekanisme molekuler apoptosis pada manusia sangat kompleks dan melibatkan sinyal molekuler, diantaranya kelompok Bcl-2. Kelompok Bcl-2, terdiri dari proapoptosis (Bax) dan penghambat apoptosis (Bcl-2 dan Bcl-xl) (Palupi, 2013). Anggota anti-apoptosis Bcl-2 bekerja dengan menekan apoptosis melalui blokade pelepasan sitokrom-c, dimana anggota proapoptosis bekerja sebagai promotor. Efek ini lebih tergantung pada keseimbangan antara Bcl-2 dan Bax dibandingkan pada Bcl-2 sendiri (Ghobrial *et al.*, 2005). Protein Bcl-2 *family* merupakan regulator yang paling penting pada jalur intrinsik, juga merupakan pengaturan utama pada proses apoptosis (Shiozawa dan Konishi, 2006).

Fungsi dari Bcl-2 sebagai antiapoptosis akan memblokir program kematian sel dan memperpanjang waktu hidup sel, ekspresi berlebih dari Bcl-2 ini melindungi limfosit dari apoptosis dan memungkinkan sel tersebut bertahan untuk periode yang lama. Bcl-2 juga mempunyai fungsi lain sebagai suatu antioksidan untuk melindungi mitokondria (Ghobrial *et al.*, 2005).

Protein (Bax) dapat bekerja dengan membuka saluran Ca^{2+} atau menghambat Bcl-2 sehingga membuat efek anti-apoptosis. Bcl-2 terhalang, demikian pula Bad menghambat Bcl-xl. Kerusakan DNA terjadi karena beberapa faktor antara lain (Riawan, 2004):

1. AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) yang terletak di intermembran mitokondria bocor

keluar, oleh karena pecahnya membran mitokondria kemudian memasuki nukleus dan menimbulkan kerusakan.

2. Aktifnya berbagai endonuklease, seperti Endonuklease G, PARP (Poly-ADP Ribose Polimerase) memicu kematian sel via apoptosis dengan menempuh berbagai jalur (*pathways*).

Berlebihnya Bax (proapoptotik) selalu ditemukan dengan aktifitas melawan Bcl-2 sehingga mempercepat kematian sel. Rasio anti dan pro-apoptotik protein keluarga Bcl-2 menentukan secara keseluruhan sel sensitif atau resisten terhadap berbagai stimulus apoptosis. Keseimbangan antara Bcl-2 dan Bax berperan penting untuk memelihara keseimbangan kelangsungan hidup dan kematian sel dan menjadi esensi dari determinasi potensi apoptosis dari sel oleh karenanya aktivitas apoptosis yang tinggi selalu dihubungkan dengan tingkat ekspresi rasio Bcl-2/Bax yang rendah (Ghobrial *et al.*, 2005).

Seiring dengan itu peneliti lain juga mengungkapkan bahwa ekspresi protein Bax dan Bak pada preeklampsia berat lebih tinggi dibandingkan dengan kehamilan normotensi dan protein Bax lebih berpengaruh pada preeklampsia dibanding dengan protein Bak (Sujatmiko *et al.*, 2015). Sejalan dengan hal ini juga ditemukan oleh Arianto (2015), bahwa ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-xl lebih rendah pada kehamilan preeklampsia berat dibandingkan kehamilan normotensi.

Peneliti lain melaporkan terjadi penurunan ekspresi protein Bcl-2 sinsitiotrofoblas pada sel plasenta penderita preeklampsia berat dan pertumbuhan janin terhambat (PJT) dibandingkan plasenta kehamilan normal (Ishihara, 2002). Penelitian lain juga menunjukkan peningkatan proses apoptosis sel sinsitiotrofoblas plasenta penderita preeklampsia dan PJT, sehingga penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada keadaan ini akan meningkatkan proses apoptosis (Teguh, 2010).

Pada PE terjadi penyempitan lumen arteri spiralis sampai diameter rata-rata 200 pm (pikometer), sedangkan pada kehamilan normal 500 pm, selain itu juga didapatkan perfusi plasenta sebesar 2 – 3 kali lebih rendah (Van Wijk *et al.*, 2000). Kegagalan remodeling ini menghalangi respons yang adekuat terhadap meningkatnya aliran darah sejalan dengan perkembangan kehamilan yang akan menyebabkan penurunan perfusi uteroplacenta sehingga terjadi iskemia plasenta. Seperti telah diketahui kegagalan remodeling menginduksi radikal bebas dan

menyebabkan peningkatan membran mitokondria sehingga terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 serta terjadinya apoptosis (Ishihara, 2002).

2.7 Perubahan Sistem dan Organ pada Preeklampsia

Beberapa diantara perubahan sistem dan organ pada PE yang dapat dijadikan sebagai salah satu acuan untuk menegakkan diagnosa PE diantaranya adalah :

2.7.1 Hipertensi.

Peningkatan lipid peroksida akibat stres oksidatif yang beredar di dalam aliran darah akan merusak sel endotel. Akibatnya sel endotel yang terpapar lipid peroksida akan rusak sehingga fungsi endotel terganggu, bahkan merusak juga seluruh struktur sel endotel, keadaan ini disebut sebagai disfungsi endotel (Angsar, 2012). Telah diketahui bahwa sel endotel berperan penting dalam proses homeostasis melalui integrasi berbagai mediator kimiawi. Sistem ini berefek positif terhadap sel-sel otot polos pembuluh darah dan sel-sel darah sehingga dapat menimbulkan berbagai perubahan antara lain (Hermann dan Lerman, 2001; Kitamoto dan Egashira, 2004).

1. Vasodilatasi atau vasokonstriksi untuk mengatur kebutuhan suplai darah bagi seluruh organ tubuh manusia.
2. Pertumbuhan dan atau perubahan-perubahan karakteristik penotif dari sel-sel otot polos pembuluh darah.
3. Perubahan – perubahan proinflamasi atau antiinflamasi.
4. Mempertahankan kekentalan darah dan mencegah perdarahan.

Sistem kerja sel endotel membutuhkan NO yang berperan mengontrol tonus vasomotor juga homeostasis pembuluh darah dan syaraf serta proses imunologik. NO diproduksi melalui perubahan asam amino L-arginine menjadi L-citrulline oleh enzim NOS. Beberapa isoform dari NOS telah berhasil dipurifikasi dan diklon sebagai NOS tipe I (diisolasi dari otak = neuronal NOS) dan NOS tipe III (diisolasi dari sel endotel = endothelial NOS) atau disebut juga constitutive-NOS (cNOS). Kedua isoform ini diatur oleh Ca^{+2} – calmodulin dan NADPH, FAD dan FMN serta HB4 sebagai kofaktor (Hermann dan Lerman, 2001).

NOS tipe I berperan penting dalam proses transmisi syaraf, kontrol homeostasis pembuluh darah dan dalam proses pembelajaran dan memori. Di dalam sistem saraf tepi, NOS berhubungan dengan jalur saraf nonadrenergic noncholinergic (NANC).

Sementara itu NOS tipe III berperan penting dalam mengontrol tonus pembuluh darah sebagai respons terhadap rangsangan, seperti rangsangan mekanik (shear stress), reseptor dependen (asetil kolin) dan reseptor independen (calcium ionophore). NO yang dihasilkan oleh NOS tipe II di dalam endotel akan berdifusi ke dalam otot polos pembuluh darah yang akan mengaktifkan enzim guanylate cyclase. Bersamaan dengan peningkatan cyclic GMP, akan terjadi relaksasi dari otot polos pembuluh darah. Jadi hasil akhir dari peningkatan NO akan terjadi vasodilatasi (Hermann dan Lerman, 2001).

Sel endotel juga memproduksi mediator-mediator yang merangsang vasokonstriksi yaitu endotelin, prostaglandin dan angiotensin II serta mengatur tonus pembuluh darah dengan cara mempertahankan keseimbangan antara vasodilatasi (produksi NO) dan vasokonstriksi (pembentukan angiotensin II). Angiotensin II diproduksi oleh sel endotel pada jaringan lokal, dibantu oleh enzim yang mengaturnya yaitu angiotensin converting enzyme (ACE). Aktivitas enzim ini di bawah pengaruh angiotensin I. Angiotensin I diproduksi melalui pemecahan dari suatu makromolekul prekursor (angiotensinogen) di bawah pengaruh renin, suatu enzim yang dihasilkan oleh ginjal. AT II berikatan dan mengatur tonus otot polos pembuluh darah melalui reseptor angiotensin yang spesifik. Tergantung dari reseptor yang diaktivasi, AT II dapat memberi efek regulasi terhadap berbagai aktivitas fungsional otot polos pembuluh darah, termasuk kontraksi (vasokonstriksi), pertumbuhan, proliferasi dan differensiasi. Oleh karena itu secara keseluruhan kerja dari AT II berlawanan dengan NO (Hermann dan Lerman, 2001; Kitamoto dan Egashira, 2004).

Oleh karena itu dapat dipahami bahwa hipertensi yang terjadi pada preeklampsia diduga karena disfungsi endotel yang menyebabkan penurunan produksi nitric oxide dan peningkatan endotelin-1 dan pengaruh AT II sehingga terjadi peningkatan tekanan darah (Kadirvelu *et al.*, 2002). Preeklampsia menyebabkan terjadi perubahan volume plasma. Pada kehamilan normal volume plasma biasanya akan meningkat (hipervolemia), bertujuan untuk memenuhi kebutuhan pertumbuhan janin. Peningkatan tertinggi volume plasma pada kehamilan normal terjadi pada umur kehamilan 32 – 34 minggu. Sebaliknya pada PE terjadi penurunan volume plasma (hipovolemia) antara 30 – 40%. Hipovolemia diimbangi dengan vasokonstriksi,

sehingga menimbulkan peningkatan total perifer resisten dan menimbulkan hipertensi.

Volume plasma yang menurun memberi dampak yang luas pada organ-organ penting lainnya salah satunya seperti ginjal, karena terjadi penurunan aliran darah ke ginjal yang mengakibatkan produksi urin menurun (oliguria), bahkan dapat terjadi anuria. Berat ringannya oliguria menggambarkan berat ringannya hipovolemia yang dapat menggambarkan berat ringannya PE, oleh karena itu pemberian cairan intravena hanya karena oliguria tidak dibenarkan, karena PE sangat peka terhadap pemberian cairan intravena yang terlalu cepat dan banyak.

Selain penurunan volume plasma, pada PE terjadi hipertensi yang merupakan tanda terpenting guna menegakkan diagnosis hipertensi dalam kehamilan. Tekanan diastolik menggambarkan resistensi perifer, sedangkan tekanan sistolik, menggambarkan besaran curah jantung. Pada PE peningkatan reaktivitas vaskular dimulai umur kehamilan 20 minggu, tetapi hipertensi dideteksi umumnya pada trimester II. Tekanan darah yang tinggi pada PE bersifat labil dan mengikuti irama sirkadian normal. Tekanan darah menjadi normal beberapa hari pascapersalinan, kecuali pada beberapa kasus PE berat bahwa kembalinya tekanan darah menjadi normal dapat terjadi 2 – 4 minggu pascapersalinan. Tekanan darah bergantung terutama pada curah jantung, volume plasma, resistensi perifer, dan viskositas darah.

Timbulnya hipertensi adalah akibat vasospasme menyeluruh dengan ukuran tekanan darah $\geq 140/90$ mmHg selang 6 jam. Dipilihnya tekanan diastolik 90 mmHg sebagai batas hipertensi, karena batas tekanan diastolik 90 mmHg yang disertai proteinuria, mempunyai korelasi dengan kematian perinatal tinggi. Mengingat proteinuria berkorelasi dengan nilai absolut tekanan darah diastolik, maka kenaikan (perbedaan) tekanan darah tidak dipakai sebagai kriteria diagnosis hipertensi, hanya sebagai tanda waspada.

2.7.2 Proteinuria

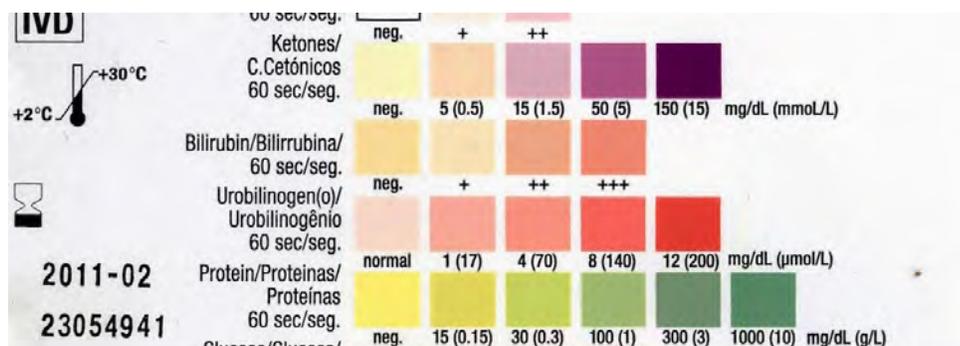
Organ ginjal juga mengalami perubahan pada PE seperti menurunnya aliran darah ke ginjal akibat hipovolemia sehingga terjadi oliguria, bahkan anuria. Kerusakan sel glomerulus mengakibatkan meningkatnya permeabilitas membran basalis sehingga terjadi kebocoran dan mengakibatkan proteinuria. Proteinuria terjadi jauh pada akhir kehamilan, sehingga sering dijumpai PE tanpa proteinuria, karena janin lebih dulu

lahir. Umumnya 80% PE ditandai dengan edema dan hipertensi serta proteinuria, maka hal ini terjadi karena hipoalbuminemia atau kerusakan sel endotel kapiler.

Akan tetapi perlu diwaspadai kapan proteinuria timbul, jika proteinuria terjadi sebelum hipertensi, umumnya merupakan gejala penyakit ginjal, dan tanpa hipertensi, maka dapat dipertimbangkan sebagai penyulit kehamilan, begitu juga bila tanpa kenaikan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg perlu dicurigai adanya infeksi saluran kencing atau anemia karena jarang ditemukan proteinuria pada tekanan diastolik < 90 mmHg.

Proteinuria adalah terdapatnya protein dalam urin 300mg/jam atau >100 mg/dl. Diagnosis PE tidak lengkap tanpa adanya proteinuria. Proteinuria tidak selalu menunjukkan kelainan ginjal. Berbagai keadaan fisiologis sering menyebabkan proteinuria dan bersifat sementara, misalnya pada keadaan demam tinggi, kedinginan dan latihan fisik berat. Sebaliknya pada beberapa penyakit ginjal tertentu sering tanpa proteinuria. Nilai diagnosis proteinuria tergantung dari derajat proteinuria, menetap (persisten) atau disertai kelainan urin lainnya. Sejumlah kecil protein dijumpai di urin dan pada wanita tidak hamil rata-rata ± 18 mg / 24 jam. Pada kehamilan normal jumlah ini dapat meningkat hingga 300 mg/24 jam. Pemeriksaan proteinuria yang terbaik adalah pengukuran kuantitatif protein total dalam 24jam (Lintang, 2003).

Pengukuran proteinuria, dapat juga dilakukan dengan (a) urin *dipstick* : 100 mg/l atau +1, sekurang-kurangnya diperiksa 2 kali urin acak selang 6 jam dan (b) pengumpulan proteinuria dalam 24 jam, maka dianggap patologis bila besaran proteinuria ≥ 300 mg/24 jam. Hasil pengukuran dengan urin *dipstick* dibaca secara semi kuantitatif (Gambar 2.4)



Gambar 2.4 Penilaian proteinuria dengan urin dipstick

Faktor yang mempengaruhi temuan laboratorium bahwa hasil positif palsu dapat disebabkan oleh hematuria, tingginya substansi molecular, infus polivinilpirolidon (pengganti darah), obat, pencemaran urine oleh senyawa aminonium kuarterner (pembersih kulit, klorheksidin), urine yang sangat basa ($\text{pH} > 8$) karena mengandung fosfat (Salma, 2012).

Hasil negative palsu dapat disebabkan oleh urine yang sangat encer, urine sangat asam ($\text{pH} < 3$). Normal eksresi protein $< 150 \text{ mg}/24 \text{ jam}$ (rentangnya $25\text{-}150\text{mg}/24 \text{ jam}$) atau $10 \text{ mg}/\text{dl}$ urin. Jika urine acak $> 10 \text{ mg}/\text{dl}$ maka disebut proteinuria, dan disebut negative jika $\leq 15 \text{ mg}/\text{dl}$ (Salma, 2012). Proteinuria pada PE berhubungan dengan angka kematian janin, mekanismenya adalah: (Bawazier, 2009)

1. Perubahan permeabilitas glomerulus yang mengikuti peningkatan filtrasi dari protein plasma normal terutama albumin.
2. Kegagalan tubulus mengabsorpsi sejumlah kecil protein yang normal difiltrasi.
3. Filtrasi glomerulus dari sirkulasi abnormal, *Low Molecular Weight Protein* (LMWP) dalam jumlah melebihi kapasitas reabsorpsi tubulus.
4. Sekresi yang meningkat makuloprotein uroepitel dan sekresi IgA (Imunoglobulin A) dalam respon untuk inflamasi.

Derajat proteinuria dan komposisi protein pada urin tergantung mekanisme jejas pada ginjal yang berakibat hilangnya protein. Sejumlah besar protein secara normal melewati kapiler glomerulus tetapi tidak memasuki urin. Muatan selektivitas dinding glomerulus mencegah transportasi albumin, globulin dan protein dengan berat molekul besar lainnya untuk menembus dinding glomerulus. Jika sawar ini rusak, terdapat kebocoran protein plasma dalam urin (protein glomerulus). Protein yang lebih kecil ($< 20\text{kDa}$) secara bebas disaring tetapi diabsorpsi kembali oleh tubulus proksimal.

Studi lain mendapatkan tingginya persentase Berat Badan Bayi Rendah (BBLR), nilai Apgar yang jelek dan kematian janin pada PE sehubungan dengan meningkatnya nilai proteinuria dan angka kematian janin pada penderita PE dengan proteinuria $< 1 \text{ mg}/24 \text{ jam}$ sebanyak 2,14%, tetapi bila proteinuria $> 1 \text{ mg} / 24 \text{ jam}$ meningkat menjadi 4,6% (Lintang, 2003). Oleh karena itu untuk menyatakan penapisan dini pada penderita PE dapat dilakukan dengan pemeriksaan mikroalbuminuria.

Brown MA (2003) pada penelitiannya menemukan bahwa pada kehamilan trimester tiga, ekskresi albuminuria / 24 jam akan meningkat, dan pada penderita PE, ekskresi albuminuria didapati lebih tinggi dari hamil normal. Selain itu ekskresi albuminuria/24 jam pada wanita tidak hamil ± 8 (5 - 10mg/hari), sedangkan wanita hipertensi esensial ± 6 (4 - 16 mg/hari), PE ringan ± 7 (4 - 10 mg/hari), PE berat ekskresi albumin meningkat ± 13 (7 - 31 mg/hari). Albumin klirens meningkat secara bermakna penderita PE berat dibanding hamil normal.

2.7.3. Asam urat

Asam urat serum (uric acid serum) umumnya meningkat ≥ 5 mg/cc juga kreatinin (≥ 1 mg/cc), namun pada lain hal, akibat hipovolemia juga menimbulkan penurunan aliran darah ginjal dan mengakibatkan menurunnya filtrasi glomerulus, sehingga sekresi asam urat dan kreatinin plasma juga ikut menurun (biasanya terjadi pada PE berat dengan penyulit pada ginjal).

Kerusakan sel glomerulus akibat hipovolemia menyebabkan iskemia jaringan sehingga terjadi peningkatan asam urat. Asam urat diduga ikut berperan pada terjadinya disfungsi endotel. Studi lain yang dilakukan pada binatang menunjukkan hiperurisemia dapat menghambat sistem NO pada ginjal. Asam urat juga dapat menghambat produksi NO pada kultur sel endotel (Irawiraman *et al.*, 2010). Adanya disfungsi endotel ditandai dengan gangguan vasodilatasi yang timbul akibat peningkatan aktifitas radikal bebas (bahan oksidan) yang mengganggu sintesis dan meningkatkan degradasi NO.

Percobaan pada tikus, terbukti asam urat berperan pada disfungsi endotel. Asam urat masuk ke dalam sel otot polos pembuluh darah, melalui transporter anion organik. Di dalam sel, asam urat akan merangsang *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) atau Erk $\frac{1}{2}$ (*Extracellular signal-regulated kinases*), yang selanjutnya akan menginduksi siklooksigenase-2 (COX-2), meningkatkan tromboksan-2, dan menyebabkan peningkatan *Platelet-Derived Growth Faktor A* (PDGF-2) dan proliferasi sel (Irawiraman *et al.*, 2010).

2.7.4. Hematokrit

Osmolaritas serum dan tekanan onkotik normalnya akan menurun seiring umur kehamilan mencapai ± 8 minggu, namun pada PE tekanan onkotik makin menurun karena kebocoran protein juga peningkatan permeabilitas vaskular. Demikian juga

dengan viskositas darah yang meningkat akibat penurunan volume plasma, maka molekul makro seperti fibrinogen dan hematokrit pada PE meningkat dan mengakibatkan peningkatan resistensi perifer serta menurunnya aliran darah ke organ.

Pada hamil normal, hematokrit menurun karena hipervolemia kemudian meningkat lagi pada trimester II akibat peningkatan produksi urin, namun pada PE ternyata hematokrit meningkat karena hipovolemia, hal ini menggambarkan beratnya PE.

2.8. Pengaruh PE Terhadap Janin

Pengaruh pada janin dengan ibu penderita PE bervariasi, dari yang paling ringan sampai dengan kematian janin. Gangguan pertumbuhan janin sering ditemukan dan bila berat dapat menyebabkan hipoksia intrapartum. Pengaruh pada janin ini berhubungan dengan aliran darah uteroplasenta dan kemampuan arteri spiralis untuk dilatasi sebagaimana seharusnya pada kehamilan.

Pertumbuhan janin terhambat lebih nyata pada hipertensi berat yang disebabkan hambatan aliran darah ke ruang intervili. Resiko kematian akan meningkat menjadi delapan kali. Janin tersebut mempunyai paru yang lebih matang, akibat stres intra uteri yang kronik. Salah satu faktor yang menyebabkan semakin buruknya kondisi janin adalah :

- a. Penderita PE dengan hipertensi kronis menyebabkan angka kesakitan dan kematian janin meningkat lima kali.
- b. Asfiksia dan kerusakan otak. Asfiksia merupakan keadaan dimana oksigen kurang, kadar karbon dioksida tinggi dan pH rendah. Berkurangnya jumlah oksigen plasenta akan menyebabkan kerusakan otak. Paparan minimal terhadap hipoksia selama 12 – 14 menit menimbulkan cedera otak, sedangkan hipoksia 25 – 30 menit akan menimbulkan edema dan nekrosis jaringan.

Dampak yang lain juga memberi pengaruh buruk untuk kesehatan janin pada preeklampsia adalah disebabkan oleh menurunnya perfusi utero plasenta, hipovolemia, vasospasme dan kerusakan sel endotel pembuluh darah plasenta (Brown, 2003). Adapun dampak yang dapat dialami oleh janin seperti IUG dan oligohidramnion, prematuritas juga solusio plasenta, berat plasenta lebih rendah dari

yang normal (< 5000 g) (Abdulsid *et al.*, 2013) hal ini meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas janin.

2.9. Pencegahan Preeklampsia

Berdasarkan teori-teori yang telah dijelaskan di atas dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa PE merupakan sindroma dari beberapa kelainan yang timbul. Namun yang menarik adalah ternyata peranan stres oksidatif dan ketidakseimbangan oksidan menimbulkan perubahan-perubahan pada tingkat molekuler, maka berkembang saat ini suatu teori bahwa sebenarnya PE dapat dicegah meskipun belum untuk seluruhnya (Matsubara *et al.*, 2015).

Pencegahan yang dilakukan pada ibu hamil yang mempunyai risiko PE, salah satunya adalah secara nonmedikal yaitu dengan tidak memberikan obat. Cara yang paling sederhana adalah melakukan tirah baring walaupun belum terbukti namun masih diperlukan bagi mereka yang mempunyai risiko tinggi PE, diet dengan penambahan suplemen yang mengandung (a) minyak ikan yang kaya dengan asam lemak tidak jenuh, misalnya omega-3 PUFA, (b) antioksidan : vitamin C, vitamin E, β -karoten, asam lipoik dan (c) elemen logam berat : zinc, magnesium, dan kalsium (Angsar, 2012). Pencegahan pada PE yang dimaksud dalam penelitian ini adalah salah satunya dengan pemberian suplemen antioksidan yaitu EVOO, namun sebelum lebih lanjut maka akan diuraikan secara teori hal-hal yang berkaitan dengan antioksidan ini.

2.9.1. Antioksidan

Tubuh memiliki sistem perlindungan untuk mencegah pembentukan oksidan dan peroksida lipid. Sistem perlindungan ini disebut antioksidan. Antioksidan dapat dibedakan atas antioksidan *endogen* yang terdiri atas enzim-enzim dan berbagai senyawa yang disintesis tubuh dan antioksidan *eksogen* yang diperoleh dari bahan makanan (Winarsi, 2011).

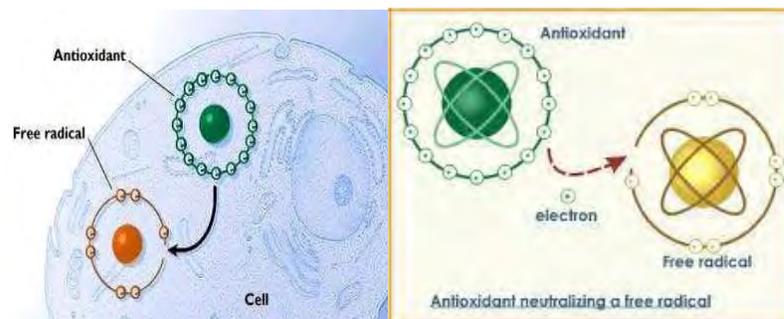
Menurut Winarsi (2011) senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat. Menurut

Kumalaningsih (2007), antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas.

Menurut Hillbom dalam Sulistyowati (2006), antioksidan adalah senyawa dalam kadar rendah mampu menghambat oksidatif molekul target sehingga dapat melawan atau menetralkan radikal bebas. Dikenal ada tiga kelompok antioksidan, yaitu antioksidan enzimatis, antioksidan pemutus rantai dan antioksidan logam transisi terikat protein. Antioksidan enzimatis adalah *superoksida dismutase* (SOD), enzim *katalase* (CAT), *gluthathion peroksidase* (GPx), juga *gluthathion reduktase seruloplasmin*. SOD merupakan katalisator dekomposisi O_2 -menjadi H_2O_2 dan O_2 . Enzim CAT adalah suatu protein heme (besi) yang merupakan katalisator dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . GPx adalah suatu protein selenium yang merupakan katalisator dekomposisi H_2O_2 dan hidroperoksida organik dengan bantuan glutathion (GSH), dan telah diketahui enzim ini dapat mereduksi lipid hidroperoksida pada proses peroksidasi lipid. Antioksidan enzimatis merupakan marker sistem pertahanan tubuh terhadap stres oksidatif, dengan kata lain antioksidan enzimatis akan dikeluarkan bila terjadi oksidasi (Lopez *et al.*, 2013). Mekanisme kerja antioksidan enzimatis adalah mengkatalis pemusnahan radikal bebas dalam intraseluler maupun ekstraseluler, yang sebagian besar terdapat di mitokondria dan sitoplasma sel. Kemampuan kerja antioksidan enzimatis ini adalah dengan melepaskan satu molekul saja dapat menetralkan beberapa ratus radikal bebas sebelum akhirnya struktur protein enzim tersebut kehilangan fungsinya. Antioksidan pemutus rantai adalah molekul kecil yang dapat menerima dan memberi elektron dari atau ke radikal bebas, sehingga membentuk senyawa baru yang stabil, contoh antioksidannya adalah vitamin E dan vitamin C. Sedangkan antioksidan logam transisi terikat protein bekerja mengikat ion logam seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} , contoh antioksidan seperti ini adalah flavonoid dapat mencegah radikal bebas. Antioksidan jenis ini memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas (Winarsi, 2011).

Menurut Winarno (2002) antioksidan dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer adalah suatu zat

yang dapat menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal yang melepaskan hidrogen. Zat-zat yang termasuk golongan antioksidan primer dapat berasal dari alami maupun buatan. Antioksidan alami antara lain vitamin E, vitamin C, lesitin dan gosipol. Antioksidan sekunder adalah suatu zat yang dapat mencegah kerja prooksidan sehingga digolongkan sebagai sinergik. Beberapa asam organik tertentu, biasanya asam dikarboksilat atau trikarboksilat, dapat mengikat logam-logam (*sequestram*). Sebagai contoh, satu molekul asam sitrat akan mengikat prooksidan Fe seperti sering dilakukan pada minyak kacang kedelai. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidatif atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidatif dapat disebabkan oleh empat macam mekanisme reaksi, yaitu: 1). Pelepasan hidrogen dari antioksidan, 2) Pelepasan elektron dari antioksidan, 3). Adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, 4). Pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Gambar 2.5) (Winarti, 2010).



Gambar 2.5 Cara kerja antioksidan

Menurut Winarti (2010) prinsip kerja dari antioksidan dalam menghambat otoolsidatif lemak menggunakan oksigen bebas di udara akan mengoksidatif ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan beraksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif. Apabila dalam suatu asam lemak yang terdapat dalam minyak tidak mengandung antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan ikatan rangkap lemak. Apabila ditambah suatu antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan antioksidan tersebut. Sehingga pembentukan radikal bebas dapat dihentikan dengan penambahan suatu antioksidan.

2.9.2 Jenis Antioksidan

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer berfungsi sebagai pelindung terhadap jenis radikal bebas yang baru dengan membentuk molekul yang kurang berbahaya dan terdapat pada intraseluler. Antioksidan primer yang merupakan enzimatis tubuh terdiri atas SOD, GPx, Katalase dan koenzim Q (Ubiquinon). Antioksidan sekunder berfungsi untuk mengikat radikal bebas, jika jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogenik). Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E (alfa (α)-tokoferol), vitamin C (asam askorbat), beta karoten, bilirubin dan albumin. Vitamin E merupakan baris pertahanan terhadap membran seluler dan subseluler (Murray *et al.*, 2000; Soeksmanto *et al.*, 2007).

Berdasarkan dua mekanisme pencegahan dampak negatif oksidan, maka antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan (Murray *et al.*, 2000), yaitu:

1. Antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*).

Antioksidan ini bertujuan untuk mencegah terjadinya radikal hidroksil, yaitu radikal yang paling berbahaya. Diperlukan tiga komponen untuk terbentuknya radikal hidroksil, yaitu logam transisi Fe (unsur besi) atau Cu (unsur tembaga), H_2O_2 (Hidrogen peroksida) dan ion superoksid. Agar reaksi Fenton tidak terjadi, maka harus dicegah keberadaan ion Fe^{2+} atau Cu^{2+} bebas. Oleh karena itu peran dari beberapa protein penting, seperti transferin atau feritin (untuk Fe) dan seruloplasmin atau albumin (untuk Cu). Penimbunan ion superoksid (O_2^-) dapat dicegah oleh enzim SOD dengan mengkatalisis reaksi dismutase ion superoksid. Penimbunan H_2O_2 dapat dicegah melalui aktivitas dua enzim, yaitu katalase (mengkatalisis reaksi dismutasi H_2O_2) dan peroksidase.

2. Antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking antioxidants*)

Dalam kelompok ini terdapat vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), beta karoten, glutathion dan sistein. Vitamin E dan beta karoten bersifat lipofilik, sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidatif lipid. Sedangkan vitamin C, glutathion dan sistein bersifat hidrofilik dan berperan dalam sitosol.

Berdasarkan teori yang berkaitan dengan antioksidan, maka salah satu antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis antioksidan pemutus rantai yaitu

EVOO karena kaya akan kandungan tokoferol. Mekanisme kerjanya merupakan suatu antioksidan sekunder atau preventif yang dapat mengurangi laju awal reaksi rantai dengan cara menangkap senyawa radikal serta mencegah terjadinya reaksi berantai (ROS) (Chrichton *et al.*, 2013). Maka selanjutnya akan dijelaskan sumber dari EVOO yaitu tumbuhan zaitun.

2.9.3 Tumbuhan Zaitun

Tumbuhan zaitun (*Olea europaea*) sebenarnya berasal dari pohon kecil (Gambar 2.6), dapat hidup lama bertahun-tahun dan warna daunnya hijau, buah mudanya dapat dimakan mentah ataupun sesudah diawetkan sebagai penyegar. Buahnya yang tua diperas dan minyaknya diekstrak menjadi minyak zaitun sehingga dapat dipergunakan untuk berbagai macam keperluan. Zaitun adalah anggota suku *Oleaceae* (Green, 2002; Besnard, 2009).



Gambar 2.6 Struktur daun dan buah zaitun

Tanaman zaitun atau *Olea europea* merupakan family dari *Oleaceae* memiliki ciri-ciri di antaranya yaitu tumbuh sebagai pohon atau perdu hijau abadi mempunyai bunga berbentuk lonceng, pendek dan gemuk, tingginya jarang melebihi 8–15 m (26–49 kaki), kecuali varietas *Pisciottana* yang lebih besar dan tinggi, daun tunggal dengan kedudukan berhadapan tanpa daun penumpu, berwarna hijau keperakan, berbentuk lonjong dengan panjang 4–10 cm (1,6–3,9 inci) dan lebar 1–3 cm (0,39–1,18 in), batang keriput dan terpelintir, bunga banci atau berkelamin tunggal dan buah menumpang; bunga kecil-kecil berwarna putih berbulu, dengan *calyx* dan *corolla* berbelah sepuluh, dua *stamen* dan *stigma bifid*, buahnya kecil berupa buah batu (*drupe*), panjangnya 1–2,5 cm (0,39–0,98 inci) dengan biji memiliki

endosperma. Buahnya berukuran lebih kurus dan kecil pada tanaman liar dibandingkan pada pembudidayaan (Green, 2002)

Zaitun mulai berbuah saat berumur lima tahun dan usianya dapat mencapai ribuan tahun, sehingga yang tadinya perdu telah menjadi pohon besar. Pohon zaitun yang berumur ribuan tahun di antaranya pernah ditemukan di Palestina yang bertahan hidup hingga 2000 tahun. Zaitun dipanen pada waktu masih hijau sampai sudah berwarna ungu. Buah zaitun dalam kaleng dapat berwarna hitam karena mengandung bahan kimia (biasanya ferro sulfat), hal ini menyebabkannya menjadi berwarna hitam secara buatan. Biji *Olea europaea*, di Amerika disebut *pit* atau *rock*, sedangkan di Inggris disebut *stone*, semuanya bermakna "batu"(Green, 2002; Besnard, 2009).

Tumbuhan zaitun ini masih berkerabat dengan melati (*Jasminum sambac*) (Besnard, 2009). Saat ini tumbuhan zaitun sudah dapat dibudidayakan di Indonesia dengan teknik *micro cutting* yaitu hanya memerlukan 4-6 ruas daun (sekitar 10 cm) cabang atau ranting untuk menjadi bakal pohon baru (Hamidi, 2014).

2.9.4. Minyak Zaitun (*Olive oil*)

Buah zaitun yang telah matang berwarna ungu kehitaman dan dapat diekstrak untuk diambil minyaknya yang dikenal sebagai minyak zaitun (Susilo, 2010 cit Nevy, 2009). Zaitun mengandung alkaloid, saponin, dan tannin, tapi tidak mengandung sianogenik glikosid. Dalam beberapa riset juga ditemukan adanya flavonoid apigenin, luteolin, chryseriol dan derivatnya (Fehri et al., 1996). Menurut Winarno (2003) bahwa Omega-9 (Asam Oleic) banyak ditemukan dalam minyak zaitun (*olive oil*). Omega-9 memiliki daya perlindungan tubuh yang mampu menurunkan LDL, meningkatkan HDL yang lebih besar dibandingkan Omega-3 dan Omega-6.

2.9.5. Jenis-jenis Minyak Zaitun (*Olive oil*)

Berdasarkan jenisnya, minyak zaitun dibagi menjadi:

1. Extra-Virgin Olive Oil : dihasilkan dari perasan pertama dengan cara *cold pressing* yang memiliki tingkat keasaman kurang dari 1 persen berdasarkan standard "European Union" (EU Directives Union 2568/91 dan 656/95) (Uceda dan Hermoso, 1997). Dianjurkan untuk kesehatan dan dapat diminum secara langsung.
2. Virgin Olive Oil : hampir menyerupai extra virgin olive oil, Bedanya, virgin olive oil diambil dari buah yang lebih matang dan punya tingkat keasaman lebih tinggi.

3. Refined Olive Oil : merupakan minyak zaitun yang berasal dari hasil penyulingan. Jenis ini tingkat keasamannya lebih dari 3,3 persen. Aromanya kurang begitu baik dan rasanya kurang menggugah lidah.
4. Pure Olive Oil : merupakan minyak zaitun paling banyak dijual di pasaran. Warna, aroma, dan rasanya lebih ringan daripada *virgin olive oil*.
5. Extra Light Olive Oil : jenis ini merupakan campuran minyak zaitun murni dan hasil sulingan, sehingga kualitasnya kurang begitu baik. Namun, jenis ini cukup populer karena harganya lebih murah daripada jenis lainnya (Kinanthi, 2009).

Berdasarkan keterangan di atas maka minyak zaitun yang akan dipakai pada penelitian ini adalah jenis *extra virgin olive oil* karena bisa langsung dipakai, berdasarkan dari Standar Nasional Indonesia (SNI) no. 7381:2008. Tolak ukur yang dipakai untuk mengetahui kualitas minyak zaitun tersebut berdasarkan SNI 2008 adalah kadar asam lemak bebas/free fatty acid (FFA) maksimal 0,2%, bilangan peroksida maksimal 2.0 mg ek/kg, bilangan iodium 4,1-11 g iod/100g, bilangan penyabunan 250-260 mg/kg (lampiran 2).

Pada minyak zaitun jenis *extra virgin olive oil* kandungan asam lemak bebasnya harus lebih rendah atau maksimal 0,2%, karena jika terjadi peningkatan asam lemak bebas, menandai penurunan mutu atau kerusakan pada minyak tersebut, hal ini dapat juga disebabkan oleh lamanya proses penyimpanan. (Ketaren, 1986). Jika jumlah peroksida lebih dari 100 mg ek peroksida/kg minyak akan bersifat sangat beracun dan mempunyai bau yang tidak enak. Kenaikan bilangan peroksida merupakan indikator bahwa minyak akan berbau tengik atau telah mengalami oksidasi dan dapat dilihat secara kasat mata minyak tersebut cenderung berwarna coklat tua sampai kehitaman, bila dibandingkan dengan minyak yang kadar peroksidanya sesuai standar masih berwarna kuning sampai coklat muda. Warna gelap pada minyak tersebut disebabkan oleh proses oksidasi terhadap tokoferol (vitamin E). Angka peroksida yang tinggi dapat menyebabkan destruksi beberapa macam vitamin dalam bahan pangan berlemak (vitamin ADEK dan sejumlah kecil vitamin B) (Fachriah, 2013). Bilangan iodium menunjukkan besarnya tingkat ketidakjenuhan minyak atau lemak. Bilangan iodium yang tinggi berarti menunjukkan ketidakjenuhan minyak atau lemak yang tinggi pula (Ketaren, 1986). Maka semakin tinggi bilangan

penyabunannya berarti asam lemaknya semakin tinggi, sehingga minyak tersebut mudah tengik (Arifin, 2010).

2.9.6. Manfaat Minyak Zaitun (*Olive oil*)

Olive oil yang dikenal oleh masyarakat, khususnya masyarakat mediterania merupakan suatu kebutuhan yang harus terkandung dalam berbagai jenis makanan. Seiring dengan pengetahuan dan perkembangan zaman, masyarakat telah mengetahui bahwa minyak zaitun banyak mengandung khasiat yang bermanfaat bagi kesehatan misalnya untuk mencegah risiko penyakit jantung koroner, kanker, dan beberapa penyakit imun serta respon inflamasi (Visioli dan Galli, 2002; Stark dan Mader, 2002). Menurut Habbah (2008), *Olive oil* memiliki beberapa kegunaan antara lain:

1. Melindungi tubuh dari serangan penyakit jantung koroner, kenaikan kolesterol darah, kenaikan tekanan darah, serta sakit diabetes dan obesitas, di samping itu minyak zaitun juga berkhasiat mencegah terjadinya beberapa jenis kanker.
2. Minyak zaitun mengurangi kolesterol berbahaya. Berbagai riset membuktikan adanya fakta yang tidak menyisakan keraguan lagi, bahwa minyak zaitun menurunkan total kadar kolesterol dan kolesterol berbahaya, tanpa mengurangi kandungan kolesterol yang bermanfaat.
3. Minyak zaitun mengurangi resiko terjadinya penyumbatan (Trombosis) dan penebalan (Arteriosklerosis) pembuluh darah. Dalam sebuah kajian yang dipublikasikan pada bulan Desember tahun 1999 di Majalah *Am J Clin Nutr* para peneliti menyatakan bahwa nutrisi yang kaya kandungan minyak zaitun bisa mengurangi pengaruh negatif lemak dalam makanan terhadap terjadinya pembekuan darah, dan selanjutnya mengurangi terjadinya penebalan pembuluh nadi jantung.

Menurut Kinanthi (2009), manfaat kandungan minyak zaitun adalah sebagai berikut:

- a. Sumber *squalene*: Minyak zaitun mengandung senyawa seperti fenol, tokoferol, *sterol*, *pigmen*, dan *squalene*, yang memegang peran penting dalam kesehatan, juga mengandung *triasilgliserol* yang sebagian besar berupa asam lemak tak jenuh tunggal jenis asam *oleat* (omega-9). Kandungan asam *oleat* 55-83% dari total asam lemak. Karena asam *oleat* merupakan asam lemak tak jenuh tunggal, risiko teroksidatif lebih rendah daripada asam *linoleat* (omega-6) dan *linolenat* (omega-3).

Keduanya termasuk kelompok asam lemak tak jenuh ganda. Asam oleat mampu mereduksi serum LDL penyebab *aterosklerosis*, yang menjadi cikal bakal stroke. Konsentrasi *squalene* minyak zaitun tertinggi dibandingkan dengan jenis minyak lain. Jumlahnya bervariasi, mulai dari 2.500 - 9.250 mikrogram per gram. Minyak lain hanya mengandung 16 - 370 mikrogram per gram. *Squalene* adalah zat organik berupa cairan eter tetapi bukan minyak karena tidak mengandung asam lemak atau gugusan COOH (karboksil), berwarna semu kuning atau putih bening, berbau khas. Secara alamiah *squalene* terdapat di dalam tubuh dan tersebar di semua organ dan jaringan, bersifat serbaguna. Contohnya, *squalene* di kulit berfungsi sebagai komponen utama zat pelicin. Beberapa rumah sakit milik universitas di Tokyo dan Fukuoka, serta rumah sakit nasional di Jepang melaporkan bahwa *squalene* bermanfaat untuk mengobati penyakit kanker. Sudah lama *squalene* dikenal sebagai *interferon* (IFN) *inducer*. *Interferon* berfungsi meningkatkan jumlah maupun aktivitas sel NK atau *lymphocytes*.

b. Kaya Antioksidan : Salah satu komponen penting minyak zaitun adalah tokoferol (vitamin E), terdiri atas tokoferol *alfa*, *beta*, *gamma*, dan *delta*. Jenis *alfa* paling tinggi konsentrasinya, hampir mencapai 90 persen dari total tokoferol. Fungsi yang nyata dari tokoferol adalah antioksidan dan anti radikal bebas, terutama untuk asam lemak tak jenuh dan fosfolipid dalam membran sel dan di tempat ada terdapat akumulasi lemak. Dalam jaringan, vitamin E menekan terjadinya oksidasi asam lemak tak jenuh sehingga mempertahankan fungsi membran. Tokoferol bertindak sebagai antioksidan dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas sebagai akibat dari kemampuannya untuk memindahkan hydrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi dan seperti telah diketahui bahwa sifat tokoferol ini dapat larut dalam alkohol, lemak serta pelarut lemak tapi tidak larut dalam air (Murray *et al.*, 2000). Oleh karena itu, minyak ini sangat ideal sebagai antioksidan. Warna minyak zaitun murni sebagian besar disumbang oleh *klorofil*, *feofitin*, dan *karotenoid*. *Klorofil* dan *feofitin* mampu melindungi minyak terhadap oksidatif dalam kondisi gelap, sedangkan *karotenoid* melindunginya dari oksidatif dalam kondisi terang. Ketiga pigmen tersebut memudahkan penyerapan minyak di dalam tubuh. Proses pemurnian minyak zaitun menghasilkan sejumlah komponen lain yang bermanfaat, di antaranya hidroksitirosol

dan Tirosol. Hidroksitirosol terbukti efektif meningkatkan aktivitas antioksidan dalam plasma serta melindungi terhadap oksidatif LDL. Tirosol beserta antioksidan fenolik lainnya mampu mengikat LDL, sehingga dapat menunda proses *aterosklerosis*. Hasil samping tersebut mempunyai aktivitas yang lebih baik dibanding minyak zaitun itu sendiri, khususnya dalam mencegah oksidatif LDL. Manfaat minyak zaitun untuk menjaga kesehatan jantung dan mencegah stroke telah terbukti secara ilmiah. Sebuah studi menyebutkan, pasien berusia 64 - 71 tahun menunjukkan penurunan total kolesterol setelah diberi dua sendok makan minyak zaitun setiap hari. Riset di Barcelona menunjukkan EVOO merupakan jenis minyak zaitun paling baik untuk mencegah gula darah dan oksidatif LDL, serta meningkatkan HDL (Kinanthi, 2009).

c. Mencegah Obesitas & Osteoporosis : Minyak zaitun dapat memecah sel adiposit penyebab obesitas. EVOO direkomendasikan untuk menggantikan diet minyak lemak jenuh yang sering kita konsumsi. Minyak zaitun juga bermanfaat mengatasi *osteoporosis*. Berdasarkan publikasi dalam *The British Journal of Nutrition*, minyak zaitun membantu mencegah *osteoporosis*, meskipun tidak memulihkan berat tulang yang hilang seluruhnya. Uji yang dilakukan pada tikus menunjukkan, pemberian minyak zaitun 50 g per kg berat tikus secara teratur selama 3 bulan, mampu memulihkan bobot tulang hingga 70-75 persen (Kinanthi, 2009).

d. Efektif melawan kanker: Minyak zaitun baik digunakan saat memasak daging. Untuk membuat daging bakar, gunakan kombinasi *extra virgin olive oil* dan minyak zaitun biasa. Untuk daging goreng dalam minyak banyak, gunakan minyak zaitun biasa. Saat menggoreng atau memanggang sapi/ayam, terbentuk senyawa HCA (heterocyclic amines), yaitu zat penyebab mutasi yang dapat merangsang munculnya radikal bebas dan merusak DNA. Riset menunjukkan, HCA mengakibatkan kanker usus besar, payudara, pankreas, hati, dan kandung kemih. HCA diduga bertanggung jawab terhadap meningkatnya insiden kanker payudara dan usus besar pada wanita di AS. Penggunaan minyak zaitun untuk proses pemasakan daging dapat mereduksi HCA. Komponen *fenolik* pada *virgin olive oil* efektif untuk melawan kanker usus, sedangkan ekstrak komponen fenol dari *virgin olive oil* sebanyak 50 mg/ml dapat mencegah pertumbuhan sel kanker kolon (Kinanthi, 2009).

e. Meningkatkan metabolisme : Makan 1/2 cup buah zaitun setiap hari dapat mencegah kegemukan. Khasiat ini berasal dari lemak tak jenuh tunggal yang mempercepat pembakaran lemak dan mencegah gula diubah menjadi lemak. Selain itu, dalam sebuah *British Journal of Nutrition* dikemukakan bahwa asam lemak tak jenuh tunggal menstimulir *cholecystokini*, sejenis hormon penekan nafsu makan yang mengirim sinyal kenyang ke otak (Kinanthi, 2009).

f. Merevitalisasi sistem imun : Zaitun kaya dengan vitamin E yang larut dalam lemak, melindungi sel-sel dari radikal-radikal bebas yang berbahaya. Antioksidan ini menguatkan sistem imun, mengurangi penyakit seperti pilek dan flu sampai 30%, begitu menurut para periset di Tufts University di Boston (Kinanthi, 2009).

g. Meningkatkan sirkulasi : Zaitun adalah sumber istimewa dari polifenol, senyawa antioksidan yang membantu mencegah penggumpalan darah yang berbahaya. Sebuah studi dalam *Journal of American College of Cardiology* mengaitkan senyawa ini dengan peningkatan kadar NO, molekul jantung sehat yang meningkatkan pelebaran pembuluh darah dan aliran darah (Kinanthi, 2009). Menurut Farid (2008), kandungan dalam minyak zaitun antara lain asam *oleat* atau MUFA sekitar 79%, asam *palmitrat* atau asam lemak jenuh (11%), asam linoleat atau PUFA (7%), asam stearat (2%), dan lain-lain sebesar 1%. Tingginya kandungan asam lemak tak jenuh khususnya asam lemak tak jenuh dengan ikatan rangkap tunggal di mana di dalamnya terdapat asam oleat atau MUFA dan juga asam linoleat atau PUFA membuat minyak zaitun banyak digunakan di bidang kesehatan. Menurut Kinsella et al (1990), MUFA dapat menghambat sintesa VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) dan LDL. Tingginya kadar VLDL dan LDL yang disekresikan dapat menimbulkan endapan kolesterol dalam darah (Susilo, 2010 cit Farid 2008). Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa *olive oil* atau minyak zaitun berkhasiat sebagai anti oksidan dalam meningkatkan resistensi LDL pada manusia yang mengalami penyakit jantung pembuluh darah (Tortosa et al., 1999).

2.9.7. Extra Virgin Olive Oil (EVOO) sebagai antioksidan.

EVOO adalah hasil sari buah zaitun yang didapat dengan penggunaan teknologi *cold-press*, mengubah senyawa kimia alam dari buah menjadi minyak. Teknik ini akan menghasilkan komponen buah memiliki pengaruh untuk menekan radikal bebas, karena mengandung struktur zat fenol yang merupakan senyawa

polar. Buah zaitun yang tingkat kematangannya cukup mengandung suatu zat yang disebut *oleuropein* (salah satu kandungan zat aktif pada buah zaitun) maka dengan bantuan enzim dan nonenzim akan dihidrolisis menghasilkan beberapa komponen yang lebih sederhana yaitu hidroksitirosol, *oleuropein*, *aglikon* dan *ligstrosida*.

Khususnya hidroksitirosol ternyata mempunyai kemampuan sebagai proteksi untuk melawan marker yang berhubungan dengan proses *atherogenic* dan kaya akan kandungan antioksidan yang cukup tinggi daripada sumber antioksidan lainnya seperti vitamin E dan C (Lopez *et al.*, 2008). EVOO juga memiliki kandungan yang tinggi *unsaponifiable* dan kaya akan kandungan fenol (tyrosol dan derivatnya, sterol bebas dan prekursor lainnya seperti squalene) dan tokoferol (α -tokoferol) juga kandungan lainnya sebagai pemberi rasa (Uceda dan Hermoso, 1997).

Dalam hal ini hasil penelitian menunjukkan bahwa manusia atau hewan yang diberi polifenol atau fenol dari EVOO menunjukkan aktifitas hidroksitirosol sebagai antioksidan cukup tinggi setelah mengkonsumsinya (Lopez *et al.*, 2008). Pada penelitian selanjutnya bahwa pemberian EVOO dengan dosis 50 ml pada orang tua yang sehat secara signifikan dapat menurunkan total kolesterol, hal ini karena kandungannya yang kaya akan polifenol. Selain itu peneliti ini juga mengungkapkan bahwa dengan mengkonsumsi EVOO sehari-hari ditemukan efek yang positif terhadap penurunan profil lipid, dan penurunan SOD, aktifitas GPx (Lopez *et al.*, 2013) secara signifikan. Penelitian yang serupa juga telah dilakukan pada orang dewasa muda dengan pemberian EVOO 50 ml perhari selama 30 hari ternyata dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah, total kolesterol dan tekanan darah secara signifikan (Lopez *et al.*, 2012).

Studi lain mengungkapkan bahwa EVOO kemungkinan juga berperan secara tidak langsung melawan stres oksidatif dengan cara memodulasi ekspresi gen dan aktivitas enzim, yang mana mampu memperbanyak antioksidan enzimatik sebagai mekanisme pertahanan tubuh. Dalam hal ini EVOO memiliki nilai nutrisi yang cukup tinggi. Penelitian ini membuktikan pada tikus bahwa mengkonsumsi EVOO dengan dosis sedang selama 3 hari berturut-turut mampu mengurangi stres oksidatif di pankreas, oleh karena itu perlu menjadi pertimbangan untuk mengembangkannya bagi kesehatan manusia (Lopez *et al.*, 2008).

Minyak zaitun jenis EVOO mengandung 17,3 % lemak jenuh (*Saturated acid*) yaitu asam palmitat dan asam stearat, 66,2 % lemak tak jenuh adalah (*Monounsaturated acid*) utamanya (asam oleat), dan 15 % *poliunsaturated acid*, sementara itu EVOO nya sendiri mengandung jumlah fenol yang cukup banyak sekitar 579,2 mg/kg dan beberapa α -tokoferol. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa fenol dan tokoferol merupakan antioksidan (Nakbi *et al.*, 2010).

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa kandungan MUFA yang terdapat dalam EVOO dapat melindungi jaringan hepar dari kerusakan karena proses oksidasi yaitu dengan cara mencegah aktivitas peroksida lipid yang berlebihan. Mekanisme kerjanya dengan cara mempertahankan marker enzim-enzim pada serum juga aktivitas enzim-enzim antioksidan hepar pada konsentrasi mendekati normal. Selain itu adalah fraksi/bagian hidrofilik dari minyak zaitun ternyata terbukti efektif untuk mengurangi stres oksidatif dan dalam hal ini ekstra hidrofilik itulah yang sangat potensial memberikan efek antioksidan langsung pada sel-sel hepar (Nakbi *et al.*, 2010).

Selain itu penelitian lain juga mengungkapkan bahwa kandungan MUFA pada EVOO dapat menurunkan rerata kadar kolesterol tikus putih dengan pemberian 0,9 g/hari (Nugraheni, 2012). Lebih lanjut Keita (2013) mengungkapkan bahwa EVOO juga mampu memperbaiki fungsi endotelial pada tikus yang dimanipulasi menjadi diabetes. Selain itu, ada peneliti lain yang melakukannya pada tikus mengungkapkan bahwa EVOO mampu mengubah struktur biokimia pada otak dan perilaku hewan coba tersebut (Pitozzi *et al.*, 2010). Beberapa mekanisme polifenol dari EVOO sangat penting untuk melindungi dan memberikan efek yang menguntungkan sebagai antioksidan yang diinginkan. Mengonsumsi EVOO tiga kali sehari dapat mengurangi stres oksidatif pada pankreas, jadi penggunaan minyak ini sangat menguntungkan untuk diformulasikan, karena dapat memberikan hasil yang signifikan untuk kesehatan tubuh manusia (Lopez *et al.*, 2008).

Pemberian EVOO diharapkan dapat mencegah terbentuknya peroksida lipid. Seperti diketahui peroksida lipid akan merusak struktur sel seperti protein membran dan nukleus, juga secara perlahan peroksida lipid akan menghambat prostasiklin sintetase dan meningkatkan kerja enzim siklooksigenase yang menyebabkan peningkatan produksi tromboksan. Produksi tromboksan yang

meningkat akan mengakibatkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah (Yung *et al.*, 2014).

2.10 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Siklus estrus tikus putih betina dapat dideteksi dari gambaran *vaginal smear*, perkawinannya dideteksi dengan terbentuknya *vaginal atau copulatory plug* yang menutup vagina dari *cervix* sampai *vulva*. Terdapat dua macam sistem kawin yang dipakai yaitu monogami (seekor jantan dan seekor betina) dan poligami (seekor jantan untuk dua atau tiga ekor betina) (Chakraborti dan Roy, 2013).

Pada saat estrus biasanya tikus betina terlihat tidak tenang dan lebih aktif, dengan kata lain berada dalam keadaan mencari perhatian kepada tikus jantan (Chakraborti dan Roy, 2013). Fase estrus merupakan periode ketika betina reseptif terhadap jantan dan akan melakukan perkawinan, tikus jantan akan mendekati tikus betina dan akan terjadi kopulasi. Tikus jantan melakukan semacam panggilan ultrasonik dengan jarak gelombang suara 30 kHz – 110 kHz yang dilakukan sesering mungkin selama masa pendekatan dengan tikus betina, sementara itu tikus betina menghasilkan semacam *pheromon* (zat untuk bau badan) yang dihasilkan oleh kelenjar preputial yang diekskresikan melalui urin. *Pheromon* ini berfungsi untuk menarik perhatian tikus jantan. Tikus dapat mendeteksi *pheromon* ini karena terdapat organ vomeronasal yang terdapat pada bagian dasar hidungnya (Gilbert, 1994).

Fase estrus yang dalam bahasa latin disebut *oestrus* yang berarti “kegilaan” atau “gairah” (Campbell, 2010). Hipotalamus terstimulasi untuk melepaskan *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH). Estrogen menyebabkan pola perilaku kawin pada tikus. Gonadotropin menstimulasi pertumbuhan folikel yang dipengaruhi FSH sehingga terjadi ovulasi (Gilbert, 1994). Jika kandungan FSH lebih rendah dibandingkan kandungan *luteinizing hormone* (LH) dan terjadi *coitus* (senggama), maka dapat dipastikan tikus akan mengalami kehamilan. Pada tahap estrus, vagina tikus betina membengkak dan berwarna merah. Tahap estrus pada tikus terjadi dua tahap yaitu tahap estrus awal dimana folikel sudah matang, sel-sel epitel sudah tidak berinti, dan ukuran uterus pada tahap ini adalah ukuran uterus maksimal, tahap ini terjadi selama 12 jam (pada tikus) atau sampai 9 - 20 jam (pada tikus). Lalu tahap estrus akhir dimana terjadi ovulasi yang hanya berlangsung selama 18 jam secara spontan (Soeminto, 2000; Kusumawati, 2004).

Tikus dapat dikawinkan pada fase estrus secara spontan, kopulasi (kawin) biasanya terjadi pada malam hari. Koagulasi semen membentuk *copulatory plug* yang merupakan sumbat vagina sehingga vagina tertutup selama beberapa jam sampai kemudian lepas terjatuh. Setelah tikus kawin maka fertilisasi dapat terjadi 7 – 10 jam, dan lama kebuntingannya sekitar 21 – 23 hari. Untuk memastikan kebuntingan, tikus betina ditimbang berat badan secara periodik pada umur kebuntingan 3, 6 dan 9 hari. Tikus dapat melahirkan anak dengan jumlah rata-rata dapat mencapai 9 – 20 ekor dan berat badan anak lahir berkisar antara 4 – 6 g, dengan umur penyapihan pada anaknya 18 sampai 23 hari serta berat anaknya ketika disapih berkisar 35 – 50 gram (Yudhie, 2010; Kusumawati, 2004).

Pengujian zat teratogenik perlu memperhatikan waktu pemberiannya yaitu (a) pemberian zat sebelum implantasi atau pra implantasi (hari ke 1 sampai ke 4) bertujuan untuk melihat pengaruh suatu zat terhadap perkembangan embrio praimplantasi. Zat yang bersifat sitostatik atau embriotoksik dapat menyebabkan kematian atau hambatan pada perkembangan embrio. (b) pemberian zat setelah implantasi (organogenesis pada hari ke 6 sampai ke 15) bertujuan untuk melihat pengaruh zat pada perkembangan fetus, terutama pada masa organogenesis. Untuk pemberian zat teratogenik setelah masa implanisasi perlu memperhatikan masa kritis suatu organogenesis. Suatu zat yang bersifat teratogenik akan menyebabkan kelainan pada fetus apabila diberikan pada masa kritis (Rahayu *et al.*, 2005).

Masa kritis adalah suatu waktu sepanjang masa kebuntingan induk yang dapat menyebabkan terjadi kelainan pada fetus yang dikandungnya apabila terdedah oleh zat teratogenik. Masa kritis induk biasanya berada pada masa organogenesis. Pada masa ini terjadi aktifitas metabolisme berupa pembelahan maupun kematian sel-sel dalam rangka pembentukan organ. Pengamatan fetus dilakukan secara *cervic dislocation* sebelum melahirkan yaitu pada hari ke 19 – 20 untuk menghindari kanibalisme induk terhadap anaknya. Pengamatan yang diamati adalah jumlah implantasi terdiri dari jumlah fetus yang hidup (ditandai dengan adanya gerakan fetus apabila dilakukan stimulasi berupa sentuhan), jumlah fetus yang mati dan jumlah fetus yang resorpsi. Pengamatan eksterna secara *morfometri* (menimbang berat fetus, mengukur panjang fetus dan mengamati morfologi fetus). Pengamatan interna

diamati sistem skeletonnya (jumlah, bentuk dan proses penulangan) (Rahayu *et al.*, 2005).

Pengambilan darah untuk keperluan penelitian dilakukan sekitar 1% dari berat badan tikus. Misalnya berat badan tikus 200 g, maka pengambilan darah maksimal hanya 2 ml, dengan jarak 3 minggu sekali. Jika pengambilan darah dilakukan setiap hari maka darah hanya boleh diambil maksimal 0,05%/BB. Pengambilan darah harus menggunakan alat se-aseptik mungkin. Untuk memudahkan pengambilan darah salah satunya adalah dengan cara meningkatkan vasodilatasi yaitu dengan memberi kehangatan pada hewan tersebut, misalnya hewan diletakkan dalam ruangan dengan suhu 40°C selama 10-15 menit, dengan memasang lampu pemanas dalam ruangan tersebut (Yudhie, 2010; Kusumawati, 2004).

2.11 Kajian Hewan Coba Tikus Model Preeklampsia

Beberapa peneliti telah melakukan percobaan pada hewan model PE pada tikus seperti penelitian Arcana dan Sugiritama (2009) yang berkaitan dengan induksi stres oksidatif. Penelitian ini memberikan dampak stres oksidatif pada induksi hewan model PE dengan memberikan (1) stres overpopulasi yaitu menempatkan satu kelompok hewan coba pada kandang pemeliharaan mulai usia kehamilan hari ke tujuh sampai dengan hari ke 20, (2) stres kronis berupa bising 100 dB selama 30 menit yang diselingi istirahat selama 90 menit dengan total pembisingan sebanyak 6 jam sehari mulai usia kehamilan hari ke tujuh sampai hari ke 14 dan (3) stres akut pada kehamilan hari ke 18 berupa penempatan pada tabung selama 30 menit. Hasil penelitian ini membuktikan adanya peningkatan tekanan darah maupun proteinuria kelompok hewan coba perlakuan setelah pemberian stres. Penelitian lain, (Irawiraman *et al.*, 2010) juga melakukan hal yang sama untuk mendapatkan hewan model PE dan mendapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan tekanan darah, proteinuria dan kadar asam urat plasma.

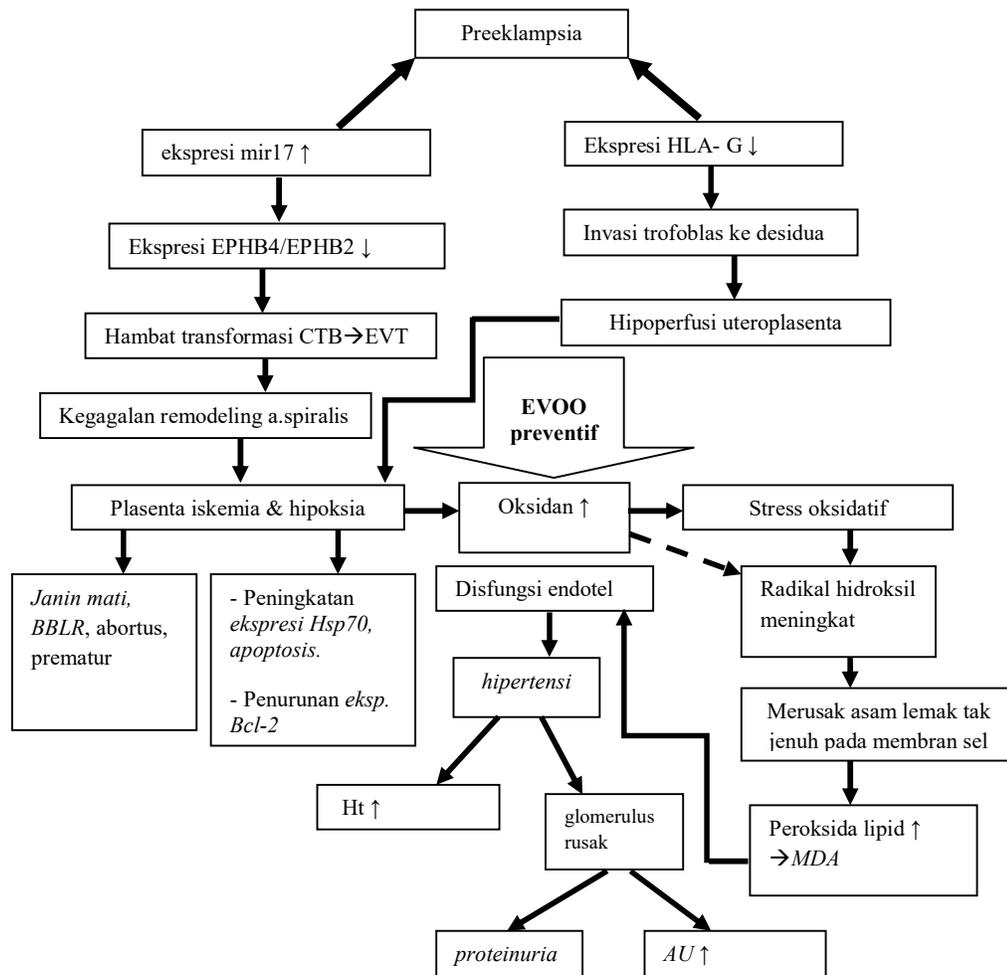
Penelitian lain pada model hipertensi telah dicobakan dengan pemberian diet tinggi garam yaitu NaCl 8% sebanyak 3 ml perhari, diberikan selama empat minggu. Pemberian larutan garam ini dilakukan dengan teknik sonde untuk memastikan agar tidak ada yang terbuang atau tersisa. Berdasarkan penelitian ini didapatkan kenaikan tekanan darah pada hewan coba tikus tersebut. Hal ini disebabkan karena diet tinggi

garam diduga dapat menyebabkan kenaikan tekanan darah melalui beberapa mekanisme, diantaranya adalah meningkatkan aktivitas renin akibat mutasi gen exon 9 pada renin, menurunkan kemampuan vasodilatasi oleh endotelial pembuluh darah, meningkatkan aktivitas saraf simpatis dan volume cairan ekstraselular (Lailani *et al.*, 2013).

Selain itu ternyata pemberian NaCl 6% dosis 3ml/hari selama masa bunting antara 21-23 hari pada hewan coba tikus dilaporkan telah mengakibatkan kerusakan pada membran sel sehingga terjadi peningkatan jumlah peroksida lipid, hal ini dibuktikan dengan nilai MDA yang tinggi (Yudomustopo, 2015). Pemberian garam, khususnya garam DOCA (Deoxycorticosterone acetate) pada hewan coba tikus yang diinjeksi secara subkutan dua kali seminggu dengan dosis 20 mg/kg BB pada 5 kali injeksi awal, kemudian dosis 10 mg/kg BB pada lima kali injeksi berikutnya yang sudah dilarutkan ke dalam minyak jagung 0,5 ml dan diberi 2% cairan NaCl sebagai air minum secara *ad libitum* telah menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas dalam tubuh yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA sehingga terjadilah hipertensi dan kerusakan jaringan. Hasil ini telah menjelaskan bahwa hipertensi hasil induksi garam-DOCA dapat memproduksi ROS sehingga dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan penebalan endotelial dan otot polos (Roseta *et al.*, 2014). Menurut Callera (2006) yang dikutip oleh Roseta (2014) menjelaskan bahwa sumber ROS didapat dari respirasi mitokondria yang terdapat pada pembuluh darah disebabkan karena adanya ET-1 (endothelin-1).

Penelitian yang sama juga telah dilakukan oleh Sjakoe dan Permatasari (2011) bahwa pemberian garam-DOCA pada hewan coba tikus terbukti dapat meningkatkan tekanan darah, dan menurut penelitiannya, hal ini sangat cocok untuk digunakan sebagai model hipertensi pada hewan coba tikus.

2.12 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2.7 Skema kerangka teori penelitian

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium genetika molekuler, laboratorium hewan departemen farmakologi dan terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Bandung serta laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan (izin dan pelaksanaan penelitian terlampir). Penelitian dimulai dari bulan Maret 2016 sampai Januari 2017.

Penelitian ini dibantu oleh 4 tenaga laboratorium terampil yang ditunjuk oleh Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Bandung dan Universitas Sumatera Utara terdiri atas tenaga laboratorium khusus untuk pemeliharaan hewan juga penanganannya, tenaga laboratorium untuk analisa kimia darah, tenaga laboratorium molekuler serta tenaga laboratorium untuk pemeriksaan imunohistokimia.

3.2 Bahan dan alat penelitian.

Bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas beberapa macam yang dikelompokkan berdasarkan kebutuhan penelitian tersebut akan diuraikan satu persatu :

3.2.1 Tahap Persiapan

Bahan dan alat penelitian yang dibutuhkan pada tahap persiapan adalah tikus putih betina dara (*Rattus norvegicus*) strain *Sparague Dawley* sebanyak 25 ekor, tikus jantan delapan ekor (rasio kawin 1:3 atau 4), kandang tikus, makanan standar AIN93-M dan minuman yang cukup, timbangan digital untuk tikus merek ACIS atau yang setara.

3.2.2 Tahap Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan pada penelitian ini terdiri atas (1). Bahan yang dibutuhkan untuk mendapatkan hewan model PE adalah NaCl 6% steril, alat yang digunakan yaitu spuit 3 cc. (2). Bahan yang dibutuhkan pada saat intervensi penelitian adalah EVOO, alat yang digunakan adalah sonde lambung, sphygmomanometer non invasif, selongsong atau pipa paralon (seukuran tubuh tikus), kandang metabolik modifikasi untuk menampung urine tikus sewaktu. Pada tahap pelaksanaan penelitian dilakukan

beberapa pemeriksaan terhadap beberapa parameter sehingga memerlukan bahan dan alat yang dibutuhkan seperti:

1. Pemeriksaan MDA dengan metode TBARs (*thiobarbituric acid reactive substances*), alat yang digunakan yaitu spektrofotometri. Bahan yang dibutuhkan adalah plasma darah sampel, larutan SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 200 μ l (larutan SDS berfungsi sebagai denaturasi protein), EDTA sebagai antikoagulan 50 μ l, BHT (Butylated Hydroxytoluene) 50 μ l (BHT merupakan sintesis antioksidan, berfungsi untuk mencegah penguraian produk MDA agar tetap stabil, dengan cara kerjanya masuk ke dalam lipid peroksida), asam asetat sebanyak 1500 μ l, TBA (Titrasi Bebas Air) 1500 μ l (TBA berfungsi untuk mendeteksi MDA), aquabidest 700ml. Alat yang digunakan adalah spektrofotometri (SmartSpecTMPlus dari BioRad, Rekalibrasi November 2016), mikropipet 100- 1000 μ l, cuvet, *waterbath*, sentrifuge (Prosedur kerja berdasarkan yang telah ditetapkan oleh produk ini)
2. Pemeriksaan ekspresi protein Hsp70, bahan yang diperlukan antara lain serum darah sampel, *Elisa kit Rat antibody Hsp70* dari “*MyBio Source*”, catalog #MBS725078 dengan sensitivitas 1.0 ng/ μ l (Prosedur kerja berdasarkan yang telah ditetapkan oleh produk ini).
3. Pengamatan sel apoptosis menggunakan Teknik DNA-terfragmentasi. Bahan yang digunakan adalah TUNEL kit, larutan PBS pH 7.4, H₂O₂ 3%, DAB (Diamino Benzidine), Peroksidase solution, Mayer Hematoxylin. Alat yang digunakan mikroskop cahaya.
4. Pengamatan ekspresi Bcl-2 bahan yang dibutuhkan *Tris Buffered Saline* (TBS) pH 7.4, *Tissue Primer*TM, peroksida block, primary antibody Bcl-2 yaitu *Monoclonal Mouse Antibody IgG_{2B} Clone #625509* (catalog #MAB8272) dengan *specieses reactivity Human/Mouse/Rat* dari *R&D SYSTEMSbiotechne*, *PolyVue Plus*TM *Enhancer*, reagen *PolyVue Plus*TM HRP (Horseradish-peroxidase), DAB/PlusTM, Mayer Hematoxylin. Alat yang digunakan adalah *PT Link Dako Epitope Retrieval*, *Pap pen*, *cover glass*, mikroskop.
5. Pengukuran tekanan darah menggunakan alat sphygmomanometer invasive untuk tikus (modifikasi).

6. Pengukuran proteinuria menggunakan metode carik celup atau dipstick. Bahan yang dibutuhkan adalah urine sampel sewaktu, dan reagen carik celup tujuh indikator. Alat yang digunakan untuk pemeriksaan proteiunuria adalah wadah carik celup sebagai standar warna, clinitex status, urisys 1100/alat baca urin lainnya, kandang metabolit individu yang telah dimodifikasi untuk menampung urin tikus.
7. Pengukuran asam urat dan hematokrit bahan dibutuhkan adalah darah tikus dalam tabung EDTA. Alat yang digunakan adalah sentrifuge, dan spektrofotometri.
8. Bahan yang digunakan pada pembedahan yaitu ketamin 0,3 ml/im, sampel tikus putih bunting. Alat yang digunakan adalah gunting bedah (terdiri atas gunting yang lurus panjang, lurus pendek dan bengkok), pincet, cawan petri untuk meletakkan organ, papan bedah (tempat fiksasi tikus yang akan dibedah), pins (untuk menfiksasi tikus yang akan dibedah), biker glass (tempat pencucian organ yang sudah dipisahkan), kertas saring untuk mengeringkan organ sebelum ditimbang, blangko untuk mencatat data.
9. Bahan yang digunakan untuk mengukur BB adalah fetus tikus putih, dan alatnya yaitu timbangan digital ACIS. Alat yang digunakan untuk mengukur panjang badan (PB) fetus lahir adalah rol centimeter.

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah *true experiment* dilakukan di laboratorium dengan rancangan *pre and post test with control group design*. Beberapa parameter diukur dengan *pre and post test* adalah tekanan darah, kadar MDA plasma, % haematokrit, kadar asam urat. Parameter lainnya diukur setelah perlakuan (*post test*) seperti: ekspresi Hsp70, Apoptosis indeks, ekspresi Bcl-2, morfometri/implantasi diukur hanya sekali. Oleh karena itu sebagai pembandingnya menggunakan kelompok kontrol.

3.4 Pelaksanaan Penelitian.

3.4.1 Tahap Persiapan

1. Hewan coba pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium hewan Departemen Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung.

2. Sebelum penelitian berlangsung, 25 ekor tikus putih betina diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari dan diberi pakan (AIN93-M) dan air minum secara *ad libitum* (berlimpah). Pakan diberikan sebanyak 10% dari bobot badan, yaitu sekitar 10-15 g/ekor/hari. Pakan diberikan pada pagi hari pada pukul 07.00 dan sore hari pada pukul 16.00, air minum diberikan secara tidak terbatas (*ad libitum*) dan pergantian air minum setiap hari. Kandang terbuat dari bak plastik tertutup dengan anyaman kawat dengan luas 1 cm, dikondisikan dengan suhu ruangan $20^0 - 24,5^0$ C, kelembapan relatif ($50 \pm 10\%$) serta mendapatkan periodisitas sinar (12 jam terang dan 12 jam gelap). Kandang pemeliharaan dilengkapi dengan tempat pemberian makanan dan minuman, dan disediakan satu kandang untuk setiap tikus. Ruang tempat kandang dengan ventilasi yang baik, penyorotan normal. Sekam alas kandang diganti setiap hari, untuk kebersihan kandang dilakukan oleh petugas tenaga khusus pemeliharaan hewan coba.

3. Tikus dikawinkan dengan menempatkan 1 ekor tikus jantan dan 3 ekor tikus betina dalam satu kandang untuk proses kopulasi (kawin). Cara mengawinkan tikus betina adalah pertama dengan memperhatikan fase estrus yang dapat terlihat dari perilaku dan morfologi vagina tikus (telah dijelaskan pada bab terdahulu). Pada tahap estrus vagina tikus betina membengkak dan berwarna merah, perilaku terlihat tidak tenang dan lebih aktif, dengan kata lain berada dalam keadaan mencari perhatian kepada tikus jantan. Mengawinkan tikus betina dan jantan dengan memasukkan ke dalam satu kandang di awal sore (17.00 WIB). Perkawinan dilakukan selama tiga hari di kandang betina. Jika terjadi kopulasi dengan cara mendeteksi terbentuknya *vaginal atau copulatory plug* yang menutup vagina dari *cervix* sampai *vulva* segera pada keesokan pagi harinya, maka hari itu adalah hari pertama kebuntingan, kemudian tikus jantan dipindahkan ke kandang lain. Tikus betina yang telah bunting diidentifikasi dengan cara menandai pada ekornya. Setiap 5 ekor tikus putih betina yang bunting dikelompokkan dalam satu kandang. Hari ke 5 tikus putih bunting

diobservasi dan palpasi bagian bawah perut tikus putih serta menimbang BB untuk memastikan kebuntingan.

3.4.2 Tahap Pelaksanaan Penelitian.

1. Setelah dipastikan kebuntingan tikus putih betina, pada hari ke 5 seluruh hewan coba kelompok kontrol dan perlakuan diukur tekanan darah. Pengukuran tekanan darah dilakukan pada pangkal ekor tikus menggunakan modifikasi sphygmomanoter non invasive untuk tikus.

2. Hari ke 6 -12 seluruh kelompok perlakuan diberikan injeksi NaCl 6% dengan dosis pemberian 3 ml/hari secara subcutan ataupun intramuscular. Kelompok kontrol tidak diberikan. Kelompok perlakuan dibagi atas 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor). Pencuplikan sampel untuk pengelompokan dilakukan secara acak.

3. Hari ke 13 seluruh kelompok kontrol dan perlakuan diukur kembali tekanan darah. Beberapa parameter seperti haematokrit, asam urat, kadar MDA plasma turut serta diukur. Pengambilan darah untuk pengukuran parameter tersebut dilakukan pada ujung ekor tikus, yang sebelumnya tikus telah dipanaskan di bawah lampu selama ± 15 menit agar darah keluar lebih lancar. Selanjutnya mulai hari ke 13 – 19 pada kelompok perlakuan diberikan EVOO peroral dengan dosis pemberian yang telah ditentukan yaitu P2: 0,38 mL/kgBB/hari, P3: 0,76 mL/kgBB/hari, P4: 1,52 mL/kgBB/hari. Kelompok perlakuan P1 sebagai kontrol positif tidak diberikan EVOO tetapi sebagai gantinya diberikan air minum biasa 2 mL. Kelompok kontrol (P0) tidak diberikan intervensi apapun.

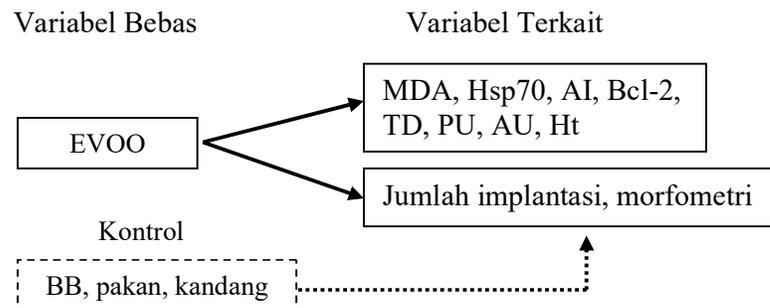
4. Hari ke 18 diberikan stres akut yang bertujuan untuk mengetahui meningkatkan tekanan darah. Stres akut dilakukan pada seluruh kelompok perlakuan kecuali kontrol dengan cara memasukkan tikus ke dalam selongsong tikus, namun pada penelitian ini diganti dengan pipa paralon yang besarnya seukuran tubuh tikus selama 30 menit, dilakukan hanya sekali saja. Setelah pemberian stres akut tekanan darah diukur kembali pada seluruh kelompok kontrol dan perlakuan.

5. Hari ke 20 sebelum dieksekusi, tekanan darah, haematokrit, asam urat dan kadar MDA plasma diukur kembali. Beberapa parameter lainnya turut diukur seperti ekspresi Hsp70, apoptosis indeks, ekspresi protein Bcl-2 dan proteinuria. Pengambilan darah dilakukan langsung dari intracardia, dan sebelum eksekusi

terlebih dahulu tikus dianestesi dengan injeksi ketamin/im dengan dosis 0,3 cc. Cara kerja setiap pemeriksaan pada penelitian ini berdasarkan standard yang telah ditetapkan oleh produk masing-masing.

3.5. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini digambarkan dalam Gambar skema kerangka konsep penelitian (Gambar 3.1) sebagai berikut :



Gambar 3.1. Skema kerangka konsep penelitian

3.5.1 Definisi Operasional :

1. NaCl 6% adalah larutan garam NaCl steril yang dikemas dalam botol, diperoleh dari toko farmasi, diberikan kepada seluruh kelompok perlakuan tikus putih bunting kecuali kontrol secara s.c atau i.m, dosis 3 ml/hari dimulai dari hari ke 6 sampai 12 periode kebuntingan.
2. Ekstra virgin olive oil adalah minyak zaitun kemasan dengan label ekstra virgin, nama dagang "**B**" (nama dirahasiakan) diperoleh dari pasar lokal. Berdasarkan uji kimia makanan (lampiran 2) maka EVOO jenis ini layak untuk digunakan dengan warna kuning kehijauan. Pemilihan ini berdasarkan yang telah pernah dilakukan oleh Salem (2015) bahwa standar EVOO yang digunakannya mendekati EVOO yang ada di Indonesia yaitu dengan bilangan peroksidanya 0,36 dan keasaman < 0,01. Berdasarkan perhitungan maka dosis pemberian EVOO secara oral terdiri atas 3 kriteria (perhitungan dosis terlampir):
 - Kelompok P2 : 0,38 mL/kgBB
 - Kelompok P3 : 0,76 mL/kgBB
 - Kelompok P4 : 1,52 mL/kgBB
3. MDA adalah kadar MDA plasma pada tikus bunting kontrol dan perlakuan yang

diukur dengan metoda TBARs spektrofotometri dengan nilai rata-rata 2.05 mmol/l. Jika nilai MDA di atas nilai rata-rata, maka disebut terjadi peningkatan radikal bebas di dalam tubuh tikus (Suwandi, 2012).

4. Hsp70 adalah ekspresi protein Hsp70 pada tikus bunting kontrol dan perlakuan yang diukur dengan metoda Elisa. Nilai *cut of point* tikus putih mengikuti nilai tikus kelompok kontrol (karena untuk saat ini belum diketahui). Pembacaan nilai Hsp70 menggunakan kurva standard yang telah tersedia pada *software computer*.
5. Apoptosis indeks adalah Pengamatan sel apoptosis pada plasenta di sitoplasma secara imunohistokimia dengan teknik DNA terfragmentasi (TUNEL). Sediaan jaringan yang telah dikerjakan dibaca oleh dua orang tenaga ahli di bidang imunohistokimia. Sel yang diamati dihitung, hasilnya menggunakan istilah *Apoptotic Index* (AI). Penghitungan AI menurut cara Kokawa *et al* (2001) sebagai berikut:

Tingkat	Kriteria	Nilai
Grade I	Apoptotic cell negatif atau < 1% (< 5 nuclei)	-
Grade II	AI < 5% (< 25 nuclei)	+
Grade III	AI 5 – 10% (25 – 50 nuclei)	++
Grade IV	AI > 10% (>50 nuclei)	+++

Penghitungan AI : (jumlah sel apoptosis : jumlah total sel) x 100%

6. Ekspresi Bcl-2 adalah pengamatan gen Bcl-2 dengan menggunakan teknik *immunostaining* Bcl-2 pada jaringan plasenta yang dinilai dengan persentase (%) pewarnaan (*staining*) (Kokawa *et al*, 2001). Hasil penilaian intensitas *staining* yang dievaluasi dengan semikuantitatif dapat dilihat kriterianya sebagai berikut:

Tingkatan	Kriteria	Nilai
Negatif	sel positif kurang dari 10%	-
Weakly positif	sel positif 10-30%	+
Moderately positif	sel positif 31-70%	++
Strongly positif	sel positif 71-100%	+++

**Penghitungan persentase (%) imunoreaktivitas ekspresi Bcl-2 (% Bcl-2):
(jumlah sel positif : jumlah total sel) x 100%.**

7. Tekanan darah (TD) adalah tekanan darah tikus bunting kontrol maupun perlakuan, diukur sebelum dan sesudah diberikan perlakuan sebanyak dua kali dengan selang

waktu 4 jam, alat ukur yang digunakan adalah sphygmomanometer khusus untuk tikus pada pangkal ekor hewan coba. Kriteria TD dalam batas normal : 130/90mmHg.

8. Proteinuria adalah protein yang terdapat dalam urin tikus bunting kelompok kontrol maupun perlakuan, diukur sebelum dan sesudah diberi perlakuan. Pengukuran proteinuria dilakukan dengan urin *dipstick*. Proteinuria dihitung dengan cara semikuantitatif. Jika hasil urin *dipstick* +1 berarti kandungan protein dalam urin $\pm 100\text{mg/dl}$, +2 sama dengan 300mg/dl , dan jika +3 kandungan proteinnya sekitar 1000mg/dl .
9. Asam urat adalah kadar asam urat serum pada tikus putih bunting kelompok kontrol maupun perlakuan, nilai normal $< 5 \text{ mg/dl}$.
10. Hematokrit adalah perbandingan sel darah merah dengan volume darah tikus putih bunting. Hasil batas normalnya adalah 36.0 – 52.0% dari volume darah.
11. Jumlah implantasi adalah pengamatan terhadap jumlah fetus yang hidup (ditandai dengan gerakan fetus bila dilakukan stimulasi berupa sentuhan), jumlah fetus yang mati pada kelompok tikus putih kontrol maupun perlakuan setelah perlakuan.
12. Morfometri adalah pengamatan eksternal dengan melakukan penimbangan berat fetus dan mengukur panjang badan fetus pada kelompok tikus putih kontrol maupun perlakuan setelah perlakuan. Berat rata-rata fetus tikus putih 2-3 g, sedangkan rata-rata panjang badan fetus 0,5-1,5 cm.
13. Berat badan adalah berat badan tikus bunting kelompok kontrol maupun perlakuan yang ditimbang secara periodik untuk memastikan kebuntingan pada hari ke 6, 12, dan 19 bertujuan memastikan kebuntingan dan mengetahui perbedaan penambahan berat badan selama periode kebuntingan.
14. Pakan adalah makanan untuk tikus digunakan untuk tikus bunting kelompok kontrol maupun perlakuan adalah berupa diet makanan maintained tikus (dapat juga digunakan pada tikus bunting) yaitu AIN93-M (diet khusus tikus maintenance cocok untuk reproduksi) yang dibuat sendiri (lampiran 19).
15. Kandang adalah sangkar untuk pemeliharaan tikus putih dengan luas 150 -250 cm², meliputi kebersihan kandang, juga kebersihan tikus putih itu sendiri.

3.6 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus putih betina dara dengan galur *Sprague Dawley*, berumur 8-11 minggu serta berat badan berkisar ± 200 gram (penambahan atau pengurangan kisaran berat badan sekitar 10%), tikus dalam kondisi sehat, di tandai dengan adanya bulu halus (tidak berdiri), gerakan cukup lincah dan tidak menunjukkan cacat fisik.

3.7 Besar Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, jumlah kelompok hewan coba terdiri atas 1 kelompok kontrol dan 4 perlakuan sehingga keseluruhannya ada 5 (lima) kelompok, maka ditentukan besar sampel dengan menggunakan rumus Federer (terlampir) didapatkan besar sampel minimal 5 ekor, sehingga jumlah total sampel adalah 25 ekor. Penentuan setiap kelompok dilakukan dengan *simple random sampling*. Perhitungan besar sampel dapat dilihat pada lampiran 20.

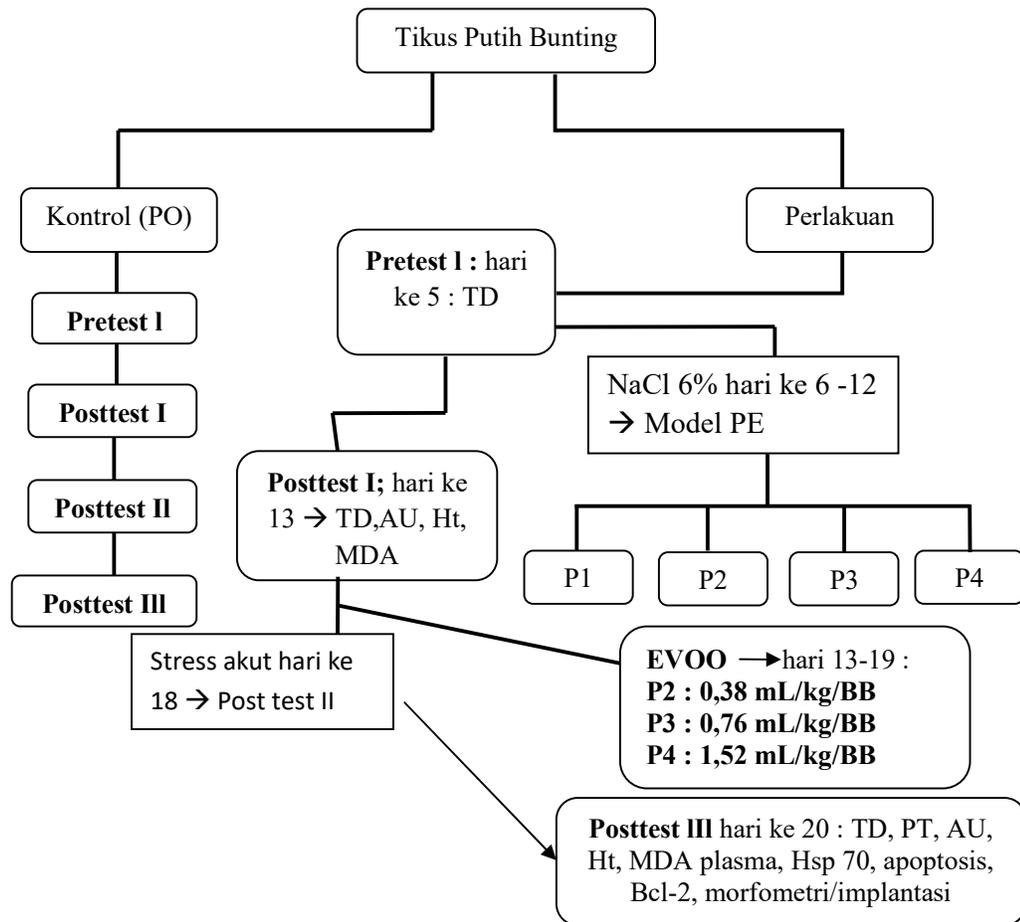
3.8 Etika Penelitian

Etik penelitian diajukan ke Komite Etik Penelitian Hewan Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara Medan. Pelaksanaan penelitian dilakukan berdasarkan terbitnya surat izin pengesahan *ethical clearance* dari komite etik penelitian hewan FMIPA USU (Lampiran 5).

3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis dengan uji statistik *Paired t Test*, dan *Anova*, dilanjutkan dengan uji lanjut (*Pos Hoc*) yaitu uji beda nyata terkecil (*Least Significant Differences*) atau *LSD* serta korelasi *Pearson Product Moment* (PPM), sebelumnya dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk*, dan homogenitas varian dengan *Levene test*. Jika data normal dan homogen yaitu $P \text{ value} > \alpha 0.05$ pada *confidence interval* (CI) 95%, maka dapat dilanjutkan dengan uji seperti di atas, namun jika salah satu atau keduanya tidak memenuhi persyaratan uji normalitas maupun homogenitas maka uji diganti dengan non parametrik test.

3.10 Alur Penelitian



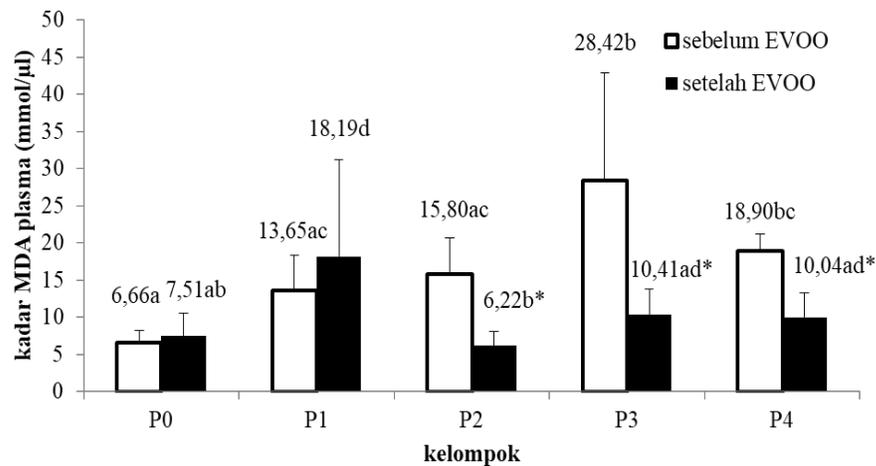
Gambar 3.2. Skema alur penelitian

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh EVOO Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus Putih Bunting

Pengukuran pertama kadar MDA plasma dilakukan setelah pemberian NaCl 6% pada hari ke 13. Pengukuran kedua setelah pemberian EVOO yaitu pada hari ke 20 kebuntingan, hasilnya seperti Gambar 4.1 berikut ini.



Gambar 4.1 Pengaruh pemberian EVOO terhadap kadar MDA plasma tikus putih bunting. Huruf kecil yang sama tidak beda nyata ($P > 0,05$)

Ket: P0. Kontrol
P1. Preeklampsia (PE)
P2. PE + EVOO (0,38mL/kgBB/hari)
P3. PE + EVOO (0,76mL/kgBB/hari)
P4. PE + EVOO (1,52 mL/kgBB/hari)
* : signifikan uji *Wilcoxon*

Berdasarkan Gambar 4.1, rerata kadar MDA plasma meningkat setelah pemberian NaCl 6% secara signifikan pada kelompok perlakuan (Uji *Anova*, $P = 0,002$, lampiran 9). Kelompok P3 dengan rerata kadar MDA plasma tertinggi (28,42 mmol/μl ± 14,44) dan signifikan berbeda dari kelompok perlakuan lainnya (Uji *LSD* lampiran 9). Sedangkan kelompok kontrol (P0) rerata kadar MDA plasmanya terendah (6,66mmol/μl ± 1,62). Jika menggunakan data penelitian Suwandi (2012) nilai normal rerata kadar MDA plasma yaitu 2,05 mmol/μl, maka kelompok kontrol pada penelitian ini lebih tinggi. Hal ini diduga karena hewan coba yang digunakan sedang bunting. Dugaan ini sejalan dengan penelitian Ekambaram dan Geetha (2008) bahwa pada kehamilan normal terjadi peningkatan produksi radikal bebas dan

peroksida lipid terutama pada akhir kehamilan jika dibandingkan dengan yang tidak hamil. Meskipun demikian pada waktu yang bersamaan terjadi juga peningkatan antioksidan selama masa kehamilan yang bertujuan untuk menjaga keseimbangan oksidan selama masa kehamilan.

Mekanisme yang telah diuraikan di atas diduga terjadi pada kelompok kontrol tikus putih bunting di dalam penelitian ini, meskipun tidak diinjeksi dengan NaCl 6% namun rerata kadar MDA plasma meningkat dari yang biasanya karena proses implantasi tersebut maka produksi oksidan lebih banyak. Hal ini dianggap karena pada kehamilan produksi oksidan lebih besar dari biasanya adalah suatu proses normal (Hubel, 1989; Zeeman, 1992). Subakir *et al* (2008) juga menyatakan bahwa tingginya kadar MDA tersebut kemungkinan karena efek polusi atau hal-hal lain yang menyebabkan pembentukan senyawa radikal bebas meningkat.

Jika diperhatikan (Gambar 4.1) rerata kadar MDA plasma setelah pemberian NaCl 6% pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari kontrol. Hal ini sejalan dengan penelitian Yudomustopo (2015) tentang kadar MDA di jaringan jantung setelah pemberian NaCl 6% selama 3 hari pada tikus kelompok perlakuan lebih tinggi (1,25 nmol/mL protein lisat) dari kontrol (0,80 nmol/mmol protein lisat). Subakir *et al* (2008) menemukan bahwa kadar MDA plasenta ibu preeklampsia berat lebih tinggi (7,13 nmol/mL \pm 5,36) dari ibu hamil normal (4,87 nmol/ μ l \pm 2,40).

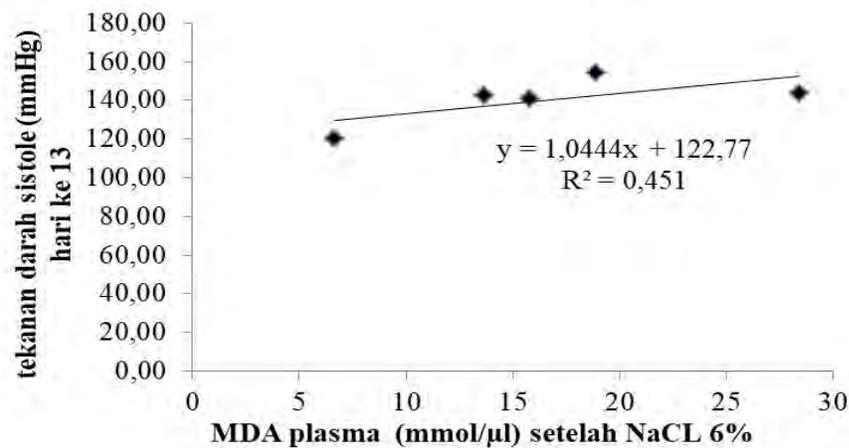
Setelah invasi trofoblas ke dalam jaringan desidua secara normal, maka terjadi pelepasan debris trofoblas di dalam sirkulasi darah. Pelepasan bahan-bahan asing tersebut dapat meningkatkan ROS akibat terjadinya stres oksidatif namun dapat diredam oleh mekanisme pertahanan sel secara alami karena tubuh memiliki sistem proteksi terhadap radikal bebas yaitu SOD, katalase dan glutathion peroksidase (Nelawati *et al.*, 2016). Apabila senyawa- senyawa tersebut tidak diredam, maka oksigen akan berbalik menjadi racun bagi tubuh sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif menghasilkan oksidan (disebut juga radikal bebas). Salah satu oksidan penting yang dihasilkan plasenta tersebut adalah radikal hidroksil yang sangat toksis (akan sangat meningkat jika terjadi plasenta iskemia) dapat merusak membran sel, mengubah asam lemak tidak jenuh menjadi peroksida lipid dan produksi akhirnya adalah MDA (Langseth, 1994; Suryohudoyo, 2000; Brooks *et al.*, 2005).

Tikus putih bunting kelompok perlakuan yang diinduksi NaCl 6% terjadi peningkatan rerata kadar MDA plasma lebih tinggi dari kontrol. Proses ini terjadi karena induksi NaCl 6% menyebabkan cairan akan tertahan di dalam jaringan sehingga volume plasma bertambah. Dengan demikian, beban kerja jantung bertambah berat karena harus melawan resistensi perifer sehingga terjadi kenaikan tekanan darah atau hipertensi (Sherwood, 2004).

Akibat hipertensi itu sendiri dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas, sehingga terjadi reaksi oksidasi berantai (ROS) yang berpotensi menjadi sitotoksik, mengakibatkan terjadinya peningkatan penebalan endotelial dan otot polos (Harjanto, 2004; Roseta *et al.*, 2014; Yudomustopo, 2015). Sumber ROS itu sendiri ternyata didapat dari respirasi mitokondria yang terdapat pada pembuluh darah disebabkan karena adanya ET-1 (Roseta *et al.*, 2014). Selain itu radikal bebas, juga dapat menyebabkan kerusakan seluruh membran biologis dengan cara menyerang protein, lipid, asam nukleat dan glikonjugat. Radikal bebas ini dapat menyebabkan kerusakan seluruh membran biologis dengan cara menyerang protein, lipid, asam nukleat dan glikonjugat. Dalam hal ini proses oksidasi asam lemak tidak jenuh berantai panjang (PUFA) atau yang dikenal dengan sebutan Peroksidasi lipid pada membran sel menghasilkan radikal peroksida lipid, hidroperoksida dan produk aldehida misalnya MDA dan jika kadarnya meningkat maka sel mengalami stres oksidasi (Sharma *et al.*, 2003; Roseta *et al.*, 2014). Hal inilah yang diduga menyebabkan kenaikan kadar MDA plasma pada tikus bunting yang diberikan NaCl 6% dalam penelitian ini.

Peroksidasi lipid atau lemak sebenarnya adalah suatu proses normal yang terjadi dalam seluruh sel dan jaringan. Proses ini melibatkan perubahan oksidasi asam lemak tak jenuh menghasilkan produk utama yang dikenal dengan peroksida lipid. Keadaan yang dapat menstimulasi peroksida lemak yaitu adanya peningkatan radikal bebas seperti yang terjadi pada kehamilan yang mengalami preeklampsia (Candra S *et al.*, 2007). Lebih lanjut Candra *et al* (2007) menjelaskan bahwa kadar MDA plasma pada PE menunjukkan 4,5 lebih tinggi konsentrasinya dari pada kehamilan normal. Sementara itu, dalam penelitian ini kadar MDA plasma 2,05 sampai 4,27 kali lebih tinggi dari kontrol setelah diinduksi NaCl 6%. Peneliti lain mengungkapkan bahwa semakin tinggi kadar MDA pada kehamilan maka makin parah derajat preeklamsianya (Suparman E, 2012).

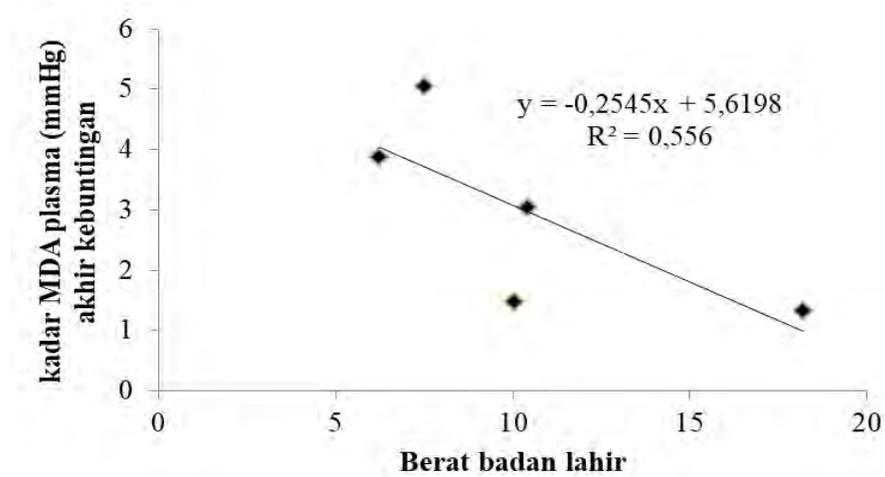
Induksi NaCl 6% 3 ml/hari selama seminggu pada penelitian ini dapat meningkatkan rerata kadar MDA plasma tikus putih bunting dan juga tekanan darah pada hari ke 13 secara signifikan. Hal ini juga terbukti berdasarkan uji korelasi *Spearman* didapatkan bahwa $P = 0,026$ (lampiran 9), berarti ada hubungan antara peningkatan tekanan darah dengan kadar MDA plasma, meskipun hubungan ini tidak terlalu kuat yaitu sekitar 44,4%. Model linear dari hubungan ini dapat dilihat pada Gambar 4.2. berikut ini.



Gambar 4.2 Hubungan kadar MDA plasma setelah pemberian NaCl 6% dengan tekanan darah sistole hari ke13.

Hubungan kadar MDA plasma setelah pemberian NaCl 6% dengan tekanan darah sistole model persamaannya adalah $Y = 1,044x + 122,7$ dengan nilai $R^2 = 0,451$. Model ini mengisyaratkan bahwa semakin tinggi kadar MDA plasma akan semakin tinggi tekanan darah sistole. Namun model ini hanya menggambarkan hubungan kadar MDA plasma dan tekanan darah sistole sebanyak 45%, berarti 55% lagi ada faktor lain yang berpengaruh tapi belum terungkap dalam penelitian ini.

Kadar MDA plasma tikus putih yang semakin tinggi hingga menjelang kelahiran fetus ternyata berpengaruh terhadap rerata BBL, hal ini berdasarkan hasil uji *Spearman* $P = 0,010$ (lampiran 17) dengan kekuatan hubungan $-0,507$ atau 50,7% (kuat). Garis persamaannya seperti Gambar 4.3 berikut ini.



Gambar 4.3 Hubungan berat badan lahir dengan kadar MDA plasma

Hubungan BBL dan kadar MDA plasma berdasarkan model persamaan $Y = -0,254x + 5,6198$ dengan nilai $R^2 = 0,556$. Model persamaan ini menggambarkan hasil hubungan yang negatif, maka dapat diartikan bahwa semakin tinggi kadar MDA plasma induk tikus maka kemungkinan fetus mengalami BBLR. Namun model ini hanya menggambarkan hubungan kadar MDA plasma dan BBL sebesar 55,5% berarti 44,5% lagi ada faktor lain yang berpengaruh tapi belum terungkap dalam penelitian ini. Hasil penelitian ini sejalan yang ditemukan oleh Yudomustopo (2015) bahwa tikus putih dengan kadar MDA plasma yang tinggi memiliki anak BBLR, demikian juga kelompok perlakuan P1 (model PE) dengan kadar MDA yang tinggi, 68% memiliki fetus dengan BBLR, sedangkan pada kontrol hampir keseluruhan memiliki BBL di atas rata-rata. Faktor lain yang berpengaruh terhadap berat badan lahir rendah dalam penelitian ini diduga kemungkinan disebabkan oleh hipertensi dan stres oksidasi menyebabkan kerusakan di membran sel endotel plasenta sehingga asupan nutrisi tidak adekuat pada fetus tikus putih.

Hari ke 13 sampai dengan 19 kebuntingan, kelompok perlakuan P2, P3 dan P4 yang diberi EVOO, sebelumnya telah dilakukan pemberian injeksi NaCl 6%, maka terjadi penurunan rerata kadar MDA plasma yang signifikan terjadi pada kelompok tersebut. Hal ini dibuktikan dari hasil uji *Kruskal Wallis* (lampiran 9) diketahui $P = 0,036$ yang berarti bahwa ada pengaruh yang signifikan terhadap kadar MDA plasma setelah pemberian EVOO. Hasil uji *Mann Whitney* (lampiran 9) diketahui bahwa pada kelompok P2 (model PE + EVOO: 0,38 mL/kgBB/hari) memiliki rerata kadar

MDA plasma yang paling rendah dari kelompok perlakuan lainnya. Hasil uji Wilcoxon (lampiran 9) diketahui bahwa ada penurunan rerata kadar MDA plasma yang signifikan dari sebelumnya setelah pemberian EVOO (dapat diperhatikan pada Gambar 4.1). Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian Meilina (2017) pada tikus wistar jantan yang dipaparkan asap rokok selama 14 hari dan diberi EVOO ternyata terjadi penurunan kadar MDA yang signifikan dari pretest $8,8838 \text{ nmol/mL} \pm 0,63541$ menjadi $3,4925 \text{ nmol/mL} \pm 0,85058$ saat posttest.

Penurunan rerata kadar MDA plasma setelah pemberian EVOO, diduga kandungan zat fenol yang terdapat di dalamnya merupakan senyawa polar didalamnya mampu untuk menekan radikal bebas. EVOO juga mengandung komponen sederhana lainnya yaitu hidroksitirosool sebagai antioksidan yang cukup tinggi daripada sumber antioksidan lainnya seperti vitamin E dan C (Lopez, *et al.*, 2008). Hal ini sejalan dengan penelitian lainnya bahwa kandungan α tokoferol dalam EVOO mencapai 90% ditambah lagi dengan kandungan fenol yang cukup banyak sekitar $579,2 \text{ mg/kg}$ dan hal ini merupakan antioksidan (Nakbi *et al.*, 2010).

Mekanisme kerja EVOO untuk menurunkan kadar MDA plasma adalah sebagai antioksidan golongan pemutus rantai. Dalam hal ini α -tokoferol yang terkandung di dalamnya berfungsi memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas dengan cara memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang telah mengalami peroksidasi sehingga membentuk senyawa baru yang lebih stabil, oleh karena itu α -tokoferol merupakan bentuk tokoferol yang paling aktif dan paling penting untuk aktivitas biologi tubuh (Murray *et al.*, 2000; Winarsi, 2011). α -tokoferol mengendalikan peroksida lemak dengan menyumbangkan ion hidrogen ke dalam reaksi, sehingga mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, menyekat aktivitas tambahan yang dilakukan oleh peroksida, pada akhirnya akan memutus reaksi berantai dan bersifat membatasi kerusakan (Murray *et al.*, 2000; Roziana *et al.*, 2015).

Selain itu EVOO diduga juga berperan secara tidak langsung melawan stres oksidatif dengan memodulasi ekspresi gen dan aktivitas enzim, sehingga dapat memperbanyak antioksidan enzimatik seperti SOD, GPx, katalase. Dalam hal ini EVOO memiliki nilai nutrisi yang cukup tinggi dan pada penelitian lainnya terbukti

dengan pemberian selama 3 hari berturut-turut ternyata mampu mengurangi stress oksidatif di pankreas (Lopez *et al.*, 2008).

Selain sebagai antioksidan alami yang membuang radikal bebas, ternyata tokoferol di dalam jaringan dapat menekan terjadinya oksidasi asam lemak tak jenuh sehingga mempertahankan fungsi membran. Tokoferol bertindak sebagai reduktor dan menangkap radikal bebas tersebut, perannya tersebut disebut sebagai *scavenger*. *Scavenger* lainnya adalah vitamin C, enzim glutathion reduktase, dismutase dan peroxidase, yang bersifat larut dalam air. *Scavenger* yang larut dalam lemak adalah vitamin E atau tokoferol dan β karoten (Murray *et al.*, 2000). Winarni (2011) menjelaskan bahwa kandungan tokoferol yang terdapat dalam EVOO sebagai antioksidan berfungsi sebagai donor ion hydrogen yang mampu mengubah radikal bebas menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak.

Penelitian lain juga mengungkapkan bahwa kandungan MUFA yang terdapat dalam EVOO dapat melindungi jaringan hepar dari kerusakan karena proses oksidasi yaitu dengan cara mencegah aktivitas peroksida lipid yang berlebihan. Mekanisme kerjanya dengan cara mempertahankan marker enzim-enzim pada serum juga aktivitas enzim-enzim antioksidan hepar pada konsentrasi mendekati normal (Nakbi *et al.*, 2010). Kelebihan dari EVOO yang lain adalah kandungan hidroksitirosol sebagai antioksidan tidak rusak atau tetap dipertahankan walaupun telah dicerna (Lopez, 2008).

Berkaitan dengan hal tersebut, sejalan dengan yang didapatkan dalam penelitian ini bahwa penurunan rerata kadar MDA plasma setelah pemberian EVOO sekitar 36,02% sampai dengan 53,12%. Seperti telah diketahui bahwa α tokoferol yang dikandung oleh EVOO merupakan salah satu nutrisi yang bekerja sebagai antioksidan yang larut dalam lemak. Senyawa antioksidan ini mencegah terjadinya oksidasi dalam membran sel dengan cara (1) melepas hydrogen dari antioksidan, (2) melepas elektron dari antioksidan, (3). Adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan dan (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Winarti, 2010).

Pemberian EVOO dosis sedang dan tinggi di dalam penelitian ini tidak menjadikan rerata kadar MDA plasma lebih rendah, namun justru lebih tinggi dari

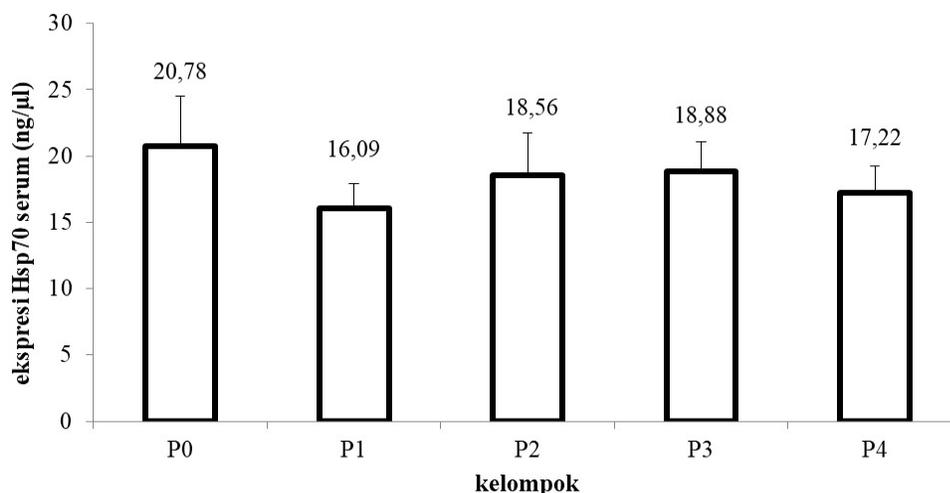
dosis rendah. Hal ini sejalan apa yang telah dikemukakan oleh Sulistyowati (2006) yang dikutip dari Hillbom bahwa pemberian antioksidan dalam kadar rendah mampu menghambat oksidasi molekul target sehingga dapat melawan atau menetralkan radikal bebas. Selain itu juga diduga bahwa α tokoferol hanya sekitar 40 – 60% saja dari makanan yang dapat diserap oleh usus. Jadi peningkatan jumlah yang dikonsumsi akan menurunkan persentase yang diserap. Selain itu, α tokoferol disimpan di dalam jaringan adipose, otot dan hati. Di dalam hati α tokoferol diikat oleh α -TPP (Tokoferol Transfer Protein). Sebagian dari α tokoferol menjalankan fungsinya sebagai antioksidan, yang lainnya disimpan di dalam hati akan teroksidasi menjadi tokoferil (suatu tokoferol bentuk radikal), meskipun bentuk ini akan direduksi kembali menjadi tokoferol oleh kinerja sinergi dari antioksidan yang lain seperti vitamin C dan glutathione (Winarsi, 2011). Oleh karena itu dapat dipahami dosis pemberian EVOO sedang maupun tinggi menyebabkan tokoferil meningkat sehingga terjadi peroksidasi asam lemak yang pada akhirnya kadar MDA plasma semakin meningkat, jika dibandingkan dengan pemberian dosis rendah.

Kelemahan dari penelitian itu tidak dilakukan penggabungan pemberian EVOO dengan antioksidan lainnya seperti vitamin C atau glutathione dan juga tidak diketahuinya antioksidan mana yang memegang peranan utama dalam menurunkan kadar MDA plasma pada model preeklampsia apakah fenol, α tokoferol, flavanoid, squalene, pigment atau β karoten karena penelitian ini tidak memeriksa kandungan fitokimia dari EVOO tersebut.

4.2 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Ekspresi Protein Hsp70 Tikus Putih Bunting

Pengukuran ekspresi protein Hsp70 serum dilakukan pada hari ke 20 setelah pemberian EVOO. Pengambilan darah serum tikus putih langsung dari *intracardia* segera dilakukan setelah dianestesi. Setelah hasil ekspresi protein Hsp70 serum terkumpul maka data dianalisis dengan uji *Anova* (lampiran 10). Berdasarkan uji *Anova* diketahui $P = 0,109$ berarti tidak ada pengaruh pemberian EVOO terhadap rerata ekspresi protein Hsp70 antara kelompok kontrol dan perlakuan tikus putih. Oleh karena tidak hasil uji *Anova* tidak signifikan maka tidak dilanjutkan ke uji

LSD. Hasil pengamatan terhadap ekspresi protein Hsp70 serum dapat dilihat pada Gambar 4.4 berikut ini.



Gambar 4.4 Pengaruh pemberian EVOO terhadap ekspresi protein Hsp70 tikus putih bunting

Ket: P0. Kontrol

P1. Preeklampsia (PE)

P2. PE + EVOO (0,38mL/kgBB/hari)

P3. PE + EVOO (0,76mL/kgBB/hari)

P4. PE + EVOO (1,52 mL/kgBB/hari)

Berdasarkan Gambar 4.4 diketahui kelompok P1 memiliki ekspresi Hsp70 paling rendah, dan pada kelompok P0 diketahui lebih tinggi dari kelompok lainnya. Subakir *et al* (2008) menemukan pada kultur sel-sel trophoblast plasenta manusia dengan PE berat, Hsp70 lebih rendah ($3,78 \pm 3,07$ nmol/ml) dari pada PE ringan ($10,15 \pm 12,39$ nmol/ml) dan pada kehamilan normal ekspresi Hsp70 diketahui $3,76 \pm 4,65$ nmol/ml.

Beberapa penelitian yang berbeda seperti Kasan *et al* (2015) mendapatkan ekspresi Hsp70 serum pada kehamilan normal $\leq 12,5$ ng/μl. Fukushima *et al* (2005) mendapatkan bahwa rerata Hsp70 serum pada kehamilan normal $21,9 \pm 5,3$ ng/μl. Menurut Kasan (2015) tingginya rerata ekspresi protein Hsp70 serum belum dapat dipastikan bahwa terjadi juga peningkatan yang sama di tempat lain seperti plasenta, amnion karena Hsp70 serum yang diperiksa berada dalam intraseluler, sehingga perlu membandingkan kadarnya di tempat lain serta dengan jumlah sampel yang lebih banyak lagi. Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut diketahui bahwa nilai normal ekspresi Hsp70 di serum lebih tinggi dari plasenta. Berhubung penulis belum

mendapatkan nilai ekspresi protein Hsp70 serum pada binatang coba tikus, maka dalam hal ini diambil acuan berdasarkan hasil penelitian lain sebelumnya pada ibu hamil normal. Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa ekspresi Hsp70 serum pada kelompok kontrol tidak jauh berbeda apa yang didapatkan oleh Fukushima *et al* (2005) yaitu $20,78 \pm 3,73$ nmol/ml.

Tingginya ekspresi Hsp70 serum merupakan sebagai bentuk perlawanan terhadap apoptosis yang terjadi (anti apoptosis), selain itu dapat meredam senyawa radikal dan mengatur homeostasis fungsi sel-sel trofoblast plasenta agar lebih baik. Kondisi demikian terjadi sebagai awal dari PE ringan, dan hal ini akan berbeda dengan PE berat yang mengakibatkan Hsp70 lebih rendah sehingga menyebabkan fungsi plasenta terganggu (Subakir *et al.*, 2008; Molvarec *et al.*, 2006).

Ekspresi Hsp70 pada kelompok P0 yang tinggi dari lainnya diduga kemungkinan merupakan kondisi normal seiring dengan bertambahnya usia kebuntingan tikus putih tersebut, karena pengukurannya dilakukan saat sebelum melahirkan. Hal ini berdasarkan hasil penelitian Molvarec *et al* (2010) yang dilakukan pada hewan coba ditemukan peningkatan Hsp90 dan Hsp70 dalam mRNA di miometrium dan endometrium, bersamaan juga dengan peningkatan glukokortikoid yang berperan untuk terjadinya persalinan normal. Dalam hal ini peningkatan Hsp90 dan Hsp70 tersebut boleh jadi untuk menghambat reseptor progesteron dan menstimulus fungsi reseptor estrogen di uterus sehingga proses persalinan terjadi.

Beberapa pendapat yang berbeda berdasarkan hasil penelitian lainnya bahwa kadar Hsp70 serum pada kehamilan normal menurut Molvarec *et al* (2010) meningkat secara bermakna seiring dengan bertambahnya umur kehamilan. Fukushima *et al* (2005) menyatakan tidak ada perubahan yang bermakna kadar Hsp70 selama kehamilan. Lebih lanjut Molvarec *et al* (2010) menyatakan bahwa peningkatan Hsp70 di tingkat intra seluler maupun ekstra seluler dibutuhkan pada akhir kehamilan untuk menginduksi proses kelahiran dimulai.

Seperti telah diketahui bahwa pada kehamilan normal, ada peningkatan produksi radikal bebas dan peroksida lipid pada akhir kehamilan jika dibandingkan dengan kondisi tidak hamil. Pada waktu yang bersamaan, biasanya terjadi juga peningkatan antioksidan selama masa kehamilan, bertujuan untuk menjaga keseimbangan oksidan selama masa kehamilan, akan tetapi kehamilan patologi seperti PE faktanya terjadi

kelebihan produksi ROS yang diduga menjadi salah satu penyebab utama terjadinya kegagalan reperfusi pada perkembangan plasenta, hal inilah yang menjadi akumulasi debris-debris plasenta pada jalur apoptosis (Ekambaram dan Geetha, 2008). Debris-debris plasenta ini yang merupakan salah satu penyebab terjadinya gangguan keseimbangan oksidan dan antioksidan di dalam tubuh, sehingga Hsp70 terinduksi untuk mencegah apoptosis tidak terjadi secara berlebihan.

Peningkatan ekspresi protein Hsp70 berperan serta dalam regulasi siklus sel diketahui turut membantu proses pelipatan protein pada kondisi stres dengan kemampuannya memperbanyak jumlah ikatan peptida dan peptida kompleks yang lebih stabil sehingga dapat mencegah proses apoptosis berlebihan (Ekambaram dan Lavanya, 2011). Oleh karena itu peningkatan ekspresi protein Hsp70 pada serum atau jaringan plasenta serta sel endotel plasenta mempunyai peranan dalam menghadapi keadaan stres oksidatif (Ekambaram, 2011).

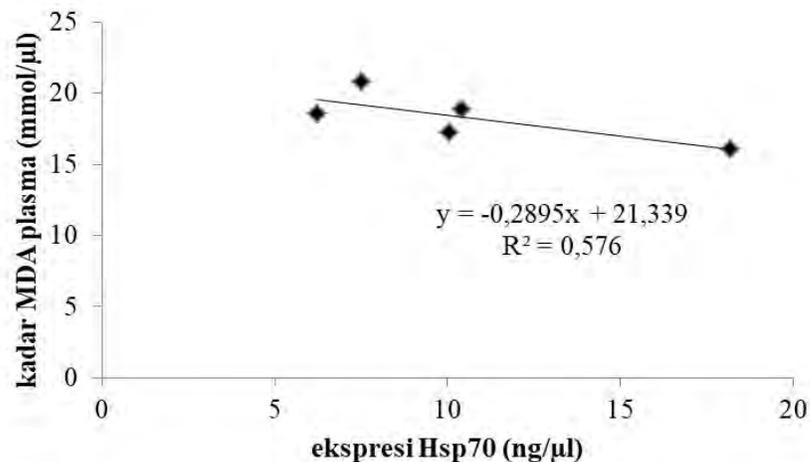
Selain itu, ekspresi Hsp70 serum yang tinggi pada kelompok kontrol dalam penelitian ini dari lainnya diduga karena respon untuk mempertahankan homeostasis di ekstra seluler tikus bunting masih tinggi, hal ini sama seperti yang telah dikemukakan oleh Fukushima *et al* (2005). Keterlibatan Hsp70 serum juga diduga untuk mempertahankan fungsi plasenta tetap adekuat sehingga dapat memberikan nutrisi yang cukup pada fetus yang dapat diamati pada kelompok kontrol bahwa seluruh fetus yang dilahirkan hidup dengan BBL di atas rata-rata, berbeda dengan kelompok lainnya, terutama pada kelompok P1 yang memiliki fetus dengan BBL lebih rendah dari lainnya.

Kadar ekspresi Hsp70 pada plasenta kehamilan normal berperan menjaga homeostasis fungsi sel dan tekanan darah tetap normal, jika tidak ada kelainan pembentukan pembuluh darah plasenta di awal kehamilan sehingga vaskularisasi plasenta tidak mengalami konstiksi, menyebabkan aliran darah ke plasenta cukup (Subakir *et al.*, 2008). Oleh karena itu dalam penelitian ini, diduga bahwa Hsp70 serum yang tinggi pada kelompok kontrol bukanlah merupakan gejala dari preeklampsia namun berfungsi sebagai respon untuk mempertahankan homeostasis di plasenta juga untuk menstimulus peningkatan estrogen pada proses persalinan.

Kelompok P1 yang merupakan model preeklampsia dalam penelitian ini memiliki ekspresi Hsp70 paling rendah dari kelompok lainnya. Hal ini sama apa yang telah

ditemukan oleh Subakir *et al* (2008), tetapi berbeda dengan yang ditemukan oleh Ekambaram (2011) bahwa semakin berat derajat PE maka semakin meningkat ekspresi Hsp 70 di plasenta. Oleh karena penelitian ini tidak mengukur ekspresi Hsp70 di plasenta maka tidak dapat diketahui dengan pasti apakah terjadi juga penurunan atau peningkatan ekspresi protein tersebut.

Jika diambil patokan dari Subakir *et al* (2008) bahwa pada PE berat ekspresi Hsp70 lebih rendah dari normal, maka kelompok P1 dengan ekspresi Hsp70 paling rendah kemungkinan mengalami PE berat sehingga integritas sel terganggu, hal ini berkaitan dengan peningkatan apoptosis indeks yang sangat kuat (>10% sel yang mengalami apoptosis) dan fetus yang dilahirkan memiliki BBL lebih rendah dari kelompok lainnya serta jumlah fetus mati juga tinggi. Berdasarkan hal tersebut maka dapat dikemukakan suatu argumen bahwa Hsp70 yang rendah tidak dapat mempertahankan fungsi plasenta akibat penurunan antioksidan ditambah lagi dengan kondisi stres oksidatif sehingga pasokan nutrisi yang adekuat ke janin berkurang. Selain itu diduga rendahnya ekspresi Hsp70 pada kelompok P1 berhubungan dengan kadar MDA plasma masih tinggi sampai akhir kebuntingan. Hasil Uji korelasi *Spearman* MDA plasma dengan ekspresi protein Hsp70 serum diketahui ada hubungan yang bermakna ($P = 0,033$). Gambaran korelasinya dapat diamati pada Gambar 4.5 berikut ini.



Gambar 4.5 Hubungan kadar MDA plasma dan ekspresi Hsp70

Gambaran ini menunjukkan korelasi antara kadar MDA plasma dan ekspresi Hsp70 berdasarkan model persamaan $Y = -0,289x + 21,33$ dengan nilai $R^2 = 0,576$.

Model persamaan ini menggambarkan hasil hubungan yang negatif, maka dapat diartikan bahwa semakin tinggi kadar MDA plasma maka kemungkinan semakin rendah ekspresi Hsp70. Namun model ini hanya menggambarkan hubungan kadar MDA plasma dan ekspresi Hsp70 sebesar 57,6% berarti 42,4% lagi ada faktor lain yang berpengaruh tetapi belum terungkap dalam penelitian ini.

Fungsi Hsp70 berperan untuk melindungi sel dari apoptosis yang berlebihan pada PE sebagai respon stres oksidatif (Ekambaram, 2011). Mekanisme Hsp70 yang berperan agar apoptosis tidak terjadi berlebihan yaitu dengan cara menghambat aktivasi protein Bax, sehingga mencegah pelepasan proapoptosis faktor dari intermembran mitokondria (Adam *et al.*, 2005; Hui Li *et al.*, 2010). Hsp70 tidak secara langsung berinteraksi dengan Bax untuk mengontrol apoptosis, tetapi melalui aktivasi JNK (Jun N terminal Kinase) untuk menekan sinyal yang menyebabkan aktivasi Bax, dalam hal ini Hsp70 diinduksi jika terjadi stres oksidatif. Hsp70 tidaklah memproteksi sel dalam rangka menghambat mutasi gen dari protein Bax sehingga Hsp70 overekspresi atau dengan kata lain bukan untuk memproteksi ekspresi protein Bax dalam bentuk mutan yang akhirnya akan masuk ke dalam membran tetapi menjaga sel bersama dengan aktivator molekul kecil dalam bentuk apoptosome. Hal ini berarti bahwa Hsp70 tidak dapat mencegah kematian sel setelah terjadi kerusakan pada mitokondria dan aktivasi caspase atau dengan kata lain Hsp70 hanya mampu mengontrol apoptosis tidak terjadi berlebihan tetapi tidak dapat berperan dalam sel bila sudah terjadi apoptosis (Adam *et al.*, 2005). Hal ini dapat dilihat dalam penelitian ini bahwa kelompok P1 yang merupakan model PE dengan ekspresi Hsp70 serum yang paling rendah memiliki indeks apoptosis lebih tinggi dari lainnya.

Overekspresi Hsp70 bertujuan untuk mengontrol apoptosis yang terjadi agar tidak berlebihan, maka sebenarnya ada hubungan yang sangat kuat dalam hal ini. Namun, berdasarkan hasil uji statistik dalam penelitian ini diketahui bahwa tidak terdapat hubungan yang bermakna antara Hsp70 dengan apoptosis indeks (*Pearson*, $P = 0,057$) sehingga perlu untuk disarankan meneliti lagi lebih dalam gen yang berperan penting dalam menginduksi Hsp70 khususnya di plasenta, hal ini berdasarkan seperti yang telah pernah dikemukakan oleh Molvarec *et al* (2010) bahwa sebenarnya masih belum jelas sumber utama yang mengatur sirkulasi heat shock protein.

Kelompok perlakuan model preeklampsia yang diberi EVOO diketahui ekspresi Hsp70 serum lebih tinggi (khususnya dengan dosis pemberian rendah (P2) dan sedang (P3P)) dari P1 yang tidak mendapatkannya. Hal ini diduga bahwa EVOO kemungkinan juga berperan secara tidak langsung melawan stres oksidatif dengan cara memodulasi ekspresi protein gen dan aktivitas enzim, sehingga dapat memperbanyak antioksidan enzimatik sebagai mekanisme pertahanan tubuh karena EVOO memiliki nilai nutrisi yang cukup tinggi (Lopez *et al.*, 2008). Penelitian lain membuktikan bahwa pada mencit yang diberi EVOO dengan dosis sedang selama 3 hari berturut-turut mampu mengurangi stres oksidatif di pankreas (Lopez *et al.*, 2008). Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa dengan pemberian EVOO dapat meningkatkan antioksidan pada tikus putih bunting khususnya pada dosis pemberian rendah dan sedang sehingga dapat meningkatkan ekspresi Hsp70 dalam serum sebagai bagian dari antiapoptotic untuk mencegah apoptosis tidak terjadi secara berlebihan.

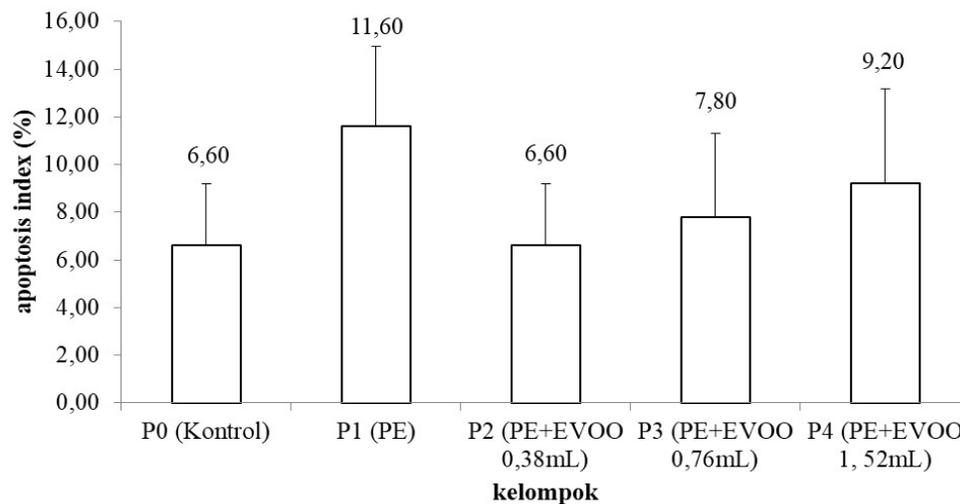
Kandungan α -tokoferol yang terdapat dalam EVOO bersama ataupun tanpa vitamin E diduga mampu meningkatkan ekspresi Hsp70 dengan cara mengikat TAP (Tocopherol Associated Protein). TAP akan menginduksi aktivasi JNK ketika berikatan dengan tokoferol, dan JNK dibutuhkan untuk menginduksi regulasi Hsp70. Seperti diketahui bahwa ROS merupakan kunci utama memediasi JNK. Ketika terjadi peningkatan ROS, maka JNK menginduksi regulasi Hsp70, sementara itu TAP dapat berinteraksi dengan JNK. Dari hasil percobaan *in vitro* dan *in vivo* diketahui bahwa TAP punya peranan penting dalam memodulasi oksidatif stres yang menginduksi apoptosis (Baoyi Zhu *et al.*, 2012).

Selain itu tokoferol yang terdapat di dalam EVOO ternyata mampu mempengaruhi sinyal sitokin pada trophoblast plasenta dan juga mempunyai efek pada sel imun maternal pada awal maupun akhir kehamilan, sehingga dengan peningkatan ekspresi protein Hsp70, dapat memblokir proses kematian sel, atau dapat mendukung maupun mengurangi pertumbuhan sel tersebut (Ekambaran, 2011). Fungsi Hsp70 berperan juga sebagai anti apoptosis yaitu dengan cara bersama bcl-2 menghambat aktivasi protein bax untuk mencegah pelepasan proapoptosis faktor seperti sitokrom-c dari mitokondria (Ekambaran dan Lavanya, 2011). Dalam hal ini Hsp70 juga menghambat kejadian stres pada sel membran permeabel mitokondria

dengan mengontrol kapan sel perlu dimatikan, tetapi tidak ikut campur pada kematian sel jika kondisi ini telah terjadi (Ekambaram, 2011). Oleh karena itu dengan pemberian EVOO, dapat meringankan gejala PE dan sekaligus juga mencegahnya dengan cara mengontrol homeostasis dengan cara menjaga keseimbangan radikal bebas dalam tubuh.

4.3 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Apoptosis Indeks Plasenta Tikus Putih

Pengamatan sel apoptosis di jaringan plasenta tikus putih secara imunohistokimia menggunakan TUNEL kit. Sel apoptosis dihitung untuk menentukan AI. Jaringan yang digunakan adalah plasenta yang disimpan dalam blok parafin. Penghitungan AI dengan kualitatif kemudian dikonversikan ke semikuantitatif berdasarkan kriteria yang telah ditentukan (Kokawa *et al.*, 2001), hasilnya seperti Gambar 4.6 berikut ini:



Gambar 4.6 Pengaruh EVOO terhadap apoptosis indeks plasenta kelompok kontrol dan perlakuan.

Berdasarkan hasil uji *Anova* ($P = 0,119$) (lampiran 11) dapat diketahui bahwa tidak ada pengaruh pemberian EVOO terhadap nilai apoptosis indeks pada kelompok kontrol dan perlakuan. Meskipun demikian berdasarkan Gambar 4.6 diketahui rerata apoptosis indeks (AI) yang paling kuat (+++) adalah kelompok P1, di mana kematian selnya $> 10\%$ = grade IV (Kokawa *et al.*, 2001). Berdasarkan

seluruh jaringan plasenta yang diamati maka 80% sel mengalami apoptosis grade IV terjadi pada kelompok P1 (model PE tanpa EVOO), P4 (model PE dengan EVOO) sekitar 60%, P3 berjumlah 40% dan menyusul P0 serta P2 yang hanya 20%. Jika diambil reratanya dari hasil penelitian ini, maka selain kelompok P1 dengan AI yang paling kuat, kelompok lainnya juga memiliki AI berada pada Grade III (++ atau kuat). Hasil penelitian ini sejalan dengan yang telah dilakukan oleh peneliti lainnya bahwa pada PE apoptosis indeksnya lebih tinggi dibandingkan dengan kehamilan normal (Keman *et al.*, 2009). Sementara itu Teguh *et al* (2010) menyatakan AI plasenta preeklampsia lebih tinggi dari kehamilan normal, juga menyebabkan komplikasi berat badan lahir fetus rendah sekitar 14,3%. Hasil penelitian ini mendapatkan AI tidak berbeda antara kelompok karena (1) penghitungan sel apoptosis dilakukan pada akhir kebuntingan tikus putih yang bisa saja tinggi, (2) pada kelompok model preeklampsia yaitu P1 dengan AI tertinggi kemungkinan diduga adanya peningkatan apoptosis karena stres oksidatif yang berlebihan sehingga terjadi penurunan ekspresi protein Bcl-2 juga Hsp70.

Kehamilan normal pada mamalia dapat terjadi apoptosis sel sinsitiotrofoblas berupa gambaran khas seperti hilangnya mikrovili dan menggembungnya membran permukaan plasenta. Proses apoptosis ini berperan dalam pergantian sitotrofoblas dan pembaruan permukaan sinsitium dari vili korialis. Proses apoptosis selain terjadi pada sinsitiotrofoblas juga pada sitotrofoblas. Proses peningkatan ini terjadi seiring dengan bertambah tuanya usia kehamilan karena penurunan ekspresi protein Bcl-2 yang menghambat apoptosis. Oleh karena itu jika kadar ekspresi protein Bcl-2 tinggi pada sinsitiotrofoblas dapat mencegah proses apoptosis pada trofoblas (Teguh *et al.*, 2010).

Apoptosis pada kondisi fisiologis berfungsi untuk mengatur jumlah sel, proliferasi dan menghilangkan sel yang sudah tidak berguna lagi sebagai suatu perkembangan normal dari sel, seperti pada embriogenesis, *hormone-dependent involution* pada siklus menstruasi dan atresia folikel pada menopause, delesi sel pada proliferasi sel epitel, eliminasi sel reaktif limfosit yang berlebihan, kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik pada infeksi virus dan perkembangan tumor (Sujatmiko *et al.*, 2015). Apoptosis sebenarnya merupakan proses penting baik dalam perkembangan jaringan normal maupun homeostasis jaringan pada orang dewasa termasuk

pengaturan sistem imun misalnya pada sel limfosit T yang merupakan sistem imun seluler bertanggung jawab untuk membinasakan sel yang rusak ataupun terinfeksi dalam tubuh. Limfosit T ini mengalami maturasi dalam kelenjar timus, tetapi sebelum masuk dalam peredaran darah akan diuji terlebih dahulu untuk memastikan bahwa sel tersebut efektif untuk melawan reaktif terhadap sel normal. Apabila ada limfosit T yang tidak efektif ataupun *self-reactive* maka akan disingkirkan melalui proses apoptosis (Hermawan, 2012).

Apoptosis juga merupakan proses penting dalam berbagai stadium perkembangan sel B, yaitu apabila terjadi kesalahan *rearrangement* gen immunoglobulin. Di dalam pusat germinal juga terjadi proses apoptosis yang tinggi untuk menyingkirkan sel yang tidak diperlukan dan memilih sel yang mempunyai afinitas tinggi terhadap antigen. Pemicu apoptosis termasuk steroid, sitokin seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6, FasL, *heat shock protein*, oksigen radikal bebas, NO dan limfosit Tc akan mengekspresi proteinkan FasL pada permukaan selnya (Roth dan Pircher, 2004). Proses kematian sel melalui apoptosis terjadi melalui tiga jalur yang berbeda, yaitu jalur reseptor kematian ekstrinsik (set tipe I), jalur intrinsik (mitokondria atau set tipe II), dan jalur yang diinduksi oleh stres (jalur retikulum endoplasma) (Peter dan Krammer, 2003; Thorburn, 2004).

Akan tetapi pada preeklampsia terjadi kegagalan adaptasi imunologik, sehingga konsepsi tetap berjalan tetapi sel-sel trofoblas tidak mampu melakukan invasi ke dalam arteri spiralis supaya berdilatasi, sehingga tonus pembuluh darah tetap tinggi dan terjadi vasokonstriksi. Keadaan ini menyebabkan pembuluh darah maternal tidak dapat memenuhi kebutuhan darah sirkulasi, sehingga akan terjadi iskemia dan merangsang terjadinya apoptosis plasenta (Teguh *et al.*, 2010). Meskipun demikian apoptosis tidak hanya terjadi akibat plasenta yang iskemia, tetapi hipoksia juga dapat merupakan pencetus apoptosis melalui mekanisme sitokin seperti TNF α atau Fas ligand yang akan mengaktifkan caspase 8 dan caspase 9 sebagai inisiator terjadinya apoptosis. Caspase 3 dan caspase 6 sebagai eksekutor. Seperti diketahui bahwa radikal bebas seringkali ikut berperan dalam terjadinya preeklampsia, tetapi tidak seluruhnya menyebabkan peningkatan apoptosis (Levy R, 2005).

Peningkatan apoptosis dalam penelitian ini yang sangat kuat pada kelompok P1 karena adanya keterlibatan dari MDA. Hal ini dibuktikan dengan hasil pengukuran

kadar MDA plasma di akhir kebuntingan, kelompok P1 lebih tinggi dari kelompok lainnya. MDA merupakan produk akhir dari lipid peroksida adalah radikal bebas. Radikal bebas ini akan menyerang pertumbuhan sel, termasuk DNA, asam lemak tak jenuh (PUFA). Ketika radikal bebas bereaksi dengan PUFA di sel membran mitokondria mengakibatkan struktur dan fungsinya menjadi rusak. Akan tetapi dugaan ini tidak sejalan dengan hasil uji korelasi *Spearman* ($P = 0,235$) yang berarti tidak ada hubungan yang bermakna antara kadar MDA plasma dengan apoptosis indeks dalam penelitian ini.

Hal yang telah dijelaskan di atas sejalan dengan pendapat Keman *et al* (2009) bahwa mitokondria berperan dalam meregulasi proses apoptosis pada preeklampsia. Apoptosis dapat terjadi dalam sel trofoblas dengan melibatkan mitokondria melalui salah satu jalur apoptosis yaitu protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam *TNF Receptor family*) beserta Fas ligand, yang disebut sebagai TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) membentuk jalur apoptosis dan disebut sebagai *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway*, namun hal ini bukanlah bagian dari proses jalur apoptosis dengan *Mitochondrial pathway (Intrinsic pathway)*.

Selain itu pendapat yang berbeda menguraikan bahwa apoptosis pada PE terjadi akibat peningkatan ekspresi protein Bax (Bcl-2 family) di intraseluler sel-sel trofoblas merupakan protein proapoptosis yang akan berinteraksi dengan Bcl-xl atau berikatan secara langsung dengan membran luar mitokondria sehingga terjadinya pelepasan sitokrom-c, yang akan bersama dengan Apaf-1, procaspase-9 dan ATP membentuk apoptosome, yang akan mengaktifkan jalur apoptosis internal (Sujatmiko *et al.*, 2015). Telah diketahui bahwa Bax yang diaktifkan oleh Bid menyebabkan terjadinya *Permeability Transition Pore* (PTP) pada membran luar mitokondria menjadi terbuka sehingga sitokrom-c keluar (bocor) sehingga terjadi apoptosis. Protein (Bcl-2 dan Bcl-xl) mampu mencegah terjadinya PTP ini, sehingga tampak bahwa peningkatan ekspresi protein Bax pada proses apoptosis oleh karena preeklampsia, memberikan bukti keterlibatan mitokondria dalam kejadian apoptosis tersebut (Keman *et al.*, 2009). Pendapat lainnya (Keman *et al.*, 2009) bahwa aktivasi protein Bax tidak sendiri untuk menginduksi terjadinya apoptosis tetapi dalam hal ini p53 (protein 53kDa) juga ikut berperan terutama pada PE berat di sejumlah sel

trofoblasnya sehingga apoptosis indeks lebih tinggi dibandingkan dengan kehamilan normal. Akan tetapi pada penelitian tidak diketahui ekspresi p53 dan Bax sehingga tidak diketahui dengan jelas ekspresi protein yang berperan dalam menginduksi apoptosis.

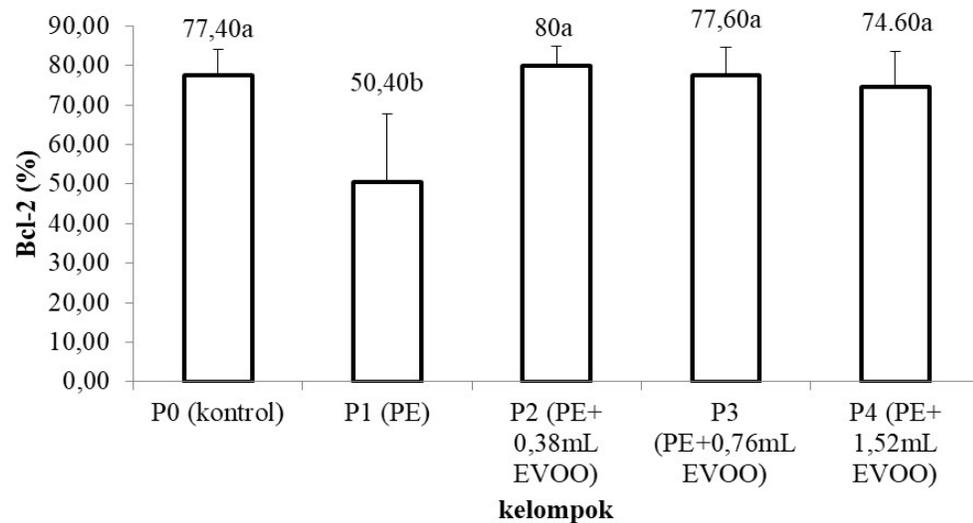
Kelompok perlakuan yang diberi EVOO, apoptosis indeks lebih rendah dari yang tidak mendapatkannya. Hal ini diduga karena kandungan polyfenol (fenol dan α -tokoferol) yang terdapat di dalam EVOO berfungsi sebagai scavenger terhadap ROS dan sebagian besar dari hydrogen peroksida (H_2O_2) yang merupakan bagian dari radikal bebas (Ramos, 2007) sehingga dapat mengurangi stres oksidatif yang menyebabkan apoptosis terjadi berlebihan.

Selain itu kandungan α tokoferol dalam EVOO secara signifikan mampu menghambat MGO (methylglyoxal) yang reaksinya sangat tinggi pada metabolisme glukosa, dan telah diketahui menjadi penyebab kerusakan dan menginduksi apoptosis dalam sel endotel. Penghambatan MGO ini mampu merubah produksi ROS dalam intraseluler sehingga terjadi peningkatan ekspresi protein Bcl-2 dan menurunkan ekspresi protein Bax, yang pada akhirnya dapat mencegah apoptosis sel meningkat lebih luas lagi (Moon ho Do, 2015).

Kandungan α tokoferol yang terdapat dalam EVOO dapat menyerang lipid peroksida yang merupakan hasil dari reaksi antara lipid dan radikal bebas pada membran sel mitokondria sehingga akan melindungi bagian metabolik yang akan mentransformasi bahan bakar energi ke dalam ATP. Oleh karena itu struktur dan fungsi sel membran dapat dipertahankan dari kerusakan akibat serangan dari radikal bebas tersebut. Dalam hal ini α tokoferol yang dapat berikatan dengan TAP akan menginduksi aktivasi JNK, sebagai akibatnya regulasi Hsp70 meningkat sehingga menghambat aktivasi Bax (gen proapoptosis) dan caspase di mitokondria, pada akhirnya apoptosis berlebihan dapat ditekan. Hal ini terbukti dari rerata ekspresi Hsp70 pada kelompok P2 dan P3 lebih tinggi dari kelompok perlakuan lainnya, serta apoptosis indeksnya lebih rendah dibanding yang lainnya, tetapi hasil uji korelasi PPM antara Hsp70 dan apoptosis tidak signifikan ($P = 0,057$).

4.4 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Ekspresi Protein Bcl-2 Tikus Putih Bunting

Hasil pengamatan ekspresi protein Bcl-2 jaringan plasenta dapat dilihat pada Gambar 4.7 berikut ini :



Gambar 4.7 Pengaruh EVOO terhadap ekspresi protein Bcl-2 jaringan plasenta tikus putih bunting. Huruf kecil yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata ($P > 0,05$).

Berdasarkan Gambar 4.7 diketahui bahwa setelah pemberian EVOO ada beda nyata ekspresi protein Bcl-2 antara kelompok kontrol dan perlakuan (uji *Kruskal Wallis*, $P = 0,020$) (lampiran 12). Dalam hal ini, EVOO mempengaruhi peningkatan ekspresi protein Bcl-2 pada kelompok perlakuan yang mendapatkannya. Peningkatan ekspresi protein Bcl-2 pada kelompok perlakuan yang diberi EVOO hampir sama dengan kontrol yaitu dalam kategori *strongly positif*, namun tidak demikian pada P1 (model preeklampsia yang tidak diberi EVOO) masuk dalam kategori *moderately positif* (sedang). Hal ini terbukti secara kuantitatif dari hasil uji Mann Whitney (lampiran 12) bahwa ekspresi protein Bcl-2 pada P1 beda nyata dengan kelompok lainnya yaitu lebih rendah, dan yang paling tinggi adalah kelompok P2, di mana hampir hampir pada seluruh jaringan plasentanya ekspresi Bcl-2 cukup tinggi.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Keman *et al* (2009) dan Teguh *et al* (2010) yang menjelaskan bahwa ada perbedaan yang signifikan ekspresi protein Bcl-

2 pada kelompok normal dan preeklampsia, dimana pada penderita PE terjadi penurunan ekspresi protein Bcl-2. Peneliti lain juga melaporkan bahwa pada PE terjadi penurunan ekspresi protein Bcl-2 di sinsitiotrofoblas sel plasenta yang mengakibatkan pertumbuhan janin terhambat (PJT). Hal ini diakibatkan oleh kegagalan remodeling arteri spiralis yang menginduksi radikal bebas di membran mitokondria sel plasenta sehingga terjadi penurunan ekspresi protein Bcl-2 sehingga memicu terjadinya apoptosis (Ishihara, 2002). Penelitian ini juga sejalan dengan yang ditemukan oleh Arianto (2015), bahwa ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-xl lebih rendah pada kehamilan preeklampsia berat dibandingkan kehamilan normotensi.

Protein (Bax) dapat bekerja dengan membuka saluran Ca^{2+} atau menghambat Bcl-2 sehingga membuat efek anti-apoptotik Bcl-2 terhalang, demikian pula Bad menghambat Bcl-xl. Kerusakan DNA terjadi karena beberapa faktor antara lain AIF yang terletak di intermembran mitokondria, bocor keluar oleh karena pecahnya membran mitokondria kemudian memasuki nukleus dan menimbulkan kerusakan, aktifnya berbagai endonuklease, di antaranya Endonuklease G, PARP (*Poly-ADP Ribose Polimerase*) memicu kematian sel via apoptosis dengan menempuh berbagai jalur (*pathways*) (Riawan, 2004). Salah satu jalur apoptosis tersebut melalui mitokondria yang dimediasi oleh Bax (*Bcl-2 family*), yang mana Bax diaktivasi oleh protein Bid maupun Bad. Bad diaktivasi melalui jalur eksternal (*death receptor*) melalui caspase-8. Bax berinteraksi dengan membran luar mitokondria, yang akan menyebabkan pelepasan sitokrom-c yang akhirnya akan menyebabkan apoptosis sel (Riawan, 2004).

Kandungan antioksidan yang terdapat di dalam EVOO terutama polifenol yang sangat tinggi, ternyata mengandung antioksidan dan sebagai scavenger (Keita *et al.*, 2013). Hal ini dapat diamati pada pada kelompok yang diberi EVOO terjadi peningkatan Bcl-2 akibat penghambatan pelepasan sitokrom-c dari membran mitokondria sehingga apoptosis tidak terjadi secara berlebihan. Berkaitan dengan hal tersebut di atas diduga bahwa kandungan α tokoferol dalam EVOO dapat menekan aktivasi p53. Telah diketahui bahwa peningkatan ekspresi Bcl-2 diduga karena inaktivasi p53 sehingga mencegah pelepasan sitokrom c dengan Apaf1 dan ATP untuk membentuk apoptosome tidak terjadi. Hal ini menyebabkan caspase 9 tidak

dapat diaktifkan sehingga terjadi hambatan apoptosis (Kirkin *et al.*, 2004; Skommer *et al.*, 2010).

Penelitian lain membuktikan bahwa dengan pemberian salep α tokoferol pada bagian punggung belakang mencit setelah terpapar sinar radiasi UV, dapat mengurangi 55% pembentukan dimer cyclobutane pyrimidine gen p53 yang berperan pada patogenesis karsinoma kulit sel squamous (Weixing *et al.*, 2009). Selain itu, peneliti lain menyatakan bahwa dengan pemberian kombinasi vitamin E dan olah raga ternyata mampu menekan radikal bebas yang dapat merusak produksi DNA dari gen p53 sehingga over ekspresinya dapat ditekan pada tumor kelenjar prostat tikus (Dashtiyani *et al.*, 2017).

4.5 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Tekanan Darah Tikus Putih Bunting

Pengukuran tekanan darah dilakukan atas 4 tahap. Pengukuran pertama dilakukan setelah dipastikan kebuntingannya pada hari ke 5. Pengukuran kedua dilakukan pada hari ke 13 setelah kelompok perlakuan diberikan injeksi NaCl 6% sebanyak 3 ml/hari yang dimulai dari hari ke 6 sampai 12 periode kebuntingannya, kontrol tidak diberikan apapun. Pengukuran ketiga dilakukan pada hari ke 18 kebuntingan yaitu setelah diberikan stres akut. Pengukuran keempat dilakukan pada hari ke 20 kebuntingan sebelum pelaksanaan eksekusi. Hasil pengukuran tekanan darah sistolik digunakan sebagai acuan klinis bahwa hewan model mengalami hipertensi dalam kehamilan. Tekanan darah diastolik tidak digunakan sebagai acuan karena pertimbangan alat yang digunakan tidak dapat mendeteksi lebih jauh bunyi terakhir dari diastole. Hasil pengukuran TD dapat diamati pada Tabel 4.1 berikut ini.

Tabel 4.1 Rerata tekanan darah sistole tikus putih bunting

Kelompok	Mean + SD sistole (mmHg) hari ke			
	5	13	18	20
P0 (kontrol)	113,40±15,36	120,20±9,01	124,20±12,85	102,20±22,06
P1 (PE)	106,80±9,44	142,40±15,76*	148,60±12,62	135,60±3,21
P2	101,80±19,56	140,60±9,79*	91,60±7,02	101,40±17,52*
P3	114,60±19,50	143,60±8,96*	115,40±15,11	114,40±17,04*
P4	122±24,32	154,20±18,97*	118,20±13,20	110±9,92*
Jumlah	111,72±17,64	140,20±12,50	119,66±12,16	112,72±13,95

Keterangan. * = signifikan berdasarkan uji *Wilcoxon* (hari ke 5 dan 13, hari ke 13 dan 20)

P2 = PE + EVOO 0,38 mL, P3 = PE + EVOO 0,76 mL, P4 = PE + EVOO 1,52 mL

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa rerata tekanan darah pada hari ke 5 hampir sama antara setiap kelompok atau tidak ada beda nyata (Uji *Anova*, $P = 0,487$) (lampiran 13). Pengukuran hari ke 5 sebelum diberikan NaCl 6% untuk memastikan bahwa seluruh kelompok kontrol dan perlakuan memiliki tekanan darah sistole yang tidak tinggi atau tidak sedang mengalami gejala dari preeklampsia. Pengukuran hari ke 13 diketahui terjadi peningkatan tekanan darah sistole yang signifikan berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* ($P = 0,038$), berarti ada pengaruh pemberian NaCl 6% terhadap peningkatan rerata tekanan darah sistole antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji *Mann Whitney* (lampiran 13) diketahui bahwa pada kelompok perlakuan yang diberi NaCl 6% peningkatan tekanan darah sistole beda nyata dengan kelompok kontrol atau dengan kata lain kelompok perlakuan memiliki tekanan darah sistole lebih tinggi dari kontrol. tertinggi kelompok perlakuan adalah P4, dan terendah pada P2. Hal ini juga didukung dari hasil uji *Wilcoxon* (lampiran 13) bahwa peningkatan rerata tekanan darah sistole signifikan lebih tinggi pada hari ke 13 daripada sebelum diberi NaCl 6% pada hari ke 5 (lihat Tabel 4.1).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian lain (Yudomustopo, 2015) pada tikus bunting bahwa dengan pemberian garam yang tinggi dapat meningkatkan tekanan darah secara signifikan. Hasil penelitian tersebut mendapatkan hasil rerata tekanan darah sistole tikus kontrol $110,18\text{mmHg} \pm 25,34$ dan untuk perlakuan yang diberi NaCl 6% dari hari 21-23 kebuntingan $127,51\text{mmHg} \pm 19,62$ (Yudomustopo, 2015). Berkaitan dengan hal ini bahwa konsumsi garam yang berlebihan dapat menyebabkan hipertensi. Hal ini disebabkan osmolaritas garam yang tinggi mempertahankan air dalam jaringan sehingga volume plasma bertambah. Dengan demikian, beban kerja jantung bertambah berat karena harus melawan resistensi perifer. Tekanan darah yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah, terutama jika ada dinding pembuluh darah yang lemah akibat proses arteriosklerosis (Sherwood, 2004). Akibat pemberian garam yang tinggi atau NaCl 6% ternyata dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah, dan dalam hal ini dapat dijadikan sebagai salah satu cara mendapatkan model PE pada hewan coba.

Hari ke 18 kebuntingan setelah pemberian stres akut selama 30 menit pada tikus putih bunting kelompok perlakuan dengan cara tikus dimasukkan ke dalam

selongsongan yang ukurannya sebesar tubuh tikus tersebut. Kemudian setelah itu, tekanan darah sistole diukur kembali (lihat Tabel 4.1). Berdasarkan hasil uji *Anova* ($P = 0,000$), hasil uji *LSD* (lampiran 13) menunjukkan ada beda nyata tekanan darah sistolik pada kelompok P1 dan P2 secara signifikan dibandingkan dengan kelompok lainnya. Peningkatan tekanan darah sistole kelompok P1 ($148,60 \pm 12,62$ mmHg) signifikan dari kelompok lainnya dan peningkatan tersebut lebih tinggi dari sebelumnya yaitu hari ke 13 ($142,40 \pm 15,76$ mmHg). Sementara itu pada kelompok P2 terjadi penurunan tekanan darah sistole secara signifikan dibanding dengan kelompok lainnya yaitu dari $140,60 \pm 9,79$ mmHg (pada hari ke 13) menjadi $91,60 \pm 7,02$ mmHg.

Setelah diberikan stres akut pada hari ke 18, kelompok P2, P3 dan P4 tidak terjadi peningkatan bahkan cenderung turun. Hal ini membuktikan bahwa pemberian EVOO sebagai antioksidan yang mengandung vitamin E atau tokoferol dapat meredam aktivasi sel endotelium menjadi berkurang sehingga tidak terjadi peningkatan tekanan darah. Berbeda dengan P1 (model PE) terjadi peningkatan tekanan darah sistole dari $142,40 \text{ mmHg} \pm 15,76$ menjadi $148,60 \text{ mmHg} \pm 12,62$. Hal ini terjadi karena stres akut (mengurung tikus sendiri dalam selongsongan) menyebabkan respon reaksi fisik tubuh terhadap ancaman dari luar meningkat, yang melibatkan sistem saraf simpatis untuk sementara waktu meningkatkan tekanan darah. Oleh karena itu, stres akut yang diberikan pada kelompok perlakuan dengan EVOO tidak memberikan efek terhadap peningkatan tekanan darah kelompok tersebut. Berdasarkan temuan ini pembuatan model PE dapat dilakukan dengan pemberian NaCl 6% selama 6 hari (mulai dari hari ke 6 – 12 kebuntingan) dan stress akut (pada hari ke 18 kebuntingan) selama 30 menit.

Hari ke 20 rerata tekanan darah sistole antara kelompok kontrol dan perlakuan berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui $P = 0,010$ (lampiran 13), yang berarti ada pengaruh pemberian EVOO terhadap penurunan tekanan darah secara signifikan. Penurunan tekanan darah hari ke 20 pada kelompok perlakuan yang diberi EVOO tidak jauh berbeda atau hampir sama dengan kontrol. Hasil uji *Mann Whitney* (lampiran 13) diketahui bahwa pada kelompok P1 rerata tekanan darah sistole beda nyata dengan kelompok lainnya atau dengan kata lain lebih tinggi dari lainnya. Berdasarkan uji *Wilcoxon* (lampiran 13, TD hari ke 13 - 20) dapat diketahui bahwa

ada penurunan tekanan darah yang signifikan dari sebelum dan setelah pemberian EVOO khususnya pada kelompok P2, P3 dan P4 (lihat Tabel 4.1)

Kelompok perlakuan yang diberi EVOO memiliki rerata tekanan darah yang hampir sama atau tidak jauh beda dengan kontrol. Namun, untuk kelompok perlakuan P1 rerata tekanan darah ternyata masih tinggi. Hal ini membuktikan bahwa kandungan EVOO selain kaya akan tokoferol, juga kaya kandungan asam lemak tak jenuh, *oleic acid*, fenol ternyata turut berperan serta sebagai efek *cardioprotective*, memperbaiki fungsi jaringan akibat peningkatan MDA (meskipun hasil penelitian ini tidak menunjukkan hubungan yang signifikan antara peningkatan MDA dengan tekanan darah pada hari ke 20) dan memperbaiki respon vasomotor endotelial untuk mencegah kerusakan lebih lanjut (Keita *et al.*, 2013).

Kandungan polifenol, hidroksitirosol dan tirosol pada EVOO dapat meningkatkan produksi NO dan mencegah pembentukan oksidan *peroxynitrite* (merupakan salah satu penyebab stres oksidatif), serta menekan produksi ROS menyebabkan respon endotelial menjadi vasorelaksasi (Keita *et al.*, 2013) sehingga dapat memperbaiki tekanan darah pada tikus. Kelebihan dari EVOO karena memiliki senyawa polifenol yang tidak mengalami kerusakan dan tetap berada dalam keadaan natural, berbeda dengan jenis lainnya seperti “*pure olive oil*” dan “*light olive oil*”. Studi literatur mengungkapkan bahwa EVOO mampu memperbaiki tekanan darah penderita hipertensi kronis dengan mengkonsumsi 2 sendok makan EVOO (sekitar 30-40 gram) setiap hari selama 6 bulan, bahkan sebagian dari penderita hipertensi tersebut dapat melepaskan ketergantungan obat penurun tekanan darah setelah masa 6 bulan berlalu (Villarejo *et al.*, 2016).

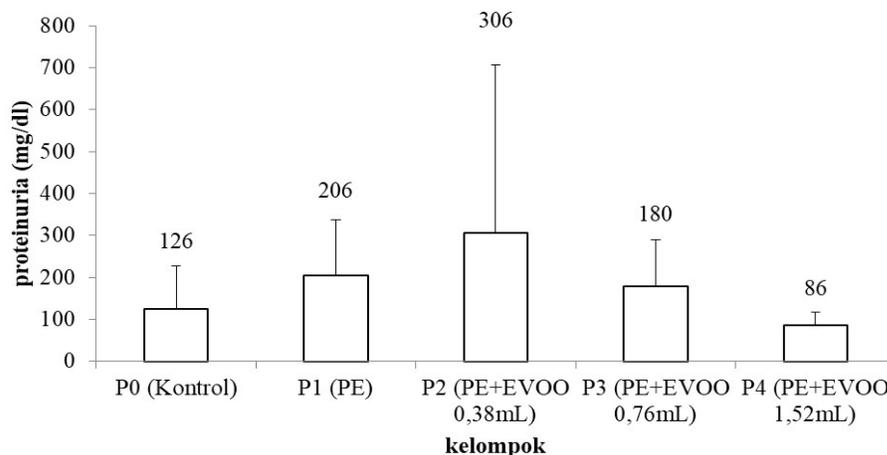
Selain itu kandungan lemak tak jenuh (MUFA) dalam EVOO ternyata mampu menghambat enzim yang mengatur regulasi tekanan darah yaitu ACE (*Angiotensin-Converting Enzim*) atau sebagai ACE inhibitor dan menurunkan kadar NO serta 8-isoprostanes (semacam senyawa prostaglandin dari radikal bebas) yang rendah di dalam urin (Villarejo *et al.*, 2015). ACE merupakan enzim yang berperan dalam sistem renin angiotensi tubuh yang mengatur volume ekstraseluler (misalnya plasma, darah, limfa dan cairan jaringan tubuh) dan vasokonstriksi arteri. Fungsi utama ACE adalah mengubah angiotensin (AT) I menjadi AT II dan degradasi (penghancuran) bradikinin (suatu peptida di dalam tubuh yang membantu untuk

memperbesar atau membuka pembuluh darah sehingga akan menurunkan tekanan darah dan memungkinkan darah mengalir lebih lancar ke seluruh tubuh). Angiotensin I ada di berbagai organ seperti ginjal, kelenjar adrenalin, jantung, pembuluh darah dan otak. Fungsi AT II adalah salah satunya dapat meningkatkan saraf simpatis yaitu vasokonstriksi (penyempitan pembuluh darah) sehingga terjadi peningkatan tekanan darah (Sherwood L, 2004).

Mekanisme penurunan tekanan darah dengan penghambatan ACE (ACE inhibitor) adalah dengan menghambat perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II, dimana angiotensin I adalah vasokonstriktor poten yang juga merangsang sekresi aldosteron. Aldosteron dalam hal ini akan menyerap kembali lebih banyak ion natrium (Na^+) dan air, sehingga meningkatkan volume dan tekanan darah. ACE inhibitor juga menghambat degradasi bradikinin dan merangsang sintesa zat-zat yang menyebabkan vasodilatasi, termasuk PGE2 (prostaglandin E2 yang dikeluarkan oleh dinding pembuluh darah sebagai respon terhadap infeksi atau inflamasi) dan prostasiklin. Akibat penghambatan ACE maka terjadi peningkatan bradikinin sehingga berefek terhadap penurunan tekanan darah inhibitor (Sherwood L, 2004).

4.6 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar Proteinuria pada Tikus Putih Bunting

Pengukuran proteinuria dilakukan setelah pemberian EVOO yaitu pada hari ke 20 kebuntingan dengan pertimbangan bahwa protein dalam urin biasanya akan tampak pada akhir trimester kehamilan, bahkan terkadang tidak selalu ditemukan pada penderita PE. Pengambilan urin dilakukan sebelum tikus putih bunting dieksekusi. Pengukuran proteinuria menggunakan metode urine dipstick. Hasil pengukuran proteinuria adalah kualitatif, maka untuk menganalisis data dilakukan konversi hasil tersebut ke kuantitatif. Hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui $P = 0,559$ (lampiran 14) yang berarti tidak ada pengaruh EVOO yang nyata terhadap proteinuria tikus putih antara kelompok kontrol dan perlakuan. Sekitar 52% tikus bunting mengalami proteinuria derajat +1 atau 100 mg/dl seperti pada Gambar 4.8 berikut ini.



Gambar 4.8 Pengaruh EVOO terhadap proteinuria tikus putih bunting.

Berdasarkan Gambar 4.8 diketahui bahwa kandungan proteinuria tertinggi adalah kelompok P2, jika dikonversikan secara kualitatif adalah +3. Kelompok P2 memiliki proteinuria lebih tinggi dari P1 (model PE). Sebaliknya kelompok P4 memiliki proteinuria lebih rendah dari P0 (kontrol). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini diketahui pada kelompok P0 dan P4 dengan proteinuria rata-rata +1 diduga hasil pemeriksaan *trace* atau positif palsu, sehingga untuk mengetahui dengan pasti kandungan protein dalam urin harus dilakukan pengukuran kuantitatif. Oleh karena keterbatasan alat dan kondisi, maka hal ini tidak dapat dilakukan.

Selain itu menurut Salma (2012) proteinuria dengan *trace* dapat disebabkan oleh hematuria, tingginya substansi molecular, infus polivinilpirolidon (pengganti darah), obat, pencemaran urine oleh senyawa aminonium kuaterner (pembersih kulit, klorheksidin), urine yang sangat basa ($\text{pH} > 8$) karena mengandung fosfat. Dalam penelitian ini ditemukan juga pada kelompok kontrol terdapat proteinuria, hal ini berbeda dengan yang ditemukan oleh Lintang (2003) bahwa tidak satupun hamil normotensif mempunyai gejala proteinuria. Namun berbeda dengan yang ditemukan oleh Arcana (2009) bahwa pada kontrol justru terdapat proteinuria yang tinggi dan bermakna dibanding dengan kelompok PE.

Hasil penelitian ini pada kelompok P1 dan P2 ditemukan rata-rata kadar proteinuria $> 200\text{mg/dl}$ atau +2. Sebaliknya pada kelompok P3 dan P4 derajat proteinuria $\leq 200\text{mg/dl}$. Proteinuria ditemukan oleh Lintang (2003) pada PE berat

dengan derajat bervariasi yaitu +2 hingga +4, demikian juga PE ringan memiliki derajat proteinuria +1 sampai dengan +2.

Jika dijumpai proteinuria lebih dari 0,25 mg/24 jam atau +1 dalam urin pada penderita PE, merupakan prognosa yang jelek (Lintang, 2003). Studi lain melaporkan proteinuria +3 pada PE berat dijumpai hanya 36 % (Brown, 2003). Peneliti lain juga melaporkan bahwa pada penderita eklampsia dijumpai rerata proteinuria 4,5 g/24 jam, dan PE berat memiliki rerata proteinuria 2.5 g/24 jam. Jadi proteinuria merupakan pertanda beratnya PE (Lintang, 2003). Proteinuria pada PE timbul akibat disfungsi endotel yang menyebabkan permeabilitas vaskular meningkat sehingga terjadi edema dan proteinuria (Dharma, 2005).

Seperti telah diketahui bahwa organ ginjal juga mengalami perubahan pada PE karena menurunnya aliran darah ke ginjal akibat hipovolemia. Kerusakan sel glomerulus mengakibatkan meningkatnya permeabilitas membran basalis sehingga terjadi kebocoran dan mengakibatkan proteinuria. Proteinuria dapat terjadi pada akhir kehamilan, sehingga sering dijumpai PE tanpa proteinuria karena janin lebih dulu lahir. Umumnya 80% PE ditandai dengan edema dan hipertensi serta proteinuria, maka hal ini terjadi karena hipoalbuminemia atau kerusakan sel endotel kapiler (Brown, 2003).

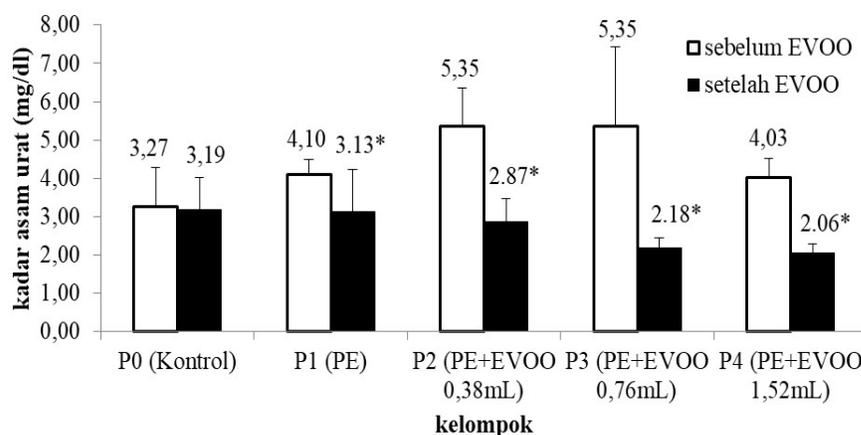
Berdasarkan penelitian ini ditemukan bahwa pada kelompok perlakuan P3 dan P4 memiliki proteinuria lebih rendah dari kelompok perlakuan lainnya. Hal ini diduga bahwa kandungan α tokoferol yang terdapat dalam EVOO berperan sebagai scavenger terhadap radikal bebas dan mampu mencegah oksidasi pada lipid sehingga dapat mempertahankan vaskularisasi renal dan integritas fungsi serta struktur glomerulus (Chan W *et al.*, 1998. Attia *et al.*, 2001). Dalam hal ini α tokoferol mampu meningkatkan NOS (Nitric Oxide Synthase) sehingga dapat menurunkan kadar proteinuria. Akibat stres oksidatif terjadi penurunan NOS secara kronis. NOS yang dihambat dapat menyebabkan kerusakan glomerulus sehingga terjadi kebocoran mengakibatkan protein keluar (Attia *et al.*, 2001).

Berbeda dengan kelompok P2 yang diberi EVOO dosis rendah ditemukan proteinuria lebih tinggi dari P1 (model PE), meskipun tekanan darahnya sudah turun ke normal. EVOO yang diberikan dalam penelitian ini selama seminggu diduga ternyata belum mampu memberi pengaruh untuk perbaikan glomerulus ginjal yang

bocor. Sehingga pada kelompok P2 proteinuria masih tetap tinggi. Sebenarnya jika tidak ada penyakit ginjal yang mendasari, proteinuria berangsur-angsur berkurang setelah ± 1 minggu pasca persalinan dengan membaiknya tekanan darah. Sebagaimana diketahui adanya proteinuria akan mempengaruhi protein didalam darah, namun pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap kadar protein total dalam darah serta kadar masing- masing fraksi protein pada serum darah dari kelima kelompok yang diteliti, selain itu perlu dipertimbangkan untuk pemeriksaan urin secara kuantitatif menggunakan urine tampung per 24 jam.

4.7 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Kadar Asam Urat Darah Tikus Putih Bunting

Pengukuran kadar asam urat dilakukan 2 kali. Pengukuran pertama dilakukan setelah pemberian NaCl 6% pada hari ke 13 (dalam hal ini disebut sebelum pemberian EVOO) dan kedua setelah pemberian EVOO yaitu hari ke 20. Uji *Kruskal Wallis* (lampiran 15) dilakukan karena data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Gambar 4.9 berikut ini.



Gambar 4.9 Pengaruh pemberian EVOO terhadap rerata kadar asam urat (mg/dl) tikus putih bunting.

Keterangan:

* signifikan berdasarkan uji *Wilcoxon*

Berdasarkan Gambar 4.9 diketahui tidak ada pengaruh yang nyata setelah pemberian NaCl 6% terhadap peningkatan rerata kadar asam urat antara kelompok kontrol dan perlakuan (berdasarkan uji *Kruskal Wallis* diketahui $P = 0,052$) atau dengan kata lain tidak ada perbedaan yang bermakna rerata kadar asam urat sebelum pemberian EVOO. Demikian juga setelah pemberian EVOO tidak ada perbedaan

yang bermakna (uji *Kruskal Wallis* diketahui $P = 0,070$) rerata kadar asam urat antara kelompok kontrol dan perlakuan. Meskipun demikian, berdasarkan uji *Wilcoxon* (lampiran 15) diketahui ada penurunan rerata kadar asam urat yang signifikan sebelum dan setelah pemberian EVOO pada kelompok perlakuan. Khusus untuk kelompok kontrol dan P1 yang tidak diberi EVOO ternyata terjadi penurunan rerata kadar asam urat darah pada hari ke 20.

Setelah pemberian NaCl 6% (hari ke 13) pada kelompok perlakuan tikus putih bunting didapatkan rerata kadar asam urat masih di bawah nilai normal yang ditetapkan yaitu < 5 mg/dl. Rerata kadar asam urat darah pada kelompok kontrol $3,27$ mg/dl $\pm 1,02$ lebih rendah yang didapat oleh Sumanti *et al* (2013) pada wanita hamil normal $3,43$ mg/dl $\pm 0,14$, dimana peneliti tersebut mengambil *cut of point* rerata kadar asam urat serum $4,8$ mg/dl. Sedangkan pada kelompok perlakuan umumnya rerata kadar asam urat lebih tinggi dari kontrol. Jika diambil *cut of point* dari Sumanti maka beberapa kelompok perlakuan pada penelitian ini seperti P2 dan P3 mengalami peningkatan asam urat, namun tidak demikian pada perlakuan lainnya. Lebih lanjut Sumanti *et al* (2013) menjelaskan bahwa kadar asam urat serum merupakan salah satu biomarker untuk terjadinya preeklampsia bahkan menganjurkan pemeriksaan serial kadarnya pada ibu hamil saat pelayanan antenatal.

Peningkatan asam urat pada kelompok perlakuan setelah pemberian NaCl 6% dibarengi dengan peningkatan tekanan darah juga dalam penelitian ini diduga kemungkinan ada hubungan antara peningkatan asam urat dan hipertensi. Hal ini sejalan dengan hasil studi lainnya yang mengumpulkan data preklinis dan observasi menunjukkan bahwa asam urat dapat berperan dalam berkembangnya hipertensi. Pada hewan percobaan, hiperurisemia menyebabkan peningkatan tekanan darah. Beberapa penelitian prospektif menunjukkan bahwa kadar asam urat serum yang lebih tinggi dapat memprediksikan peningkatan tekanan darah dan timbulnya hipertensi pada sampel yang normotensi. Dilaporkan bahwa kadar asam urat yang tinggi berhubungan dengan peningkatan reabsorpsi natrium tubulus proksimal (Tziomalos *et al.*, 2010). Berbeda dengan hasil uji korelasi *Spearman* dalam penelitian tidak menunjukkan hubungan yang bermakna ($P = 0,069$), meskipun faktanya seluruh kelompok perlakuan terjadi peningkatan tekanan darah. Begitu juga dengan penurunan rerata asam urat setelah pemberian EVOO dibarengi dengan

penurunan tekanan darah, tetapi hasil uji korelasi *Spearman* diketahui tidak terdapat hubungan yang bermakna ($P = 0,410$). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian yang lain maka hasil penelitian ini sejalan, menyatakan bahwa pada manusia bahwa tidak ditemukan korelasi antara kadar asam urat serum dan kejadian hipertensi pada laki-laki usia lanjut (Hsu *et al.*, 2013).

Mekanisme yang berperan dalam tingginya kadar asam urat serum pada hipertensi karena reabsorpsi pada tubulus proksimal meningkat sebagai akibat dari berkurangnya aliran darah ke ginjal, dalam hal ini ada hubungannya dengan hipovolemia yang merupakan kondisi terkait PE. Penyakit mikrovaskular renal menyebabkan iskemia jaringan dan peningkatan regulasi dari NO sehingga meningkatkan produksi asam urat serum. Reduksi sekresi asam urat pada tubulus proksimal dan penggunaan diuretik juga dapat meningkatkan kadar asam urat (Adriana *et al.*, 2010 ; Pasalic *et al.*, 2012).

Jika terjadi peningkatan asam urat seperti pada PE, hal ini akibat dari *Glomerular Capillary Endoteliosis* karena sel endotel glomerular yang membengkak disertai deposit fibril, gagal ginjal akut hingga nekrosis tubulus ginjal. Bila sebagian besar kedua korteks ginjal mengalami nekrosis, maka korteks ginjal akan nekrosis yang bersifat irreversibel. Asam urat diduga ikut berperan pada terjadinya disfungsi endotel. Hiperurisemia pada penelitian yang lain ternyata dapat menghambat sistem NO pada ginjal. Asam urat juga dapat menghambat produksi NO pada kultur sel endotel (Irawiraman *et al.*, 2010).

Adanya disfungsi endotel ditandai dengan gangguan vasodilatasi yang timbul akibat peningkatan aktivitas radikal bebas yang mengganggu sintesis dan meningkatkan degradasi NO. Percobaan pada tikus, terbukti asam urat berperan pada disfungsi endotel. Asam urat masuk ke dalam sel otot polos pembuluh darah, melalui transporter anion organik. Di dalam sel, asam urat akan merangsang MAP kinase, yang selanjutnya akan menginduksi COX-2, meningkatkan tromboksan-2 dan menyebabkan peningkatan PDGF-2 dan proliferasi sel (Irawiraman *et al.*, 2010).

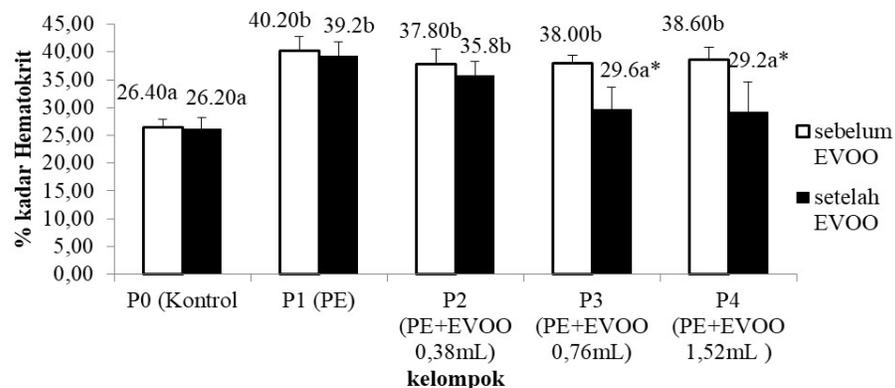
Berkaitan dengan hal ini diketahui bahwa asam urat berasal dari purin yang merupakan jenis protein golongan nukleo-protein. Selain didapat dari makanan, purin juga berasal dari penghancuran sel-sel tubuh yang sudah tua. Pembuatan atau sintesis purin juga bisa dilakukan oleh tubuh sendiri dari bahan-bahan seperti CO₂, glutamin,

glisin, asam urat, dan asam fosfat. Diduga metabolit purin diangkut ke hati, lalu mengalami oksidasi menjadi asam urat.

Hari ke 20 setelah pemberian EVOO pada kelompok perlakuan terjadi kecenderungan penurunan rerata kadar asam urat dari sebelumnya yang nyata (uji *Wilcoxon*). Penurunan rerata kadar asam urat ini diduga karena kandungan zat klorin di dalam EVOO yang dapat membantu mempercepat mengeluarkan zat sisa bagi tubuh. Dengan demikian zat asam yang telah tertimbun di dalam tubuh dapat keluar dengan bantuan zat tersebut (Keita, 2013). Oleh karena itu pemberian EVOO dapat menurunkan rerata kadar asam urat dalam darah.

4.8 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Nilai Hematokrit Tikus Putih Bunting

Pengukuran nilai hematokrit tikus putih bunting sebanyak 2 kali. Pengukuran pertama dilakukan setelah pemberian NaCl 6% (dalam hal ini disebut sebelum pemberian EVOO), dan kedua setelah pemberian EVOO. Gambar 4.10 menampilkan hasil pengukuran nilai hematokrit tikus putih bunting tersebut.



Gambar 4.10 Pengaruh pemberian EVOO terhadap rerata kadar hematokrit (%) tikus putih bunting. Huruf kecil yang sama tidak ada beda nyata ($P > 0,05$)

Keterangan: *signifikan uji *Wilcoxon*

Berdasarkan Gambar 4.10 diketahui setelah pemberian NaCl 6% atau sebelum pemberian EVOO pada kelompok perlakuan terjadi peningkatan hematokrit yang signifikan dibanding kontrol (berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* (lampiran 16) diketahui $P = 0,008$) atau dengan kata lain ada pengaruh pemberian NaCl 6% terhadap rerata nilai hematokrit tikus putih bunting. Setelah pemberian EVOO nilai hematokrit cenderung menurun terutama pada kelompok perlakuan yang diberi

EVOO. Penurunan tersebut signifikan terutama pada kelompok P3 dan P4 (berdasarkan uji *Wilcoxon*, lampiran 16). Pemberian EVOO berpengaruh terhadap nilai hematokrit dan berbeda nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan (berdasarkan uji *Anova* $P = 0.000$).

Rujukan rerata nilai hematokrit adalah 36 – 52%. Penelitian ini tidak menemukan nilai hematokrit di atas nilai rujukan setelah pemberian NaCl 6%. Kelompok kontrol memiliki nilai hematokrit di bawah nilai rujukan (26,40%). Khusus untuk kelompok perlakuan, nilai hematokritnya masih berada di batas normal (berdasarkan nilai rujukan), namun lebih tinggi dibanding kontrol.

Nilai hematokrit yang didapat dalam penelitian ini, khususnya pada tikus putih bunting model preeklampsia sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa peningkatan hematokrit sejalan dengan penurunan volume plasma darah, mengakibatkan viskositas darah semakin besar sehingga aliran darah ke beberapa organ menurun, pada akhirnya terjadi resistensi perifer, menyebabkan vasokonstriksi dan selanjutnya terjadi hipertensi (Brown, 2003).

Secara teori pada kehamilan normal volume plasma meningkat (hipervolemia) guna memenuhi kebutuhan pertumbuhan janin. Sebaliknya pada PE akibat hipoksia plasenta yang terjadi maka menyebabkan zat-zat toksik dan radikal bebas berada dalam sirkulasi darah ibu. Hal ini kemudian akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif, pada tahap berikutnya bersama zat toksik yang beredar akan merangsang terjadinya kerusakan sel endotel pembuluh darah penderita preeklampsia (Robert JM, 2004).

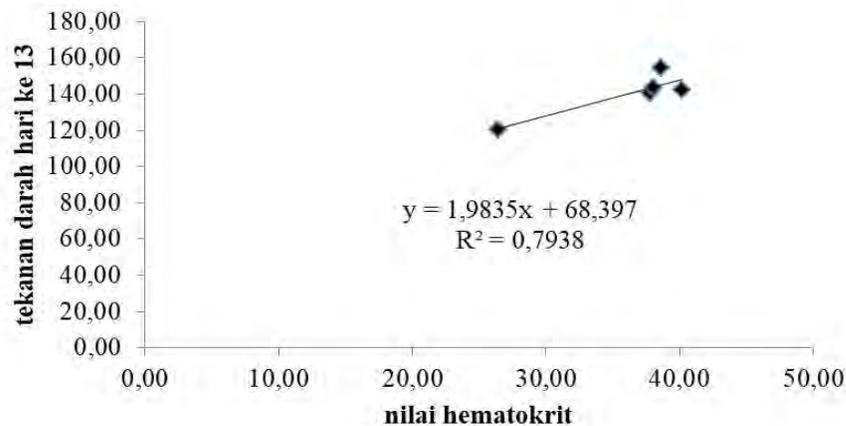
Disfungsi endotel mengakibatkan terjadi ketidakseimbangan produksi zat-zat yang bertindak sebagai vasodilator, sehingga terjadi vasospasme (Roeshadi, 2006). Vasospasme yang berkelanjutan akan menyebabkan integritas endotel pembuluh darah rusak, sehingga plasma darah bergeser ke ruang interstitial. Akibatnya volume plasma menurun (hipovolemia) antara 30 – 40% sehingga menyebabkan hemokonsentrasi. Hemokonsentrasi dapat dinilai dari hematocrit (Roeshadi, 2006).

Hemokonsentrasi terjadi akibat peningkatan viskositas darah sehingga seperti molekul makro diantaranya fibrinogen dan hematokrit meningkat. Hemokonsentrasi yang meningkat menyebabkan resistensi perifer meningkat, sehingga aliran darah ke organ menurun (perfusi jaringan semakin berkurang pada seluruh organ) yang

kemudian akan memperburuk preeklamsia itu sendiri. (Brown, 2003; Roeshadi, 2006).

Oleh karena itu, viskositas darah yang semakin besar disebabkan oleh peningkatan nilai hematokrit dan fibrinogen. Meskipun demikian peningkatan hematokrit tidak hanya mempengaruhi viskositas darah dan resistensi karena intrinsik aliran darah, tetapi juga resistensi vaskuler pembuluh kecil pada organ. Diketahui bahwa peningkatan viskositas yang berkelanjutan dapat menurunkan perfusi dan meningkatkan tekanan darah. Peningkatan viskositas darah itu sendiri memiliki dua efek dalam sistem kardiovaskular yaitu bertindak untuk meningkatkan tegangan gesekan pada endotel dan meningkatkan pengeluaran NO, sehingga menyebabkan vasodilatasi serta peningkatan komponen resistensi viskositas pembuluh darah (Roeshadi, 2006).

Dengan demikian peningkatan kekentalan darah dapat menyebabkan vasodilatasi, yang memiliki efek non-linear cukup besar dalam menurunkan resistensi pembuluh darah perifer untuk menetralkan peningkatan karena viskositas (Sherwood, 2004). Peningkatan rerata hematokrit setelah induksi NaCl 6% dalam penelitian ini sejalan dengan peningkatan tekanan darah hari ke 13. Berdasarkan hasil uji korelasi *Spearman* mendapatkan $P = 0,009$ dengan kekuatan hubungan sedang (50,9%). Hubungan korelasi ini dapat diketahui dari Gambar 4.11 berikut ini.



Gambar 4.11 Hubungan peningkatan tekanan darah hari ke 13 dengan nilai hematokrit.

Gambar 4.11 menunjukkan korelasi antara nilai hematokrit dan tekanan darah hari ke 13 berdasarkan model persamaan $Y = 1,983 + 68,39$ dengan nilai $R^2 = 0,7938$.

Model persamaan ini menggambarkan hasil hubungan yang positif dan kuat, maka dapat diartikan bahwa semakin tinggi nilai hematokrit kemungkinan dapat terjadi peningkatan tekanan darah, begitu juga sebaliknya. Namun model ini hanya menggambarkan hubungan nilai hematokrit dan tekanan darah sebesar 79,3% berarti 20,7% lagi ada faktor lain yang berpengaruh tetapi belum terungkap dalam penelitian ini.

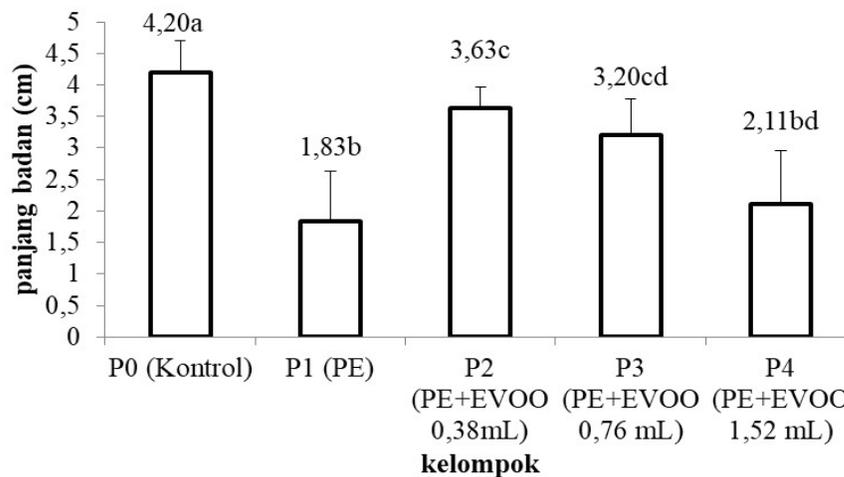
Studi lain juga menyatakan bahwa ada hubungan yang bermakna antara peningkatan nilai hematokrit dengan peningkatan derajat PE ringan menjadi PE berat (Gana, 2010). Selain itu, dampak peningkatan hematokrit juga terjadi pada fetus, karena hemokonsentrasi yang terjadi disebabkan oleh penurunan volume plasma menyebabkan terjadi hipoperfusi jaringan. Makin tinggi hemokonsentrasi, yaitu hematokrit 35-38%, janin resiko relatif mati sebesar 3,2 kali, sedangkan hematocrit > 38% maka resiko janin lahir mati 7,6 kali (Kawuryan, 2004). Dalam penelitian ini kelompok P1 dengan nilai hematokrit paling tinggi dibanding dengan kelompok lainnya memiliki fetus lahir mati sekitar 71,43 %.

Penurunan rerata hematokrit kelompok perlakuan yang diberi EVOO sebenarnya tidak berdiri sendiri tetapi berkaitan dengan tekanan darah. Dalam hal ini pada kelompok perlakuan yang diberi EVOO ternyata dapat memperbaiki tekanan. Peningkatan volume plasma tersebut mengakibatkan viskositas dan kekentalan darah sehingga mengakibatkan volume plasma dalam darah kembali meningkat. Peningkatan volume plasma tersebut mengakibatkan viskositas dan kekentalan darah menurun sehingga nilai hematokrit menurun. Meskipun hasil uji korelasi *Spearman* tidak ada hubungan antara nilai hematokrit setelah pemberian EVOO dan tekanan darah hari ke 20 ($P = 0,139$).

4.9 Pengaruh Pemberian EVOO Terhadap Morfometri Fetus (Berat Badan, Panjang Badan) dan Jumlah Implantasi (Fetus Hidup Atau Mati)

Telah dilakukan *laparotomi dan torakotomi* pada tikus putih bunting untuk mengetahui jumlah implantasi fetus yang hidup atau mati pada hari ke 20 sebelum tikus melahirkan secara normal. Tikus dianestesi dengan ketamin 0,3ml/im sebelum eksekusi. Jaringan uterus dibuka satu persatu untuk mengangkat fetus yang ada, kemudian ditimbang dan diukur panjang badannya serta dipastikan fetus hidup atau

mati dengan cara menyentuhnya, jika tidak ada respon maka fetus dinyatakan mati. Fetus-fetus tersebut dikelompokkan sesuai dengan induknya, kemudian data yang didapat dari berat badan, panjang badan dan berat plasenta dikumpulkan. Uji *Kruskal Wallis* dilakukan untuk data BB dan PB fetus. Uji *Anova* dilakukan untuk data berat plasenta. Gambar 4.12 menjelaskan tentang rerata BBL dan berat plasenta tikus putih kelompok kontrol dan perlakuan.



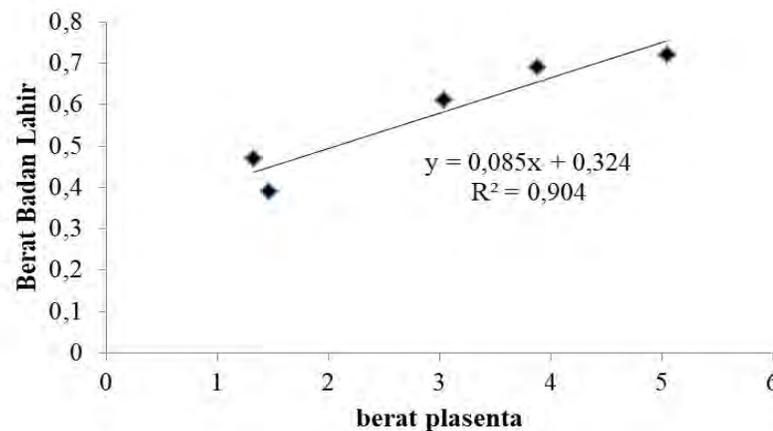
Gambar 4.12 Pengaruh EVOO terhadap BBL dan berat plasenta fetus tikus putih. Huruf kecil yang sama tidak ada beda nyata ($P > 0,05$).

Berdasarkan Gambar 4.12 diketahui bahwa ada pengaruh pemberian EVOO yang signifikan terhadap BBL fetus tikus putih (berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* $P = 0,006$, lampiran 17) atau dengan kata lain BBL kelompok kontrol maupun perlakuan beda nyata. Berat badan lahir fetus kelompok kontrol dalam penelitian ini yaitu 5,05 gram (rujukan 2 – 3 gram), lebih besar dari biasanya dan berbeda seperti yang didapatkan oleh Nelawati (2016) bahwa BBL fetus normal 3,2 gram. Telah diketahui bahwa bobot lahir tikus dipengaruhi oleh pertumbuhan fetus sebelum lahir atau pertumbuhan selama kebuntingan (Kusumawati, 2004).

Kelompok perlakuan tikus putih bunting yang dipaparkan dengan NaCl 6% selama masa organogenesis pada hari ke 6 sampai 13 memiliki BBL lebih rendah dari kontrol, meskipun berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* ada beberapa kelompok yang memiliki BBL hampir sama dengan kontrol khususnya kelompok perlakuan yang diberikan EVOO dengan dosis bervariasi dari dosis ringan (P2) sampai sedang (P3), hal ini berbeda dengan kelompok perlakuan lainnya (P1 dan P4), dimana rerata

BBL di bawah normal. Beberapa faktor yang mempengaruhi berat badan lahir yaitu genotif (36%), lingkungan fetal (30%), lingkungan induk (18%), kesamaan induk (7%), nutrisi induk (6%) dan umur induk (1%) (Nelawati, 2016).

Berat lahir plasenta pada Gambar 4.12 diketahui tidak beda nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan (hasil uji *Anova*, $P = 0,059$) atau dengan kata lain tidak ada pengaruh pemberian EVOO yang signifikan terhadap berat plasenta tikus putih kelompok kontrol maupun perlakuan. Meskipun sebenarnya hasil penelitian ini diketahui bahwa pada kelompok kontrol dengan BBL yang paling berat memiliki plasenta yang lebih berat dibanding dengan kelompok lainnya. Demikian juga pada kelompok P1 dan P4 dengan BBL rendah memiliki berat plasenta yang rendah juga. Berdasarkan hal tersebut diduga kemungkinan ada hubungan berat plasenta dengan BBL fetus. Hal ini diperkuat berdasarkan uji korelasi *Spearman* diketahui $P = 0,000$ (lampiran 17) seperti pada Gambar 4.13 berikut ini.



Gambar 4.13 Hubungan BBL fetus tikus putih dan berat plasenta

Berdasarkan Gambar 4.13 menunjukkan korelasi antara BBL dan berat plasenta dengan model persamaan $Y = 0,085 + 0,324$ dengan nilai $R^2 = 0,904$. Model persamaan ini menggambarkan hasil hubungan yang positif dan sangat kuat, maka dapat diartikan bahwa semakin besar berat badan lahir maka kemungkinan memiliki plasenta yang lebih besar juga, begitu juga sebaliknya. Namun model ini hanya menggambarkan hubungan BBL dan berat plasenta sebesar 90,4% berarti 6% lagi ada faktor lain yang berpengaruh tetapi belum terungkap dalam penelitian ini.

Seperti diketahui bahwa plasenta mempunyai peranan penting dalam memberikan pasokan nutrisi yang adekuat kepada fetus. Oleh karena itu plasenta yang memiliki ukuran lebih besar maka biasanya suplai nutrisi kepada fetus akan lebih besar pula sehingga mempengaruhi BBL nantinya. Kerusakan sel endotel yang terjadi pada plasenta dengan PE menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan terganggu. Selain itu juga diduga bahwa BBL fetus yang rendah berhubungan dengan kadar MDA plasma setelah pemberian EVOO, hal ini didukung oleh uji korelasi *Spearman* (lampiran 17) diketahui $P = 0,010$ dengan koefisien korelasi sebesar $-0,507$ (diasumsikan hubungan ini memiliki kekuatan korelasi yang sedang), berarti semakin tinggi kadar MDA plasma maka kemungkinan semakin rendah BBL fetus begitu juga sebaliknya atau dengan kata lain BBL fetus 50,7% ditentukan oleh kadar MDA plasma.

Peningkatan kadar MDA plasma terjadi akibat pemberian injeksi NaCl 6% pada kelompok tikus dengan PE sehingga BBL rendah. Tubuh sebenarnya memiliki antioksidan endogen untuk melawan radikal bebas tapi apabila kadar radikal bebas terus meningkat maka antioksidan endogen tidak mampu mengimbangi peningkatan tersebut sehingga terjadi stres oksidatif. Pada kondisi stres oksidatif akan terjadi peroksidasi lemak yang pada akhirnya akan merusak sel, selain itu hasil samping berupa MDA juga bersifat sitotoksik bagi sel endotel, sehingga mengakibatkan sel endotel mengalami *disjunction* dengan jaringan di bawahnya sehingga akan terlepas ke dalam sirkulasi (Samsuria, 2009).

Lebih lanjut pada hasil penelitian Samsuria (2009) menjelaskan bahwa dengan terjadinya degradasi NO yang cepat akibat peningkatan ROS sehingga terjadi disfungsi endotel karena bioavailabilitas NO menurun. Radikal superoksida maupun Ox-LDL kolesterol bertanggungjawab atas peningkatan degradasi NO, bahkan radikal superoksida dapat secara langsung menginaktifkan NO melalui proses reaksi cepat membentuk peroksinitrit yang merupakan komponen yang sangat kuat dan memiliki daya hancur lebih kuat daripada superoksida.

Endotel sebenarnya merupakan lapisan sel yang melapisi dinding vaskular yang menghadap ke lumen dan melekat pada jaringan sub-endotel yang terdiri atas kolagen dan berbagai glikosaminoglikan termasuk fibronektin. Fungsi endotel adalah sebagai barrier struktural antara sirkulasi dengan jaringan di sekitarnya. Selain itu

fungsi endotel yang lain diketahui juga turut mengatur tonus vaskular, mencegah trombosis, mengatur aktivitas sistem fibrinolisis, mencegah perlekatan leukosit dan mengatur pertumbuhan vaskular. Substansi vasoaktif yang dikeluarkan endotel antara lain NO yang juga disebut *endotelial-derived relaxing factor* (EDRF), *endotelial-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) prostasiklin (PGI₂), bradikinin, asetilkolin, serotonin dan histamine. Substansi vasokonstriktor antara lain adalah endotelin, *platelet activating factor* (PAF), angiotensi II, prostaglandin H₂, thrombin dan nikotin. Endotel juga berperan pada haemostasis dengan mempertahankan permukaan yang bersifat antitrombotik (Dharma *et al.*, 2005). Jika endotel mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti *shear* stres hemodinamik, stress oksidatif maupun paparan dengan sitokin inflamasi dan hiperkolesterolemia, maka fungsi pengatur menjadi abnormal dan disebut disfungsi endotel.

Kondisi disfungsi endotel yang terjadi secara terus menerus dapat menimbulkan apoptosis, yang kemudian menyebabkan denudasi (pengikisan) endotel dan mempengaruhi jumlah sel endotel plasenta yang masih lengkap. Terjadinya kerusakan sel endotel pada plasenta yaitu terjadi hambatan terhadap distribusi oksigen dan nutrisi sehingga fetus tidak mendapatkan oksigenasi dan nutrisi yang adekuat (Samsuria, 2009) sehingga menyebabkan BBL rendah seperti kelompok P1.

Selain itu preeklampsia mengakibatkan terjadinya infark pada plasenta disebabkan karena oklusi arteria spiralis. Akibat infark plasenta terhadap janin tergantung dari luas infark, serta fungsi plasenta yang masih sehat. Semua ini akan menyebabkan gangguan oksigenasi dan nutrisi pada janin. 44% kematian perinatal karena faktor obstetrik, dimana 65% disebabkan karena insufisiensi plasenta (Brown, 2003). Pada preeklampsia terjadi penurunan volume plasma 30-40% dari kehamilan normal, menimbulkan hemokonsentrasi dan peningkatan viskositas darah, akibatnya hipoperfusi jaringan. Sistem yang paling peka terhadap hipoperfusi adalah uni-fetoplasenta, perfusi fetoplasenta menurun 35-65%. Sindroma pada janin timbul akibat berkurangnya perfusi uteroplasenta dan terjadi gangguan nutrisi dan respirasi. Resiko terhadap janin pada preeklampsia akibat berkurangnya sirkulasi uteroplasenta bisa menyebabkan terjadinya gangguan pertumbuhan dan prematuritas (Brown, 2003).

Terkait dengan hal tersebut di atas sebagai akibat terjadinya stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan lipid peroksida, indikatornya adalah kadar MDA plasma akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan senyawa oksigen reaktif (ROS) yang membentuk hidroperoksida (Setiawan B dan Suhartono E, 2007). Munculnya aksi ROS disebabkan oleh rendahnya sistem antioksidan sehingga aktivitasnya dalam menangkal aksi ROS tersebut menjadi kurang sempurna (Baydas G *et al.*, 2002). Rendahnya sistem pertahanan antioksidan ini disebabkan oleh adanya keterbatasan penyediaan antioksidan oleh berbagai organ tubuh akibat proses pematangan yang tidak lengkap, selain beberapa senyawa yang utamanya ditranspor melalui plasenta, baru terjadi pada trimester III (Dani C *et al.*, 2003). Akibatnya stres oksidatif dan kerusakan oksidatif akan berlangsung dalam tubuh (Hirano *et al.*, 2001). Selain itu, salah satu faktor yang mempengaruhi BB lahir rendah pada PE adalah karena dampak kekurangan gizi akibat rendahnya vaskularisasi uteroplasenta yang mengarah ke gangguan pertumbuhan. Hal inilah yang mengakibatkan terjadi gangguan pertumbuhan pada embrio, dapat ditandai dengan BB lahir rendah, abortus, hingga kematian fetus di dalam kandungan. Sejalan dengan hal tersebut diketahui dari hasil penelitian ini bahwa 71,43% fetus tikus mati pada kelompok perlakuan P1(model preeklampsia).

Selain argumentasi yang telah dikemukakan di atas, diduga ada hubungan antara BBL rendah dengan AI. Contohnya pada kelompok P1 memiliki rerata BBL fetus rendah (< 2 gram) tetapi AI tinggi. Hal ini didukung oleh hasil uji korelasi *Spearman* (lampiran 17) diketahui $P = 0.038$ yang berarti bahwa ada hubungan antara BBL fetus tikus putih dengan AI dengan koefisien korelasi -0,418 (diasumsikan kekuatan hubungan ini sedang), atau dengan kata lain semakin tinggi AI maka semakin rendah BBL fetus, dalam hal ini 41,8% BBL fetus ditentukan oleh AI. Hal ini sejalan seperti yang dilaporkan oleh Teguh *et al* (2010) bahwa ada perbedaan yang bermakna antara AI dengan BB lahir bayi pada penderita preeklampsia dan kontrol.

Berbeda dengan fetus yang diberi EVOO, ternyata pada pemberian dosis rendah dan sedang BBL fetus tidak begitu jauh berbeda atau dengan kata lain BBL fetus sama dengan BBL fetus normal lainnya. Hal ini karena kandungan α -tokoferol mampu menurunkan kadar MDA plasma induk tikus secara signifikan sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sel endotel plasenta karena kemampuannya

dalam memutus rantai reaksi radikal bebas dengan cara bereaksi terhadap radikal peroksid, sehingga mengurangi resiko terjadinya insufisiensi plasenta yang dapat menyebabkan penurunan berat badan bayi (Nelawati, 2016). Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nelawati (2016) tentang manfaat vitamin E pada BBL fetus tikus. Peneliti tersebut menjelaskan bahwa dengan dosis rendah sampai sedang (100-200 mg/kgBB/hari) dapat meningkatkan BBL fetus tikus. Penelitian Nelawati tersebut juga sejalan dengan penelitian Salem (2015) yang melaporkan bahwa fetus tikus putih bunting yang diberi EVOO memiliki BB lahir yang lebih rendah dari kontrol karena memiliki kandungan nutrisi yang seimbang dan penting untuk mengontrol perkembangan lemak yang optimal pada fetal intrauterine sejak dari awal kehamilan karena mengandung MUFA. Salah satu keuntungannya adalah kandungan MUFA tersebut mampu mengurai lemak yang tersimpan, sehingga berat fetus yang dilahirkan tidak terlalu besar, khususnya kelompok perlakuan EVOO dengan dosis rendah dan sedang, BB fetus sedikit di atas rerata.

Berkaitan dengan hal tersebut diduga bahwa EVOO ternyata mampu mengatasi ketidakseimbangan antioksidan di dalam tubuh karena kandungan α tokoferol dapat mencegah kerusakan membran dan modifikasi lipoprotein densitas rendah (Baydas G *et al.*, 2002). Argumentasi ini berdasarkan penelitian lain bahwa pada bayi baru lahir, terdapat korelasi positif antara konsentrasi vitamin E darah tali pusat dan serum ibu. Konsentrasi vitamin E neonatus bergantung pada konsentrasi vitamin E ibu. Selain itu konsentrasi vitamin E di dalam serum bayi dan ibu mempunyai perbandingan tetap, yaitu 1:4, hal ini disebabkan oleh mekanisme transportasi melalui plasenta (Baydas G *et al.*, 2002). Hal ini berbeda dengan bayi prematur memiliki tokoferol total di plasma lebih rendah dibanding bayi aterm (Buonocore G *et al.*, 2002).

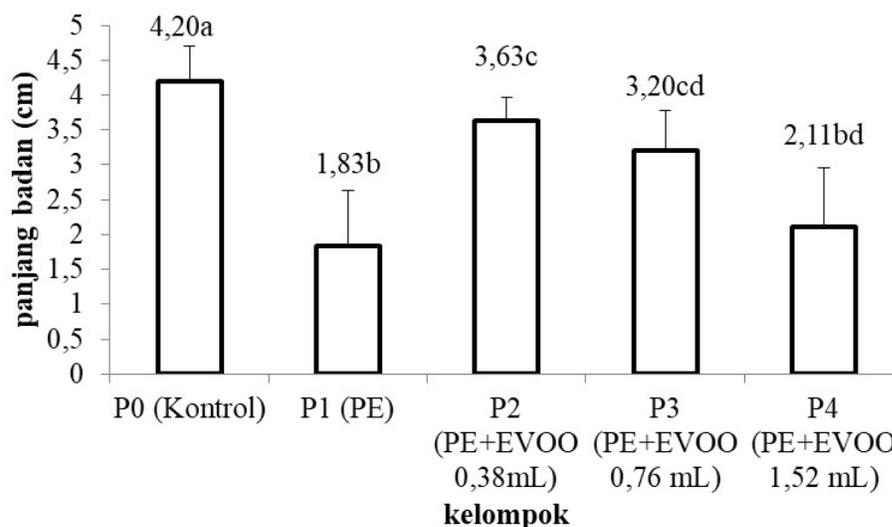
Nelawati (2016) juga mendapatkan bahwa induk tikus yang diberi vitamin E dosis tinggi (400 mg/kgBB/hari) memiliki BBL bayi tikus rendah, hal ini sama seperti yang terjadi pada penelitian ini. Hal ini disebabkan karena pada kondisi tertentu jika diberikan berlebihan maka α - tokoferol (α -TocH) atau vitamin E yang hanya larut dalam lemak dapat menjadi prooksidan kuat untuk LDL. Mekanisme terbentuknya radikal bebas α tokoferol adalah melalui reaksi antara α -TocH dengan LOO- (radikal

peroksilipid) atau ROO- (radikal peroksil), dan juga reaksi radikal bebas α tokoferol dengan PUFA mengandung lemak. Oleh karena itu ternyata α tokoferol mempunyai dua fungsi yang berbeda yaitu dapat menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai pemulung LOO- dan menginisiasi terbentuknya radikal bebas ROO- (Richard, 2001).

Bersamaan dengan hal tersebut, juga telah diketahui bahwa kandungan vitamin E atau tokoferol yang terdapat di dalam EVOO hanya dapat larut dalam lemak, dan metabolisemenya oleh empedu dan hati. Jika berlebih, maka tidak bisa dibuang dan lemak tersebut dapat berubah menjadi radikal bebas dan akhirnya akan merusak membran sel, kondisi ini akan menyebabkan stres oksidatif sehingga menghambat pertumbuhan sel serta menyebabkan kematian (Lopez *et al.*, 2008). Hal ini sejalan juga dengan hasil penelitian, bahwa pada kelompok P4 yang mendapatkan EVOO dosis tinggi diketahui sekitar 41.94% fetus mati.

Pada penelitian ini kelompok P4 yang diberikan dengan dosis tinggi yaitu 1,52 mL/kgBB/hari memiliki rerata BB fetus lebih rendah (1,47g) dari normal. BBL yang rendah pada kelompok P4 ini diduga karena vitamin E atau tokoferol yang terkandung di dalam EVOO hanya dapat larut dalam lemak, dan metabolisemenya oleh empedu dan hati. Jika berlebih, maka tidak bisa dibuang dan lemak tersebut dapat berubah menjadi radikal bebas dan akhirnya akan merusak membran sel, kondisi ini akan menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan pada sel endotel plasenta sehingga fungsi plasenta terganggu yang pada akhirnya plasenta tidak adekuat mensuplai nutrisi ke janin. Suplai nutrisi yang berkurang ke janin mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan janin sehingga menyebabkan kematian embrio tikus putih bunting. Dengan demikian dosis EVOO yang tinggi pada penelitian ini kurang tepat diberikan jika dibandingkan dengan dosis lebih rendah atau sedang.

Gambar 4.14 berikut ini menampilkan grafik PB fetus pada tikus putih kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 4.14 Pengaruh EVOO terhadap PB (cm) fetus tikus putih. Huruf kecil yang sama tidak beda nyata ($P > 0,05$).

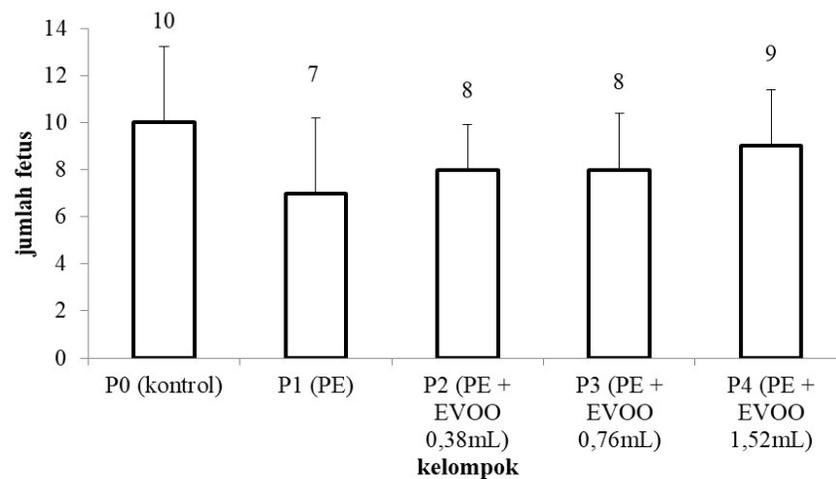
Berdasarkan Gambar 4.14 diketahui ada kecenderungan pada fetus BBL besar maka memiliki badan yang lebih panjang, begitu juga sebaliknya. Hal ini juga didukung oleh hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui $P = 0,001$ (lampiran 17) yang berarti ada pengaruh pemberian EVOO terhadap panjang badan fetus tikus putih. Kelompok kontrol memiliki badan yang lebih panjang dari kelompok lainnya. Kelompok P2 dan P3 memiliki panjang badan yang hampir sama, demikian juga pada P4 dan P1 dengan panjang badan yang tidak berbeda. Panjang badan fetus tikus putih dalam penelitian ini diduga ada hubungannya dengan BBL, berdasarkan korelasi *Spearman* diketahui $P = 0,000$ dengan koefisien korelasi 0,935 (diasumsikan bahwa hubungan ini sangat kuat), yang berarti semakin besar BBL fetus maka semakin panjang badannya atau panjang badan lahir 93,5% ditentukan oleh BBL fetus.

Rerata PB kelompok kontrol dalam penelitian ini 4,20 cm $\pm 0,51$ lebih panjang dari PB normal (0,5-1,5 cm, sumber Kusumawati, 2004). Namun pada penelitian lain mendapatkan rerata PB fetus tikus 36,676 mm (3,67cm) (Wijayanto *et al.*, 2007). Seluruh kelompok perlakuan dalam penelitian ini memiliki rerata PB di atas rata-rata, namun pada P1 rerata PB fetus lebih pendek dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, meskipun masih di atas rata-rata (1,83 cm $\pm 0,81$).

Selain itu juga ditemukan dalam penelitian ini bahwa ternyata berat plasenta berhubungan secara signifikan dengan PB. Hal ini sejalan apa yang dijelaskan oleh Kusumawardana *et al* (2014) bahwa penurunan berat plasenta akan mengakibatkan penurunan BBL dan PB. Korelasi yang sangat kuat antara BBL dan PB fetus diduga dipengaruhi oleh perbedaan susunan morfologi plasenta, karakteristik dan densitas dari sel trophoblast, ditambah dengan akibat penurunan aliran darah ke plasenta sehingga menyebabkan penurunan oksigenisasi, absorpsi nutrisi dan aliran darah plasenta ke fetus.

Hasil penelitian ini juga sejalan apa yang ditemukan oleh Kusumawardana *et al* (2014) bahwa rerata PB pada kelompok kontrol 4,8 cm, dengan berat plasenta berkisar 0,62 gram dan BBL 4,08 gram. Sementara itu rerata berat plasenta kelompok kontrol pada penelitian ini berkisar $0,72 \text{ gram} \pm 0,05$. Jika diamati keseluruhan ukurannya ini tidak jauh berbeda atau hampir sama. Oleh karena itu dapat diketahui bahwa berat plasenta sangat mempengaruhi ukuran BBL dan PB fetus, karena plasenta merupakan pusat nutrisi bagi pertumbuhan dan perkembangan fetus.

Seperti telah diketahui bahwa sirkulasi aliran darah plasenta merupakan awal dari pertumbuhan dan perkembangan embrio atau plasenta itu sendiri. Peningkatan pertukaran transplasenta akan mendukung peningkatan eksponen lain pada perkembangan fetal selama masa pertengahan kehamilan, hal ini sangat tergantung pada perkembangan aliran darah plasenta dan hasilnya akan terjadi peningkatan aliran darah umbilical uterine. Perkembangan vaskularisasi pada plasenta sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan fetus tentunya (Kusumawardana *et al.*, 2014). Maka dalam hal ini keterkaitan antara berat plasenta, BBL dan PB sangat kuat sekali dan saling mempengaruhi satu sama lain. Gambar 4.15 berikut ini tentang jumlah fetus (fetus hidup dan mati) yang berasal dari induk tikus putih.



Gambar 4.15 Pengaruh EVOO terhadap jumlah fetus tikus putih.

Berdasarkan Gambar 4.15 diketahui bahwa tidak ada pengaruh EVOO yang signifikan terhadap jumlah fetus tikus putih, atau dengan kata lain tidak ada beda nyata jumlah fetus pada kelompok kontrol maupun perlakuan (uji *Anova*, $P = 0,715$). Kelompok kontrol umumnya memiliki jumlah fetus lebih banyak, dan P1 umumnya memiliki jumlah fetus lebih sedikit dari yang lainnya. Selain fetus mati yang terjadi pada kelompok P1 dan P4, ditemukan juga dalam penelitian ini beberapa fetus ada yang tidak jadi pembentukannya walaupun kehamilannya aterm, dan ada beberapa induk mengalami keguguran (khusus pada kelompok P1). Jumlah fetus yang dilahirkan oleh tikus putih dalam penelitian ini tidak ada hubungannya dengan BBL, hal ini didukung oleh hasil uji korelasi *Spearman* $P = 0,145$.

Dampak preeklampsia pada fetus adalah kekurangan gizi akibat kekurangan vascular uteroplasenta, pada akhirnya mengakibatkan gangguan pertumbuhan sehingga kesehatan fetus serta berat badannya terganggu, dan mungkin dapat menyebabkan kematian fetus. Hal ini dapat diketahui bahwa pada kelompok P1 (model preeklampsia) dari 36 fetus yang dilahirkan, sekitar 71,43% fetus mati. Pada kelompok P4 (model preeklampsia yang diberi EVOO dosis 1,52mL) yaitu sekitar 41,94% fetus mati dari total fetus 44 ekor yang dilahirkan. Vasokonstriksi yang merupakan salah satu patogenesis terjadinya preeklampsia menimbulkan peningkatan total perifer resisten dan hipertensi, sehingga menyebabkan terjadinya hipoksia pada sel endotel khususnya pada arteri spiralis. Kondisi ini menyebabkan penurunan perfusi utero plasenta yang pada plasenta menyebabkan terjadi proses hiperoksidase

sehingga membutuhkan konsumsi oksigen yang lebih tinggi. Akibat kondisi ini menyebabkan terganggunya metabolisme di dalam sel itu sendiri. Hiperoksidase menghasilkan peroksidase lemak yang merupakan suatu radikal bebas. Jika kondisi ini tidak diikuti dengan keseimbangan dengan antioksidan, hal ini akan menimbulkan stres oksidatif. Hal ini terbukti dengan masih tingginya kadar MDA plasma kelompok P1 pada akhir kehamilan. Kondisi ini diduga menyebabkan terjadinya kematian janin pada preeklampsia seperti yang dialami oleh kelompok P1.

Kelompok P4 yang merupakan model preeklampsia diberi EVOO dosis tinggi juga mengalami kematian janin di dalam kandungan. Hal ini diduga bahwa EVOO dosis pemberian tinggi tidak dapat memperbaiki kondisi stres oksidatif yang terjadi karena kandungan tokoferol (vitamin E) yang larut dalam minyak tidak dapat diabsorpsi oleh hati dengan baik, sementara beban kerja hati meningkat akibat peroksidase asam lemak jenuh, sehingga semakin memperburuk stres oksidatif yang terjadi. Namun dalam penelitian ini tidak diteliti kadar MDA di dalam hati dan plasenta sehingga tidak diketahui dengan pasti apa yang menyebabkan kematian janin pada kelompok P4. Meskipun demikian pemberian EVOO dengan dosis rendah dan sedang dapat memperbaiki kondisi stres oksidatif yang terjadi pada model preeklampsia, sehingga tidak mempengaruhi jumlah anak dan kematian janin seperti pada kelompok perlakuan lainnya. Hal ini diduga bahwa α -tokoferol yang terdapat dalam EVOO dapat memutus mata rantai reaksi asam lemak jenuh berantai sehingga tidak sampai merusak membran sel, dan struktur sel lainnya seperti mitokondria bahkan perubahan yang terjadi pada DNA. Struktur fungsi endotel tidak berubah, sehingga iskemia plasenta tidak terjadi, dan pada akhirnya pasokan nutrisi adekuat terhadap fetus tikus putih .

Preeklampsia tidak mempengaruhi jumlah rata-rata fetus tikus putih yang dilahirkan oleh kelompok kontrol maupun perlakuan, dalam hal ini karena pemberian NaCl 6% untuk mendapatkan model preeklampsia dilakukan setelah masa implantasi, sehingga diduga tidak mempengaruhi jumlah fetus yang dilahirkan. Jumlah rata-rata fetus yang dilahirkan masih dalam batas normal yaitu antara 6 – 12 ekor (Kusumawati, 2004).

4.10 Mekanisme EVOO Untuk Mencegah Preeklampsia.

Stres oksidatif saat kehamilan diduga menjadi penyebab timbulnya preeklampsia yang disebabkan oleh radikal bebas yang menimbulkan reaksi radikal hidroksil (OH) berantai disebut dengan peroksidasi lipid sehingga menimbulkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksis terhadap sel, khususnya membrane sel, dan penandanya adalah MDA (Suryohudoyo, 2000).

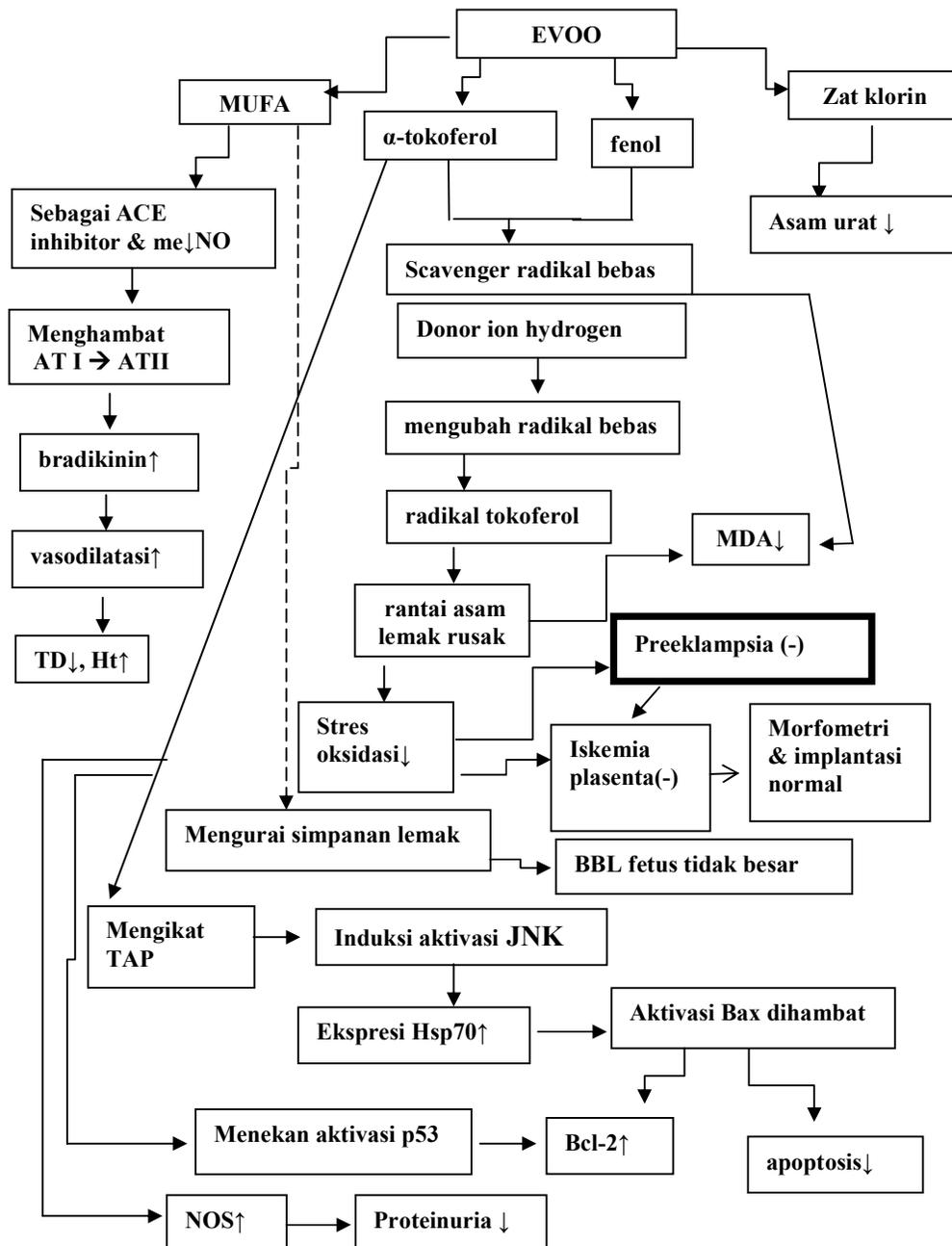
Selain pada membran sel, radikal bebas juga dapat menimbulkan kerusakan DNA dengan terjadinya hidrolisis basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Jika kerusakan yang ditimbulkannya tidak terlalu parah maka dapat diperbaiki, namun jika tidak dapat diperbaiki maka replikasi sel terganggu. Protein yang rusak akibat oksidan juga dapat mengakibatkan terganggunya asam-asam amino penyusun protein sehingga kehilangan fungsi biologisnya (misalnya struktur sel saja menjadi sangat rentan, termasuk juga membran, protein dan DNA yang menyebabkan mutasi dan kematian sel (Winarsi, 2011).

Kondisi stres oksidatif pada preeklampsia membutuhkan konsentrasi dan aktivitas antioksidan, karena diduga terjadinya penurunan antioksidan enzimatis (GPx, SOD, CAT) maupun non enzimatis (vitamin E dan C). Kandungan α -tokoferol yang terdapat dalam EVOO memiliki afinitas di fosfolipid pada mitokondria, retikulum endoplasma serta membran plasma ternyata dapat bekerja secara sinergis dengan enzim GPx, SOD dan CAT (38). Keberadaan α -tokoferol dalam membran menyebabkan dapat bereaksi dengan radikal lipid (L) dan radikal peroksilipid (LOO), membentuk radikal tokoferol (α -TO) atau tokoferoksil yang tidak reaktif. (Suryohudoyo, 2000; Winarsi, 2011). Keterbatasan dalam penelitian ini tidak meneliti lebih lanjut kadar enzim yang telah disebutkan di atas setelah diberikan EVOO sehingga diketahui juga peranannya dalam mencegah stres oksidatif.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa pemberian EVOO ternyata dapat memperbaiki kondisi-kondisi tertentu dari parameter yang diukur sebagai indikator terjadinya preeklampsia. Kandungan tokoferol dalam EVOO, 90% merupakan jenis α -tokoferol, disamping kandungan lainnya seperti fenol, tirosol, hidroksitirosol yang merupakan antioksidan (Nakbi *et al.*, 2010). Hal inilah yang diduga berperan dalam mencegah kerusakan pada membran sel lebih lanjut. Pemberian EVOO pada

kelompok model preeklampsia pada penelitian ini setidaknya dapat meminimalisir kondisi preeklampsia tidak sampai berat.

Berdasarkan penjelasan di atas dapat diringkas dalam bentuk skema seperti Gambar 4.16 berikut ini.



Gambar 4.16. Skema mekanisme EVOO dalam mencegah preeklampsia

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa EVOO dengan dosis pemberian rendah atau sedang dapat mencegah peningkatan radikal bebas pada tikus putih bunting model preeklampsia dalam penelitian ini sehingga beberapa indikator yang merupakan bagian dari preeklampsia menurun atau meningkat. Pemberian NaCl 6% 3mL/hari selama seminggu (dimulai dari hari ke 6 – 12 kebuntingan) dan stres akut dapat memodulasi tikus putih bunting sebagai model preeklampsia. Beberapa parameter diukur setelah pemberian EVOO sebagai indikator preeklampsia sebagai berikut:

- 5.1.1 Pemberian EVOO dapat menurunkan kadar MDA plasma tikus putih bunting kelompok perlakuan model preeklampsia yang sebelumnya terjadi peningkatan setelah pemberian NaCl 6% dan nilainya tidak jauh berbeda dengan kontrol.
- 5.1.2 Ekspresi protein Hsp70 serum tikus putih model preeklampsia lebih tinggi setelah pemberian EVOO, hal ini ditandai juga dengan peningkatan ekspresi Bcl-2 pada kelompok yang mendapatkannya, dan juga tidak jauh berbeda dengan control
- 5.1.3 Apoptosis index pada kelompok kontrol dan perlakuan model preeklampsia yang diberi EVOO umumnya berada pada grade III (++) lebih rendah dari kelompok model preeklampsia (grade IV atau +++).
- 5.1.4 Tekanan darah pada kelompok model preeklampsia yang diberi EVOO menurun dari sebelumnya dan tidak jauh berbeda dengan kontrol, namun tidak mempengaruhi proteinuria menjadi negatif atau turun. Demikian juga kadar asam urat dalam darah dan hematokrit menurun pada kelompok model preeklampsia yang diberi EVOO, juga tidak jauh berbeda dengan kontrol.
- 5.1.5 Rerata BBL, PB dan jumlah fetus pada kelompok model preeklampsia yang diberi EVOO dengan dosis rendah dan sedang tidak berbeda dari kontrol.

5.2 Saran

- 5.2.1 Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk mengukur kadar MDA dan ekspresi Hsp70 di plasenta dan serum pada model preeklampsia setelah pemberian EVOO sehingga dapat dibandingkan antara keduanya.
- 5.2.2 Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk meneliti aktivasi JNK di plasenta dalam keterlibatannya meregulasi Hsp70.
- 5.2.3 Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk mengukur kadar GPx, Glutathion (GSH) serta vitamin E untuk mengetahui peranannya dalam mereduksi peroksida lemak setelah pemberian EVOO.
- 5.2.4 Perlu dilakukan pemeriksaan terhadap ekspresi protein p53 atau Bax untuk mengetahui protein mana yang meregulasi terjadinya apoptosis.
- 5.2.5 Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk mengukur proteinuria secara kuantitatif dan kadar albumin dalam darah sehingga hasil lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulsid A, Hanretty K, and Lyall F. 2013. Heat Shock Protein 70 Expression Is Spatially Distributed In Human Placenta and Selectively Upregulated During Labor And Preeclampsia. *PLoS ONE*, 8: 1 – 7
- Abigail PYT. 2014. Uji Efektivitas Anti Inflamasi Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis*) Tikus Putih Jantan Galur *Sparague Dawley* yang Diinduksi *Karagenin*. *Digilib. Unila.ac.id*.
- Adriana I, Alexandru, Dinu D. 2010. Serum Uric Acid and Cardiovascular Disease. *Medica – a Journal of Clinical Medicine*, 5: 186-192
- Ahmed GA, Abdul H A F, and Saman HN. 2008. Role Of Malondialdehyde in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Iraqi Journal of Medical Science*, 6: 35 – 41.
- Adam R Stankiewicz, Guillaume L, Cheryl PZ Foo, Stefani M Radicioni, and Dick D Mosser. 2005. Hsp70 Inhibits Heat-Induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. *The journal of Biological chemistry*, 280: 38729-38739.
- Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, and Lessey BA. 2000. Placental Apoptosis in Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 96: 271-276
- Amorim F dan Moseley P. 2010. Heat Shock Protein and Inflammation. *Heat Shock Protein and Whole Body Physiology*, Springer Science, 1: 57-83
- Angsar MD. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan, In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Arianto B, Rumekti HD, Detty SN. 2015. Perbandingan Rerata Ekspresi Bcl-2 dan Bcl-X1 pada Preeklampsia Berat dan Kehamilan Normotensi. *IPAKESPRO*, 2: 122-126.
- Arcana N, and Sugiritama W. 2009. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lam*) Terhadap Kadar Vitamin E Plasma Hewan Model Preeklampsia, *Medicina*, 40: 27 – 31.
- Arifin T. 2010. Sains & Matematika. [https://id.answers](https://id.answers.yahoo.com). Yahoo.com.
- Arisman, 2009. Gizi dalam Daur Kehidupan. Palembang, Universitas Sriwijaya Press.
- Attia Diana M, G Marja A, Verhagen, Erik SG Stroes, Ernst Evan F, Hermann JG, and et al. 2001. Vitamin E Alleviates Renal Injury, but not Hypertension During Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition in Rats. *Journal of the American society of nephrology*, 12: 2585-2593.

- Barton JR, and Sibai BM. 2007. Preeclampsia. In *Manual of Obstetrics*, 7 th edition, Texas, Liincott Williams & Wilkins.
- Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G dan Asea A. 2005. Alternative Mechanism by Which IFN-Gamma Enhances Tumor Recognition: Active Release of Heat Shock Protein 72. *J Immunol*, 5: 2900-2912
- Baoyi Zhu, Xiaojuan Li, Yuying Zhang, Chunwei Ye, Yu Wang, Songwang Cai, Huaiqiu Huang *et al.* 2012. Cross-Talk of Alpha Tocopherol-Associated Protein and JNK Controls The Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *International journal of cancer*, 132: 2270-2282.
- Bawazier LA. 2009. Ginjal Hipertensi : Proteinuria. In Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata KM, Setiati S (edisi.V). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta, Interna Publising.
- Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A *et al.* 2002. Antioxidant Vitamin in Term and Preterm Infants and Their Relation to Maternal Vitamin Status. *Arch Med Res*, 33: 276-280.
- Beswick, RA Zhang, H Marable, D Catravas, JD Hill WD dan Webb RC. 2001. Long –Term Antioxidant Administration Attenuates Mineralcorticoid Hypertension and Renal Inflammatory Response, *J. Hypertension*, 37: 781 - 786.
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, *et al.* 2002. Oxidative Stress in Preterm Neonates at Birth and on the Seventh Day Of Life. *Pediatr Res*, 52: 46 – 49.
- Boutiller PL, and Mallet V. 1997. HLA-G in Pregnancy. In Angsar M. D. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Brooks GF, Butel JS, and Morse SA. 2005. Patogenesis Infeksi Bakteri. In Jawetz, Menick, and Adelberg's *Mikrobiologi Kedokteran*. 22nd Ed. Terjemahan Bonang G. Jakarta, EGC.
- Brown MA. 2003. Diagnosis and Classification of Preeclampsia and Other Hypertensive Disorders of Pregnancy in Belfort MA, Thornton S, Saade GR. Hypertension in Pregnancy. In Angsar MD. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, and Taft RA. 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tools and Image. *PLoS ONE*, 7: 355 - 358.

- Candra S, Muhammad A.W, Soetomo S, and I Ketut Muliarta G. 2007. Kadar MDA dan Rasio GSH/GSSH pada Kehamilan Normal, Preeklampsia Berat dan Eklampsia di Malang. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23: 35 – 39.
- Campbell NA. 2010. *Biologi* Edisi ke 8 Jilid III. Erlangga, Jakarta
- Cerdeira AS, and Karumanchi SA. 2012. Angiogenic Factors in Preeclampsia and Related Disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med*, doi:10.1155/2012/298343.
- Cook NK. 1996. Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66 – 76.
- Corbett A, McGowin A, Scott S, Tiffany F and Bethany Sibbitt. 2012. A Method For Reliable Voluntary Oral Administration of Fixed Dosage (mg/kg) of Chronic Daily Medication to Rats. *Laboratory Animals*, 46 : 318 - 324.
- Cunningham FG, Gant NF, and Laveno KJ. 2005. Hypertensive Disorders in Pregnancy. In *William Obstetric*, New York, Mac Graw Hill.
- Chakraborty P, and Roy SK. 2013. Expression of Estrogen Receptor α 36 (ESR36) in the Hamster Ovary Throughout the Estrous Cycle: Effects Of Gonadotropins. *PLoS ONE*, 8: 582 - 591. doi:10.1371.
- Chan W, Krieg RJ jr, Norkus EP and Chan JC.1998. Alpha-Tocopherol Reduces Proteinuria, Oxidative Stress, and expression of Transforming Growth Factor Beta1 in IgA Nephropathy in the Rat. *Mol.Genet Metab*, 63: 224 - 229.
- Chen bao D and Wang W. 2013. Human Placental microRNAs and Preeclampsia. Mini review. *BOR Papers in Press*, 10: 1 – 6.
- Churchill D, and Beevers DG. 1999. Definition and Classification Systems of the Hypertensive Disorders in Pregnancy. In Angsar M. D. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Chio CC, Lin JW, Cheng HA, Chiu WT, Wang YH and Wang JJ, *et al.* 2013. MicroRNA-210 Targets Antiapoptotic Bcl-2 Expression and Mediates Hypoxia-Induced Apoptosis of Neuroblastoma Cells. *Archives of Toxicology*, 87: 458 - 468.
- Chrichton GE, Bryan J, and Murphy KJ. 2013. Dietary Antioxidants, Cognitive Function and Dementia-A Systematic Review. *Plant Food for Human Nutrition*, 68: 279 - 292.

- Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Fili:i L, Rossetti M, *et al.* 2003. Plasma Bilirubin and Oxidative Stress in Preterm Infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*.
- Dashtiyani Amin A, Sepehrimanesh M, Nader T, Mohammad E A. 2017. The Effect of Endurance Training With and Without Vitamin E on Expression of p53 and PTEN Tumor Suppressing Genes in Prostate Glands of Male Rats. *Biochimic open*, 4: 112 - 118.
- Dinkes Sumut. 2015. *Profil Kesehatan Propinsi Sumatera Utara Tahun 2015*. Dinas Kesehatan Prop.Sumatera Utara, Medan
- Decker G.A. 1999. Risk Factor for Preeclampsia Clinical Obstetrics and Gynecology. In Angsar M. D. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- De Jong TR, Beiderbeck DI, and Neumann ID. 2014 Measuring Virgin Female Aggression in The Female Intruder Test (FIT): Effects of Oxytocin, Estrous Cycle, and Anxiety. *PLoS ONE*, 9: 91 – 97, doi: 10.1371
- De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, and Vermulen NPE. 1998. Biomarker of Free Radical Damage. A Location in Experimental Animals and Humans. *Free Rad Biol Med*, 26: 202 - 260
- Dharma R, Wibowo N, and Hessyani PTR. 2005. Disfungsi Endotel pada Preeklampsia. *Makara Kesehatan*, 9: 63 - 69.
- Droge W. 2003. Free Radicals in the Physiology Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82: 47 - 95.
- Ekambaram P, and Geetha B.V. 2008. Placental Heat Shock Protein 70 Overexpression Confers Resistance Against Oxidative Stress in Preeclampsia. *Turk. J. Med. Sc*, 38: 27 – 34.
- Ekambaram P, Srinivasan L, and Venkrataman U. 2009. Preeclamptic Placenta Stress And Over Expression Of Mitochondrial HSP70. *Clin Chem Lab Med*, 47: 1073 – 1080.
- Ekambaram P, and Uthra V. 2009. MTT Assay Based Ureaplasma urealyticum Infection Quantification in Preeclampsia. *Asian J Microbial Biotech Env Sci*, 11: 299 – 334.
- Ekambaram P. 2011. HSP70 Expression and its Role in Preeclamptic Stress. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics Review*, 48: 243 - 255.
- Ekambaram P, dan Lavanya S. 2011. Over Expression of HSP70 and HSF1 in Preeclampsia Endothelial Cells. *Aust N Z J obstet Gynecol*, 51: 47 - 52.
- Exiqon. 2015. <http://www.exiqon.com/what-are-microRNAs>

- Fachriah Nur. 2013. Penentuan Bilangan Peroksida Dalam Suatu Sampel. <http://www.kimia terpadusmaksima 4>.
- Fehri B, Aiache J.M., Mrad S, Korbi S, and Lamaison, J.L. 1996. *Olea Europea L : Stimulant, anti-ulcer, anti-inflammatory effects*. *Boll. Chim. Pharm*, 135: 42-49.
- Fekete A, Ver A., Bogi K, Treszl A, and Rigo J. 2006. Is Preeclampsia Associated with Increasing Frequency of Hsp70 Gene Polymorphism ? *Eur J Obstet Gynecol Reproduct Biol*, 126: 197 – 200.
- Fukushima A, Kawahara H, Isurugi C, Syoji T, Oyama R, Sugiyama T and Horiuchi S. 2005. Changes in Serum Levels of Heat Shock Protein 70 In Preterm Delivery and Pre-Eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 1: 72 - 77.
- Gana V.Yulianti. 2010. Hubungan Kadar Hematokrit Dengan Derajat Preeklampsia. *Skripsi FK UNS, Surakarta*.
- Gant NF, Worley RJ. 1980. Hypertension in Pregnancy Concepts and Management. In Angsar MD. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Giuliano JS, Patrick ML, Hector RW, and Derek SW. 2011. Extracelullar Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *The Open Inflammation Journal*, 4: 49 – 60.
- Gilbert SF. 1994. *Developmental Biology*. 4th ed. Sianuer Associates inc Publisher, Massachusetts.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin*, 55: 178 - 194.
- Green PS. 2002. A Revision of Olea L (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57: 91 – 140.
- Hamidi NR. 2014. <http://www.agribisnis indonesia.com/2014/03 budi daya-tanaman-zaitun.html>.
- Habbah. 2008. *Minyak Zaitun Obat Segala Penyakit*. <http://www.cahayaiman.web.id/tag/minyak-zaitun/>.
- Halliwell B, and Gutteridge J.M. 1999. Free Radicals, Reactive Species and Toxicology. In *Free Radicals In Biology And Medicine*. Third edition. New York, Oxford University Press.
- Halliwell B. 1991. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med*, 91: 14 – 21.

- Hanson JL, and Hurley L.M. 2012 Female Presence and Estrous State Influence Mouse Ultrasonic Courtship Vocalizations. *PLoS ONE*, 7: 40782. doi:10.1371.
- Harjanto. 2004. Pemulihan Stres Oksidatif pada Latihan Olahraga. *J. Kedokteran Yarsi*, 3: 81 – 87.
- Hermawan AG, 2012. Mekanisme Apoptosis pada Sepsis. *Majalah Kedokteran Terapi Intensif*, 2 : 26 – 32.
- Hirano K, Morinobu T, Kim H, Hiroi M, Ban R, Ogawa S, *et al.* Blood Transfusions Increases Radical Promoting Non-Transferrin Bound Iron in Preterm Infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, Ed.84.
- Hung JH. 2007. Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclampsia. *J.Chin Med Assoc*, 70: 430 – 432.
- Hubbel CA. 1989. Lipid Peroxidation in Pregnancy: New Perspectives on Preeclampsia. In Angsar M. D. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Hui Li, Lei Lim, Daxing, Wei R Chen. 2010. Inhibition of The JNK/Bim Pathway by Hsp70 Prevents Bax Activation in UV Induced Apoptosis. *FEBS letters*, 584: 4672 - 4678.
- Hendromartono S. 2000. Peran Radikal Bebas Terhadap Komplikasi Vaskuler. *Majalah Penyakit Dalam Udayana*, 1: 89 - 92.
- Hermann J, dan Lerman A. 2001. The endothelium: Dysfunction and Beyond. *J.Nucl Cardiol*, 8: 197 - 206.
- Higgins JR, and M de Swiet. 2001. Blood Pressure Measurement And Classification in Pregnancy. In Angsar M. D. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Hsu PF, Chuang SY, Cheng HM, Sung SH, Ting CT, Lakatta EG, Yin FC, *et al.* 2013. Associations of Serum Uric Acid Levels With Arterial Wave Reflections and Central Systolic Blood Pressure. *Int. J Cardiol*, 3: 2057 - 2063.
- Irawiraman H, Harijadi, and Totok U. 2010. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lam*) Terhadap Kejadian Preeklampsia (Studi Asam Urat dan Endoteliosis pada Glomerulus). *Majalah Patologi*, 19: 14 - 21.
- Ishihara N, Matsno H, Murakoshi H, Fernandez JB, Sannoto T, and Maruo T. 2002. Increased apoptosis in Syncytiotrophoblast in Human Term Placenta

Complicated by Either Preeclampsia or Intrauterine Growth Retardation. *Am J Obstet Gynecol*, 186: 158 - 166.

Kadirvelu A, Chee KH, Chim CL. 2002. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Med Progr*. 4 - 12.

Kasan WS, Hari Supriyadi R, and Antonius Budi GB. 2015. Kadar Heat Shock Protein 70 pada Persalinan Premature. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 28: 309 – 313.

Kashinakuti S.V, Sunitha H, K Gurupada:a, DS Shankarprasad, G Suryaprakash and JB Ingin. 2010. Lipid Peroxidation and Antioxidan Status in Preeclampsia. *Al Ameen J. Med.Sci*, 3: 38 – 41.

Kaufmann Sh, Hengartner MO. 2001. Programmed Cell Death: Alive and Well in the Millineum. *Trend Cell Biol*, 11: 526 - 534.

Kaur P, Reis M, Coucman G, Forjuoh S, Greene dan Asea. 2010. Role of Heat Shock Protein in Obesity and Type 2 Diabetes. *Heat Schock Proteins and Whole Body Physiology*, Springer Science.

Kawuryan SL. 2004. Pengaruh Kadar Trombosit, Hematokrit, Hemoglobin Darah dan Protein Urin pada Ibu Preeklampsia/Eklampsi Terhadap Nilai Apgar Bayi yang Dilahirkan. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, XX: 78 – 81.

Keita H, Eduardo RSJ, Norma PC,Leticia GS, and Lucia Q. 2013. The Long Term Ingestion of a Diet High in Extra Virgin Olive Oil Produces Obesity and Insulin Resistance But Protects Endothelial Function in Rats: a Preeliminary Study. *BioMed Central*, 5: 1 – 10.

Kemendes RI. 2015. Profil Kesehatan Indonesia 2015. Pusat Data dan Informasi Kemendes RI, Jakarta.

Keman K, Prasetyorini N, MJ Langgar. 2015. Perbandingan Ekspresi p53, Bcl-2 dan Indeks Apoptosis Trofoblas pada Preeklampsia/Eklampsi dan Kehamilan Normal. *Maj Obstet Ginekol Indones*, 33: 151 - 159.

Ketaren S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Edisi I,cetakan pertama, Jakarta, UI Press.

Kim YJ. 2013. Pathogenesis and Promising Non Invasive Markers for Preeclampsia. *Obstet Gynecol Sci*, 56: 2 – 7.

Kinanthi. 2009. *Minyak Zaitun (Sumber Lemak Nabati)*. [serial on line]. <http://kinanthidiah.multiply.com/journal/item/4/>.

- Kirkin S, Joos M, and Zornig. 2004. The Role of Bcl-2 Family Members in Tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1644 : 229 - 249.
- Kitamoto S dan Egashira K. 2004. Endothelial dysfunction and coronary atherosclerosis. *Current drug targets-cardiovasc & haematological disorders*, 4: 13 - 22.
- Kusumawati D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*, Gadjah University Press, Yogyakarta.
- Kusumawardani B, Arina YD, Azham P. 2014. Perkembangan Plasenta dan Pertumbuhan Janin pada Tikus Hamil yang Diinfeksi *Poryphyromonas Ginggivalis*. *IDJ*, 3: 22 - 29
- Kumalaningsih S. 2007. Antioksidan Alami, Penangkal Radikal Bebas, Sumber, Manfaat, Cara Penyajian dan Pengolahan, *Trubus Agrisarana*, Surabaya.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2005. *Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death*. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 64: 21 - 30.
- Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, et al. 2001. *Apoptosis and The Expression Of Bax And Bcl-2*. In Hyperplasia and Adenocarcinoma of the Uterine Endometrium. *Hum Reprod*, 16: 2211 – 2218.
- Lailani M, Zulkarnain E, and Rahmatina BH. 2013. Gambaran Tekanan Darah Tikus Wistar Jantan dan Betina Setelah Pemberian Diet Tinggi Garam. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3: 146 – 150.
- Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, and Garrido C. 2010. Heat Shock Proteins: Cell Protection Through Protein Triage. *Sel World J*, 3: 1543 – 1552.
- Langseth L. 1994. Oxidants and Antioxidants: Some Basic Concepts. In: Bracco U, Jardine NJ (Eds). *Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention*. Belgium: International Life Science Institute.
- Lee Yong E, Hong Chung Y, Yi Ling L, and Ruei Ming C. 2015. Micro RNA-1 participates in Nitric Oxide-Induced Apoptotic Insults to MC3T3-E1 Cells by Targeting Heat Shock Protein-70. *Int.J. Biol Sci*, 11: 246 - 255.
- Levy R, 2005. The Role of Apoptosis in Preeclampsia. *IMAJ*, 7: 178 - 181.
- Laurence J, Bacharach M. 1964. *Analytical Toxicology*. Philadelphia, CRC Press.
- Lintang LS. 2003. Gambaran Fraksi Protein Darah pada Preeklampsia dan Hamil Normotensif. *USU digital library*.

- Lopez Maria Jesus O, Berna G, Everado MC, Hermina LG, Franz M and M Carmen L. 2008. An Extra-Virgin Olive Oil Rich in Polyphenolic Compounds Has Antioxidant Effects in Of1 Mice. *The Journal of Nutrition*, 138: 1074 – 1078.
- Lopez Maria Jesus O, Innocenti M, Francisco Martin B, Herminnia Lopez GS, and Nadia M. 2012. Effect of Extra Virgin Olive Oil on Glycaemia in Healthy Young Subjects. *European Journal Of Lipid Science and Technologi*, 114: 999 - 1006.
- Lopez Maria Jesus O, Molina Jose J, Marina V Mir, Encarnacion FR, Francisco M, and Herminia Lopez GS. 2013. Extra Virgin Olive Oil (EVOO) Consumption and Antioxidant Status in Healthy Institutionalized Elderly Human. *Arceives of gerontology and geriatrics*, Elsevier Inc.
- Martin Jr, Magann EF, and Isler CM. 2003. HELLP Syndrome: The Scope of Disease and Treatment. In Belfort MA, Thornton S, Saade GR. Hypertension in pregnancy. In Angsar MD. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Martha SA, Ferry F, Karwur, and Ferdy SR. 2013. Mekanisme Kerja dan Fungsi Hayati Vitamin E pada Tumbuhan dan Mamalian, *Jurnal.fkip.uns*, 10: 1 - 8.
- Mayer M.P, dan Bukau B. 2005. Hsp70 Chaperones : Cellular Function and Molecular Mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62: 670 – 684.
- Matsubara K, Higaki T, Yuko M, and Akihiro N. 2015. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pahogenesis of Preeclampsia. *Int.J.Mol.Sci*, 16: 4601 – 4614.
- Mates J.M. 2000. Inter relationship Between Oxidative Damage and Antioxidant Enzyme Activities: an Easy and Rapid Experimental Approach. *Biochemical Education*, 28: 93 - 95.
- Meilina. 2017. Extra Virgin Olive Oil Menurunkan Kadar MDA (malondialdehyde) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar yang Dipapar Asap Rokok. *Intisari Sain Medis*, 8: 97 - 101.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, and Rodwell VW. 2000. *Biokimia Harper*. Edisi 25, Jakarta, EGC.
- Molvarec A, Prohaszka Z, Nagy B, Szalay J, Fust G, Karadi I and Rigo J Jr. 2006. Association of Elevated Serum Heat Shock Protein 70 Concentration With Transient Hypertension of Pregnancy, Preeclampsia and Superimposed Preeclampsia: a Case-Control Study. *Journal of Human Hypertension*, 20: 780 -786.
- Molvarec A, Rigo Jr J, Levente L, Krisztian B, Veronika M, Laszlo C. *et.al*. 2009. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation,

oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress and Chaperones*, 14: 151 – 159.

- Molvarec A, Tamasi L, Losonczy G, Madach K, Prohaszka Z, and Rigo J Jr. 2010. Circulating Heat Shock Protein 70 (HSPA1A) in Normal and Pathological Pregnancies. *Cell Stress and Chaperones*, 15: 237 – 247.
- Moon ho Do, Su nam Kim, Seung-Yong Seo, Eui-Ju Yeo and Sun Yeou Kim. 2015. δ - Tocopherol Prevents Methylglyoxal-Induced Apoptosis by Reducing ROS Generation and Inhibiting Apoptotic Signaling Cascades in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Food Funct*, 6: 1568 - 1577.
- Nakbi A, Tayeb W, Abir G, Manel I, Samia D, Issam C. *et.al.* 2010. Effects of Olive Oil and its Fractions on Oxidative Stress and the Livers Fatty Acid Composition In 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid-Treated Rats. *BioMed Central*, 7: 1 - 11.
- Nelawati A, Soemardini, Bambang P. 2016. Pengaruh Pemberian Vitamin E pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok Subakut Terhadap Berat Badan Bayi Lahir Aterm. *Majalah Kesehatan FKUB*, 3: 76 - 85.
- Nugraheni K. 2012. Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Serum Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. *Artikel Penelitian*, Undip.
- Palupi A. 2013. Perbandingan Ekspresi Protein Bcl-Xl Sel Trofoblas Plasenta Antara Preeklampsia Berat dengan Kehamilan Normotensi. *Tesis*, UGM, Yogyakarta.
- Pasalic D, Marinkovic N, and Feher-Turkovic L. 2012. Uric Acid As One of Important Factors in Multifactorial Disorders - Facts and Controversies. *Biochem Med*, 22: 63 - 75.
- Perlitasari Y. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Herba Anting-Anting (*Acalypha Indica Linn*) Terhadap Kadar *Malondialdehyde* pada Mencit Balb/C Induksi Streptozotocin. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Peter ME, and Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and Beyond. *Cell Death Differ*, 1: 26 – 35.
- Pitozzi V, Michela J, Mohamed Z, Cristina L, Elisabetta B, Maura L, *et.al.* 2010. Effects of Dietary Extra – Virgin Olive Oil on Behaviour and Brain Biochemical Parameter in Aging Rats. *British Journal of Nutrition*, 103: 1674 – 1683.

- Pockley AG, Shepherd J dan Corton JM. 2003. Detection of Heat Shock Protein 70 (HSP70) and Anti-HSP70 Antibodies in the Serum of Normal Individuals. *Imunol Invest*, 6: 67 - 77.
- Phalak P, Tyoti K, Mona T, and A. P.T. 2013. Role of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Pathogenesis of Preeclampsia. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 2: 536 – 539.
- Pokja Nurtrigenomik. 2016. Protokol Laboratorium Workshop Penelitian Berbasis Nurtigenomik: Penangan Hewan Coba dan Analisis Ekspresi Gen, UGM Jokjakarta.
- Rahayu SY, Widiyani T, and Sutarno. 2005. Pertumbuhan Dan Perkembangan Embryo Tikus Putih (*Rattus Norvegicus L.*) Setelah Perlakuan Kebisingan. *BioSmart*, 7: 53 - 59.
- Ramos S. 2007. Effects of Dietary Flavonoids on Apoptotic Pathways Related to Cancer Chemoprevention. *J. Nutr Biochem*, 7: 420 - 427.
- Riawan W, Keman K, Wibowati S, Ali M. Peningkatan Insiden Apoptosis pada Sel-Sel Trofoblas Jaringan Plasenta Preeklampsia Berkaitan dengan Peninngkatan Ekspresi p53 dan Penurunan: AR Teraktivasi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, XX: 136 - 141.
- Riedman C, and Walker I. 1992. Preeclampsia The Fact. In Angsar MD. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.
- Richard BW, Barbara SV, Rachel AA, Jene ES, Michael JT. 2001. Pro-Oxidant Effect of Vitamin E in Cigarette Smokers Consuming a High Polyunsaturated Fat Diet. *Arterioscler Throb Vasc Biol*, 21: 1029 - 1033.
- Redman Kaplan's. 2002. *Clinical Hypertension*, Ed. 8th, Norman M.Kaplan.
- Redman CW, and Sargent IL. 2005. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*, 308: 1592 - 1594.
- Roeshadi RH. 2006. Upaya Menurunkan Angka Kesakitan dan Angka Kematian Ibu pada Penderita Preeklampsia dan Eklampsia. *Pidato Pengukuhan Guru Besar*, Gelanggang Mahasiswa, Kampus USU 29 April 2006.
- Robert JM, Judith L, Lisa MB, Jose MB, Eduardo B and Anibal M. 2003. Nutrient Involvement in Preeklampsia. *The Journal of Nutrition*, 133: 1684 – 1692.
- Robert JM, Carl A Hubel. 2004. Oxydative Stress in Preeclampsia. *AJOG*, 190: 117 – 118.

- Roseta M, C Masdiana, Padaga, and Rositawati I. 2014. Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar MDA (Malondialdehyde) dan Histopatologi Aorta Abdominal Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Hipertensi yang Diinduksi Garam-DOCA (Deoxycorticosterone Acetate). *Monickrose 1508@gmail.com*. Universitas Brawijaya.
- Roth E, and Pircher H. IFN-Gamma Promotes Fas Ligand- and Perforin-Mediated Liver Cell Destruction by Cytotoxic CD8 T Cells. *J Immunol*, 3: 1588 – 1594.
- Roziana, Subagio HW, Suhartono, and Nyoman SW. 2015. Pengaruh Suplementasi Vitamin E (α -tokoferol) Terhadap Kadar Gamma Glutamyl Transferase (GGT) dan Kadar Nitric Oxide (NO) pada Tikus (Studi pada Tikus *Rattus Novergicus* Strain Wistar Jantan Terpapar Inhalasi Uap Benzene). *Jurnal Gizi Indonesia*, 3: 73 - 79.
- Rudov A, Balduini W, Silvia C, Serafina P, Giuse:e B, and Maria Cristina A. 2014. Involvement of miRNAs in Placental Alteration Mediated by Oxidative Stress. *Hindawi Publishing Corporation, oxidative medicine and cellular longevity*, 2: 103 – 106.
- Salem AA. 2015. Effect of Feeding on Olive Oil and Thyme on Pregnancy and Lactation Periods. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4: 19 - 28.
- Salma. 2012. Bagaimana Memahami Hasil Tes Urine Anda. *Majalah kesehatan.com*. Posting 8 Januari 2012.
- Samsuria. 2009. Efek Asap Rokok Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Bunting Terhadap Tampilan Fisiologis Induk dan Anaknya Setelah Dilahirkan. *Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Subakir S.B, Dewi I.S.S, and Arleni. 2008. Kadar MDA dan HSP 70 pada Plasenta Penderita Preeklampsia. *Makara Kesehatan*, 12: 92 – 94.
- Sumanti N, Noormatany, Muhammad A, Tiene R. 2013. Kadar Asam Urat Sebagai Biomarker Preeklampsia. *MKB*, 2: 98 - 104.
- Setiawan B, Suhartono E. 2007. Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stress Oksidatif pada Bayi Premature. *Maj Kedokt Indon*, 57: 1 - 5.
- Suparman E. 2012. Kadar Lipid Peroksida pada Kehamilan Normotensi dan Preeklampsia. *Majalah Obstetri & Ginekologi*, 20: 65 - 71.
- Suryohudoyo P. 2000. Oksidan, Antioksidan dan Radikal bebas. In: *Ilmu Kedokteran Molekuler. Kapita Selekta*, Jakarta, Sagung Seto.

- Susilo T.Y. 2012. Khasiat Minyak Zaitun (Olive Oil) Dalam Meningkatkan Kadar HDL (High Density Lipoprotein) darah Tikus Wistar Jantan Penelitian Eksperimental Laboratorium). *Skripsi*, FKG, Universitas Jember.
- Sulistiyowati Y. 2006. Pengaruh Pemberian Likopen Terhadap Status Antioksidan (Vitamin C, Vitamin E, dan Gluthathion Peroksidase) Tikus (*Rattus Norvegitembagas Galur Sprague Dawley*) Hiperkolesterolemik. *Tesis*. Universitas Diponegoro.
- Suwandi J. 2012. Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela Menurunkan Malondialdehid pada Tikus yang Diberi Minyak Jelantah. *Tesis*. Universitas Udayana, Denpasar.
- Sujatmiko T, Rumekti H Diah, Betty SN. 2015. Perbandingan Rerata Ekspresi Protein Bax dan Bak pada Preeklampsia Berat dan Kehamilan Normotensi, *jurnal kesehatan reproduksi (IPAKESPRO)*, 2: 3 - 6.
- Soeksmanto A, Hapsar Y, and P Simanjuntak. 2007. Kandungan Antioksidan pada Beberapa Bagian Tanaman Mahkota Dewa, *Phaleria Macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymelaceae). *Biodiversitas*, 8: 92 - 95.
- Soeminto. 2000. Embriologi Vertebrata. Unsoed, Purwokerto.
- Soeprijanto B, and Julianti H.A. 2014. Mekanisme Peningkatan *Heat Shock Protein-70* pada Kanker Payudara Tikus Diradiasi, Pasca pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus Niruri*). *Jurnal Veteriner*, 15: 1411 – 8327.
- Sharma A, S Bansal dan RK Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian J. of Pediatrics*, 70: 715 - 717.
- Shiozawa T, Konishi I. 2006. Early Endometrial Carcinoma: Clinicopathology, Hormonal Aspects, Molecular Genetics, Diagnosis, and Treatment. *Int J Clin Oncol*, 11: 13 - 21.
- Sherwood L. 2004. Human Physiology From Cells to Systems. 4th ed. Belmont CA., Thomson Brooks/Cole.
- Sjakoer NAA, and Permatasari N. 2011. Mekanisme Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Garam Terhadap Peningkatan Tekanan Darah pada Hewan Coba. *El- Hayah*, 1: 199 - 213.
- Skommer JT, Brittain S, and Rayhaudhuri. 2010. Bcl-2 Inhibits Apoptosis by Increasing the Time-to-Death and Intrinsic Cell –to-Cell Variations in the Mitochondrial Pathway Of Cell Death. *Apoptosis*, 15: 1223 - 1233.
- Stark A.H, and Mader Z. 2002. Olive Oil As a Functional Food: Epidemiology and Nutritional Approaches. *cit Nakbi et.al. Nutrition & metabolism*, 2010, 7: 80 - 81.

- Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress in Pregnancy: A New Wistar Rat Model For Human Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 3: 544 - 550.
- Teguh M, C Johannes Mose, Jusuf SE, Betty SH. 2010. Perbedaann Indeks Apoptosis Plasenta Antara Preeklampsia dan Kehamilan Normal Serta Hubungannya dengan Berat Badan Lahir dan Tekanan Darah Ibu, *Majalah Kedokteran Bandung*, 42: 1 - 5.
- Tortosa MCR, Urbano G, Maria LJ, Teresa N, Maria CG, Amalia M, *et.al.* 1999. Extra – Virgin Olive Oil Increased the Resistence of LDL to Oxidation More Than Refined Olive Oil in Free – Living Men With Peripheral Vascular Disease. *American Society for Nutritional Sciences*, 99: 2177 – 1283.
- Thorburn A. 2004. Death Receptor-Induced Cell Killing. *Cell Signal*, 2: 139 - 144.
- Tziomalos K, Athyros Vasilios G, Asterios K and Dimitri PM. 2010. Pitfalls in the Evaluation of Uric Acid As a Risk Factor for Vascular Disease. *The Open Clinical Chemistry Journal*, 3: 44 - 50.
- Uceda M, and Hermoso M. 1997. La Calidad Del Aceite De Oliva. In *El Cultivo Del Olivo Barranco*, D., fernandez-escobar, R. & Rallo, L, eds). : 539 – 564, *Junia de Andalucia & Ediciones Mundiprensa*, Madrid, spain.
- Valko M. 2006. Free Radical, Metal and Antioxi-dant in Oxidative Stress Induced Cancer. *J.Chen-Bio, Rusia*, 160: 1 – 40.
- Van Wijk MJ, Kublickiene K, Boer K, and Van Bavel E. 2000. Vascular Function in Preeclampsia. *J Cardio vasc Res*, 47: 38 - 48.
- Visioli F, and Galli C. 2002. Biological Properties of Olive Oil Phytochemical. Cit Nakbi *et.al. nutrition & metabolism*, 2010, 7: 80 - 82.
- Villarejo AB, Ramirez-Sanchez M, Segarra AB, Martinez-CanameroM, and Prieto. 2015. Influence Of Extra Virgin Olive Oil on Blood Pressure and Kidney Angiotensinase Activities in Spontaneously Hypertensive Rats. *Planta Med*, 8: 664 - 669.
- Vijayalakshmi B, Kondam A, Kayalvizhi E, Qairunnisa S, Revathi M, and Chandrasekhar M. 2013. Effect of Antioxi-dans in Preeclampsia Women at Increased Risk. *Int.J.Med.Res.Health.Sci*, 2: 177 – 181.
- Volobueva AL, Duan M, Ouyang YB, Emry JF, Stoy C, and Giffard RG. 2008. Overexpression of Mitochondrial Hsp70/Hsp75 Protect Astrocytes Against Ischemic Injury in Vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 1009 - 1016.
- Walker JJ.2000. Preeclampsia. In Angsar MD. 2012. Hipertensi dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.

- Wang Y, Fan H, Zhao G, Liu D, Du L, Wang Z, *et.al.* 2014. MIR-16 Inhibits the Proliferation and Angiogenesis-Regulating Potential of Mesenchymal Stem Cells in Severe Pre-eclampsia. *FEBS J*, 289: 4510 - 4524.
- Weixing Chen, Margaret B, Jessie M, David A and Helen L Gensler. 2009. Inhibitions of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation in Epidermal P53 Gene Of UV- Irradiated Mice by A Tocopherol. *Journal nutrition of cancer*, 29: 205 - 211.
- Widiartini W, Siswati E, Ana S, Ita M, and Eko P. 2012. *Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Tersertifikasi Dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium*. Fak.Peternakan dan Pertanian, Undip.
- Wijayanto H, Pangestiningih TW, and Erdiansyah R. 2007. Pengaruh Pemberian Kafein pada Masa Organogenesis Terhadap Berat Lahir Fetus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *J. Ked. Hewan*, 1: 53 - 58.
- Winarno F.G. 2003. *OMEGA-9 Perannya dalam Diet Jantung Sehat*. [serial on line]. <http://www.intiboga.com/omega9b.htm>.
- Winarno FG. 2002. *Kimia Pangan Dan Gizi*. Jakarta:Gramedia pustaka utama.
- Winarsi Hery. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Winarti Sri. 2010. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta, Graha Ilmu.
- WHO. 2013. *Buku Saku Pelayanan Kesehatan Ibu di Fasilitas Kesehatan Dasar dan Rujukan*. Kemenkes RI, Jakarta.
- Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF dan Pockley AG. 2000. Elevated Levels of Circulating Heat Shock Protein 70 (HSP70) in Peripheral And Renal Vascular Disease. *Heart Vessels*, 1: 18 - 22.
- Xiao L, Zhang C, Xiaohan L, Shiaoqing G, Renming H, Ravikumar B, *et.al.* 2014 Signaling Role of Prokineticin 2 on the Estrous Cycle of Female Mice. *PLoS ONE* 9: 86 - 90. doi:10.1371.
- Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, and Zhao G. 2005. Dicer is Required For Embryonic Angiogenesis During Mouse Development. *J Biol Chem*, 280: 9330 - 9335.
- Yudomustopo B. 2015. Peroksida Lipid dan Glutation Peroksidase Jantung Akibat Diet Makanan Tinggi Garam : Penelitian Eksperimental pada Model Hewan Coba Tikus Sprague Dawley Bunting. *Penelitian Kesehatan, JKPKB*, 30: 36 – 54.

- Yung HW, Atkinson D, Tim CS, Matts Olovson, D Stephen CJ, and Graham JB, *et.al.* 2014. Differential Activation of Placental Unfolded Protein Response Pathway Implies Heterogeneity in Causation of early–and late–onset Preeclampsia. *The Journal of Pathology*, 234: 262 – 272.
- Yudhie. 2010. Mencit dan Tikus. [http:// blog. Your smile my life, htm//](http://blog.Your smile my life, htm//).
- Yusniar. 2004. Faktor Risiko Kejadian Preeklampsia dan Eklampsia di RSUD Labuan Baji Makassar. *Skripsi*. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Zeeman GG, and Dekker G.A. 1992. Pathogenesis of Preeclampsia a Hypothesis. In Angsar M. D. 2012. Hipertensi Dalam Kehamilan. In S. Prawirohardjo, *Ilmu Kebidanan*, Jakarta, PT. Bina Pustaka.

Lampiran 1. Konversi Perhitungan Dosis untuk Beberapa Jenis Hewan dan Manusia (Ghosh, 1971 dan Kusumawati 2004).

	Mencit 20 g	Tikus 200g	Marmot 400g	Kelinci 1.5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20g	1.0	7.0	2.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200g	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 g	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1.5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.10	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Lampiran 2. Laporan Hasil Pengujian Kimia Makanan

No	Parameter	Satuan	Hasil Analisa				Metode Analisa
			Petroco liceli	Betolli	Selva	Filippo berio	
1	pH		5.0	5.0	5.0	5.0	SNI 7381: 2008
2	Asam lemak bebas	%	0,26	0.18 ✓	0.20	0.3 ✓	SNI 7381: 2008
3	Bilangan Iodium	g iod/100g	9,2	8,6	9,2	9,5 ✓	SNI 7381: 2008
4	Bilangan peroksida	mg ek/kg	0,121	0,380	0,196	0,030 ✓	SNI 7381: 2008
5	Bilangan penyabunan	mg/kg	240	235	237	238	CMI Dep.kes RI

Medan, 07 Desember 2015

Manager Teknis

Dra. ERNA WATI, Apt.
195702231989112001



DINAS KESEHATAN PROVINSI SUMATERA UTARA
UPT. LABORATORIUM KESEHATAN DAERAH

Jl. Willem Iskandar Pasar V Barat I No. 4 Medan - 20371
Phone. (061) 6613249-6613286 Fax. (061) 6617079 Ext. 33
Medan



Komite Akreditasi Nasional
Laboratorium - penguji
LP - SSI - IDN

LAPORAN HASIL PENGUJIAN KIMIA MAKANAN
NOMOR : 440.445.01.1/226/XII/2015

Nama Pelanggan : Evi Irianti S.Si,M.Si
Alamat : Mhs.S-3 USU

Tgl. Penerimaan : 16-11- 2015

Tgl. Pengujian : 16-11 s/d 27-11--2015

Sampel : Minyak zaitun
Jumlah sampel : 4 (Empat) botol

No. Lab. : 4263-4264/ L/IX/2015

Lampiran 3. Izin Penelitian ke Laboratorium Hewan Dep. Farmakologi dan Terapi



Nomor : *S23/KUR.2-1-8.29/SPB/2016* Medan, Maret 2018
 Lampiran :
 Perihal : Izin Penelitian

Kepada Yth :
 Kepala Laboratorium Hewan Departemen Farmakologi dan Terapi
 Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran
 di
 Bandung

Dengan hormat, sehubungan dengan kegiatan penelitian mahasiswa Program Studi Doktorat (S3) Ilmu Biologi Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara dengan ini kami memohon izin untuk melakukan pemeliharaan hewan coba yang akan dilaksanakan oleh mahasiswa yang tersebut di bawah:

Nama : EVI IRIANTI
 NIM : 138109005
 Judul Penelitian : Profil ekspresi miRNA dan Hsp70 pada hewan model preeklampsia setelah pemberian extra virgin olive oil (EVOO) (percobaan pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*))
 Tempat Penelitian : Laboratorium Farmakologi

Untuk maksud tersebut kami mohon kepada saudara agar dapat memberi izin untuk melakukan penelitian. Segala biaya yang diperlukan untuk penelitian ditanggung oleh yang bersangkutan.

Demikian disampaikan atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Rektus Prodi,

 Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed.
 NIP. 19560209 199203 1 003

Lampiran 4. Izin Penelitian ke Fakultas Kedokteran Unpad



Nomor : **322/UMS.2.1.29/SPB/2016** Medan, Maret 2016
 Lampiran : -
 Perihal : Izin Penelitian

Kepada Yth.:
 Dekan Fakultas Kedokteran
 Universitas Padjadjaran
 di
 Bandung

Dengan hormat, sehubungan dengan kegiatan penelitian mahasiswa Program Studi Doktor (S3) Ilmu Biologi Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara dengan ini kami memohon izin untuk penggunaan Laboratorium Genetika Molekuler yang akan dilaksanakan oleh mahasiswa yang tersebut di bawah ini :

Nama : EVI IRIANTI
 NIM : 138109005
 Judul Penelitian : Profil ekspresi miRNA dan Hsp70 pada hewan model preeklampsia setelah pemberian extra virgin olive oil (EVOO) (percobaan pada hewan coba tikus putih (rattus norvegicus)
 Tempat Penelitian : Laboratorium Genetika Molekuler

Untuk maksud tersebut kami mohon kepada saudara agar dapat memberi izin untuk melakukan penelitian. Segala biaya yang diperlukan untuk penelitian ditanggung oleh yang bersangkutan.

Demikian disampaikan atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Ketua Prodi,

Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed.
 NIP. 19660209 199203 1 003

Lampiran 5. Rekomendasi Persetujuan Etik Penelitian Kesehatan



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU
PENGETAHUAN ALAM
Jln. Bioteknologi No. 1 Kampus USU Telp. (061) 814290 - Fax (61) 814290
MEDAN

No. 158/KEPH-FMIPA/2016

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komite Etik Penelitian Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam - Universitas Sumatera Utara (*Animal Research Ethics Committees/AREC*) setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

PROFIL EKSPRESI miRNA DAN HSP70 PADA HEWAN MODEL PREEKLAMPSIA SETELAH PEMBERIAN EXTRA VIRGIN OLIVE OIL (EVOO),

menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **EVI IRIANTI** dari Mahasiswi Program Studi S3 Ilmu Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara Medan.

Dapat disetujui pelaksanaannya setelah dipertimbangkan relevansinya terhadap kesehatan manusia yang berpedoman pada prinsip-prinsip hewan coba secara etis untuk penelitian kesehatan yang menggunakan hewan.

Medan, 30 Maret 2016

Ketua

Komite Etik Penelitian Hewan FMIPA USU
(*Animal Research Ethics Committees/AREC*)



Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M. Biomed,
NIP. 196602091992031003

Lampiran 6. Surat Keterangan Penelitian dari Dep. Farmakologi dan Terapi
Fakultas Kedokteran UNPAD

	<p>UNIVERSITAS PADJADJARAN FAKULTAS KEDOKTERAN RSUP Dr. HASAN SADIKIN DEPARTEMEN FARMAKOLOGI DAN TERAPI SMF FARMAKOLOGI KLINIK</p> <p><small>Jl. Raya Bandung Sumedang KM. 21 Jatinangor Sumedang Tlp. (022) 7794583 Fax. 7795595 Jl. Eijkman No. 38 Bandung Tlp. (022) 2032170 Fax. (022) 2037823</small></p>	
<p><u>SURAT KETERANGAN</u> No: <u>071</u> /UN6.C1.1.9/LT/2016</p>		
<p>Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Departemen Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, menerangkan bahwa :</p>		
Nama	:	Evi Irianti
NIM	:	138109005
Instansi	:	Program Doktorat Biologi Fakultas Matematika Pengetahuan Alam Universita Sumatera Utara
Judul	:	Profil Ekspresi miRNA dan Hsp70 pada Hewan Model Preeklampsia Setelah Pemberian Extra Virgin Olive Oil (EVOO) (percobaan pada hewan coba tikus putih (<i>rattus norvegicus</i>)).
<p>telah melakukan penelitian dengan baik mulai tanggal 23 April – 20 Juni 2016 di Laboratorium Hewan Departemen Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.</p>		
<p>Demikian Surat Keterangan ini dibuat, untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.</p>		
<p>Bandung, 29 Juli 2016 Kepala Dept. Farmakologi dan Terapi</p> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  <p>Rovina Kuslami, d.r., Sp.PD., Ph.D. NIP. 196610061997022002</p> </div>		

Lampiran 7. Surat Keterangan Telah Melakukan Penelitian dari Lab. PA FK USU



SURAT KETERANGAN
TELAH MELAKUKAN PENELITIAN
Nomor : 17 /UNS.2.1.1.1.R/PPM/2017

Yang bertanda tangan di bawah ini Ketua Departemen Laboratorium Patologi Anatomi FK USU Medan, menerangkan bahwa :

Nama : Evi Irianti
NIM : 138109005
Fakultas : Fakultas FMIPA USU
Program Studi : Peserta Pendidikan Program Studi Doktorat Biologi
Judul Penelitian : Ekspresi Profil Protein BCL2 dan HSP70 pada Hewan Model Preeklamsia Setelah Pemberian Extra Virgin Olive Oil."

Adalah benar telah selesai melakukan penelitian sejak tanggal 08 November 2016 s/d 05 Januari 2017 di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran USU, bahwa yang bersangkutan telah memenuhi dan menyelesaikan semua persyaratan yang berlaku di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran USU.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat dengan sebenarnya, untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Medan, 18 Januari 2017
Ketua Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran USU



Dr. T. Itho Alifery, M.Ked(PA), Sp.PA, D.Biot
NIP. 1962-0212-198911 1 001

Lampiran 8. Surat Keterangan dari Lab. Genetika Molekular FK. UNPAD**SURAT KETERANGAN**

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Genetika Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran , menerangkan bahwa :

Nama : Evi Irianti
NIM : 138109005
Instansi : Program Doktorat Biologi Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sumatera Utara
Judul : Profil Ekspresi miRNA dan Hsp70 pada Hewan Model Preeklampsia
Setelah Pemberian Extra Virgin Olive Oil (EVOO) (percobaan pada
Hewan coba tikus putih (*rattus norvegicus*)

telah melakukan penelitian dengan baik mulai tanggal 19 – 28 juli 2016 di Laboratorium Genetika Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

Demikian surat keterangan inidibuat, untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bandung, 17 November 2016

Kepala Lab. Genetika Molekuler



Dr. Ani Melani Maskoen, drg., @fkes
NIP.195303171982032001

Lampiran 9. Hasil Uji Normalitas MDA Plasma

Hasil Uji Normalitas Mda Pretest

Tests Of Normality							
	Noklp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Pretest	0	.285	5	.200*	.881	5	.312
	1	.299	5	.165	.826	5	.130
	2	.183	5	.200*	.987	5	.968
	3	.308	5	.136	.796	5	.075
	4	.174	5	.200*	.962	5	.823

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

test homogenitas MDA pretest

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.055	4	20	.125

ANOVA MDA Pretest

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1265.332	4	316.333	6.047	.002
Within Groups	1046.273	20	52.314		
Total	2311.605	24			

Post Hoc Tests (LSD) MDA pretest

(I) Noklp	(J) Noklp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-6.99000	4.57444	.142	-16.5321	2.5521
	2	-9.13400	4.57444	.060	-18.6761	.4081
	3	-21.75800*	4.57444	.000	-31.3001	-12.2159
	4	-12.23800*	4.57444	.015	-21.7801	-2.6959
1	0	6.99000	4.57444	.142	-2.5521	16.5321
	2	-2.14400	4.57444	.644	-11.6861	7.3981
	3	-14.76800*	4.57444	.004	-24.3101	-5.2259
	4	-5.24800	4.57444	.265	-14.7901	4.2941
2	0	9.13400	4.57444	.060	-.4081	18.6761
	1	2.14400	4.57444	.644	-7.3981	11.6861
	3	-12.62400*	4.57444	.012	-22.1661	-3.0819
	4	-3.10400	4.57444	.505	-12.6461	6.4381
3	0	21.75800*	4.57444	.000	12.2159	31.3001
	1	14.76800*	4.57444	.004	5.2259	24.3101
	2	12.62400*	4.57444	.012	3.0819	22.1661
	4	9.52000	4.57444	.050	-.0221	19.0621
4	0	12.23800*	4.57444	.015	2.6959	21.7801
	1	5.24800	4.57444	.265	-4.2941	14.7901
	2	3.10400	4.57444	.505	-6.4381	12.6461
	3	-9.52000	4.57444	.050	-19.0621	.0221

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Korelasi MDA pretest dan TD hr13

				pretest	TD sistole hari ke 13
Spearman's rho	Pretest	Correlation Coefficient		1.000	.444*
		Sig. (2-tailed)		.	.026
		N		25	25
	TD sistole hari ke 13	Correlation Coefficient		.444*	1.000
		Sig. (2-tailed)		.026	.
		N		25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Uji normalitas data dan homogenitas MDA post test

	Noklp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
MDA plasma posttest	0	.280	5	.200*	.925	5	.561
	1	.281	5	.200*	.838	5	.160
	2	.191	5	.200*	.944	5	.692
	3	.260	5	.200*	.893	5	.373
	4	.261	5	.200*	.923	5	.548

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test MDA post test

	MDA plasma posttest
Chi-Square	10.288
Df	4
Asymp. Sig.	.036

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Hasil uji Mann Whitney MDA plasma posttest

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.047	P1-P2	.016	P2 – P3	.036
P0-P2	.602	P1- P3	.251	P2 – P4	.036
P0-P3	.175	P1 – P4	.347		
P0-P4	.175			P3 – P4	.834

Uji wilcoxon MDA pre dan post

	Test Statistics ^a				
	P0	P1	P2	P3	P4
Z	-.135 ^b	-.135 ^b	-2.023 ^c	-2.023 ^c	-2.023 ^c
Asymp. Sig. (2-tailed)	.893	.893	.043	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test b. Based on negative ranks. c. Based on positive ranks.

Lampiran 10. Hasil Uji Ekspresi Hsp70 Serum**ANOVA hsp70 baru**

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		62.835	4	15.709	2.176	.109
	Linear Term	Contrast	9.392	1	9.392	1.301	.268
		Deviation	53.443	3	17.814	2.467	.092
Within Groups			144.409	20	7.220		
Total			207.244	24			

Korelasi MDA Plasma Posttest dan Hsp70

			hsp70 baru	MDA plasma posttest
Spearman's rho	hsp70 baru	Correlation Coefficient	1.000	-.428*
		Sig. (2-tailed)	.	.033
		N	25	25
	MDA plasma posttest	Correlation Coefficient	-.428*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.033	.
		N	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 11. Hasil Uji Apoptosis Indeks**ANOVA apoptosis indeks**

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	88.560	4	22.140	2.102	.119
Within Groups	210.700	20	10.535		
Total	299.260	24			

Korelasi AI dan MDA Plasma posttest

			nilai apoptosis indeks	MDA plasma posttest
Spearman's rho	nilai apoptosis indeks	Correlation Coefficient	1.000	.246
		Sig. (2-tailed)	.	.235
		N	25	25
	MDA plasma posttest	Correlation Coefficient	.246	1.000
		Sig. (2-tailed)	.235	.
		N	25	25

Korelasi AI dan hsp70

		nilai apoptosis indeks	hsp70 baru
nilai apoptosis indeks	Pearson Correlation	1	-.386
	Sig. (2-tailed)		.057
	N	25	25
hsp70 baru	Pearson Correlation	-.386	1
	Sig. (2-tailed)	.057	
	N	25	25

Korelasi AI dengan BB

			nilai apoptosis indeks	rata-rata berat badan fetus
Spearman's rho	nilai apoptosis indeks	Correlation Coefficient	1.000	-.469*
		Sig. (2-tailed)	.	.018
		N	25	25
	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	-.469*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.018	.
		N	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 12. Hasil Uji Ekspresi Bcl-2**Kruskal-Wallis Test****Test Statistics^{a,b}**

	nilai ekspresi bcl2
Chi-Square	11.718
Df	4
Asymp. Sig.	.020

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

HASIL UJI MANN WHITNEY

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.009	P1-P2	.009	P2 – P3	.456
P0-P2	.459	P1- P3	.020	P2 – P4	.167
P0-P3	1.000	P1 – P4	.027		
P0-P4	.595			P3 – P4	.387

Nonparametric Correlations hsp70-bcl2**Correlations**

			hsp70 baru	nilai ekspresi bcl2
Spearman's rho	hsp70 baru	Correlation Coefficient	1.000	-.051
		Sig. (2-tailed)	.	.809
		N	25	25
	nilai ekspresi bcl2	Correlation Coefficient	-.051	1.000
		Sig. (2-tailed)	.809	.
		N	25	25

Lampiran 13. Hasil Uji Tekanan Darah

ANOVA

				Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TD sistole hari ke 5	Between Groups	(Combined)		1197.040	4	299.260	.891	.487
		Linear Term	Contrast	312.500	1	312.500	.930	.346
			Deviation	884.540	3	294.847	.878	.469
	Within Groups			6718.000	20	335.900		
	Total			7915.040	24			
TD sistole hari ke 18	Between Groups	(Combined)		8328.800	4	2082.200	13.411	.000
		Linear Term	Contrast	1021.520	1	1021.520	6.579	.018
			Deviation	7307.280	3	2435.760	15.688	.000
	Within Groups			3105.200	20	155.260		
	Total			11434.000	24			

Post Hoc Tests Multiple Comparisons

LSD : TD sistole hari ke 18

(I) Noklp	(J) Noklp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-24.400*	7.881	.006	-40.84	-7.96
	2	32.600*	7.881	.001	16.16	49.04
	3	8.800	7.881	.277	-7.64	25.24
	4	6.000	7.881	.455	-10.44	22.44
1	0	24.400*	7.881	.006	7.96	40.84
	2	57.000*	7.881	.000	40.56	73.44
	3	33.200*	7.881	.000	16.76	49.64
	4	30.400*	7.881	.001	13.96	46.84
2	0	-32.600*	7.881	.001	-49.04	-16.16
	1	-57.000*	7.881	.000	-73.44	-40.56
	3	-23.800*	7.881	.007	-40.24	-7.36
	4	-26.600*	7.881	.003	-43.04	-10.16
3	0	-8.800	7.881	.277	-25.24	7.64
	1	-33.200*	7.881	.000	-49.64	-16.76
	2	23.800*	7.881	.007	7.36	40.24
	4	-2.800	7.881	.726	-19.24	13.64
4	0	-6.000	7.881	.455	-22.44	10.44
	1	-30.400*	7.881	.001	-46.84	-13.96
	2	26.600*	7.881	.003	10.16	43.04
	3	2.800	7.881	.726	-13.64	19.24

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

uji kruskal wallis tekanan darah sistole hari ke20

Test Statistics^{a,b}

TD sistole hari ke 20	
Chi-Square	13.229
Df	4
Asymp. Sig.	.010

a. Kruskal Wallis Test

HASIL UJI MANN WHITNEY TD HARI KE 20

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.009	P1-P2	.009	P2 – P3	.249
P0-P2	.917	P1- P3	.009	P2 – P4	.465
P0-P3	.169	P1 – P4	.009		
P0-P4	.754			P3 – P4	.249

uji wilcoxon tekanan darah hari ke 13 dan 20**Test Statistics^a**

	P0	P1	P2	P3	P4
Z	-1.625 ^b	-.677 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.104	.498	.043	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

uji wilcoxon TD hr 18 dan 20**Test Statistics^a**

	P0	P1	P2	P3	P4
Z	-2.023 ^b	-2.032 ^b	-1.342 ^c	-.135 ^b	-1.095 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043	.042	.180	.893	.273

a. Wilcoxon Signed Ranks Test b. Based on positive ranks. c. Based on negative ranks.

hasil uji wilcoxon tekanan darah hari 13 - 20**Test Statistics^a**

	P0	P1	P2	P3	P4
Z	-1.625 ^b	-.677 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.104	.498	.043	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

korelasi MDA plasma dan TD hr20

			MDA plasma posttest	TD sistole hari ke 20
Spearman's rho	MDA plasma posttest	Correlation Coefficient	1.000	.215
		Sig. (2-tailed)	.	.303
		N	25	25
	TD sistole hari ke 20	Correlation Coefficient	.215	1.000
		Sig. (2-tailed)	.303	.
		N	25	25

uji kruskal wallis tekanan darah sistole hari ke13**Test Statistics^{a,b}**

	TD sistole hari ke 13
Chi-Square	10.172
Df	4
Asymp. Sig.	.038

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Uji Mann Whitney tekanan darah sistole hari ke 13

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.021	P1-P2	.834	P2 – P3	.402
P0-P2	.036	P1- P3	.462	P2 – P4	.246
P0-P3	.012	P1 – P4	.598		
P0-P4	.020			P3 – P4	.528

uji wilcoxon masing kelompok pada hari ke 5 dan 13**Test Statistics^a**

	P0	P1	P2	P3	P4
Z	-1.342 ^b	-2.032 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.180	.042	.043	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

Lampiran 14. Hasil Uji Proteinuria**Kruskal-Wallis Test Proteinuria****Test Statistics^{a,b}**

	Proteinuria
Chi-Square	2.995
df	4
Asymp. Sig.	.559

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Lampiran 15. Hasil Uji Asam Urat**Kruskal-Wallis Test asam urat setelah NaCl 6% dan EVOO****Test Statistics^{a,b}**

	asam urat setelah NaCl 6%	asam urat setelah EVOO
Chi-Square	9.382	8.662
df	4	4
Asymp. Sig.	.052	.070

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Uji wilcoxon pre post asam urat**Test Statistics^a**

	P0 pre dan post EVOO	P1 pre dan post EVOO	P2 pre dan post EVOO	P3 pre dan post EVOO	P4pre dan post EVOO
Z	-.135 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b	-2.023 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	.893	.043	.043	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

Korelasi asam urat dengan tekanan darah hr 13

			TD sistole hari ke 13	asam urat setelah NaCl 6%
Spearman's rho	TD sistole hari ke 13	Correlation Coefficient	1.000	.369
		Sig. (2-tailed)	.	.069
		N	25	25
	asam urat setelah NaCl 6%	Correlation Coefficient	.369	1.000
		Sig. (2-tailed)	.069	.
		N	25	25

Korelasi asam urat dan td hr20**Correlations**

			TD sistole hari ke 20	asam urat setelah EVOO
Spearman's rho	TD sistole hari ke 20	Correlation Coefficient	1.000	.172
		Sig. (2-tailed)	.	.410
		N	25	25
	asam urat setelah EVOO	Correlation Coefficient	.172	1.000
		Sig. (2-tailed)	.410	.
		N	25	25

Lampiran 16. Hasil Uji Hematokrit.**Anova hematokrit% setelah EVOO**

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		567.600	4	141.900	11.244	.000
	Linear Term	Contrast	6.480	1	6.480	.513	.482
		Deviation	561.120	3	187.040	14.821	.000
Within Groups			252.400	20	12.620		
Total			820.000	24			

hasil uji Kruskal Wallis Ht pre**Test Statistics^{a,b}**

		hematokrit% setelah pemberian NaCl 6%
Chi-Square		13.733
Df		4
Asymp. Sig.		.008

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Uji Mann Whitney hematokrit pre (setelah NaCl 6%)

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.008	P1-P2	.160	P2 – P3	.589
P0-P2	.009	P1- P3	.126	P2 – P4	.522
P0-P3	.008	P1 – P4	.329		
P0-P4	.009			P3 – P4	.827

Uji wilcoxon hematokrit pre dan pro EVOO**Test Statistics^a**

	P0	P1	P2	P3	P4
Z	.000 ^b	-.552 ^c	-1.633 ^c	-2.023 ^c	-2.023 ^c
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.581	.102	.043	.043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

c. Based on positive ranks.

b. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

Korelasi ht pre dengan td hr13

Correlations				
			TD sistole hari ke 13	hematokrit% setelah pemberian NaCl 6%
Spearman's rho	TD sistole hari ke 13	Correlation Coefficient	1.000	.509**
		Sig. (2-tailed)	.	.009
		N	25	25
	hematokrit% setelah pemberian NaCl 6%	Correlation Coefficient	.509**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.009	.
		N	25	25

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

korelasi td hr20 dan ht post

Correlations				
			TD sistole hari ke 20	hematokrit% setelah EVOO
Spearman's rho	TD sistole hari ke 20	Correlation Coefficient	1.000	.304
		Sig. (2-tailed)	.	.139
		N	25	25
	hematokrit% setelah EVOO	Correlation Coefficient	.304	1.000
		Sig. (2-tailed)	.139	.
		N	25	25

Lampiran 17. Hasil Uji Morfometri dan Implantasi.**ANOVA**

rata-rata berat plasenta fetus

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.471	4	.118	2.710	.059
Within Groups	.869	20	.043		
Total	1.340	24			

uji kruskal wallis rata-rata BB fetusTest Statistics^{a,b}

rata-rata berat badan fetus	
Chi-Square	14.540
Df	4
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Uji Mann Whitney rata-rata BB fetus

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.009	P1-P2	.016	P2 - P3	.347
P0-P2	.076	P1- P3	.076	P2 - P4	.028
P0-P3	.117	P1 - P4	.917		
P0-P4	.009			P3 - P4	.175

uji kruskal wallis rata-rata tinggi badan**Test Statistics^{a,b}**

rata-rata tinggi badan fetus	
Chi-Square	18.860
Df	4
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Noklp

Uji Mann Whitney rata-rata panjang badan fetus

Kelompok	Sig	Kelompok	Sig	Kelompok	Sig
P0-P1	.009	P1-P2	.009	P2 – P3	.175
P0-P2	.009	P1- P3	.016	P2 – P4	.009
P0-P3	.047	P1 – P4	.347		
P0-P4	.009			P3 – P4	.076

Korelasi berat plasenta dengan BB fetus**Correlations**

			rata-rata berat badan fetus	rata-rata berat plasenta fetus
Spearman's rho	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	1.000	.875**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	25	25
	rata-rata berat plasenta fetus	Correlation Coefficient	.875**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	25	25

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Korelasi bb dgn jumlah fetus**Correlations**

			total jumlah anak hidup atau mati	rata-rata berat badan fetus
Spearman's rho	total jumlah anak hidup atau mati	Correlation Coefficient	1.000	-.300
		Sig. (2-tailed)	.	.145
		N	25	25
	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	-.300	1.000
		Sig. (2-tailed)	.145	.
		N	25	25

Korelasi spearman TB dan BB**Correlations**

			rata-rata berat badan fetus	rata-rata tinggi badan fetus
Spearman's rho	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	1.000	.935**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	25	25
	rata-rata tinggi badan fetus	Correlation Coefficient	.935**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	25	25

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Korelasi BB dan MDA

			MDA plasma posttest	rata-rata BB fetus
Spearman's rho	MDA plasma posttest	Correlation Coefficient	1.000	-.507**
		Sig. (2-tailed)	.	.010
		N	25	25
	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	-.507**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.010	.
		N	25	25

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Korelasi apoptosis dan BB

			APOPTOSIS	rata-rata BB fetus
Spearman's rho	APOPTOSIS	Correlation Coefficient	1.000	-.418*
		Sig. (2-tailed)	.	.038
		N	25	25
	rata-rata berat badan fetus	Correlation Coefficient	-.418*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.038	.
		N	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Korelasi apoptosis dan fetus mati

			APOPTOSIS	jumlah fetus mati
Spearman's rho	APOPTOSIS	Correlation Coefficient	1.000	.222
		Sig. (2-tailed)	.	.287
		N	25	25
	jumlah fetus mati	Correlation Coefficient	.222	1.000
		Sig. (2-tailed)	.287	.
		N	25	25

ANOVA

total fetus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.360	4	3.840	.530	.715
Within Groups	144.800	20	7.240		
Total	160.160	24			

Lampiran 18. Perhitungan Dosis Pemberian EVOO

Perhitungan dosis EVOO berdasarkan volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada tikus adalah 5 mL (Corbett, *et al*, 2012). Cara perhitungan dosis menggunakan faktor konversi (menurut Laurence & Bacharach, 1964), yaitu mengkonversi dosis dari manusia Eropa dengan berat badan 70 kg terhadap tikus dengan berat badan 200 g adalah 0.018. Asumsi BB rata-rata orang Indonesia adalah 50 kg (Arisman, 2009).

Dosis EVOO yang lazim di masyarakat adalah 2 sendok makan setiap hari (Kinanthi, 2009). Volume rata-rata satu sendok makan EVOO adalah 15 cc (mL). Bila 2 sendok makan, maka $2 \times 15 = 30$ mL. Maka diketahui dosis EVOO yang lazim digunakan oleh masyarakat perhari adalah 30 mL. Sebelum menghitung dosis EVOO maka terlebih dahulu dilakukan konversi dosis untuk tikus, perhitungan dosis berikut ini bersumber pada hasil perhitungan dosis yang telah dilakukan oleh Abigail (2014).

Dosis konversi manusia ke tikus adalah :

$$\begin{aligned} & 30 \text{ mL} \times (70 \text{ kg}/50 \text{ kg}) \times 0,018 \\ & = (30 \text{ mL} \times 1,4) \times 0,018 \\ & = 0,756 \text{ mL/kgBB.} \end{aligned}$$

Dalam penelitian ini digunakan dosis EVOO yang bertingkat (Kusumawati D, 2004) yaitu setengah dari dosis lazim sampai dengan 2 kali dosis lazim, terdiri atas :

$$\begin{aligned} \text{Kelompok uji I : dosis rendah/ dosis I} &= 0,5 \times 0,756 \text{ mL/kgBB} \\ &= 0,378 \text{ mL} \approx 0,38 \text{ mL/kgBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok uji II : dosis sedang/dosis II} &= 1 \times 0,756 \text{ mL/kgBB} \\ &= 0,756 \text{ mL} \approx 0,76 \text{ mL/kgBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok uji III : dosis tinggi/dosis III} &= 2 \times 0,76 \text{ mL/kgBB} \\ &= 1,52 \text{ mL} \approx 1,52 \text{ mL/kgBB} \end{aligned}$$

maka dosis pemberian EVOO adalah :

- a. Kelompok P2 : 0,38 mL/kgBB
- b. Kelompok P3 : 0,76 mL/kgBB
- c. Kelompok P4 : 1,52 mL/kgBB

Pemberian dosis EVOO per oral berdasarkan kelompok yang telah ditetapkan. Pemberian dosis EVOO berbeda setiap tikus tergantung dari BB dan kelompok

perlakuan. Misalkan diketahui BB tikus 185 g pada kelompok P3 (dosis EVOO 0,76 mL/kgBB/hari) maka terlebih dahulu mengkonversi BB tikus yang digunakan yaitu 200 g. Jika 1 kg = 1000 g maka 185 g = 0,185 kg, dan 200 g = 0,2 kg. Dosis EVOO yang diberikan pada tikus adalah :

$$\begin{aligned} & 0,76 \text{ mL/kgBB/hari} \times (0,185 / 0,2) \text{ kgBB} \\ & = 0,76 \text{ mL/hari} \times 0,925 \\ & = 0,70 \text{ mL/hari} \end{aligned}$$

Berarti tikus dengan berat badan 185 g pada kelompok P3 akan diberikan EVOO 0,70 mL per oral/hari.

Lampiran 19. Pembuatan Pakan Ain93-M

Campuran pakan tersebut terdiri atas tepung maizena 620g, kasein 140g, sukrosa 100g, oil (kedelei) 40g, serat 50g, mineral (AIN-93-VX) 35g, vitamin mix (AIN-93M-MX)10g, L.sistin 1.8g, kolin 2.5g dan TBHQ 0.008g (tert-butylhydroquinone). Cara pembuatan pakan adalah dengan prinsip pencampuran bahan dimulai dari volume yang terkecil sampai dengan terbesar. Cara kerjanya adalah L.sistin + vitamin mix dicampur pertama kali. Kemudian setelah keduanya dipastikan tercampur maka tambahkan ke dalamnya mineral + TBHQ (Tersier Butil Hidroquinon) (pengawet bahan makanan) + kolin + serat+ dicampur dan diaduk kembali kesemuanya hingga rata. Selanjutnya tambahkan kasein + sukrosa, campur dan diaduk lagi semuanya, terakhir tambahkan tepung maizena. Setelah dipastikan semua bahan tercampur maka tambahkan minyak, kemudian aduk kembali sampai merata, dan pengerjaan terakhir adalah dengan mencampurkan air sedikit demi sedikit, sampai bahan pakan tersebut kira-kira sudah bisa dicetak dan tidak lengket di tangan. Kemudian bahan pakan tersebut dimasukkan ke dalam cetakan khusus (seperti cetakan untuk membuat mie), atur putarannya sesuai dengan yang diinginkan yaitu berbentuk pelet. Setelah selesai dicetak, maka bahan dipanggang di dalam oven hingga kering dan matang, kemudian disimpan di wadah penyimpanan yang kering, tidak lembab pada suhu ruangan. Untuk pemberian pakan dan mengatur jadwal pemberiannya, peneliti akan dibantu oleh petugas tenaga khusus pemeliharaan hewan coba.

Lampiran 20. Perhitungan Besar Sampel Berdasarkan Rumus Federer (1963)

$$(t - 1) (n - 1) \geq 15$$

Keterangan : t = kelompok perlakuan, n= jumlah sampel perkelompok perlakuan

Sehingga $(t - 1) (n - 1) \geq 15$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4 (n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 4 + 15$$

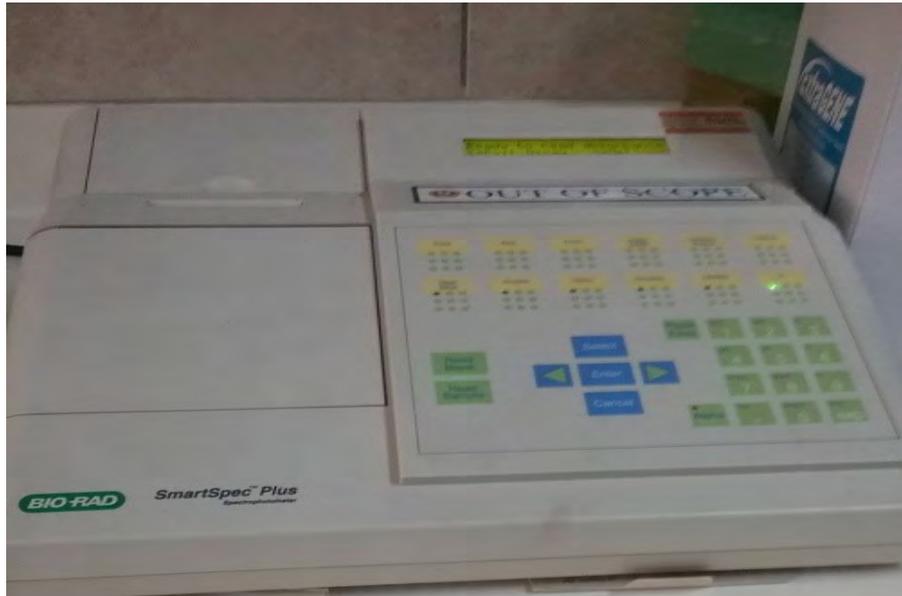
$$4n \geq 19$$

$$n = 19 : 4$$

$$n = 4,75 \approx 5$$

Dalam penelitian ini, tikus dibagi atas kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan, dan jumlah sampel perkelompok adalah lima ekor, sehingga didapat jumlah sampel 25 ekor tikus.

Lampiran 21. Alat yang digunakan dalam penelitian



Spektrofotometri



Washing microplate otomatis