EFEK EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH (*Punica granatum)* TERHADAP KADAR VEGF DAN PlGF PADA KULTUR HUVECs YANG DIPAPAR PLASMA PENDERITA PREEKLAMPSIA

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

OLEH :
RIRIN WIDYASTUTI
126070400111018

PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Angka kematian ibu (AKI) merupakan salah satu indikator derajad kesehatan perempuan. Berdasarkan data Survei Demografi Kesehatan Indonesia (SDKI), selama periode tahun 1991-2007 AKI mengalami penurunan dari 390 menjadi 228 per 100.000 kelahiran hidup. Tahun 2012 AKI kembali meningkat menjadi 359 per 100.000 kelahiran hidup. Target global MDGs ke-5 adalah meningkatkan kesehatan ibu dengan cara menurunkan AKI menjadi 102 per 100.000 kelahiran hidup pada tahun 2015. Mengacu dari kondisi saat ini, untuk mencapai target 102 pada tahun 2015 diperkirakan sulit tercapai. Penyebab terbesar kematian ibu selama tahun 2010-2013 adalah perdarahan, hipertensi dalam kehamilan (HDK) dan infeksi. HDK menyebabkan kematian ibu sebesar 27.1% pada tahun 2013. Salah satu HDK adalah preeklampsia (Kemenkes., 2014).

Preeklampsia merupakan gangguan kompleks yang dapat mengenai setiap sistem organ yang menyebabkan mortalitas dan morbiditas maternal dan neonatal di dunia (Silasi *et al.,* 2010). Angka kejadian preeklampsia berkisar antara 3–5% pada kehamilan yang dapat menyebabkan 16 % kematian maternal dan 10% kematian neonatal di seluruh dunia (Maynard *and* Karumanchi., 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa faktor genetik, imunologi/inflamasi dan peningkatan stres oksidatif berkontribusi terhadap patogenesis terjadinya preeklampsia (Young *et al.,* 2010). Stres oksidatif mengakibatkan peningkatan p38 MAPK sehingga terjadi penurunan aktivitas katalitik yang menyebabkan terjadinya plasentasi abnormal (Agarwal *et al.,* 2012). Invasi trofoblas yang tidak adekuat menyebabkan terjadinya penurunan perfusi plasenta sehingga terjadi

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

defisiensi remodeling arteri spiralis yang dapat mengakibatkan terjadinya hipoksia plasenta. Kondisi hipoksia pada plasenta menyebabkan stres oksidatif pada plasenta yaitu peningkatan *xanthine oxidase* dan NAD(P)H *oxidase. Xanthine oxidase* merupakan sumber terbesar dari superoksida (O_2^-) (Raijmakers *et al.,* 2004). Hipoksia pada plasenta menyebabkan reoxigenation/reperfusion yang dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif pada plasenta yaitu terjadi peningkatan superoksida (Cindrova-Davies., 2014). Stres oksidatif pada plasenta menyebabkan pelepasan faktor antiangiogenik dan sitokin proinflamasi ke dalam sirkulasi maternal (Luo *et al.,* 2011; Young *et al.,* 2010). Pengeluaran protein yang berlebih pada kondisi stres oksidatif dapat mengganggu keseimbangan angiogenik pada maternal (Cindrova-Davies., 2014).

Biomarker terkini dari perkembangan preeklampsia adalah ketidakseimbangan angiogenik (Naljayan *and* Karumanchi., 2013). Ketidaksembangan angiogenik ditandai dengan peningkatan *soluble fms like tyrosine-1* (sFlt1) dan penurunan dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *placental growth factor* (PlGF). Ketidakseimbangan faktor angiogenik berkontribusi terhadap disfungsi endotel (Bridges *et al.,* 2009)

Upaya pencegahan preeklampsia akibat stres oksidatif adalah dengan memanfaatkan antioksidan (Cuningham *et al.*, 2012). Buah delima merah (*Punica granatum*) merupakan sumber antioksidan dari tumbuhan dengan kandungan polifenol dan antosianin yang cukup tinggi (Chen *et al.,* 2012). antosianin dapat menscavenger *reactive oxigen species* (ROS) (Miguel., 2011). Selain mengandung polifenol, buah delima merah juga mengandung vitamin A, C dan E yang dapat mengurangi dan menetralisir ROS (Agarwal., 2012). Hasil penelitian Chen., *et al* (2012) terhadap 20 ibu hamil normal yang diberikan jus delima dan jus apel pada umur kehamilan 35-38 minggu sampai dengan melahirkan dengan menggunakan *immunohistochemistry* dan

immunofluorescence menunjukkan bahwa jus delima mempunyai aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan Hsp 90 yang merupakan marker dari stres oksidatif pada ibu yang mengkonsumsi jus delima. Sedangkan pada *in vitro* yaitu pada kultur trofoblas yang berasal dari jaringan plasenta menunjukkan bahwa jus delima juga memiliki aktivitas antioksidan yaitu penurunan ekspresi Hsp 90 pada model yang terpapar hipoksia. Sedangkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Poston., *et al* (2011) menjelaskan bahwa tidak ada efek dari pemberian vitamin C dan E untuk mengurangi insiden terjadinya preeklampsia tetapi suplementasi antioksidan vitamin C dan E dapat menurunkan konsentrasi plasma dari sFlt1 dan peningkatan konsentrasi plasma dari PlGF. Bertolak dari penelitian tersebut dapat diduga bahwa buah delima merah dapat mengatasi stres oksidatif pada preeklampsia sehingga mungkin dapat memperbaiki VEGF dan PlGF pada preeklampsia.

Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) adalah model untuk mempelajari perubahan dan mekanisme yang belum diketahui dari fungsi endotel pada preeklampsia. HUVECs adalah sel endotel yang berasal dari talipusat bayi baru lahir (BBL) yang memiliki sifat seperti pada maternal. Penelitian terbaru dari HUVECs yang berasal dari pasien preeklampsia menunjukkan bahwa terjadi perubahan morfologi dan fungsi pada sirkulasi maternal. Hal ini dapat diasumsikan bahwa sel endotel maternal dan fetal terjadi perubahan fenotip yang sama selama preeklampsia (Wang *et al.,* 2007).

Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang Efek ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* terhadap kadar VEGF dan PlGF pada kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah ekstrak buah delima merah *(Punica granatum)* mempunyai efek meningkatkan kadar VEGF dan PIGF pada kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk membuktikan efek pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* terhadap peningkatan kadar VEGF dan PIGF pada kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan penurunan kadar VEGF dan PIGF pada kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.
2. Membuktikan efek pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* terhadap peningkatan kadar VEGF pada kultur HUVEs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.
3. Membuktikan efek pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* terhadap peningkatan kadar PIGF pada kultur HUVEs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian dapat memperluas wawasan mengenai perkembangan patofisiologi preeklampsia yang disebabkan karena faktor stres oksidatif akibat radikal bebas, sehingga mengakibatkan ketidakseimbangan faktor angiogenik yang dapat digunakan sebagai marker untuk memprediksi terjadinya preeklampsia sehingga dapat menentukan tindakan pengobatan yang tepat.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1.4.2. Praktis

1. Hasil penelitian dapat menjadikan buah delima merah (*Punica granatum)* sebagai penunjang terapi untuk pengobatan preeklampsia.
2. Memberikan prospek yang lebih baik terhadap pengembangan budidaya dan pemanfaatan buah delima merah (*Punica granatum)* sebagai obat tradisional atau obat herbal sebagai penunjang terapi medis.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 2

TINJAUAN TEORI

2.1. Preeklampsia

2.1.1. Definisi

Preeklampsia didefinisikan sebagai onset baru hipertensi yang ditandai dengan peningkatan tekanan darah sistolik lebih dari 140 mmHg atau tekanan darah diastolik lebih dari 90 mmHg dan protein uria yang melebihi 300 mg dalam 24 jam yang terjadi setelah 20 minggu kehamilan (Naljayan *and* Karumanchi., 2013; Polsani, Phipps, *and* Jim., 2013, Steegers *et al.,* 2010). Preeklampsia merupakan gangguan hipertensi dalam kehamilan yang didefinisikan sebagai onset baru hipertensi, protein urine dan disfungsi vaskular maternal. Manifestasi pada kehamilan lanjut dan umumnya setelah 20 minggu kehamilan (George *and* Granger., 2012).

Preeklampsia adalah penyakit yang ditandai dengan plasentasi yang tidak adekuat karena invasi trofoblas yang kurang pada arteri spiralis uteri. Kekurangan ini dapat menyebabkan terjadinya hipoksia plasenta, sekresi sitokin proinflamasi dan pelepasan faktor angiogenik dan antiangiogenik (Laresgoiti-Servitje *and* Gomez-Lopez., 2012).

Preeklampsia merupakan penyakit yang disebabkan karena gangguan pada fungsi plasenta dalam dua tahap. Tahap pertama yaitu plasenta menghasilkan faktor seperti protein-protein spesifik yang masuk dalam sirkulasi ibu. Tahap kedua yaitu sindrom maternal, pada tahap ini tidak hanya faktor-faktor atau protein yang masuk pada peredaran darah ibu tetapi penyakit ibu yang lain juga dapat mempengaruhi pembuluh darah ibu seperti *cardiorenal,* metabolisme, faktor genetik dan obesitas (Lindheimer *et al.,* 2008).

2.1.2. Klasifikasi Hipertensi Dalam Kehamilan

Berdasarkan *National High Blood Pressure Education Program* (NHBPEP) tahun 2000 dalam Lindheimer *et al* (2008) dan Cunningham *et al* (2012), menjelaskan bahwa klasifikasi preeklampsia dibagi menjadi empat, yaitu :

1. Preeklampsia – eklampsia

   Preeklampsia adalah hipertensi yang muncul setelah umur kehamilan 20 minggu disertai dengan protein uria. Eklampsia adalah preeklampsia yang disertai dengan kejang dan koma.

2. Hipertensi kronik

   Hipertensi kronik merupakan hipertensi yang terjadi pada umur kehamilan 20 minggu atau pertama kali didiagnosis setelah umur kehamilan 20 minggu dan menetap sampai 12 minggu *post partum.*

3. Hipertensi kronik dengan *superimposed preeclampsia*

   Hipertensi kronik dengan *superimposed preeclampsia* adalah hipertensi kronik yang disertai tanda-tanda preeklampsia atau hipertensi kronik disertai protein uria.

4. Hipertensi gestasional

   Hipertensi gestasional disebut juga dengan hipertensi transisi, yaitu hipertensi yang timbul pada kehamilan tanpa disertai proteinuria dan hipertensi menghilang setelah 12 minggu pasca persalinan atau kehamilan dengan tanda-tanda preeklampsia tetapi tanpa protein urin.

2.1.3. Insiden dan Faktor Risiko

Insiden Preeklampsia 3–5% pada seluruh kehamilan, 10% berhubungan dengan mortalitas perinatal dan neonatal. Insiden preeklampsia pada populasi nulipara berkisar antara 3–10% sedangkan pada multipara bervariasi (Cunningham *et al.*, 2012; Silasi *et al.*, 2010).

Faktor risiko yang berkaitan dengan preeklamsia mencakup ras, primipara, nulipara, obesitas, kehamilan ganda, usia ibu lebih dari 35 tahun, riwayat preeklampsia sebelumnya, riwayat dalam keluarga, status hipercoagulasi, hipertensi kronik, penyakit ginjal, lupus (penyakit *autoimune*), DM, sindrom antiphospolipid (Polsani *et al,* 2013; Naljayan *and* Karumanchi, 2013; Cunningham *et al.,* 2012).

2.1.4. Etiologi Preeklampsia

Etiologi terjadinya preeklampsia antara lain :

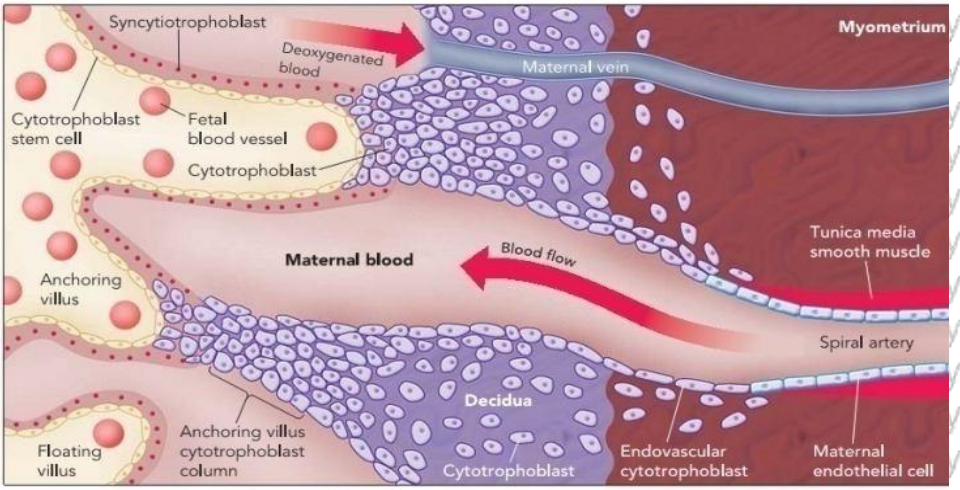
1. Implantasi plasenta disertai invasi trofoblastik abnormal pada pembuluh darah uterus.

Preeklampsia merupakan kelainan dua tahap. Tahap 1 terjadi pada awal kehamilan (8-18 minggu) yang disebabkan karena abnormalitas pada proses remodeling trofoblastik endovaskular yaitu kegagalan remodeling arteri spiralis dalam memasok sirkulasi uteroplasenta (Redman *and* Sargent., 2010), yang melalui serangkaian peristiwa dapat menyebabkan sindrom klinis tahap 2 (Cunningham *et al.,* 2012; Lindheimer *et al.*, 2008). Kegagalan remodeling vaskular pada plasenta mungkin disebabkan karena faktor maternal, genetik, pola hidup dan lingkungan, serta perubahan psikologi pada ibu hamil yang mungkin berhubungan dengan pengurangan perfusi plasenta yang dapat menyebabkan sindrom pada maternal. Komponen penting lainnya adalah stres oksidatif yaitu ROS yang dapat mengurangi perfusi plasenta dengan mengaktifkan monosit dan neutrofil ke dalam ruang intervili. Plasenta mengeluarkan sitokin, faktor antiangiogenik dan *syncytiotrophoblast microparticles* (STBM) (Roberts *and* Hubel., 2009).

Pada implantasi normal (Gambar 2.1), terjadi dua tahap mekanisme yaitu invasi trofoblas membutuhkan proses vascularisasi untuk mendirikan

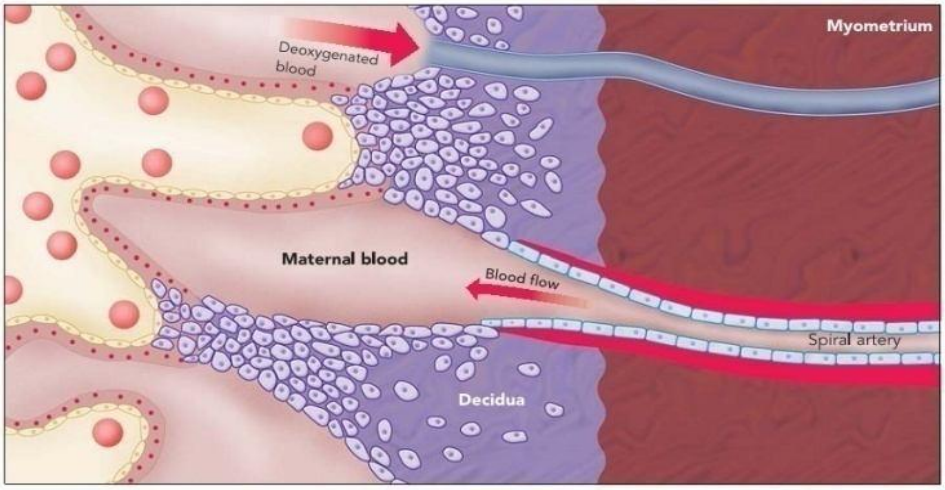
jaringan vascular *fetoplacental*, kemudian terjadi remodeling arteri spiralis lengkap untuk sirkulasi *uteroplacental* (Bdolah *et al.,* 2005). Sitotrofoblas ekstravili yang berasal dari janin berinvasi pada arteri spiral uterin di desidua dan miometrium. Sitotrofoblas invasif menggantikan lapisan endotel dari arteri spiralis maternal. Kemudian mengubah dari pembuluh darah yang kecil menjadi pembuluh darah yang besar sehingga mampu untuk memberikan perfusi plasenta yang cukup untuk mempertahankan pertumbuhan dan perkembangan bayi (Wang *et al.,* 2009).

Pada preeklampsia terjadi invasi trofoblastik abnormal. Bila terjadi invasi yang dangkal seperti ini, pembuluh desidua akan dilapisi oleh trofoblas endovaskular. Arteriola miometrium yang lebih dalam tidak kehilangan lapisan endotel dan jaringan muskuloelastik. Derajad gangguan invasi trofoblas pada arteri spiralis berhubungan dengan keparahan penyakit hipertensi (Cuningham *et al.*, 2012; Wang *et al.,* 2009). Invasi trofoblastik abnormal yang tidak adekuat pada arteri spiralis maternal menyebabkan iskemia plasenta. Plasenta mempunyai peranan penting dalam patogenesis terjadinya preeklampsia, yang diawali dengan plasentasi abnormal yang mengakibatkan pelepasan faktor plasental ke dalam sirkulasi maternal yang dapat menyebabkan respon inflamasi dan aktivasi endotel sistemik (gambar 2.2) (Cuningham, *et al*, 2012; Silasi, *et al,* 2010; Sankaralingam, 2006).



Gambar 2.1.Plasentasi Normal

Dalam perkembangan plasenta normal, sitotrofoblas janin menginvasi arteri spiralis maternal, mengubah dari pembuluh darah kecil ke pembuluh darah besar agar mampu memberikan perfusi yang cukup untuk mempertahankan pertumbuhan janin. Selama proses invasi vaskular, sitorofoblas membedakan dari fenotipe epitel ke fenotipe endotel, disebut *"pseudovasculogenesis "* atau "mimikri pembuluh darah" (Wang *et al*., 2009).



Gambar 2.2.Plasentasi Abnormal Pada Preeklampsia

Pada preeklampsia sitotrofoblas gagal untuk mengadopsi fenotipe endotel invasif. Sebaliknya, invasi arteri spiralis tetap besar dan pembuluh resisten tetap mengecil (Wang *et al*., 2009).

2. Toleransi imunologis yang bersifat maladaptif diantaranya pada jaringan maternal, plasenta dan fetal.

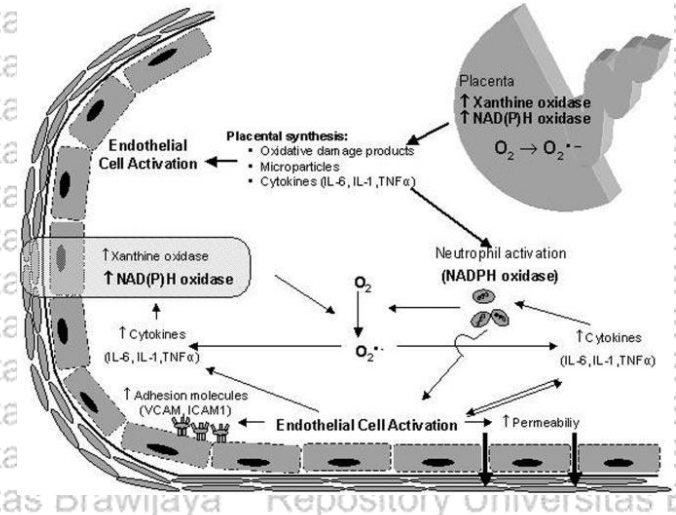
Beberapa penelitian menunjukkan bahwa maladaptif imun merupakan faktor penting dalam patogenesis terjadinya preeklampsia. Faktor risiko

preeklampsia berhubungan dengan paparan antigen paternal dari janin atau sperma yang dapat menyebabkan terjadinya toleransi imun (Powe *et al.,* 2011; George *and* Granger., 2010).

Preeklampsia berkembang secara bertahap dan terakhir akan menjadi penyakit klinis. Hal ini disebabkan karena non spesifik, sistemik (vaskular), respon inflamasi, dan stres oksidatif sekunder pada plasenta. Fase pre konseptual melibatkan toleransi maternal pada antigen paternal antigen oleh plasma seminal. Setelah terjadi konsepsi, regulasi sel T, berinteraksi dengan *indoleamine* 2,3-*dioxygenase,* bersama-sama dengan desidua sel NK dari janin HLA-C pada trofoblas ekstravili dapat memfasilitasi pertumbuhan plasenta oleh regulasi imunologi. Kegagalan komplet pada mekanisme ini akan mengakibatkan terjadinya abortus, sedangkan kegagalan parsial akan mengakibatkan plasentasi abnormal dan disfungsi perfusi uteroplasenta (Redman *and* Sargent., 2010). Redman *dan* Sargent (2008) dalam Cunningham (2012), menjelaskan bahwa selama kehamilan normal, dihasilkan limfosit *T-helper* (Th) sehingga aktivitas tipe 2 meningkat dibandingkan tipe 1. Sel-sel Th_2 memacu imunitas humoral, sedangkan sel Th_1 merangsang sitokin peradangan. Sejak awal trimester kedua pada perempuan yang mengalami preeklampsia, kerja Th_1 meningkat dan terjadi perubahan rasio Th_1/Th_2. Faktor – faktor yang berperan terhadap reaksi radang yang dipacu secara imunologis ini dirangsang oleh *mikropartikel* plasenta serta oleh adiposit. Pemeriksaan plasenta pada preeklampsia menunjukkan bahwa terdapat peningkatan sel dendritik dan infiltrasi makrofag serta terdapat tanda-tanda terjadinya inflamasi kronis (Powe *et al.,* 2011).

3. Stres oksidatif

Sebab pasti dari preklampsia belum diketahui dengan pasti, namun stres oksidatif menunjukkan ciri dari sindrom pada maternal. Invasi trofoblas yang tidak adekuat menyebabkan terjadinya penurunan perfusi plasenta sehingga terjadi defisiensi remodeling arteri spiralis maternal. Defisiensi dari remodeling arteri spiralis dapat mengakibatkan terjadinya hipoksia plasenta. Hipoksia merupakan rangsangan yang sangat kuat untuk mengaktivasi *xanthine oxidase,* yang merupakan sumber terbesar dari superoksida. *Xanthine oxidase* berperan sangat penting pada radikal bebas yang dapat merangsang kerusakan jaringan pada plasenta (Gambar 2.3). Oksidasi NAD(P)H adalah sumber terbesar dari superoksida pada neutrofil, sel endotel vaskular dan pada trofoblas manusia. Aktivasi oksidasi NAD(P)H pada preeklampsia dirangsang oleh peningkatan tekanan vaskular feto-plasenta, peningkatan konsentrasi sitokin plasma maternal dan peningkatan sensitivitas dari angiotensin II (ANG II) (Raijmakers *et al.,* 2004).



Gambar 2.3. Hubungan antara stres oksidatif plasenta dan disfungsi vaskular maternal pada preeklampsia.
Terdapat hipotesis bahwa pembentukan radikal bebas melalui *xanthine oxidase* atau NAD(P)H *oxidase* pada plasenta yang secara tidak langsung memicu aktivasi neutrofil maternal. Aktivasi neutrofil mengakibatkan aktivasi NAD(P)H *oxidase* dan pelepasan superoksida (Raijmakers *et al.,* 2004)

Stres oksidatif pada preeklampsia dapat dibuktikan pada plasenta dan sirkulasi ibu. Plasenta menghasilkan superoksida yang lebih besar dan kapasitas antioksidan yang lebih sedikit dibandingkan pada plasenta normal. Serum ibu menunjukkan adanya modifikasi oksidatif protein dan partikel lipoprotein (Powe *et al.,* 2011). Stres oksidatif pada plasenta dapat dideteksi melalui peningkatan konsentrasi serum dari ROS seperti H_2O_2 atau marker dari lipid peroksidase seperti MDA dan *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) (Agarwal *et al.,* 2012). MDA merupakan produk akhir lipid peroksidase didalam tubuh. TBARS merupakan salah satu indikator lipid peroksidase yang paling awal digunakan dalam penelitian dengan subjek manusia atau hewan coba (Winarsi., 2011).

Stres oksidatif dapat merangsang plasenta untuk mengeluarkan faktor plasenta, termasuk sitokin inflamasi dan faktor antiangiogenik yang menyebabkan peningkatan respon inflamasi ibu dan disfungsi endotel. Hipoksia pada plasenta menyebabkan peningkatan stres oksidatif pada plasenta sehingga menyebabkan peningkatan sFlt1. Perubahan kadar sirkulasi dari sFlt1 mempunyai peranan penting pada patogenesis terjadinya preeklampsia dan berhubungan dengan disfungsi endotel. (Cindrova-Davies., 2014).

Peranan stres oksidatif pada patofisiologi preeklampsia didukung oleh beberapa penelitian yaitu terjadi penurunan yang signifikan pada vitamin antioksidan C, A, E, *β-carotene,* kadar *glutathione* dan kapasitas *iron-binding* pada sirkulasi maternal pada wanita preeklampsia. Pengurangan kadar dan aktivitas *superoxidase dismutase* (SOD) pada maternal dan plasenta menunjukkan adanya penurunan kemampuan antioksidan. Perubahan pada plasenta dengan *hypoxia-reoxygenation* (HR) atau hipoksia pada *invitro* merangsang ekspresi sFlt1 melalui pengaturan HIF-1α. Pengaturan peran

stres oksidatif pada preeklampsia pada *in vitro* dan *in vivo* mengusulkan hipotesa bahwa vitamin antioksidan mempunyai peranan penting pada pengobatan dari patofisiologi penyakit iskemia (Cindrova-Davies., 2014).

Hasil penelitian pada *in vitro* dan kohort menunjukkan bahwa pemberian vitamin C dan E untuk pengobatan preeklampsia tidak mengurangi insiden terjadinya preeklampsia, tetapi suplemen antioksidan dapat menurunkan konsentrasi plasma sFlt1 dan peningkatan konsentrasi plasma PIGF. Sedangkan pada *in vitro* pemberian antioksidan menunjukkan menunjukkan manfaat yang menguntungkan dari antioksidan pada sinyal VEGF (Poston *et al*., 2011).

4. Faktor Genetik

Faktor genetik terjadinya preeklampsia dijelaskan dengan *Mendelian* (penetrasi yang tidak sempurna oleh *autosomal resesif* dan *autosomal* dominan). Penetrasi tergantung pada genotip janin, poligenik/multifaktorial dan mitokondria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara preeklampsia dengan polimorfisme gen yang mengontrol tekanan darah, *coagulation,* atau oksigen radikal bebas seperti *renin angiotensin.* eNOS, *methyltetrhydrofolate dan* faktor V Kleiden. Lokus potensial yang terkait dengan preeklampsia adalah : 2p13, 2p25 dan 9p13. Lokus yang terindentifikasi pada preeklampsia adalah 10q22. Preeklampsia diturunkan oleh ibu bukan dari ayah (Oudejans *et al.,* 2004).

2.1.5. Patogenesis Preeklampsia

Preeklampsia adalah suatu sindrom sistemik kehamilan yang berasal dari plasenta yang disebabkan karena invasi sitotrofoblas plasenta yang tidak adekuat diikuti dengan disfungsi endotel pada maternal. Gangguan dari *renin-*

aldosteron-angiotensin II, stres oksidatif yang berlebihan, peradangan, maladaptasi imun dan kerentanan genetik berkontribusi terhadap patogenesis terjadinya preeklampsia (gambar 2.4) (Young *et al.,* 2010).

Peningkatan stres oksidatif diusulkan sebagai komponen dasar yang dapat menyebabkan terjadinya plasentasi abnormal dan sindrom pada ibu (Parra., 2009). Stres oksidatif ditandai dengan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), yaitu O_2^-, H_2O_2, OH dan $ONOO^-$ yang menyebabkan penurunan tingkat antioksidan dalam mengikat radikal bebas. Peningkatan stres oksidatif dipengaruhi oleh gaya hidup seperti obesitas, kekurangan gizi, penyalahgunaan narkoba, merokok, alkohol dan paparan lingkungan (Agarwal *et al.,* 2012).

ROS mungkin sebagai sumber utama yang menyebabkan patofisiologi pada plasenta tetapi leukosit dan endotel ibu juga mempunyai kontribusi pada patofisiologi ini. Penurunan perfusi plasenta, kemungkinan menyebabkan kondisi hipoksia-reoksigenation yang dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif karena perubahan aktivitas vasomotor pembuluh darah oleh pengaruh humoral dan saraf ibu. Stres oksidatif menyebabkan perubahan adaptif karena penurunan kemampuan degradatif sekunder yaitu penurunan kadar sitokin atau molekul adhesi. Stres oksidatif pada plasenta menyebabkan peningkatan NADPH oksidase dan *endotelin* (ET-1) di plasenta. Proses yang terjadi selama perkembangan plasenta menyebabkan gangguan migrasi dan diferensiasi sel trofoblas (gambar 2.5) (Parra., 2009).

Kondisi stres oksidatif menyebabkan AT1-AA menginduksi aktivasi dari oksidasi NADPH yang dapat mengakibatkan peningkatan produksi ROS. Peningkatan ROS mengakibatkan peningkatan nitrasi p38 MAPK sehingga terjadi penurunan aktivitas katalitik yang menyebabkan terjadinya plasentasi abnormal (Agarwal *et al.,* 2012 dan Rodrigo., 2009). Invasi trofoblas yang tidak adekuat pada arteri spiralis menyebabkan terjadinya hipoksia plasenta. HIF-1α

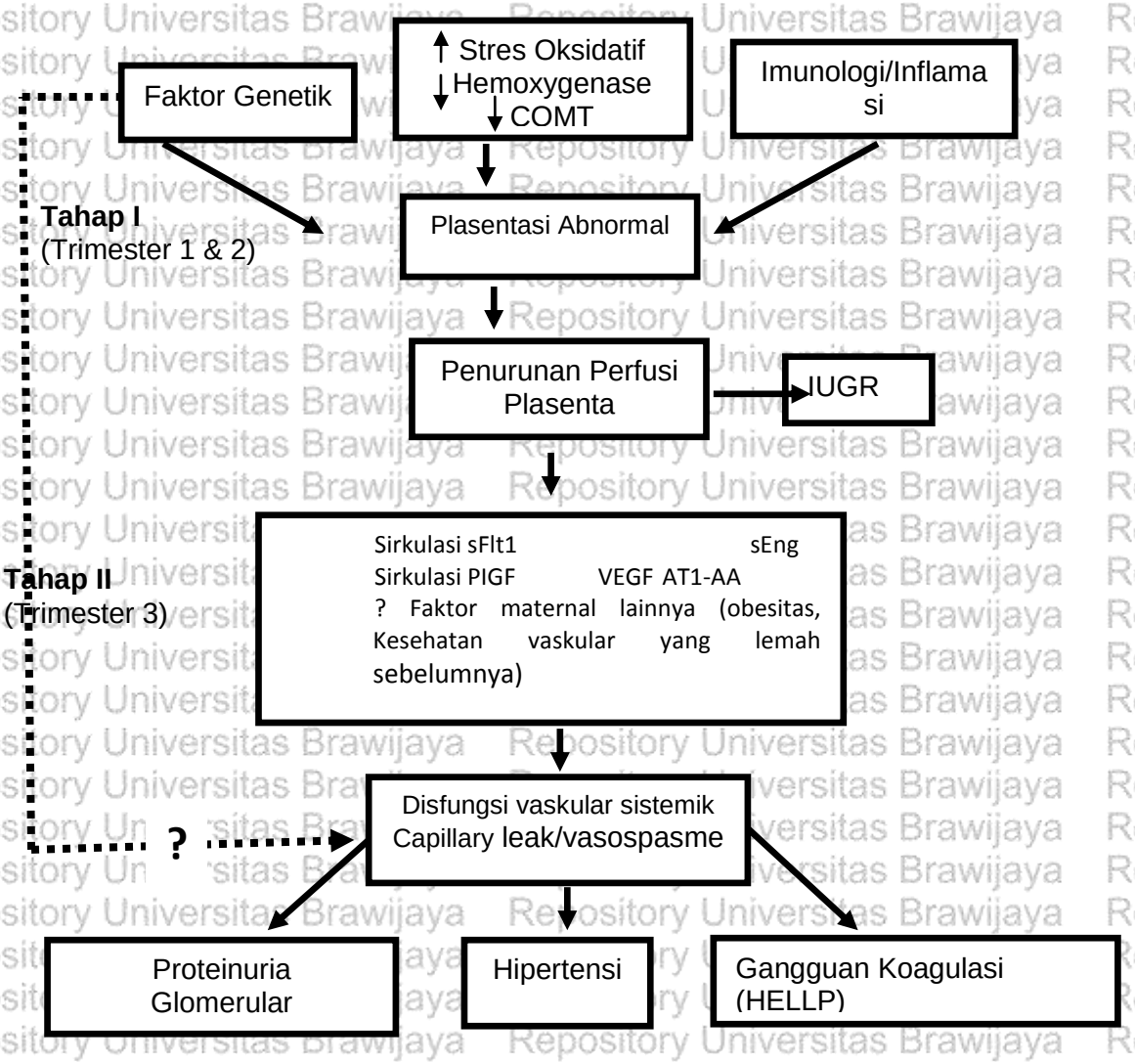
pada kondisi hipoksia/iskemia plasenta dapat mempengaruhi ekspresi dari *transforming growth factor-β3* (TGF-β3) dan menghambat diferensiasi ekstravili trofoblas dan penurunan invasi trofoblas pada awal kehamilan. Overekspresi HIF-1α dan TGF-β3 pada plasenta preeklampsia menunjukkan indikasi kondisi hipoksia persisten pada plasenta (Laresgoiti-Servitje *and* Gomez-Lopez., 2012).

Iskemia pada plasenta menyebabkan terjadinya penurunan perfusi plasenta yang mengakibatkan stres oksidatif plasenta (Cuningham *et al.*, 2012; Silasi *et al.,* 2010; Young *et al., 2010;* Gilbert *et al., 2008;* Sankaralingam., 2006). Stres oksidatif pada plasenta menyebabkan pelepasan berbagai faktor plasenta seperti faktor antiangiogenik (sFlt1 dan sEng) dan sitokin proinflamasi (Luo *et al.,* 2011).

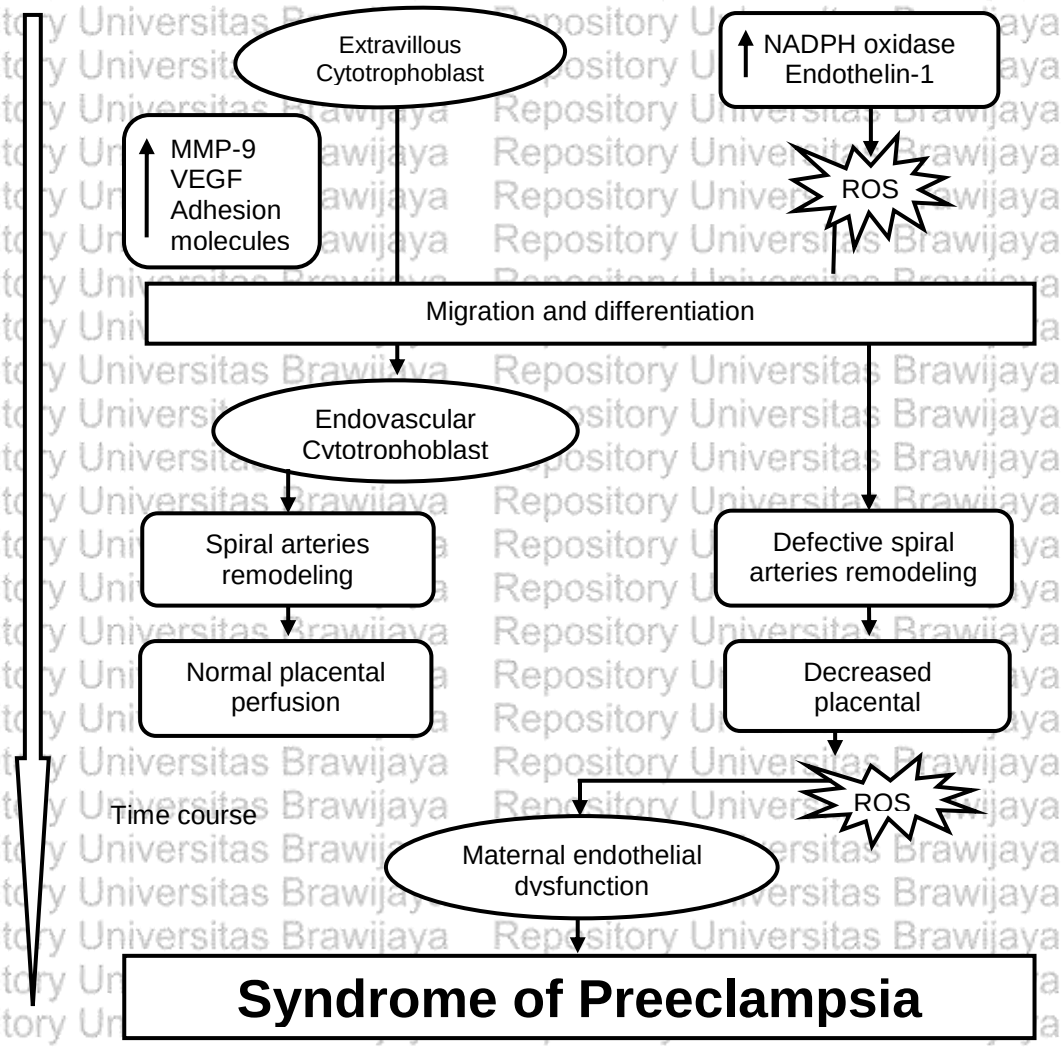
Stres oksidatif menginduksi *growth arrest and DNA damage inducible 45 alpha* (Gadd45α) yang mengakibatkan aktivasi P38 MAPK yang dapat menyebabkan peningkatan sFlt1 pada sel endotel. Peningkatan sFlt1 dapat menyebabkan ketidakseimbangan pada faktor angiogenik (Luo *et al.,* 2011). Ketidakseimbangan faktor angiogenik dapat digunakan sebagai prediktif perkembangan preeklampsia (Naljayan *and* Karumanchi., 2013).

Peningkatan sFlt-1 menyebabkan terjadinya penurunan pada konsentrasi VEGF dan PlGF. sFlt1 adalah penghambat yang kuat pada VEGF dan PlGF, karena berikatan dengan reseptor endogen dari VEGF dan PlGF pada sirkulasi maternal dan menghalangi efek angiogenik (Laresgoiti-Servitje *and* Gomez-Lopez., 2012). VEGF adalah mediator penting pada fungsi endotel normal. VEGF berperan untuk mengatur stres oksidatif pada sel dan berkontribusi untuk menjaga vaskular melalui produksi NO (Bridges *et al.,* 2009). Penurunan VEGF dapat mengubah keseimbangan dari anion superoksida dan nitrit oksida (NO) sehingga menyebabkan disfungsi endotel.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa VEGF dan PIGF diinduksi pada kondisi hipoksia plasenta dan dihambat oleh sFlt1. TGF-β3 memproduksi sEng dan kerjanya menghambat VEGF dan terlibat dalam disfungsi endotel. Peningkatan kadar antiangiogenik faktor seperti sFlt-1 dan sEng yang dikeluarkan plasenta ke sirkulasi maternal, menyebabkan disfungsi endotel (Young *et al.,* 2010).



Gambar 2.4.Patogenesis Preeklampsia.
Faktor genetik, kelainan imune (sel NK/*human leucocyte antigen* (HLA)-C axis), dan faktor stres oksidatif mungkinmenyebabkan terjadinya disfungsi plasenta dan terjadi pelepasan faktor antiangiogenik (seperti *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt1) dan *soluble endoglin* (sEng) dan mediator inflamasi yang menginduksi terjadinya hipertensi, protein uria dan komplikasi lain dari preeklampsia. Abbreviations : AT1-AA, *Angiotensin Tipe II reseptor*, COMT, *cathecol-O-methyltransferase*, HELLPS, *hemolisisis, Placental growth factor* (PIGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF). (Young *et al,* 2010).



Gambar 2.5 Patogenesis Preeklampsia.
Hipotesis yang menjelaskan peranan stres oksidatif dalam patogenesis dari sindrom preeklampsia . Efek antioksidan vitamin C dan E dalam menangkal dua tahap penting pada proses plasentasi dit*and*ai dengan t*and*a (-). ROS (*reactive oxygen species);* MMP-9 (*matrix metaloproteinase-9),* VEGF (*vascular endothelial growth factor).* (Parra., 2009)

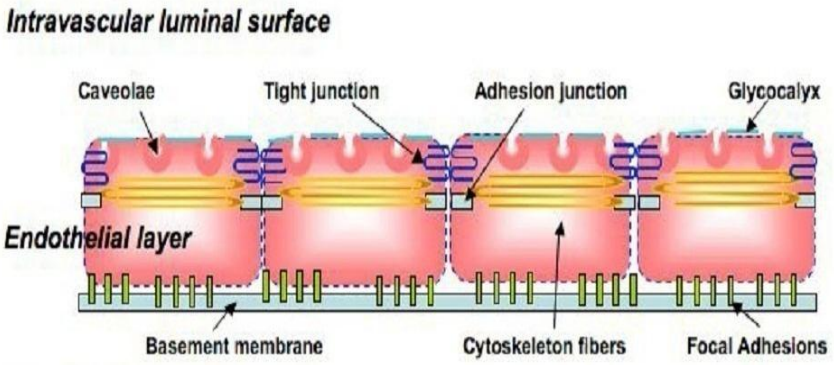
2.1.6. Disfungsi Endotel

Sel endotel adalah monolayer sel datar poligonal yang berkembang secara terus menerus diatas *luminal surface* pada seluruh pembuluh darah. Tahanan biologikal yang strategis terletak diantara otot polos pembuluh darah dan aliran darah (Rodrigo *et al.,* 2009). Wang., *et al* (2007) menjelaskan bahwa sel endotel merupakan sensor yang memberikan respon sinyal yang beragam dalam sirkulasi darah, yang dihasilkan oleh matriks sub-endotel, dan diproduksi sebagai

hasil dari interaksi dengan sirkulasi darah (Gambar 2.6). Fungsi dari sel endotel bervariasi tergantung dari ukuran dan distribusi pembuluh darah. Sel endotel berperan dalam modulasi vaskular, kontrol hemostasis primer, pertahanan dan inflamasi, transportasi nutrisi dan soluble faktor lainnya dengan aktivasi atau inaktivasi hormon vasoaktif. Disfungsi sel endotel ditandai oleh pergeseran dari kerja endotel menuju pengurangan vasodilatasi, keadaan proinflamasi dan properti protrombin. Disfungsi sel endotel bertanggung jawab dalam aspek klinis dari sindrom preeklampsia pada maternal (Rodrigo *et al.,* 2009).

Faktor yang mungkin berkontribusi menyebabkan terjadinya disfungsi endotel adalah iskemia plasenta, induksi toksisitas lipoprotein, peningkatan ROS, mal adaptasi imunologi yang mengakibatkan sintesa dan pelepasan sitokin proinflamasi. Stres oksidatif merupakan mediator utama terjadinya preeklampsia. Namun, mekanisme terjadinya preeklampsia melibatkan banyak faktor diantaranya adalah modulator antiangiogenik. Faktor plasenta yang dilepaskan ke aliran darah ibu oleh plasenta yang abnormal dapat mengakibatkan disfungsi endotel sistemik. Pada stres oksidatif, ROS menyebabkan terjadinya penurunan biovabilitas NO. NO merupakan faktor humoral yang mengatur aliran darah plasenta janin dan mempertahankan resistensi rendah dan melemahkan vasokontriktor pada pembuluh darah plasenta janin. Stres oksidatif dapat mengaktifkan neutrofil dan monosit dalam ruang intervili dan menghasilkan ROS ketika terjadi kontak dengan endotel ibu. Stres oksidatif berkontribusi pada patogenesis disfungsi endotel yang melibatkan rekrutmen monosit dalam preeklampsia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *F2-isoprostanes* memediasi peningkatan ekspresi IL-8 dalam makrofag manusia, mendukung hubungan antara stres oksidatif/peroksidase lipid dan peradangan pada sel yang menunjukkan peran *f2-isoprostane* pada disfungsi endotel (Rodrigo *et al.,* 2009).

Kerusakan dari sel endotel sistemik menjadi faktor utama tanda dan gejala dari preeklampsia. Pada disfungsi endotel terdapat ketidakseimbangan antara vasodilator dan vasokonstriktor. Pada sel desidua terdapat banyak sel yang apabila diaktivasi akan mengeluarkan faktor tertentu yang dapat merusak sel endotel (Gilbert *et al.,* 2008). Pada disfungsi endotel terjadi ketidakseimbangan antara vasodilator (prostasiklin dan NO) dan vasokonstriktor (endothelin 1, tromboxan dan angiotensin II) sehingga akan terjadi vasokonstriksi luas yang menyebabkan terjadinya hipertensi.



Gambar 2.6. Struktur Sel Endotel.
Struktur sel endotel merupakan kunci dan protein yang menjaga integritas endotel dan barier yang memastikan bahwa larutan intravaskular tidak bocor ke dalam kompartemen ekstravaskular. Protein *tight junction* dan protein *adhesion junction* merupakan segel persimpangan antara sel endotel. *Tight junction* dan protein *adhesion junction* mengikat protein membentuk kompleks jugsional dan berinteraksi dengan aktin sitoskeleton untuk meningkatkan kekuatan adhesi sel-sel *focal adhesion* dari sel endotel dengan matriks yang mendasari struktur penting untuk fungsi endotel normal dan barier. *Caveolae,* sebagai pembawa vesikel yang bertanggungjawab untuk transportasi transeluler protein plasma albumin dan lainnya diseluruh endotelium, dapat membantu untuk mempertahankan tekanan *transcapilillary* protein onkotik, yang sangat penting untuk keseimbangan cairan yang normal (homeostatis). Glikokaliks bermuatan negatif pada permukaan protein glikan coatof dan menyerap protein plasma yang melapisi permukaan luminal endotel vaskular. Muatan negatif *glycocalyx* sel darah merah dan melindungi endotel pembuluh darah dari platelet dan leukosit yang menempel (Wang *et al.,* 2007).

2.2. Plasma Penderita Preeklampsia

Plasma penderita preeklampsia adalah plasma yang didapat dari ibu hamil dengan hipertensi yang muncul setelah umur kehamilan 20 minggu dengan

kriteria tekanan darah ≥ 140/90 mmHg, peningkatan ≥ 30/15 mmHg dan protein uria ≥ 2+ dengan pemeriksaan dipstik, ≥ 300 mg/dL urin dalam 24 jam (Cunningham *et al.,* 2012).

Pada beberapa penelitian didapatkan bahwa *circulating factor* pada plasma preeklampsia adalah sitotoksik pada kultur sel endotel. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa plasma dari ibu hamil dengan preeklampsia dapat mengaktivasi sel endotel *in vitro* (Faas *et al.,* 2010). *Circulating factor* dapat mengubah fungsi endotel dengan mengaktivasi sel inflamasi seperti monosit, granulosit dan endotel (Faas *et al.,* 2010; Baker *et al.,* 1995). Plasma penderita preeklampsia merangsang migrasi transendotelial dari neutrofil pada *in vitro.* Neutrofil tersebar merata pada endotel dan infiltrasi *pada intimal space.* Infiltrasi neutrofil berhubungan dengan marker inflamasi pada endotel. Neutrofil pada endotel memperburuk kondisi endotel dengan melepaskan ROS, TNF-α dan *myeloperoxidase* (Walsh., 2006). Plasma penderita preeklampsia mengandung oksidan (lipid peroksidase). Lipid peroksidase dapat mengaktifkan NF-$_{\kappa}$B sehingga dapat meningkatkan ekspresi *intracelluler adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecul-1* (VCAM-1) dibandingkan pada plasma atau serum normotensi. (Wang *et al.,* 2007; Walsh., 2006 ; Takacs *et al.,* 2001).

Plasma preeklampsia juga mengandung sitokin proinflamasi (TNF-α dan IL-6) dan Angiotensin II (Sankaralingam *et al.,* 2006). Sitokin proinflamasi diduga memproduksi *superoxide anion* (O_2^-) lebih tinggi dan terjadi peningkatan H_2O_2 dibandingkan pada kontrol negatif yang dipapar plasma kehamilan normal. O_2^- dimutasikan oleh enzim SOD menghasilkan H_2O_2 karena adanya logam transisi, seperti Fe^{2+}, Cu^{2+} akan menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif ($O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH^- + O_2$) (Miguel., 2011). Radikal hidroksil akan menyerang membran sel, ikatan ganda asam lemak tak jenuh sehingga terbentuk radikal lipid. Radikal lipid ini berinteraksi dengan molekul oksigen (O_2) menjadi lipid

peroksida. Lipid peroksida dan peningkatan stres oksidatif dapat mengakibatkan penurunan antioksidan enzimatis (Miguel., 2011).

Pada preeklampsia terjadi penurunan biovabilitas NO, namun pada sel endotel yang telah dipapar plasma penderita preeklampsia 2% menunjukkan peningkatan sintesa NO (NOS), peningkatan ekspresi protein *endothelial NOS* (eNOS) dan peningkatan produksi *nitrite*. *Circulating factor* yang ada pada plasma preeklampsia diduga meningkatkan produksi NO pada vaskular penderita preeklampsia. Reaksi NO dengan anion superoksida menjadi peroksinitrit. Hal ini dapat menyebabkan peningkatan peroksinitrit pada plasenta dan endotel vaskular maternal. Peroksinitrit tidak hanya sebagai indikator dalam NO *scavenging* tetapi menunjukkan efek fungsi endotel. Peroksinitrit meningkatkan ekspresi protein *inducible* (i) NOS pada isolasi sel endotel melalui aktivasi dari NF-$_{K}$B. kemudian rangsangan peroksinitrit meningkatkan NO yang dapat meningkatkan stres oksidatif. Selain itu, peroksinitrit menurunkan ekspresi sintesa *prostacyclin*, yang dapat mengubah keseimbangan vasokonstriksi (Sankaralingam *et al.,* 2006).

2.3. *Angiogenesis*

2.3.1. Definisi

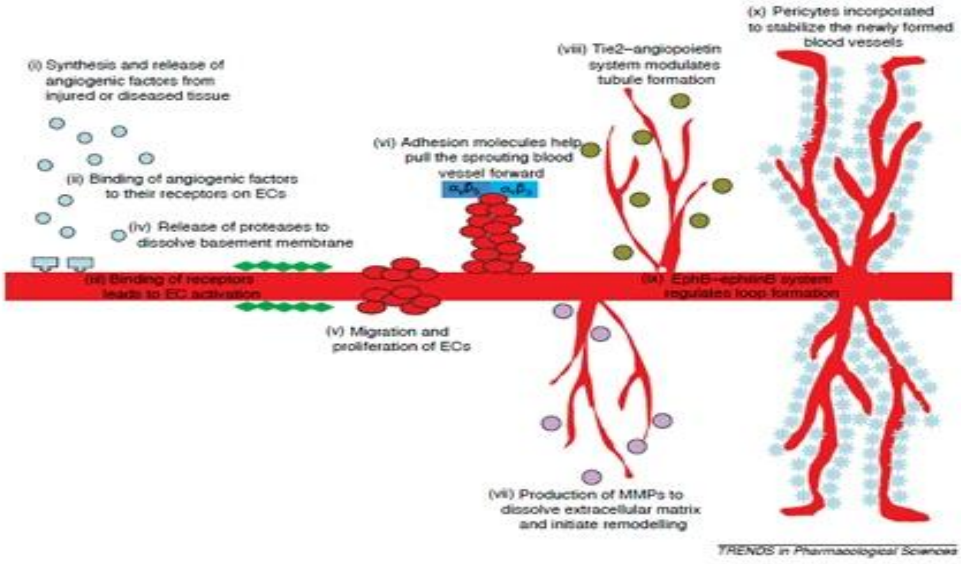
Asupan nutrisi dan oksigen diperlukan untuk perkembangan embrio yang dimediasi melalui pembentukan pembuluh darah baru. Proses pembentukan pembuluh darah baru terdiri dari *vasculogenesis* dan *angiogenesis. Vasculogenesis* adalah proses pembentukan pembuluh darah baru secara *de novo,* dari diferensiasi sel-sel endotel, dengan ataupun tanpa melalui migrasi *angioblast. Angiogenesis* adalah pembentukan pembuluh darah mikro/ *microvessel* pada jaringan avaskular dari pembuluh darah yang sudah terbentuk sebelumnya. *Angiogenesis* terbentuk secara alami didalam tubuh baik dalam

kondisi fisiologis ataupun patologis (Frisca *et al.,* 2009; Roskoski., 2007). *Angiogenesis* adalah proses dari neovaskularisasi dari pre-existing pembuluh darah, sedangkan *vasculogenesis* adalah proses generasi pembuluh darah baru dari *angioblast* (Kopcow *and* Karumanchi., 2007).

2.3.2. Tahapan *Angiogenesis*

Tahapan *angiogenesis* (Gambar 2.7) diawali melalui proses inisiasi, yaitu enzim protease yang dilepaskan dari sel endotel yang telah teraktivasi, pembentukan pembuluh darah vascular, antara lain terjadinya degradasi *matriks ekstraseluler (ECM),* migrasi dan proliferasi sel endotel, serta pembuatan ECM baru yang kemudian dilanjutkan dengan maturasi pembuluh darah untuk memenuhi kebutuhan jaringan (Felmeden *et al.,* 2003).

Tahapan-tahapan angiogenesis terdapat pada gambar 2.7 berikut ini.



Gambar 2.7 Tahap-tahap proses angiogenesis.
Peristiwa seluler dan molekuler yang tergambar dalam proses *angiogenik.* Tergantung pada lingkungna mikro (seperti tekanan oksigen, infiltrasi leukosit dan pelepasan faktor *angiogenic* seperti vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-β dan platelet). Untuk perkembangan pembuluh darah baru dan mengalami pemetangan menjadi jaringan fungsional atau mengalami regresi untuk mempertahankan kepadatan pembuluh darah asli (Fan *et al.,* 2006).

Menurut Fan, *et al* (2006) tahapan *angiogenesis* terdiri dari :

1. Kumpulan sel pada jaringan yang mengalami kerusakan atau hipoksia akan melepaskan *angiogenic growth factor* yang berdifusi ke jaringan sekitar.
2. *Angiogenic growth factor* akan berikatan dengan reseptor spesifik di dalm sel endotel yang terletak dekat dengan pembuluh darah yang sudah ada.
3. Sel endotel akan menjadi aktif pada saat faktor pertumbuhan berikatan dengan reseptornya. Sinyal akan dikirimkan dari permukaan sel menuju ke inti sel.
4. Sel endotel akan memproduksi enzim protease yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler yang dapat menyebabkan terbentuknya lubang kecil pada membran basalis untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah.
5. Sel endotel mulai berproliferasi dan bermigrasi keluar menuju lubang pada pembuluh darah yang sudah ada.
6. Molekul khusus yang disebut molekul adhesi atau integrin (avb3, avb5) yang berperan sebagai pengait untuk membantu menarik pembuluh darah yang baru terbentuk untuk berkembang.
7. Enzim tambahan (*matrix metalloproteinase*/MMP) diproduksi untuk mengakomodasi pertumbuhan pembuluh darah baru, terjadi *remodeling* jaringan disekitar pembuluh darah.
8. Interaksi *angiopoietin-Tie-2* memodulasi pembentukan tubule/pembuluh sehingga sel endotel akan tumbuh dan berkembang membentuk pembuluh darah.
9. Pembuluh-pembuluh darah baru akan saling berhubungan membentuk *loop* pembuluh darah yang dapat mensirkulasikan darah.
10. Akhirnya terbentuk pembuluh darah baru yang distabilisasi oleh sel-sel otot khusus (sel otot polos, perisit) sebagai struktur penyokong.

2.3.3. Pengaturan Proses *Angiogenesis*

Implantasi, plasentasi dan berlangsungnya kehamilan membutuhkan koordinasi dari perkembangan vaskular dan adaptasi baik dari maternal, paternal dan fetal. Implantasi, plasentasi dan berlangsungnya kehamilan membutuhkan koordinasi dari perkembangan vaskular dan adaptasi baik oleh maternal ataupun fetal. Vaskularisasi yang cukup menyebabkan endometrium kaya vaskularisasi yang diperlukan untuk terjadi implantasi, perkembangan dan perluasan pembuluh darah vili plasenta yang berfungsi untuk suplai nutrisi dan oksigen dari maternal ke fetal. Proses *angiogenesis* diperlukan untuk terjadinya implantasi. Vaskularisasi yang tidak sesuai dapat mengakibatkan terjadinya gangguan atau kegagalan implantasi (Torry *et al.,* 2007).

Sel endotel dapat diinduksi oleh faktor angiogenik untuk bereplikasi dan membentuk pembuluh darah baru untuk merespon stimulus fisiologi dan patologi. Tubuh yang sehat akan menjaga keseimbangan baik modulasi maupun inhibisi *angiogenesis* melalui regulasi kadar faktor angiogenik secara ketat. Ketika jumlah faktor angiogenik yang diproduksi dalam jumlah melebihi inhibitor angiogenik, maka sel endotel akan teraktivasi sehingga terjadi pembentukan pembuluh darah baru dan sebaliknya jika inhibitor angiogenik melebihi faktor angiogenik yang diproduksi sehingga proses angiogenesis akan terhenti (Frisca *et al.,* 2007).

2.4. Faktor Angiogenik

2.4.1. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

1. Famili dan Reseptor VEGF

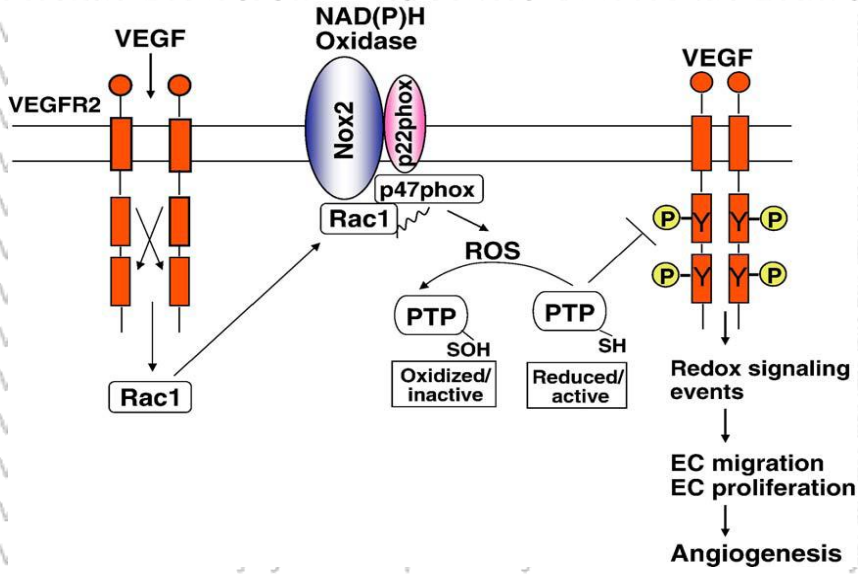
Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan faktor angiogenik atau *vasculogenesis* yang kuat yang terlibat dalam perkembangan vaskular baik fisiologis ataupun patologis (Torry *et al.,* 2007). Famili VEGF terdiri dari 5 anggota, yaitu : VEGF (atau VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-

D dan PlGF. Masing-masing protein mengandung urutan sinyal yang sudah mengalami pembelahan selama biosentesa (Roskoski., 2007). Reseptor VEGF adalah VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR) dan dua reseptor non enzimatik yaitu *neuropilin-1 dan neuropilin-2* (Torry *et al.,* 2007).

2. Peran VEGF pada Angiogenesis

VEGF merupakan glikoprotein yang disekresi dalam *homodimer* (45 kDa) yang terlibat dalam proses *angiogenesis* dan *vasculogenesis* (Cindrova-Davies., 2014). VEGF merupakan faktor kunci pertumbuhan angiogenik, merangsang proliferasi dan migrasi pada sel endotel primer melalui reseptor VEGF yaitu (VEGFR2, KDR/Flk). Ikatan VEGF memulai *autophosphorylation* dari VEGFR2, yang menghasilkan aktivasi dari *downstream signaling enzym* termasuk ERK1/2, Akt dan eNos pada sel endotel. Selanjutnya merangsang *angiogenesis.* (Ushio-Fukai., 2006). VEGF merupakan protein angiogenik yang kuat yang penting untuk integritas endotel (Cindrova-Davies., 2014).

Sel endotel menghasilkan ROS yang terdiri dari O_2^- dan H_2O_2 yang berperan dalam respon fisiologi dan patologi. Konsentrasi ROS yang tinggi menyebabkan terjadinya apoptosis/kematian sel dan stres oksidatif yang berhubungan dengan penyakit *cardiovascular*, termasuk hipertensi, kegagalan jantung, *atherosclerosis* dan *diabetus militus.* Produksi ROS yang rendah memberikan respon untuk faktor pertumbuhan, pengkondisian jaringan iskemia/hipoksia, fungsi signal molekul untuk memediasi proliferasi dan migrasi sel endotel (Ushio-Fukai., 2006).



Gambar 2.8 Peranan ROS yang berasal dari NADPH oxidase pada signaling VEGF yang berhubungan dengan Angiogenesis.
VEGF berikatan dengan VEGFR2/KDR yang menyebabkan aktivasi dan translokasi dari GTPase Rac1 ke dalam membran plasma, yang merangsang NADPH oxidase pada sel endotel. ROS yang berasal dari oksidasi mungkin oksidasi dan menginaktifkan *protein tyrosine phosphatases* (PTPs) dimana diatur negatif oleh VEGFR2, dengan demikian meningkatkan *autophosphorylation* VEGFR2 dan peningkatan *redox signaling* berhubungan dengan respon *angiogenic* seperti proliferasi dan migrasi (Ushio-Fukai., 2006).

Sumber ROS pada sel endotel adalah NADPH *oxidase* yang terdiri dari Nox 1, Nox 2 (gp91 phox), Nox4, p22phox, p47 phox, p67 phox dan G protein Rac1. NADPH *oxidase* diaktifkan oleh beberapa perangsang seperti faktor pertumbuhan (VEGF), *angiopoietin-1*, sitokin, Ang II pada sel endotel. ROS diproduksi dengan aktivasi dari NADPH *oxidase* melalui rangsangan *redox signaling pathway* yang berbeda yang berhubungan dengan *angiogenesis.* VEGF berikatan dengan dua reseptornya yaitu Flt-1 dan KDR pada sel endotel. Efek mitogenik dan kemotaktik dari VEGF pada sel endotel melalui KDR dimana diaktivasi melalui *autophosphorylation* dari sisa tirosin pada *cytoplasmic kinase domain.* Peristiwa ini diikuti oleh *downstream signaling pathways* seperti MAPK, Akt dan eNOS yang penting untuk migrasi dan proliferasi sel endotel. VEGF merangsang peningkatan produksi ROS melalui

aktivasi dari *Rac1-dependent NADPH oxidase* pada sel endotel. ROS terlibat dalam VEGF yang diinduksi oleh KDR *autophosphorylation* pada sel endotel (Gambar 2.8). (Ushio-Fukai., 2006).

VEGF memediasi peningkatan permeabilitas pembuluh darah pada mikrovaskular tumor. Dalam keadaan normal, VEGF diekspresikan dalam kadar yang bervariasi. Tekanan oksigen sebagai regulator VEGF. Kondisi hipoksia dapat menginduksi ekspresi VEGF dengan cepat. Sebaliknya, kadar oksigen yang normal menyebabkan ekspresi VEGF menurun dan mengalami stabilisasi. Ekspresi VEGF tergantung pada *epidermal growth factor* (EGF), *interleukin-1β, platelet derived growth factor* (PDGF), TNF-α dan *transforming growth factor-β1*(TGF-β1) (Frisca *et al.,* 2009). Pada preeklampsia konsentrasi dari VEGF menurun dan terjadi sebelum onset terjadinya penyakit (Cindrova-Davies., 2014).

VEGF meningkatkan *angiogenesis*, mempengaruhi produksi sel endotel dari vasodilatory NO dan *prostacyclin* serta penting untuk regulasi vascular. Aksi proinflamatory dari VEGF dapat mengakibatkan terjadinya patogenesis dari disfungsi endotel. VEGF mungkin sebagai mediator disfungsi endotel pada preeklampsia melalui reseptor Flt1 (Sankaralingam *et al.,* 2006).

VEGF merupakan gen yang pertama kali diaktivasi selama preimplantasi dari perkembangan embrio. Pada blastosit dapat menstimulasi *angiogenesis* melalui produksi dari jumlah VEGF yang signifikan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ekspresi VEGF dan reseptornya pada trimester I pada desidua basalis dan parietalis pada beberapa tipe sel, termasuk sel endotel, sel epitel, makrofag dan trofoblas. VEGF juga menstimulasi proliferasi dan invasi trofoblas. VEGF mempunyai peranan aktif pada invasi trofoblas dan *angiogenesis* selama implantasi (Plaiser., 2011).

VEGF diproduksi lebih awal pada tahap embrio (2-8 sel) dan dapat meningkatkan mikrovaskular endometrium sel endotel pada *in vitro.* Ekspresi VEGF pada pada awal kehamilan berhubungan dengan kadar estradiol dan hCG. hCG juga dapat merangsang ekspresi VEGF pada jaringan endometrium (Torry *et al.,* 2007).

2.4.2. *Placental Growth Factor* (PlGF)

1. Karakteristik PlGF

PlGF merupakan unsur utama dari family VEGF yang merupakan faktor proangiogenik. PlGF adalah protein proangiogenik yang sama kuatnya dengan VEGF (George *and* Granger., 2010). Sebagian besar, PlGF diproduksi oleh trofoblas. Splicing alternatif menghasilkan empat isoform yang berbeda dalam ukuran. PlGF-1 dan PlGF-2 merupakan isoform utama. Masing-masing PlGF-1 dan PlGF-2 terdiri dari 131 dan 152 sisa asam amino. (Perkin Elmer., 2009; Torry *et al., 2007*).

PlGF adalah protein dimerik dan monomer yang disediakan bersama oleh rantai *disulfide.* Masing-masing monomer PlGF terdiri dari 8 sisa *cysteine* dan dua diantaranya terlibat dalam rantai *disulfide* diantara monomer. PlGF mampu membentuk heterodimer dengan VEGF, terutama ketika dua protein diekspresikan pada sel yang sama (Perkin Elmer., 2009).

2. Reseptor dan Pathway Sinyal Transduksi PlGF

Pada umumnya PlGF berikatan dengan reseptor trans membran yang disebut dengan *vascular endothelial growth factor receptor 1* (VEGFR-1) yang biasa dikenal dengan *Fms-like tyrosine kinase-1* (Flt-1). VEGFR-1 adalah reseptor tirosin kinase (RTK) dan berikatan dengan VEGF dan PlGF. Bentuk larut dari VEGFR-1 adalah sVEGFR-1 (sFlt-1), dimana tidak memiliki domain

trans membran dan domain intraseluler kinase. Pada sirkulasi, sFlt-1 berikatan dengan PIGF dan VEGF sehingga mengurangi fraksi bebas, dan mampu menstimulasi reseptor batas membran pada faktor angiogenik (Elmer., 2009).

PIGF tergantung pada VEGF melalui sinyal langsung oleh VEGFR-1. Ikatan PIGF menyebabkan terjadinya *autophosphorylation* pada VEGFR-1, dimana akan menginduksi pathways sinyal transduksi. Pada sel trofoblast, sel yang berasal dari plasenta mempunyai peranan yang penting untuk pembentukan plasenta. PIGF berikatan dengan VEGFR-1 akan menginduksi fosforilasi spesifik dan aktivasi *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) dan p38. Pada HUVECs, ikatan PIGF menyebabkan aktivasi pada regulasi sinyal ekstraseluler kinase 1 dan 2 (ERK 1/2) yang menyebabkan pelepasan NO. Ekspresi monosit VEGFR-1 dan stimulasi dengan PIGF mengaktifkan p38 dan ERK 1/2 yang menyebabkan terjadinya migrasi monosit. JNK, p38 dan ERK 1/2 adalah milik dari *motitogen-activated protein kinases* (MAP *kinases,* MAPKs) yang terlibat dalam regulasi pada proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis dan juga respon dari rangsangan stres yang berbeda (Elmer., 2009).

3. Aspek Biologi

PIGF diekspresikan pada sel endotel (ECs), trofoblas, monosit dan sel eritrosit. *Glial cell missing 1* (GCM1) adalah faktor transkripsi dari PIGF pada trofoblas. Hipoksia adalah pencetus dari degradasi GCM1 yang mengakibatkan penurunan ekspresi dari PIGF. *Metal-responsive transcription factor* (MTF-1) juga dilaporkan meregulasi ekspresi PIGF pada trofoblas. Ekspresi GCM-1 dan MTF-1 menurun karena hipoksia yang dapat mengakibatkan penurunan ekspresi PIGF (Elmer., 2009).

Pada preeklampsia, hipoksia plasenta menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi PIGF pada trofoblas (Torry *et al.,* 2007).. Produksi yang berlebihan dari jumlah sFlt1 menyebabkan penurunan VEGF dan PIGF bebas pada maternal. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan ekspresi pada PIGF dan produksi yang berlebihan pada sFlt-1(Elmer., 2009).

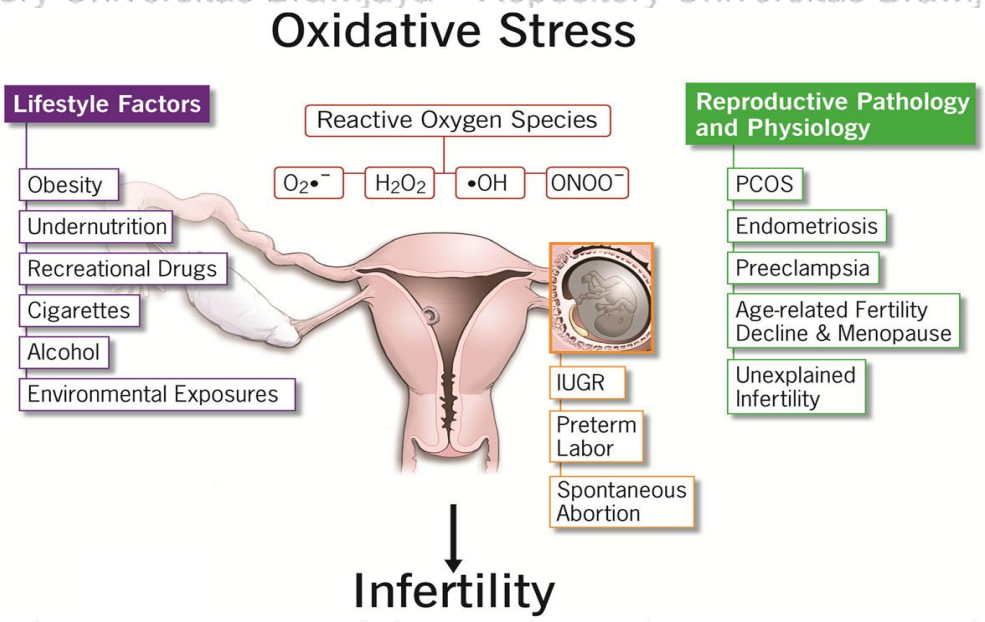
Pada penelitian menunjukkan bahwa penurunan PIGF menunjukkan patologi *angiogenesis* pada mencit dewasa dan PIGF adalah angiogenik baik pada *in vivo* atau *in vitro.* PIGF berhubungan dengan dengan peningkatan perfusi plasenta pada maternal dan fetal. PIGF bersama dengan VEGF merangsang proses *angiogenesis* baik secara langsung atau tidak langsung. PIGF merupakan *growth factor* yang telibat dalam tahapan molekular dan morfologi dari *vasculogenesis* dan *angiogenesis* (Torry *et al.,* 2007).

Ekspresi PIGF selama tahap awal implantasi sedikit diketahui, akan tetapi PIGF mempunyai peranan pada perkembangan plasenta dan pada *angiogenesis* normal yang terjadi selama tahap awal implantasi. Pada tahap selanjutnya, ekspresi PIGF yang rendah dan ekspresi sFlt-1 yang tinggi pada maternal berhubungan dengan on-set dari preeklampsia. PIGF yang rendah menyebabkan terjadinya defisiensi *angiogenesis* plasenta (Torry *et al.*, 2007).

2.5. Stres Oksidatif dan Ketidakseimbangan Faktor Angiogenik Pada Preeklampsia

Stres oksidatif disebabkan karena ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Ketidakseimbangan ini dapat terjadi karena perubahan oleh karena peningkatan kadar ROS dan atau RNS atau karena penurunan mekanisme pertahanan antioksidan yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel (Agarwal *et al.,* 2012; George *and* Granger., 2010). Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan sistem pertahanan antioksidan kalah yang

dapat menyebabkan kondisi yang tidak cocok untuk fisiologi organ reproduksi perempuan.



Gambar 2.9 Stres Oksidatif.
Faktor yang berperan dalam perkembangan stres oksidatif dan dampaknya terhadap reproduksi perempuan (Agarwal *et al.*, 2012).

Pada gambar 2.9 menjelaskan bahwa kondisi stres oksidatif dapat mengakibatkan berbagai penyakit gangguan reproduktif yaitu endometriosis, *polycystic ovary syndrom* (PCOS) dan infertilitas yang tidak dapat dijelaskan. Selain gangguan reproduktif dapat menyebakan komplikasi selama kehamilan yaitu abortus spontan, *abortus habitualis*, preeklampsia dan pertumbuhan janin terhambat (IUGR). Obesitas, malnutrisi dan gaya hidup termasuk merokok, alkohol dan penyalahgunaan narkoba dapat menyebabkan gangguan pada oksidatif (Agarwal *et al.*, 2012)

Selama trimester I dan II, arteri spiralis mengalami remodeling yang luas sehingga terjadi pengurangan aliran darah pada maternal dan meningkatkan perfusi uteroplasenta. Remodeling arteri spiralis abnormal adalah kunci dari patogenesis terjadinya preeklampsia (Lindheimer *et al.*, 2009). Pada implantasi normal, sitotrofoblas ekstravili yang berasal dari janin berinvasi pada arteri spiral

uterin di desidua dan miometrium. Sitotrofoblas invasif menggantikan lapisan endotel dari arteri spiralis maternal. Kemudian mengubah dari pembuluh darah yang kecil menjadi pembuluh darah yang besar sehingga mampu untuk memberikan perfusi plasenta yang cukup untuk mempertahankan pertumbuhan dan perkembangan janin (Wang *et al.,* 2009). Namun, pada preeklampsia terjadi invasi trofoblastik inkomplet yang dapat menyebabkan iskemia plasenta (Cuningham, *et al*, 2012; Silasi, *et al,* 2010; dan Sankaralingam, 2006).

Iskemia/reperfusion plasenta menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada plasenta dan terjadi penurunan kemampuan antioksidan alami pada plasma (Agarwal *et al.,* 2012; Sedeek *et al.,* 2008). Stres oksidatif dapat menyebabkan peningkatan nitrasi dari p38 MAPK, yang menghasilkan penurunan aktivitas katalitik. Hal ini menyebabkan plasentasi abnormal dan pertumbuhan terhambat pada preeklampsia. Stres oksidatif memungkinkan terjadinya apoptosis berlebihan pada vili trofoblas. *Mikropartikel dari sinsitiotrofoblas membran microvili* (STBMs) ditemukan pada seluruh sirkulasi darah ibu dengan preeklampsia dan diketahui dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel *in vitro* (Agarwal *et al.,* 2012).

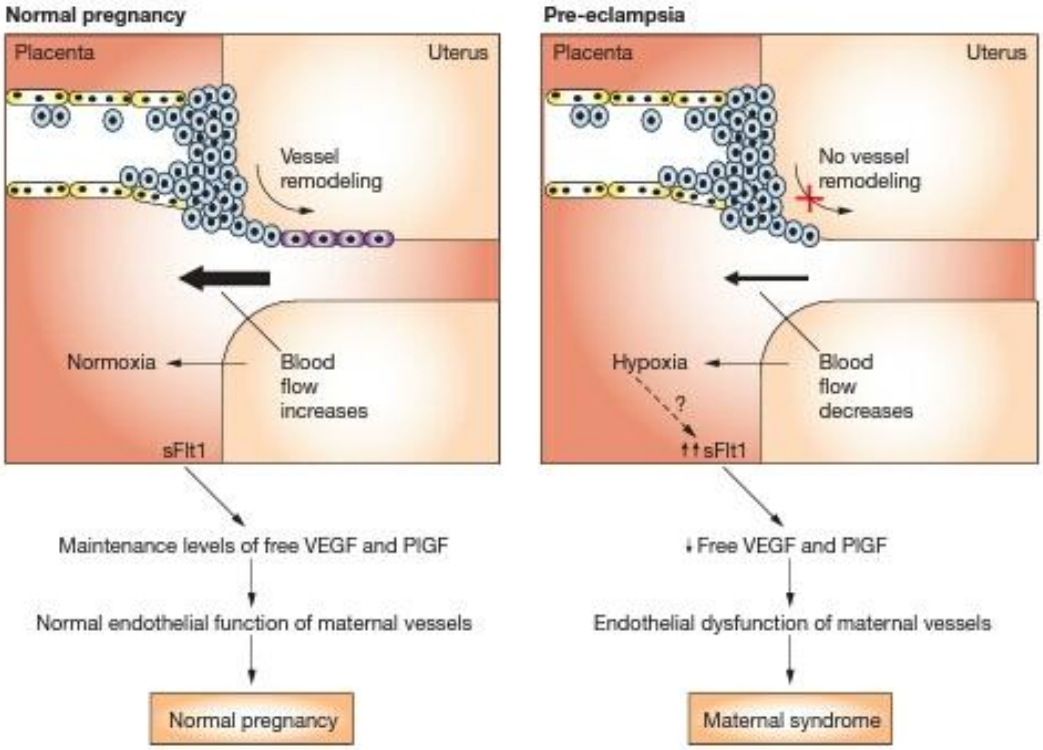
Stres oksidatif pada plasenta merangsang pengeluaran sitokin inflamatori dan faktor antiangiogenik yang menyebabkan perubahan pada respon inflamasi maternal dan disfungsi endotel (Cindrova D., 2014). Plasenta adalah sumber dari faktor antiangiogenik dan mengatur proses *angiogenesis*. Faktor penting yang dikeluarkan dari plasenta adalah sFlt-1 dan sEng. Kedua faktor antiangiogenik tersebut berkontribusi dalam defisiensi remodeling arteri spiralis (Luo *et al.,* 2011).

Pengeluaran faktor antiangiogenik dari plasenta ke dalam sirkulasi maternal dapat mengganggu keseimbangan angiogenik yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel yang bermanifestasi pada tanda dan

gejala preeklampsia (Cindrova D., 2014; Laresgoiti-Servitje *and* Gomez-Lopez., 2012). Pada kehamilan normal, VEGF dan PIGF mempunyai konsentrasi yang tinggi pada sirkulasi (Lindheimer *et al.,* 2009; Noris *et al.,* 2005). VEGF menginduksi sel endotel melalui ekspresi integrin $\alpha_v\beta_3$, molekul yang berhubungan dengan *angiogenesis* dan invasi sitotrofoblas. Selanjutnya, sitotrofoblas mempunyai reseptor VEGF, termasuk *reseptor fms like tirosinekinase 1* (Flt1). Kadar VEGF yang tinggi dapat ditemukan pada invasi sitotrofoblas dini yaitu 6 minggu pasca fertilisasi, interaksi antara reseptor dengan VEGF dan PIGF penting untuk invasi dan *pseudovasculogenesis,* Sedangkan sFlt1 mengalami penurunan pada invasi trofoblast pada *in vitro.* Sirkulasi kadar sFlt1 relatif rendah pada awal kehamilan dan mulai meningkat pada trimester III, serta TGF-β menurun pada 9 minggu kehamilan untuk invasi trofoblas (Young *et al.,* 2010). Kenaikan sFlt-1 bersamaan dengan penurunan kadar VEGF dan PIGF (Shenoy. *et al.,* 2010).

Pada preeklampsia terjadi proses antiangiogenik yang berlebihan dimana kadar sFlt-1 yang berlebihan dipercaya menjadi penyebab penurunan yang berlebihan pada VEGF dan PIGF sehingga menyebabkan disfungsi endotel berat dan gejala preeklampsia pada maternal (Gambar 2.10). sFlt-1 adalah antagonis yang kuat untuk VEGF dan PIGF (Shenoy. *et al.,* 2010) dan merupakan varian reseptor Flt-1 untuk VEGF dan PIGF. Peningkatan kadar sFlt-1 pada sirkulasi ibu akan menurunkan kadar PIGF dan VEGF bebas dalam sirkulasi sehingga terjadi disfungsi endotel. sFlt-1 menghambat VEGF dan PIGF karena berikatan dengan beberapa faktor pada sirkulasi maternal dan memblokir efek angiogenik (Laresgoiti *and* Gomez., 2012). sEng menghambat berbagai isotop TGF-β untuk berikatan dengan reseptor di endotel sehingga menyebabkan penurunan vasodilatasi yang bergantung nitrat oksida endotelial. Penyebab produksi berlebihan protein antiangiogenik oleh plasenta masih menjadi misteri. Bentuk

terlarut protein-protein ini tidak meningkat pada sirkulasi janin atau cairan amnion, dan kadar mereka dalam darah ibu menurun drastis setelah kelahiran (Cunningham *et al*, 2012).



Gambar 2.10. Peran dari *soluble form of Fms-like tyrosine kinase 1* pada sindrom maternal dari preeklampsia.
Fms-like tyrosine kinase-1 yang diproduksi oleh plasenta adalah bentuk *soluble* yang dihasilkan melalui *alternative splicing. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1* dilepaskan dalam jumlah yang besar ke dalam darah. *Soluble Fms-like tyrosine kinase 1* berikatan dengan *vascular endotelial growth factor* dan *placental growth factor* yang mengakibatkan pengurangan kadar bebas mereka pada darah oleh karena sFlt1 antagonis dengan kedua faktor tersebut dan memelihara fungsi endotel normal (Panah kiri). Plasenta preeklampsia melepaskan *soluble Fms-like tyrosine kinase 1* dalam jumlah yang sangat besar dibandingkan pada plasenta normal (panah kanan). Kemudian menyebabkan disfungsi vaskuler pada maternal dari preeklampsia. PlGF, *placental growth factor;* sFlt1, *soluble Fms-like tyrosine kinase 1; VEGF, vascular endotelial growth factor* (Noris *et al.*, 2005).

Faktor antiangiogenik (sFlt1) dapat berlawanan dengan VEGF dan PlGF dengan berikatan dengan keduanya dan mencegah interaksi dengan reseptor membran endogennya (Kopcow *and* Karumanchi., 2007). Peningkatan sFlt-1

menyebabkan terjadinya penurunan pada konsentrasi VEGF. Penurunan VEGF dapat mengubah keseimbangan dari *superoxide anion* dan NO sehingga menyebabkan disfungsi endotel. Selain itu, ketidakseimbangan faktor angiogenik juga dapat mengakibatkan peningkatan produksi superoksida pada plasenta dan vaskular (Bridges *et al.,* 2009).

Stres oksidatif akibat peningkatan dari radikal bebas menyebabkan penurunan tingkat antioksidan yang mengikat radikal bebas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa stres oksidatif plasenta mungkin terlibat dalam patologi preeklampsia. Stres oksidatif terjadi ketika ROS meningkat dan menguasai pertahanan antioksidan tubuh. ROS telah diusulkan sebagai promotor peroksidasi lipid dan disfungsi sel endotel yang umumnya terkait dengan preeklamsia (Gupta *et al.,* 2005). Penelitian pada preeklampsia menunjukkan bahwa terjadi peningkatan lipid hidroperoksida dan isoprostone bebas pada desidua. Selain itu kadar peroksinitrit pada endotel pembuluh darah lebih tinggi dibandingkan pada kehamilan normal yang diikuti dengan penurunan *superoxide dismutase* (SOD) dan sintesa NO (George *and* Granger., 2010).

Stres oksidatif pada plasenta dapat diketahui dari peningkatan konsentrasi serum seperti H_2O_2 atau marker peroksidase lipid seperti MDA dan *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS). Pada preeklampsia terjadi peningkatan kadar sirkulasi dari H_2O_2 vasokonstriktor dan penurunan kadar vasodilator NO yang dapat menyebabkan terjadinya vasokonstriksi dan hipertensi. Modulasi neutrofil merupakan sumber penting dari ROS dan merupakan hasil dari peningkatan produksi anion stres oksidatif dan penurunan NO yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel pada preeklampsia (Agarwal *et al.,* 2012).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Burton., *et al* (2011) dalam Poston., *et al* (2011) menjelaskan bahwa hipoksia plasenta menyebabkan stres pada retikulum endoplasma. Stres pada retikulum endoplasma digabungkan dengan

sintesa ROS. Sintesa ROS mungkin meningkatkan malfungsi arteri spiralis maternal. Secara bersamaan stres pada retikulum endoplasma dan sintesa ROS menyebabkan pelepasan sitokin, sintesa prostaglandin, peningkatan ekspresi antiangiogenik (sFlt-1) dan mengaktifkan *apoptosis.*

Peningkatan stres pada retikulum endoplasma berkontribusi terhadap respon inflamasi yang dirangsang oleh p38 dan NF-κB (Burton dan Jauniaux, 2011). Aktivasi dari NF-κB meningkatkan stres oksidatif, stres pada retikulum endoplasma dan inflamasi. NF-κB dapat diaktifkan oleh peningkatan stres pada retikulum endoplasma melalui aktivasi PERK-eIF2α atau IRE1α *autophosphorylation.* Reaksi ini dapat menghalangi calcium dan antioksidan (Cindrova-Davies., 2014).

Peranan dari stres oksidatif pada patofisiologi plasenta didukung oleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada kadar antioksidan vitamin seperti vitamin C, A, E, *β-carotene* dan kadar *glutathione* dalam sirkulasi maternal pada preeklampsia. Penurunan SOD dan aktivitasnya dalam sirkulasi maternal pada preeklampsia menunjukkan penurunan antioksidan total. Penelitian pada *model of reduced uterine perfusion pressure* (RUPP) dengan pemberian pengobatan vitamin C dan E tidak dapat menurunkan tekanan darah. Sedangkan pada *in vitro,* pemberian vitamin C dan E menunjukkan bahwa tidak menurunkan insiden terjadinya preeklampsia tetapi pemberian suplementasi antioksidan (vitamin C dan E) menyebabkan penurunan yang signifikan pada konsentrasi plasma dari sFlt1 dan peningkatan konsentrasi plasma dari PIGF. Berdasarkan pada percobaan *in vitro* tersebut menunjukkan bahwa manfaat dari efek antioksidan pada signal VEGF. Vitamin antioksidan dapat bersama dengan peranan fisiologi dari VEGF dan tampaknya manfaat potensial dari antioksidan dapat digunakan untuk pencegahan dan memperbaiki preeklampsia (Poston *et al.,* 2011).

2.6. Radikal Bebas

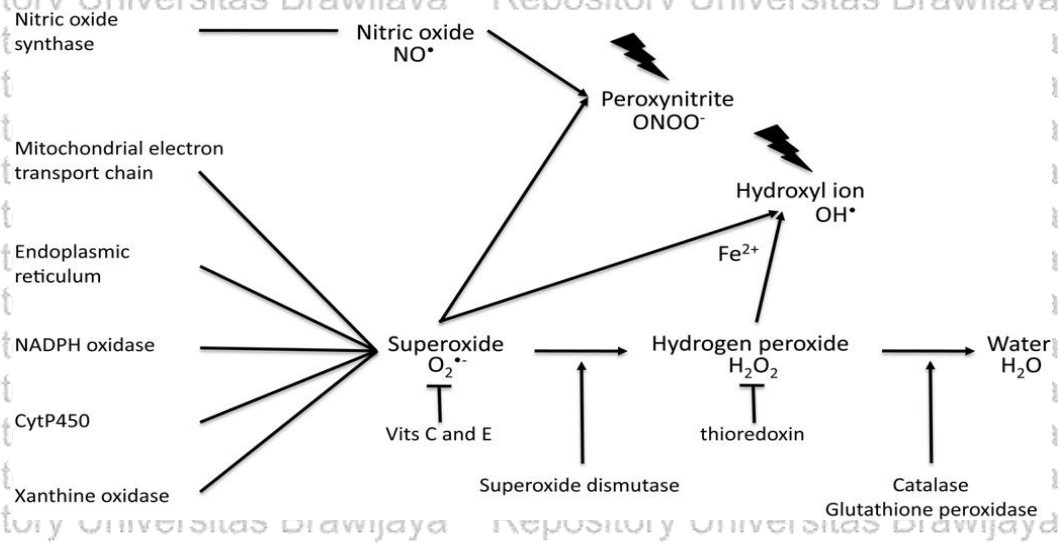
2.6.1. Pengertian

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu molekul, atom, atau beberapa atom yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat sangat reaktif. ROS dihasilkan oleh proses penggunaan oksigen (O_2) dan terdiri dari radikal bebas dan non radikal bebas intermediate (Agarwal *et al.,* 2012; Rumbold *et al.,* 2008). Bila molekul tidak stabil, maka akan mengambil satu elektron dari senyawa lain sehingga molekul tersebut menjadi stabil dan sebaliknya molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil dan berubah menjadi radikal dan merangsang terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya atau reaksi berantai. Reaksi seperti ini akan terus berlanjut dan akan berhenti bila reaktivitasnya direndam oleh senyawa yang bersifat antioksidan seperti *glutation* (Rumbold *et al.,* 2008). Radikal bebas dapat dihasilkan oleh berbagai elemen (Gambar 2.11). Selain itu proses biologinya tergantung pada O_2 dan nitrogen yang penting karena produk akhir mereka biasanya ditemukan dalam keadaan tinggi pada metabolisme seperti proses patologi dan interkasi dari lingkungan (Agarwal *et al.,* 2012; Burton *and* Jauniaux., 2011).

Radikal bebas memiliki reaktivitas yang sangat tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron yang ada disekelilingnya. Senyawa radikal bebas juga dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal (Winarsi., 2011). Radikal bebas dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan pada sel karena dapat menimbulkan kerusakan pada protein, aktivitas enzim terganggu dan kerusakan pada DNA termasuk terjadi mutasi sel. Radikal bebas berasal dari dalam tubuh (*endogen*) dan dari luar tubuh (*eksogen*). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal rantai biokimia dalam tubuh. Secara alamiah radikal bebas dibentuk

dalam tubuh makhluk hidup termasuk manusia, hewan dan tumbuhan. Organisme lebih sering terpapar radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (Kohen *et al.*, 2002).

Radikal bebas terbentuk secara terus-menerus didalam tubuh, baik melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respon tubuh terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok, dll. Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh ditunjukkan dengan rendahnya aktivitas enzim antioksidan dan tingginya kadar *malondialdehid* (MDA) dalam plasma (Winarsi., 2011).



Gambar 2.11.Sumber Radikal Bebas.
Prinsip ROS, Asal potensial, dan pathway detoksifikasi. NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotida phosphate.* (Burton dan Jauniaux., 2009).

2.6.2. Tahapan Pembentukan Radikal Bebas

Menurut Winarsi (2011), pembentukan radikal bebas melalui tiga tahapan reaksi sebagai berikut :

a. Tahapan inisiasi, yaitu tahapan pembentukan radikal bebas

Misalnya :

$Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+++} + OH^- + OH$

$R_1{}^-H + OH \rightarrow R_1 + HO$

b. Tahapan propagansi, yaitu pemanjangan rantai radikal

Misalnya :

$R_2^{\cdot}H + R_1^{\cdot} \rightarrow R_2^{\cdot} + R_1^{\cdot}H$

$R_3^{\cdot}H + R_2 \rightarrow R_3^{\cdot} + R_2^{\cdot}H$

c. Tahapan terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lainnya atau dengan penangkapan radikal sehingga potensi propagansinya rendah.

Misalnya :

$R_1^{\cdot} + R_1 \rightarrow R_1^{\cdot}R_1$

$R_2^{\cdot} + R_1 \rightarrow R_2^{\cdot}R_1$

$R_2^{\cdot} + R_2 \rightarrow R_2^{\cdot}R_2$

2.6.3. *Reactif Oxigen Species* (ROS)

Proses fisologi yang membutuhkan O_2 sebagai substrat, seperti pada reaksi oksigenasi dan tranfer elektron membuat sejumlah besar ROS dimana anion superoksida adalah yang paling umum. Sebagian besar ROS diproduksi ketika terjadi kebocoran elektron pada rantai pernafasan mitokondria, disebut juga dengan rantai transport elektron (Agarwal *et al.,* 2012; Burton *and* Jauniaux., 2011). Sumber-sumber lain dari anion superoksida termasuk rantai pendek elektron pada retikulum endoplasma (RE), sitokrom P450 dan enzim *nicotinamide adenine dinucleotide phospate* (NADPH) oxidase yang menghasilkan jumlah subtansial terutama pada awal kehamilan dan *oxido-reductases* lainnya (Agarwal *et al.,* 2012; Burton *and* Jauniaux., 2011).

Mitokondria adalah pusat terjadinya aktivitas metabolisme pada sel, sehingga apabila terjadi gangguan dalam fungsi tersebut dapat menyebabkan perubahan pada *adenine triphosphate* (ATP). Energi dari ATP penting untuk fungsi gamet. Produksi ROS yang berlebihan dapat mempengaruhi fungsi

mitokondria pada oosit dan embrio. Disfungsi pada mitokondria dapat menyebabkan gangguan pada pembelahan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif. Kenaikan moderate pada kadar ROS dapat merangsang pertumbuhan sel dan proliferasi dan memungkinkan untuk terjadinya fisiologi normal. Sebaliknya ROS yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan seluler (seperti kerusakan DNA, membran lipid dan protein) (Agarwal *et al.,* 2012).

Tabel 2.1 Jenis – jenis *reactive Oxygen Species*

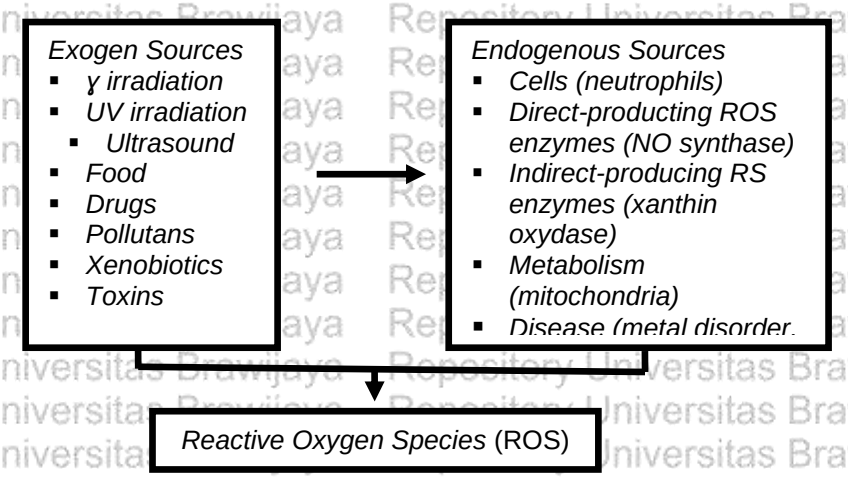
ROS		Keterangan
Anion superoksida	O_2^-	Tidak terlalu merusak, tetapi dapat membentuk hidrogen peroksida, yang merupakan reduktan logam transisi dalam pembentukan radikal hidroksil
Radikal hidroksil	OH^-	Radikal pengoksidasi yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan hampir seluruh biomolekul.
Radikal peroksil	LO_2	Dihasilkan antara lain pada proses peroksida lipid
Hydrogen peroksida	H_2O_2	Hidrogen peroksida bukan merupakan sumber radikal hidroksil dalam kondisi jenuh ion logam transisi, juga terlibat dalam pembentukan HOCl
Oksigen singlet	$'O_2$	Meskipun bukan radikal bebas, tetapi merupakan pengoksidasi kuat
Nitrogen oksida	NO^-	Radikal bebas dalam bentuk gas
Peroksinitrit	$ONOO^-$	Terbentuk dari reaksi NO^- dengan O_2^-
Asam hipoklor	HOCl	Dihasilkan oleh neutrofil pada proses inflamasi dan terbentuk dari H_2O_2 dan Cl^- yang dikatalis oleh mieleperoksidase

(Winarsi., 2011)

Anion superoksida didetoksifikasi oleh *superoxide dismutase enzim* (SOD), yang mengubahnya menjadi H_2O_2. *Catalase* dan *glutathione peroxidase* (GPx), pada hasil akhir lebih menurun pada H_2O. Meskipun H_2O_2 tidak merupakan radikal bebas, tetapi biasanya terlibat dalam generasi dan pemecahan dari radikal bebas. Pertahanan antioksidan harus mengimbangi konsentrasi ROS, karena peningkatan anion superoksida dan H_2O_2 dapat menghasilkan hidroksil radikal yang lebih beracun. OH* memodifikasi purin dan pirimidin yang dapat menyebabkan rantai DNA istirahat dan kerusakan DNA.

Dengan mempertahankan homoestasis jaringan dan membersihkan sel yang rusak, *apoptosis* memainkan peranan penting dalam perkembangan normal (Agarwal *et al.*, 2012).

ROS dapat berasal dari dalam tubuh (*endogen)* maupun dari luar tubuh (*eksogen).* Organisme lebih sering terpapar ROS yang berasal dari luar tubuh (Gambar 2.12) (Kohen *et al.*, 2002).



Gambar 2.12 Sumber ROS (Kohen *et al.,* 2002).

2.6.4. *Reactive Nitrogen Species* (RNS)

RNS termasuk nitrit oksida (NO) dan *nitrogen dioxide* (NO_2), selain itu spesies non reaktif seperti peroksinitrit dan *nitrosamines.* Pada mamalia, RNS terutama berasal dari NO yang terbentuk dari O_2 dan *L-arginine* dan reaksinya dengan anion superoksida yang membentuk peroksinitrit. Peroksinitrit mampu menginduksi peroksidase lipid dan nitrosasi dari banyak molekul tirosin yang biasanya bertindak sebagai mediator fungsi enzim dan sinyal transduksi (Agarwal *et al.*, 2012).

NO adalah radikal bebas yang bersifat vasodilatasi dan merupakan molekul sinyal seluler penting yang terlibat dalam proses fisiologis dan patologis. Produksi RNS yang berlebihan dapat mempengaruhi struktur dan fungsi protein. Dengan demikian dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim katalitik,

mengubah organisasi citoskeletal dan merusak transduksi sinyal. Kondisi oksidatif dapat mengganggu respon vasomotor dan efek NO terkait juga dengan produksi ROS dari interaksi antara NO dan anion superoksida. Kadar anion superoksida yang meningkat menyebabkan reaksi antara anion superoksida dengan NO untuk menghasilkan peroksinitrit yang dapat memperbururuk sitotoksisitas (Agarwal *et al.,* 2012). Visioli *et al* (2011) dalam Agarwal *et al* (2012) menjelaskan bahwa NO merupakan faktor kunci yang menyebabkan terjadinya gangguan fungsi vaskular yang berhubungan dengan status infertil. Dengan demikian, kelangsungan hidup sel sebagian besar tergantung pada tingkat isiologis berkelanjutan dari NO.

Nitric oxide synthase (NOS), merupakan degradasi pembentukan NO dari O_2 dan *L-arginine* menggunakan NADPH sebagai donor elektron dan terdiri dari *neural* NOS (nNOS atau NOS 1), *inducible* NOS (iNOS atau NOS II) dan *endothelal* NOS (eNOS atau NOS III). Secara umum, NO diproduksi oleh eNOS dan nNOS untuk mengatur fungsi fisiologis sementara. Fungsi isoform sebagai neurotransmitter dan iNOS dinyatakan terutama dalam makrofag setelah diinduksi oleh sitokin. eNOS meningkat akibat lonjakan *luteinizing hormone (*LH) dan *human chorionic gonadotropin* (HCG) (Agarwal *et al.*, 2012).

Modulasi aktivitas eNOS oleh peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler ($[Ca^{2+})_i]$, yang mungkin terjadi respon akut pada agonis, termasuk estradiol dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Namun, masuknya Ca^{2+} diseluruh membran plasma menghasikan peningkatan ($[Ca^{2+})_i]$, atau biasa disebut dengan *capacitative calcium entry* (CCE) dan sangat penting untuk mempertahankan aktivitas eNOS dan untuk mengatur vaskular. Pada kondisi kehamilan normal, vasodilatasi sangat menonjol pada pembuluh uteri. Selama kehamilan, adaptasi berkelanjutan masuknya dan elevasi ($[Ca^{2+})_i]$ melalui respon CCE sangat penting

untuk aktivasi eNOS dan perubahan vaskular yang berhubungan dengan kehamilan normal (Agarwal *et al.,* 2012).

Kondisi hipoksia juga mengatur NOS dan terjadi peningkatan eNOS. Kegagalan kehamilan untuk beradaptasi pada vasodilatasi mempengaruhi respon sinyal CCE yang dapat menyebabkan komplikasi seperti IUGR dan preeklampsia (Agarwal *et al.,* 2012).

2.7. Antioksidan

Antioksidan adalah pertahanan yang dapat mendetoksifikasi kelebihan ROS yang dapat membantu menjaga keseimbangan oksidan dan antioksidan (Agarwal *et al.,* 2012). Senyawa ini memiliki berat molekul kecil tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi., 2011). Terdapat dua jenis antioksidan yaitu enzimatik dan non enzimatik (Agarwal *et al.,* 2012).

2.7.1. Antioksidan Enzimatik

Antioksidan enzimatis merupakan antioksidan endogen. Antioksidan enzimatik memiliki pusat metalik yang memberikan kemampuan untuk mengambil valensi berbeda karena menstranfer elektron untuk menyeimbangkan molekul pada proses detoksifikasi. Antioksidan ini menetralisir kelebihan ROS dan mencegah kerusakan struktur sel. antioksidan enzimatik endogen meliputi SOD, katalase, GPx dan oksidase glutathione (Agarwal *et al.,* 2012). Enzim-enzim ini bekerja dengan melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas oksigen seperti O_2^-, OH^- dan H_2O_2 (Winarsi., 2011).

1. *Superoxide Dismutase* (SOD)

Enzim SOD terdiri dari tiga yaitu SOD 1 (meng*and*ung Cu dan Zn) sebagai logam cofaktor yang terletak di sitosol, SOD 2 adalah isoform mitokondria yang meng*and*ung *manganese* (Mn), dan SOD 3 mengkode bentuk ekstraseluler, SOD 3 secara struktural mirip dengan Cu, Zn-SOD, karena meng*and*ung CU dan Zn sebagai kofaktor (Agarwal *et al.,* 2012).

SOD berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutasi dari anion superoksida ke H_2O_2 dan oksigen (Agarwal *et al.,* 2012). SOD melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadinya peradangan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Winarsi., 2011).

2. Katalase

Katalase adalah enzim yang meng*and*ung heme, yang mengkatalisis dismutasi H_2O_2 menjadi air dan oksigen. Katalase berperan sebagai enzim peroksidasi khusus dalam reaksi dekomposisi hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air (Winarsi., 2011).

3. *Glutathione* (GSH)

Family *Glutathione* (GSH) meliputi *Glutation peroksidase* (GPx), GST, dan reduktase GSH. GPx menggunakan pengurangan bentuk GSH sebagai donor H^+ untuk menurunkan peroksida. Penipisan GSH menghasilkan kerusakan DNA dan meningkatkan konsentrasi H_2O_2. GSH merupakan antioksidan yang penting. Selama pengurangan H_2O_2 ke H_2O dan O_2, GSH dioksidasi menjadi GSSG oleh GPx. Reduktase GSH berpartisipasi dalam reaksi balik dan memanfaatkan donor proton dari NADPH ke GSSG kemudian daur ulang GSH. *Glutathione peroxidase* terdiri dari lima isoform dalam tubuh yaitu GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 dan GPx5.GPx1 adalah isoform sitosol yang

tersebar luas di jaringan sementara GPx2 mengkode bentuk gastrointestinal dengan fungsi spesifik, GPx3 hadir dalam plasma dan epididimis cairan. GPx4 khusus mendetoksifikasi fosfolipid hidrosperoksida dalam membran biologis. GPx5 ditemukan pada epididimis. *Glutathione* adalah buffer tiol utama dalam sel dan dibentuk dalam sitosol dari sitein, glutamat dan glisin. *Glutathione* diatur melalui pembentukan de-novo yang dikatalisis oleh enzim ɣ-*glutamylcystein synthetase* dan *glutamylcystein synthetase.* Pada sel, GSH berperan untuk pemeliharaan sel dan pembentukan konjugat dengan beberapa endogen berbahaya dan senyawa xenobiotik (Agarwal *et al.,* 2012).

Pada kehamilan normal (umur kehamilan 10 – 12 minggu), aliran darah maternal pada plasenta menyebabkan peningkatan tekanan oksigen dan perubahan paralel dari ekspresi dan aktivitas antioksidan enzim. Namun sebaliknya, pada preeklampsia terjadi peningkatan konsentrasi *superoxide anion* pada plasenta yang berhubungan dengan penurunan aktivitas SOD dan ekspresi mRNA (Rodrigo *et al.,* 2009).

2.7.2. Antioksidan Non Enzimatik

Antioksidan non enzimatik banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan, suplementasi makanan dan antioksidan sintetik seperti Vitamin C, GSH, taurin, hipotaurin, vitamin E, Zn, *selenium* (Se), *betacaroten* dan *caroten.* Vitamin C (*ascorbic acid)* merupakan katalis redoks yang dapat mengurangi dan menetralisir ROS. Vitamin C mengurangi ROS melalui reaksi GSH dan dapat dikatalisasi oleh protein disulfida isoerase dan *glutaredoxin* (Agarwal *et al.,* 2012).

Glutathione adalah peptida yang ditemukan pada sebagian besar bentuk kehidupan aerobik seperti yang dibuat dalam sitosol dari sistein glutamat dan glisi dan juga merupakan antioksidan utama yang ditemukan pada oosit dan

embrio. Tingkat GSH diatur oleh pembentukan de-novo yang dikatalisasi oleh enzim gamma-GCS dan glutation sintesa. *Glutathione* berpartisipasi dalam reaksi termasuk pembentukan *glutathione disulfida*, yang diubah kembali ke GSH oleh *glutation reduktase* dengan menggunakan NADPH (Agarwal *et al.,* 2012).

Systein dan *cysteamine* (CSH) meningkatkan kandungan GSH oosit. *Cysteamine* bertindak sebagai penahan dan merupakan antioksidan yang penting untuk pemeliharaan tingkat GSH yang tinggi. Selanjutnya CSH dapat dikonversi ke antioksidan lainnya. Seperti pada GSH, *thioredoxin* (Trx) mengatur fungsi gen dan mengkoordinasikan berbagai enzim. Trx mendetoksifikasi H_2O_2 dan mengkonversinya melalui Trx reduktase. Biasanya Trx terikat dengan apoptosis, yiatu mengatur sinyal kinase (ASK1), renderingin aktif. Namun, ketika kelompok thiol dari Trx teroksidasi oleh *superoxide anion*, ASK 1 melepaskan dari Trx dan menjadi aktif menyebabkan peningkatan apoptosis. ASK 1 juga dapat diaktifkan oleh paparan H_2O_2 atau *hypoxiareoxygenation,* dan dihambat oleh vitamin C dan E. Sistem Trx juga memainkan peran dalam reproduksi wanita dan perkembangan janin dengan terlibat dalam pertumbuhan sel, diferensiasi dan apoptosis (Agarwal *et al.,* 2012).

2.8. Delima Merah *(Punica granatum)* Sebagai Antioksidan Herbal

2.8.1. Asal dan Klasifikasi Delima *(Punica granatum)*

1. Asal- usul Buah Delima

Buah delima (Gambar 2.13) berasal dari Timur Tengah. Penyebarannya di daerah subtropik sampai Tropik, dari dataran rendah sampai dibawah 1.000 m dpl. Pada tahun 1500 SM, delima dibawa ke Mesir dan Suriah pada masa pemerintahan Hyksos dan dimanfaat untuk melawan cacingan. Abad 138-125 SM benih buah delima dibawa oleh pedagang Timur Tengah ke Cina. Buah

delima memiliki banyak biji dan dipercaya sebagai simbol rejeki yang melimpah (Marhari dan Dewi., 2014).

Meskipun bukan asli dari Indonesia, tetapi buah delima mampu beradaptasi dan dapat tumbuh subur di Indonesia. Ada tiga jenis buah delima yang tersebar di Indonesia, yaitu delima putih, delima merah dan delima hitam. Dari ketiga jenis delima tersebut, delima merah yang paling terkenal karena memiliki rasa manis dan segar. Delima putih berasa lebih sepat, kesat dan kurang manis sedangkan delima hitam agak sulit ditemukan dipasaran (Astawan., 2008).

Gambar 2.13 Buah Delima (*Punica granatum*)
Buah Delima Merah mengandung polifenol yaitu antosianin dan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan (Astawan., 2008).

2. Klasifikasi Buah Delima

Tinggi pohon delima merah ± 5 meter, lebih menyukai tanah yang gembur dan tidak terendam air. Memiliki daun tunggal, bertangkai pendek, letaknya berkelompok, mengkilap, berbentuk lonjong dengan pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, tulang menyirip, ukuran panjang daun 3-7 cm dan lebar 0.5 -2.5 cm, warna hijau. Bunga tunggal bertangkai pendek. Buahnya berbentuk bulat dengan diameter 5 – 12 cm, beratnya ± 100 – 300 gram,

terdiri dari biji-biji kecil, tersusun tidak beraturan, berwarna putih sampai kemerahan (Budka., 2008).

Klasifikasi ilmiah buah delima menurut Budka (2008) adalah :

Kerajaan : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Rosidae

Ordo : Myrtales

Famili : Lythraceae

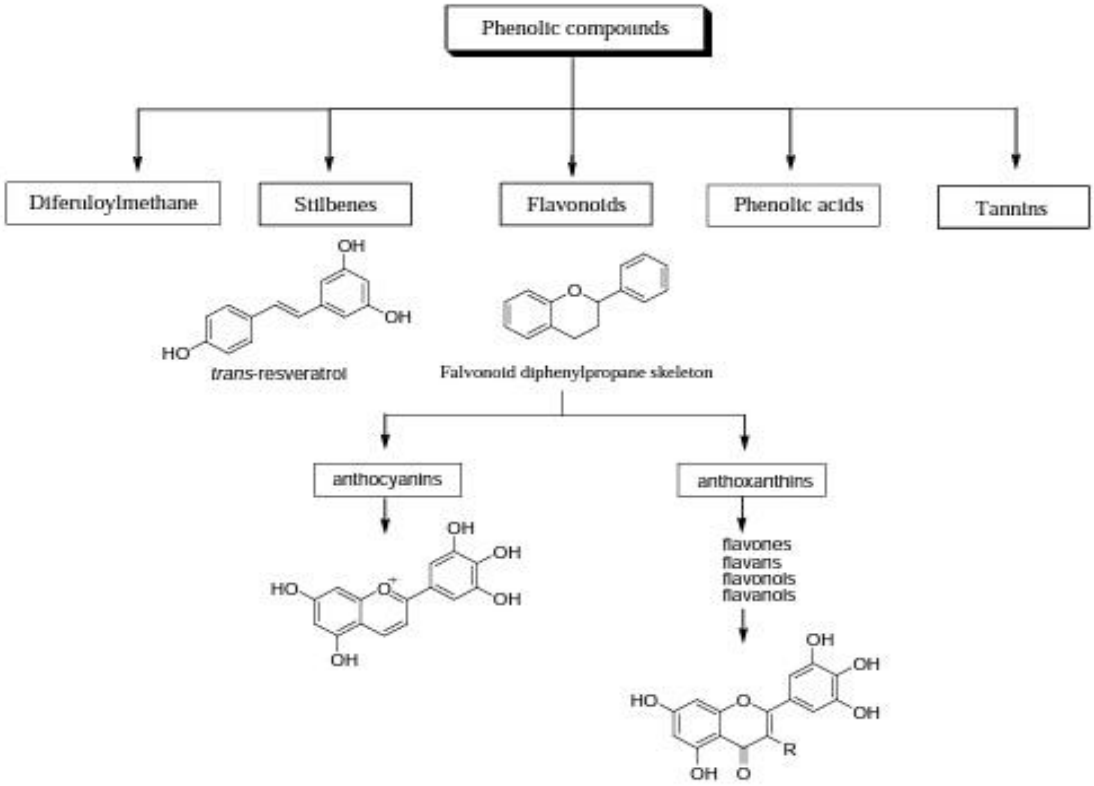
Genus : *Punica*

Spesies : *P. Granatum*

2.8.2. Kandungan Delima (*Punica granatum)*

Buah delima mengandung fitokimia yang mengandung antioksidan dan antiinflamasi yang didalamnya terdapat polifenol (Kholifa., 2010; Basu *and* Panugonda., 2008; Jurenka., 2008). Klasifikasi polifenol (Gambar 2.14) terdiri dari (1) sub kelas *phenolic acid* yang berasal dari *hydroxybenzoic acids* seperti *gallic acids* dan *hydroxycinnamic acid* yang terdiri dari *caffeic, ferulic* dan *coumaric acid;* (2) sub kelas *flavonoid,* yang termasuk didalamnya adalah *flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins,* dan *flavanols;* (3) *stilbenes* dan (4) *polymeric lignins* (Han *et al., 2007).*

Karakteristik warna merah pada buah delima karena kombinasi dari 6 antosianin, termasuk *3-glucosides* dan *3.5-diglucosides* dari *delphinidin, cyanidin* dan *pelargonidin.* 92% aktivitas antioksidan terdapat dalam buah (Heryani., 2010).



Gambar 2.14 Klasifikasi Polifenol (Han *et al.*, 2007).

Delima mengandung kalori sedang dan tiap 100 g buah delima mengandung 85 kalori. Delima tidak mengandung lemak jenuh atau kolesterol. Delima kaya serat yaitu 4 g per 100 g yang bermanfaat untuk memperlancar pencernaan. Delima memiliki sifat antioksidan karena mengandung vitamin A, C dan E yang tinggi. Kandungan vitamin C pada buah delima adalah 17% dari kebutuhan harian per 100 g yaitu 10,2 mg. Kandungan vitamin E adalah 4% dari kebutuhan harian per 100 g yaitu 0.60 mg (Marhari dan Dewi., 2014). Manfaat mengkonsumsi buah delima adalah membantu tubuh dalam melawan radikal bebas dan meningkatkan kekebalan tubuh. Selain itu delima mengandung vitamin B komplek diantaranya adalah asam folat, *pantothenic acid, pyridoxine,* vitamin K, kalsium, potasium, mangan dan *copper* . Nilai gizi buah delima per 100 g dapat dilihat pada tabel 2.2 berikut ini:

Tabel 2.2 Nilai Gizi Buah Delima

NO	Kandungan	Jumlah	% RDA
1.	Energi	83 Kcal	4 %
2.	Karbohidrat	18.70 g	14 %
3.	Protein	1.67 g	3 %
4.	Lemak	1.17 g	6 %
5.	Kolesterol	0 mg	0 %
	Vitamin		
6.	Folat	38 µg	9.5 %
7.	Niacin	0.293 mg	2 %
8.	Pantothenic Acid	0.135 mg	3 %
9.	Pyridoxine	0.075 mg	6 %
10.	Riboflavin	0.053 mg	4 %
11.	Thiamin	0.067 mg	5.5 %
12.	Vitamin A	0 IU	0 %
13.	Vitamin C	10.2 mg	17 %
14.	Vitamin E	0.60 mg	4 %
15.	Vitamin K	16.4 µg	14 %
	Elektrolit		
16.	Sodium	3 mg	0 %
17.	Potassium	236 mg	5 %
	Mineral		
18.	Calcium	10 mg	1 %
19.	Copper	18%	0.158 mg
20.	Iron	0.30mg	4 %
21.	Magnesium	12 mg	3 %
22.	Manganese	0.119 mg	5 %
23.	Phosphorus	36 mg	5 %
24.	Selenium	0.5 µg	1 %
25.	Zink	0.35 mg	3 %
	Phytonutrient		
26.	Caroten β	0 µg	-
27.	Crypto-xanthine-β	0 µg	-

(Marhari dan Dewi., 2014).

2.8.3. Efek buah delima sebagai antioksidan alami pada preeklampsia

Stres oksidatif mempunyai peranan penting dalam patogenesis terjadinya preeklampsia. Untuk mengatasi radikal bebas yang berlebihan sebagai akibat dari stres oksidatif diperlukan mekanisme pertahanan, baik secara endogen ataupun eksogen untuk menjaga keseimbangan (Han *et al.,* 2007). Konsumsi antioksidan mampu meningkatkan antioksidan endogen dalam tubuh sehingga dapat menekan kerusakan sel yang berlebihan dan mempertahankan antioksidan seluler (Amjad *and* Shafighi., 2012; Sreekumar *et al.,* 2014).

Antioksidan dapat bekerja pada tingkat yang berbeda, yaitu : (1) menurunkan konsentrasi oksigen; (2) mencegah rantai inisiasi dengan *scavenging* ROS/RNS seperti anion superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan peroksinitrit; (3) berikatan dengan *metal ions* yang tidak menghasilkan species seperti OH^-, *ferryl* atau $Fe^{2+}/Fe^{3+}/O_2$ dan atau menguraikan peroksidase lipid menjadi *peroxyl* dan *alkoxyl radical;* (4) menguraikan peroksida dengan mengonversi mereka menjadi produk *non-radical* seperti alkohol; (5) memutuskan rantai, *scavenging* radikal intermediat seperti *peroxyl* dan *alkoxyl radicals* untuk mencegah kelangsungan dari abstraksi hidrogen (Miguel., 2011).

Pada beberapa penelitian, buah delima difokuskan pada aktivitas antioksidan pada *in vitro.* Antioksidan buah delima terdapat pada daun dan buah. Ekstrak buah delima dan ekstrak daun yang mengandung air dapat *scavenger* secara efektif dari ROS atau RNS yaitu O_2^-, H_2O_2, OH^- dan NO (Wang *et al.,* 2010).

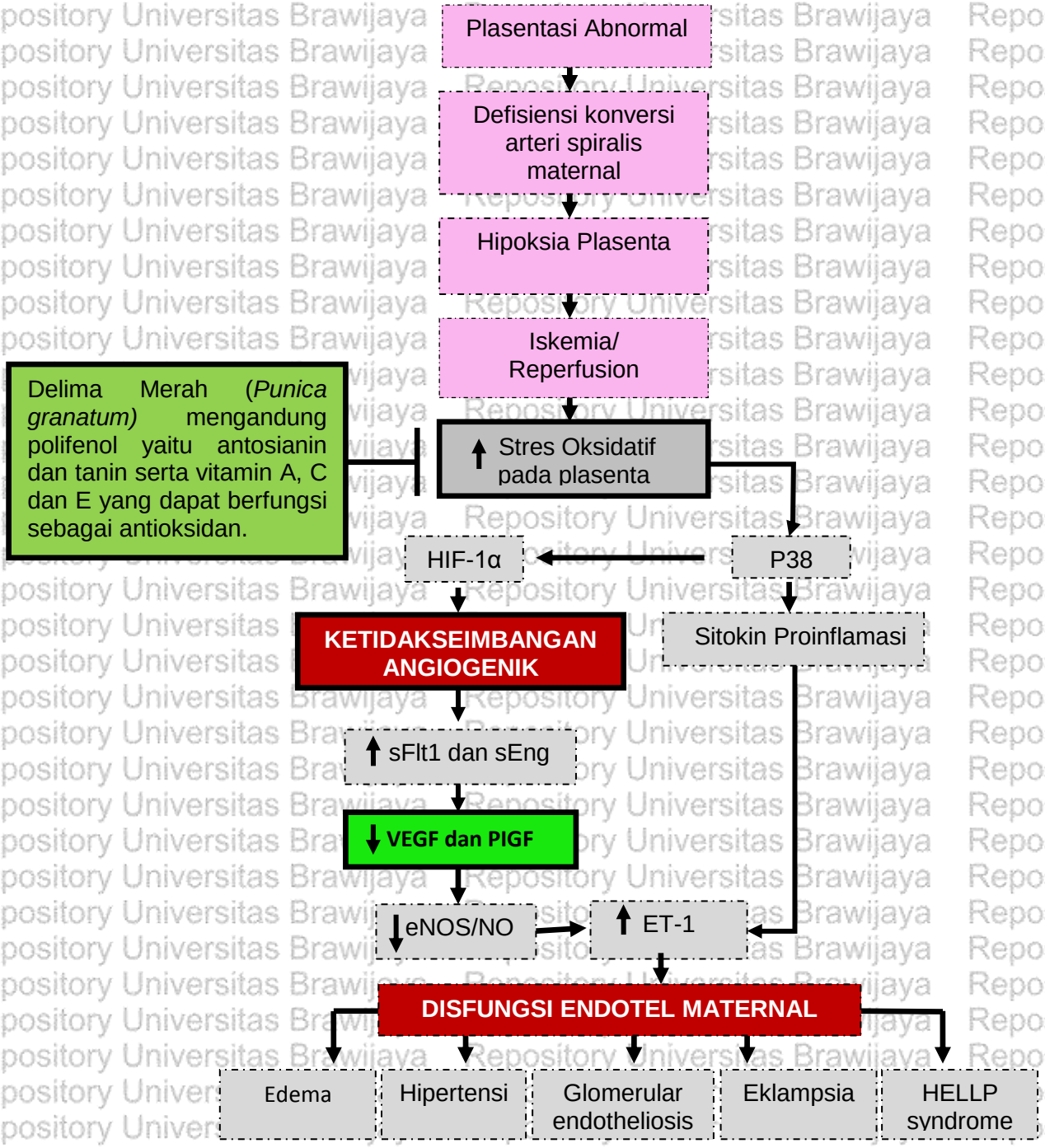
Pada *in vitro,* buah delima memiliki efek sebagai antioksidan yang memiliki aktivitas antioksidan tiga kali lebih tinggi dibandingkan pada anggur merah dan teh hijau (Christaki *et al.,* 2011; Jurenka *et al.,* 2008). Antioksidan ini berperan juga dalam mencegah peroksidase lipid. Ekstrak buah delima terbukti dapat *scavenging* radikal bebas dan menekan stres oksidatif makrofag dan lipid peroksidase pada model hewan dan meningkatkan kapasitas antioksidan plasma pada usia lanjut (Jurenka *et al.,* 2008).

Ekstrak buah delima terdiri dari dua tipe polifenol yaitu *antosianin* (*delpinidin, cyanidin* dan *pelargordin*) dan *tannin* (*punicalagin, pedunculagin, punicalagin, gallagic* dan *ellagic acid)* dimana 92% aktivitas antioksidan terdapat dalam buah (Heryani., 2010; Afaq *et al.,* 2005). Rasheed., *et al* (2009) menjelaskan bahwa buah delima mengandung antosianin dan tanin yang

merupakan bagian dari polifenol yang berperan sebagai antioksidan kuat dengan aktivitas inflamasi. Total antosianin yang terkandung dalam 100 g buah delima adalah 12.8 mg (Gadze *et al.,* 2012).

Hasil penelitian Chen., *et al* (2012) terhadap 20 ibu hamil yang diberikan jus delima dan jus apel pada umur kehamilan 35-38 minggu sampai dengan melahirkan adalah jus delima menunjukkan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan Hsp 90 yang merupakan marker dari stres oksidatif pada ibu yang mengkonsumsi jus delima. Punicalagin dan polifenol pada delima mengurangi stres oksidasi pada plasenta *in vivo* dan *in vitro.* Jadi asupan buah delima selama kehamilan mungkin membatasi plasenta rusak dan mungkin untuk perlindungan bayi. Hasil penelitian pada *in vitro* bahwa jus delima menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu terjadi penurunan ekspresi Hsp 90 pada model yang terpapar hipoksia. Selain itu jus delima mempunyai keuntungan untuk fungsi kardiovaskular terutama pada sel endotel (Chen., *et al.,* 2012).

2.9. Kerangka Teori

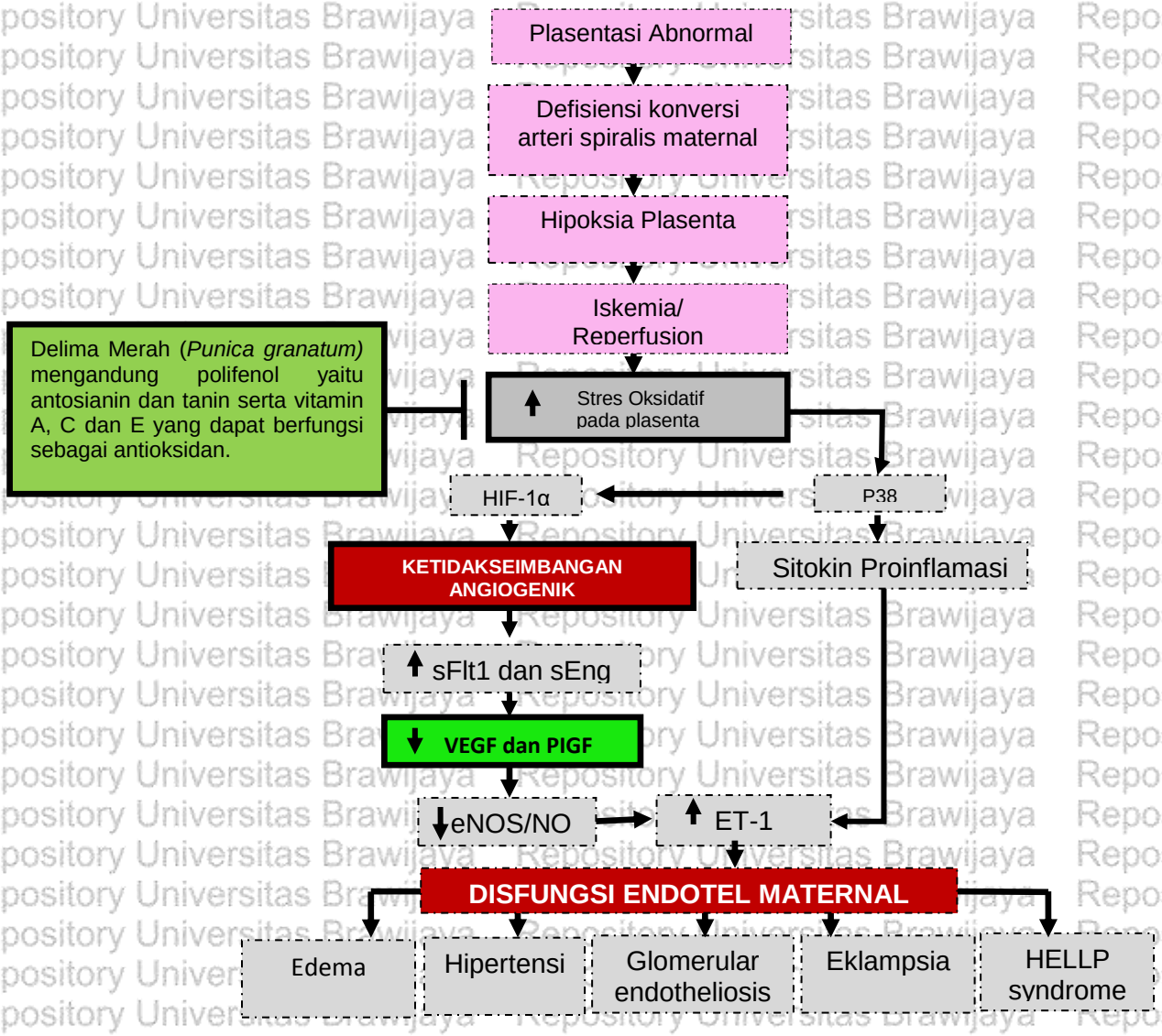


Gambar 2.12. Kerangka Teori Preeklampsia dan Antioksidan

BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

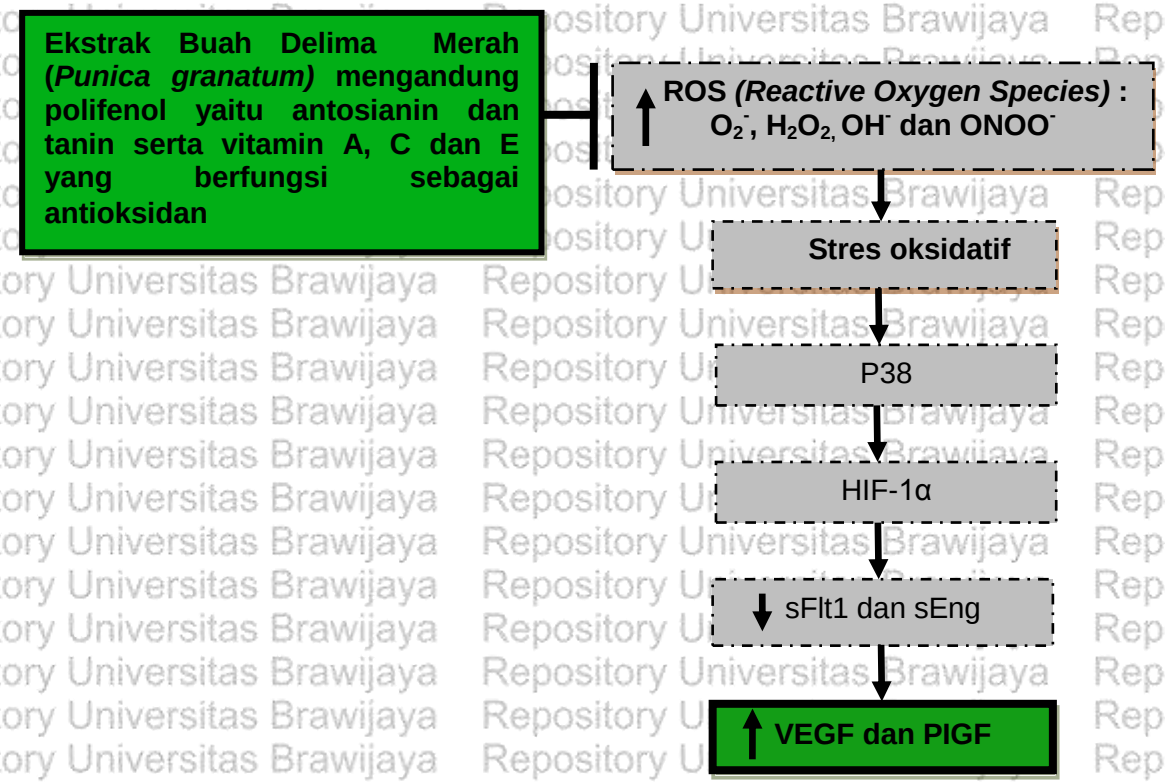
3.1. Kerangka Teori



Gambar 2.12. Kerangka Teori Preeklampsia dan Antioksidan

Pada preeklampsia terjadi plasentasi abnormal yang dapat menyebabkan defisiensi arteri spiralis maternal sehingga terjadi hipoksia pada plasenta. Hipoksia pada plasenta menyebabkan terjadinya iskemia plasenta yang dapat meningkatkan stres oksidatif pada plasenta. Melalui aktivasi P38 dan HIF-1α akan menyebabkan ketidakseimbangan angiogenik sehingga terjadi peningkatan sFlt1 dan sEng sehingga terjadi penurunan pada VEGF dan PIGF yang dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel. Pemberian buah delima merah diharapkan dapat menurunkan stres oksidatif pada plasenta sehingga dapat menurunkansFlt1 dan sEng dan terjadi peningkatan pada VEGF dan PIGF.

3.2. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan

⊢ : Menghambat

: Paramater yang diteliti

: Paramater yang tidak diteliti

Penjelasan :

Peningkatan stres oksidatif ditandai dengan peningkatan ROS yaitu anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH^-) dan peroksinitrit ($ONOO^-$) yang menyebabkan penurunan tingkat antioksidan dalam mengikat radikal bebas. Kondisi Stres oksidatif mengakibatkan aktivasi dari P38 dan HIF-1α yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan *angiogenik* yang ditandai dengan peningkatan sFlt1 dan sEng sehingga terjadi penurunan kadar

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

VEGF dan PIGF. Ketidakseimbangan angiogenik mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel yang mengakibatkan terjadinya sindrom maternal preeklamsia.

Ekstrak Buah Delima merah merah (*Punica granatum)* mengandung senyawa polifenol yaitu antosianin dan tanin serta vitamin A, C dan E yang berfungsi sebagai antioksidan. Ekstrak buah delima merah terbukti dapat *scavenging* radikal bebas dan menekan stres oksidatif. Antioksidan dapat bekerja dengan mencegah rantai inisiasi dengan *scavenger* secara efektif pada ROS atau RNS yaitu O_2^-, H_2O_2, OH^- dan $ONOO^-$. Antioksidan berikatan dengan metal ions yang tidak menghasilkan spesies seperti OH^-, *ferryl* atau $Fe^{2+}/Fe^{3+}/O_2$ dan atau menguraikan lipid peroksidase menjadi *peroxyl* dan *alkoxyl radical*.

Stres oksidatif pada plasenta menyebabkan peningkatan *NADH oxidase* dan *xanthine oxidase* sehingga terjadi peningkatan O_2^- pada plasenta. Pemberian buah delima merah yang mengandung senyawa polifenol (antosianin dan tanin) serta vitamin A, C dan E dapat berfungsi sebagai antioksidan. Polifenol dan vitamin C serta E dapat menghambat O_2^- sehingga O_2^- tidak dapat berikatan dengan Fe^{2+} sehingga tidak terbentuk OH^- atau Lipid peroksidase (ROOH). Vitamin C dan E menghambat O_2^- dan mengubahnya menjadi H_2O_2 dengan bantuan SOD dalam tubuh. Antioksidan vitamin C mampu bereaksi dengan radikal bebas, kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil. Senyawa radikal askorbil akan menjadi askorbat dan dehidroaskorbat. Asam askorbat dapat bereaksi dengan oksigen teraktivasi seperti O_2^- dan OH^-. Bentuk terekdusinya dapat diubah kembali menjadi asam askorbat oleh enzim monodehidroaskorbat reduktase dan dehidroaskorbat reduktase yang ekuivalen dengan NADPH. Dehidroaskorbat selanjutnya dipecah menjadi tartarat dan oksalat. Reaksi askorbat dengan superoksida adalah sebagai berikut :

$$2O_2^- + 2H^+ + \text{askorbat} \longrightarrow 2H_2O_2 + \text{dehidroaskorbat.}$$

Sedangkan reaksinya dengan hidrogen peroksida dikatalisis oleh enzim askorbat peroksidase yaitu H_2O_2 + 2 askorbat ⟶ $2H_2O$ + 2 monodehidroaskorbat. Vitamin C bekerja secara sinergis dengan vitamin E. Vitamin E yang teroksidasi oleh radikal bebas dapat bereaksi dengan vitamin C, kemudian akan berubah menjadi tokoferol setelah mendapatkan ion hidrogen dari vitamin C. Reaksinya adalah Tokoferoksil radikal + askorbat ⟶ tokoferol + monodehidroaskorbat.

Buah delima merah dapat meningkatkan *glutation peroksidase* (GSH-Px). Kerja dari enzim ini adalah mengubah H_2O_2 menjadi H_2O (air).

Jadi dapat diduga bahwa ekstrak buah delima merah mungkin dapat memperbaiki kadar VEGF dan PIGF pada kutur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia sehingga dapat meningkatkan kadar VEGF dan PIGF.

3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum*) meningkatkan kadar VEGF pada model HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia.
2. Pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum*) meningkatkan kadar PIGF pada model HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan/Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik/*true experimental* dengan pendekatan *post test only control group design.* Eksperimental adalah penelitian hubungan sebab akibat yang dilakukan terhadap kejadian atau fenomena yang terjadi akibat adanya intervensi dari peneliti (Zainuddin, 2011). Syarat dilakukan penelitian eksperimental adalah adanya kelompok kontrol, random dan replikasi.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel darah preeklampsia berat (PEB) di RSUD Bangil, RSUD Ngudi Waluyo Blitar dan RSUD Dr. Soeroto Ngawi. Pengambilan sampel tali pusat bayi baru lahir (BBL) dari persalinan SC di RSUD Bangil dan pengambilan sampel darah ibu hamil normal dan tali pusat BBL dari persalinan normal di BPS Melati Husada. Untuk selanjutnya penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik FKUB dan ekstraksi buah delima merah di Laboratorium Farmakologi FKUB. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober s/d Desember 2014 dan Januari s/d April 2015.

4.3. Sampel, Teknik Pengambilan Sampel dan Besar Sampel

4.3.1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel sel endotel yang dikutur dalam 4-5 hari yang berasal dari talipusat bayi baru lahir (BBL) yang berasal dari ibu yang bersalin dengan cara *sectio caesaria* (SC) tanpa komplikasi kehamilan ataupun persalinan normal.

Kriteria sampel yang digunakan adalah :

1. Kriteria Tali Pusat

a. Kriteria inklusi tali pusat

1) Ibu hamil sehat dengan kadar Hb ≥ 11 g/dL dengan kriteria berat badan (BB) dan tinggi badan (TB) normal.

2) Persalinan SC atau persalinan normal dan bayi sehat dengan kriteria berat badan bayi > 2500 gram dan apgar score 7-9.

b. Kriteria eksklusi tali pusat adalah kehamilan dengan komplikasi

2. Kriteria Plasma PEB dan Plasma Normal

a. Kriteria inklusi plasma Preeklampsia Berat (PEB) adalah plasma yang didapat dari ibu hamil dengan :

1) Hipertensi yang muncul setelah umur kehamilan 20 minggu dengan kriteria tekanan darah ≥ 140/90 mmHg, peningkatan ≥ 30/15 mmHg, diastolik ≥ 90 mmHg diukur dengan posisi duduk, manset dengan ukuran yang tepat

2) Protein uria ≥ 2+ dengan pemeriksaan dipstick, ≥ 300 mg/dL urin 24 jam.

b. Kriteria inklusi plasma normal adalah plasma yang didapat dari ibu hamil fisiologis dengan :

1) Ibu hamil sehat dengan kadar Hb ≥ 11 g/dL dengan kriteria berat badan (BB) dan tinggi badan (TB) normal.

4.3.2. Teknik Pengambilan Sampel

1. Menjelaskan dan memberikan *Informed concern* kepada ibu atau keluarga
2. Menyiapkan botol berisi *cord solution* dari *refrigerator* 4° c
3. Sel endotel berasal dari talipusat BBL melalui persalinan SC ataupun persalinan normal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4. Setelah persalinan, talipusat dipotong ± 10 cm, kemudian dimasukkan kedalam *cord solution.*
5. Membuat kultur sel endotel tidak lebih dari 12 jam setelah persalinan.
6. Mengambil sel endotel melalui vena umbilikalis dengan metode standar dan selanjutnya dikultur.

4.3.3. Besar Sampel

Besar sampel merupakan banyaknya pengulangan yang dilakukan pada kelompok perlakuan (Sarbini, 2005). Dalam penelitian ini banyaknya replikasi ditentukan dengan rumus :

$$p\,(n-1) \geq 15$$

Keterangan

n : Jumlah pengulangan tiap perlakuan

p : Jumlah perlakuan.

$P\,(n - 1) \geq 15$

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

$n \geq 4$

Berdasarkan rumus tersebut, maka ditentukan jumlah replikasi yang dilakukan adalah 4 kali setiap perlakuan. Sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi 20 pengamatan.

Kelompok pengamatan terdiri dari :

1. Kelompok I : Kontrol (-) HUVECs yang dipapar plasma normal 2%.
2. Kelompok II : Kontrol (+) HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia 2% (Model Preeklampsia)
3. Kelompok III : Model Preeklampsia + Ekstrak Delima 14 ppm
4. Kelompok IV : Model Preeklampsia + Ekstrak Delima 28 ppm
5. Kelompok V : Model Preeklampsia + Ekstrak Delima 56 ppm

4.4. Bahan dan Alat

4.4.1. Bahan dan Alat untuk Kultur Sel Endotel HUVECs

1. Bahan yang digunakan untuk isolasi dan Kultur HUVECs, terdiri dari :

   a. Media yang digunakan untuk pengambilan tali pusat *: Hank's balance salt solution* (HBSS) 100 mL, *gentamycine, sodium hidrogen bicarbonat* dan *phenol red* 4 mL, HEPES *solution* 2 mL, *deiozined water.*

   b. Bahan isolasi sel endotel adalah *collagenase solution* (SIGMA Type HA, C-6885) 0.5 mg/mL, *Filter* 0.2 µm dan *medium serum free.*

   c. Bahan *medium serum free* adalah medium 199 (SIGMA, M-5017), *gentamycin* 10 mg/ml 250 µm, *sodium hydrogen bicarbonat* 5% 4 ml, *L-glutamin* 2 mM 1.25 ml, HEPES 25 mM 2 ml.

   d. Bahan kultur sel endotel adalah *gelatin* 0.2 % (SIGMA, G-1393), *Endothelial complete medium* 20 % (*Plasma free medium* 80 ml ditambah dengan *Newborn calf serum* (SIGMA, N-4637) 20 ml.

2. Alat yang digunakan untuk untuk isolasi dan Kultur HUVECs terdiri dari *Vertical laminary air flow, inverted microscope,* mikroskop cahaya, *centrifus, desicator, incubator, dispossible pippet, filter* 0.2 µm, botol biakan 25 cm^2, 24 *well plate,* timbangan magnetik, *liquid nitrogentank,* lampu UV, lemari es 4 – 80^0 c, lemari es -20^0c, lemari es -50^0c, lemari es -70^0c, *autoclave,* tabung sentifus, *scalpel,* gunting, *forceps, alumunium foil, kanul,* pH meter, jarum suntik 10 cc, *bunsen* dan *waterbath.*

4.4.2. Bahan dan Alat Pengambilan Plasma Preeklampsia dan Plasma Normal.

Bahan dan alat yang digunakan adalah *spuit dispossible* 5 cc, *vacutainer litium heparin* steril, *centrifuge* dan pipet volume 2 cc.

4.5. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.5.1. Cara Pengambilan Tali Pusat

Tali pusat diambil melalui persalinan SC atau persalinan normal dengan kriteria inklusi dan eksklusi seperti pada definisi operasional. Pembuatan kultur sel endotel tidak boleh lebih dari 12 jam setelah persalinan. Segera setelah persalinan, talipusat dipotong sepanjang ± 10 cm kemudian dimasukkan kedalam *cord solution.*

4.5.2. Pembuatan Kultur HUVECs

Kultur sel endotel yang digunakan diambil dari vena umbilikalis yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Untuk mengisolasi sel endotel digunakan kolagenase tipe II (0.5 mg/ml), media kultur mengandung M199, *newborn calf serum* (NBS) 10%, *fetal bovine serum* (FBS) 10%, glutamine 200 mm, Streptomisin 100 µg/ml dan penisilin 100 µg/ml. Sel endotel ditanam dalam cawan petri 6 sumur dan penutup gelas obyek (Permatasari., 2014)

Langkah-langkah isolasi dan pembuatan kultur sel endotel manusia (HUVECs) menurut Permatasari (2014) adalah :

a. Tali pusat dibersihkan dari jaringan dan gumpalan darah dengan kertas tisu yang diberi alkohol 70%.
b. Salah satu ujung tali pusat dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena, vena mempunyai dinding yang lebih tebal dan elastis.
c. Vena dimasukkan kanul (1-2 cm), kemudian diikat dengan benang.
d. Kanul dihubungkan dengan spuit 20 cc, dan melalui spuit vena dibersihkan dengan memakai larutan PBS-A. Lakukan 2-3 kali.
e. Setelah bersih ujung tali pusat yang lain diklem.

f. Larutan kolagenase tipe 2 dimasukkan dengan menggunakan cara d, tetapi spuit dibiarkan menancap di kanul. Kolagenase diinkubasi selama 8 menit dan tali pusat didekap dengan kedua tangan untuk mendapatkan suhu 37°c.

g. Kolagenase yang telah mengandung sel endotel diaspirasi dan sel endotel yang kemungkinan masih tertinggal dibilas dengan PBS-A seperti cara f. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentifus 15 cc dan disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit.

h. Supernatan di buang sedangkan pellet yang mengandung sel endotel diresuspensi dengan media sebanyak 4 ml. Agar sel endotel tidak menjadi gumpalan, sel endotel dipisahkan dengan cara memipetnya berulang kali.

i. Sel endotel ditanam pada tempat penanaman (cawan petri, penutup gelas obyek) yang telah dilapisi gelatin 0.2%, kemudian dimasukkan pada incubator CO_2 dengan suhu 37°c dan CO_2 5 %.

j. Setelah 20 – 30 menit, terlihat dibawah mikroskop inverted sel endotel telah menempel di dasar tempat penanaman. Agar tidak terjadi kontaminasi, kultur dicuci dengan cara mengambil dan menggantikan dengan media, hingga media kultur bersih.

k. Kultur sel endotel menjadi satu lapis dalam waktu 5 hari dan siap untuk diberikan perlakuan.

l. Talipusat yang telah diambil sel endotelnya dibersihkan kemudian dibungkus dan dikubur dalam tanah.

4.5.3. Isolasi Plasma dari Darah Ibu Penderita Preeklampsia Berat (PEB) dan Kehamilan Normal

Ibu penderita PEB ataupun ibu hamil normal yang akan diambil darahnya harus mendapatkan persetujuan/*inform concent* baik dari ibu ataupun keluarga. Darah diambil sebanyak 4 cc dengan cara *aseptic* dengan menggunakan *spuit*

dispossible 5 cc dan dimasukkan *vacutainer lithium heparin* steril. Kemudian didiamkan. Selanjutnya darah disentrifugasi dengan kecepatan 1000 g (3500 rpm) selama 10 menit. Untuk menjaga plasma tetap steril, pengambilan plasma dilakukan di *Vertical laminary air flow.* Plasma disimpan ke dalam *freezer* dengan suhu -40°c.

4.5.4. Pembuatan Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum)* dan Perhitungan Berat Sampel

1. Ekstrak Buah Delima Merah *(Punica granatum)*

Sebagian besar senyawa yang terkandung didalam buah delima merah adalah tidak tahan panas sehingga teknik yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah dengan teknik maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena senyawa pada buah delima larut dalam air. Selain itu, etanol memiliki sifat melarutkan hampir semua zat baik yang bersifat polar, non polar maupun semi polar (Heryani*.,* 2010). Menurut Remington (2000) langkah dalam teknik maserasi yaitu sebagai berikut :

a. Proses pengeringan

1) Mencuci bersih bahan alam (buah delima) yang akan dikeringkan.
2) Memisahkan buah dengan kulit delima
3) Memasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°c - 60°c atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)

b. Proses ekstraksi

1) Membuat serbuk buah delima dengan cara, setelah buah delima kering, dihaluskan dengan menggunakan blender sampai halus.
2) Menimbang sampel kering sebanyak 100 gram (sampel kering)

3) Memasukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L.
4) Kemudian direndam dengan menggunakan etanol 900 ml.
5) Mengocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
6) Mendiamkan 1 malam sampai mengendap.
7) Mengambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring)
8) Melakukan proses perendaman ini sampai 3 kali.

c. Proses evaporasi

1) Memasukkan dalam labu evaporator 1 L.
2) Memasang labu evaporasi pada evaporator.
3) Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh.
4) Memasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator,* pemanas/*water bath* (atur sampai suhunya 90°c sesuai dengan titik didih pelarut) dan sambungkan dengan aliran listrik.
5) Biarkan larutan etanol memisah yang sudah ada dalam labu evaporator.
6) Menunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (± 1.5 sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL.
7) Hasil yang diperoleh kira-kira ¼ dari bahan alam kering.
8) Memasukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik/kaca.
9) Kemudian disimpan dalam freezer.

2. Perhitungan Berat Sampel

Perhitungan berat sampel ekstrak delima dengan langkah langkah penghitungan sebagai berikut :

a. Pembuatan stok dosis ekstrak buah delima merah adalah

Untuk membuat stok dosis 5600 ppm adalah dengan menimbang ekstrak buah delima merah (esensial oil) sebanyak 0.056 g/ml = 5600 µg/ml, kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml *serum free medium* (SFM).

b. Pembuatan Medium Komplit Normal dan Medium Komplit PEB

1) Pembuatan Medium Komplit Normal untuk kelompok K (-), yaitu *fetal bovine serum* (FBS) 400 µl + SFM 4.5 cc + Plasma Normal 100 µl.

2) Pembuatan Medium Komplit PEB untuk Kelompok K (+) dan kelompok perlakuan dengan dosis berbeda, yaitu : FBS 2.4 cc + SFM 27 cc + Plasma PEB 600 µl.

c. Pembuatan konsentrasi dosis ekstrak delima

V1 x M1 = V2 x M2

V1 : Volume konsentrasi ekstrak delima yang diperlukan

M1: Stok ekstrak buah delima merah = 5600 ppm

V2: Volume medium kultur = 10.000 µl = 10 cc

M2 : Dosis ekstrak delima (ppm)

1) Volume konsentrasi ekstrak delima yang diperlukan pada dosis 56 ppm adalah :

$$V1 = \frac{V2 \text{ x } M2}{M1} = \frac{10.000 \text{ µl x } 56 \text{ ppm}}{5600\text{ppm}} = 100 \text{ µl}$$

Jadi volume konsentrasi ekstrak buah delima merah yang diperlukan pada dosis 56 ppm adalah dengan mengambil 100 µl dari stok dosis ekstrak buah delima merah + 9.9 ml medium komplit PEB = 10 ml.

2) Volume konsentrasi ekstrak delima yang diperlukan pada dosis 28 ppm adalah :

$$V1 = \frac{V2 \text{ x } M2}{M1} = \frac{10.000 \text{ µl x } 28 \text{ ppm}}{56 \text{ ppm}} = 5000 \text{ µl} = 5 \text{ ml}$$

Jadi volume konsentrasi ekstrak buah delima merah yang diperlukan pada dosis 28 ppm adalah dengan mengambil 5 ml dari stok dosis 56 ppm + 5 ml medium komplit PEB = 10 ml.

3) Volume konsentrasi ekstrak delima yang diperlukan pada dosis 14 ppm adalah :

$$V1 = \frac{V2 \text{ x } M2}{M1} = \frac{10.000 \text{ µl x } 14 \text{ ppm}}{28 \text{ ppm}} = 5000 \text{ µl} = 5 \text{ ml}$$

Jadi volume konsentrasi ekstrak buah delima merah yang diperlukan pada dosis 14 ppm adalah dengan mengambil 5 ml dari stok dosis 28 ppm + 5 ml medium komplit PEB = 10 ml.

4.6. Pemaparan Kultur HUVECs dengan Plasma Kehamilan Normal

Kultur sel endotel diinkubasi pada suhu 37^0c selama 4-5 hari dalam Medium 199 (M199) yang mengandung 20% FBS (v/v) dan diperkirakan 80-90 % sel konfluen. Plasma normal yang akan dipaparkan pada kultur HUVECs adalah sebesar 2% (Baktiyani, 2007).

4.7. Pemaparan Kultur HUVECs dengan Plasma Preeklampsia dan Ekstrak Delima

Kultur sel endotel diinkubasi pada suhu 37^0c selama 4-5 hari dalam M199 yang mengandung 20% PBS (v/v) dan diperkirakan 80-90% sel konfluen. Kemudian kultur HUVECs dipapar dengan medium complet PEB yang merupakan campuran antara ekstrak delima (14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm),

plasma PEB 2% (Baktiyani., 2007) dan medium kedalam masing-masing *well* yang berisi kultur HUVECs yang telah di monolayer. Tahap selanjutnya adalah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0c.

4.8. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.8.1. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent)* adalah ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* dengan konsentrasi berbeda yaitu 14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm.
2. Variabel tergantung (*Dependent)* adalah Kadar VEGF dan PIGF pada kultur HUVECs.

4.8.2. Definisi Operasional

1. Plasma penderita preeklampsia didefinisikan sebagai plasma darah yang dipakai sebagai sampel yang berasal dari ibu hamil yang menderita preeklampsia berat (PEB). Kriteria dari PEB adalah tekanan darah ≥ 140/90 mmHg, peningkatan ≥ 30/15 mmHg, diastolik ≥ 90 mmHg, diukur dengan posisi duduk, manset dengan ukuran tepat, protein uria ≥ 2+ dengan pemeriksaan dipstick, ≥ 300 mg/dL urin 24 jam.
2. Plasma Kehamilan normal didefinsikan sebagai plasma darah yang dipakai sebagai sampel yang berasal dari ibu hamil normal. Kriteria kehamilan normal adalah tekanan darah 100/60 mmHg s/d 120/80 mmHg yang diukur dengan posisi duduk, manset dengan ukuran tepat. Kadar Hb ≥ 11 g/dL dengan kriteria berat badan (BB) dan tinggi badan (TB) normal. Protein urin (-).
3. Kutur sel endotel (HUVECs) adalah kultur sel endotel yang berasal dari tali pusat BBL dari ibu dengan kehamilan normal melalui persalinan secara SC

ataupun persalinan normal yang dipakai pada hari ke-5 dan kultur HUVECs konfluen 80-90%.

4. Kontrol negatif adalah kultur HUVECs yang dipapar dengan plasma kehamilan normal 2%.
5. Kontrol positif adalah kultur HUVECs yang dipapar dengan plasma penderita preeklampsia 2%.
6. Kelompok perlakuan adalah kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia 2% serta diberi ekstrak delima dalam 3 dosis berbeda yiatu 14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm.
7. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum)* adalah ekstrak buah delima merah (daging buah dan biji). Varietas *Phonecia* (*Fenecia*), yaitu varietas yang berasal dari Camarillo, California. Bentuk buahnya besar dengan diameter 4-5 inci, kulitnya hijau dengan bintik-bintik merah, memiliki biji yang relatif lebih keras dan rasanya manis. Kondisi buah dalam keadaan masak dan didapatkan dari Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang Propinsi Jawa Tengah.
8. Kadar VEGF adalah kadar VEGF kultur HUVECs dari supernatan kultur setelah dilakukan perlakuan dan inkubasi selama 24 jam yang dikur dengan menggunakan metode *Elisa* dan dinyatakan dengan satuan pg/ml
9. Kadar PIGF adalah kadar PIGF kultur HUVECs dari supernatan kultur setelah dilakukan perlakuan dan inkubasi selama 24 jam yang dikur dengan menggunakan metode *Elisa* dan dinyatakan dengan satuan pg/ml

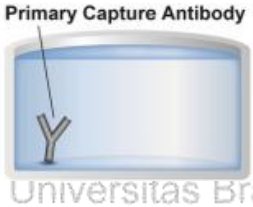
4.9. Metode pengukuran Kadar VEGF

Reagen VEGF menggunakan VEGF *comercial immunoassay* yang dilakukan berdasarkan instruksi *manufacture's.* Metode pengukuran yang digunakan adalah *quantitative* buatan RayBiotech, Inc, katalog ELH-VEGF.

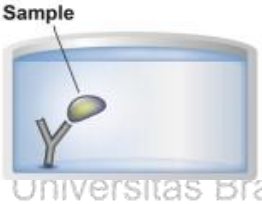
Antibodi spesifik untuk human VEGF dicoating pada 96 well plate. Standart dan sampel diambil dengan menggunakan pipet dan dimasukkan pada well. VEGF pada sampel menunjukkan ikatan oleh *immobilized antibody. Wells* dicuci kemudian ditambahkan *biotinylated antibody.* Setelah dicuci, untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan, *HRP-conjugated streptavidin* ditambahkan pada well. Kemudian well kembali dicuci dan ditambahkan *TMB substrat solution* pada well dan perubahan warna pada proporsi menunjukkan jumlah ikatan dari VEGF. Pemberian solution dihentikan pada saat terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Intensitas dari warna diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Metode pengukuran yang dilakukan adalah :

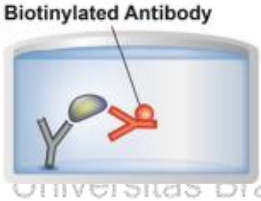
1. Mempersiapkan semua reagent, sampel dan standart sesuai dengan instruksi.



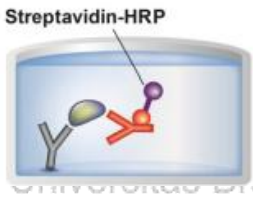
2. Menambahkan 100 µl standar atau sampel pada masing-masing well. Inkubasi 2.5 jam pada suhu ruang atau *over night* pada suhu 4°c

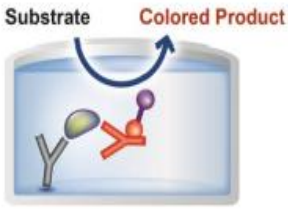


3. Menambahkan 100 µl biotin antibodi yang telah disiapkan pada masing-masing well. Inkubasi 1 jam pada suhu ruang.



4. Menambahkan 100 µl streptavidin solution yang telah diasiapkan. Inkubasi 45 menit pada suhu ruang.



5. 

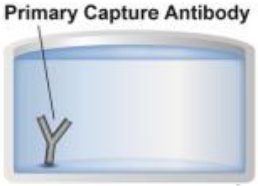
Menambahkan 100 µl *TMB one step substrate reagent* pada masing-masing well. Inkubasi 30 menit pada suhu ruang dan menambahkan 50 µl stop solution pada masing-masing well dan hasilnya dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

4.10. Metode Pengukuran Kadar PIGF

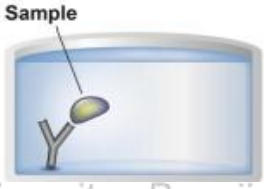
Reagen PIGF menggunakan PIGF *comercial immunoassay* yang dilakukan berdasarkan instruksi *manufacture's*. Metode pengukuran yang digunakan adalah ELISA untuk pengukuran *quantitative* pada human PIGF di serum, plasma, sel kultur supernatan dan urine buatan RayBiotech, Inc, katalog ELH-PLGF.

Antibodi spesifik untuk human PIGF dicoating pada 96 well plate. Standart dan sampel diambil dengan menggunakan pipet dan dimasukkan pada well. PIGF pada sampel menunjukkan ikatan oleh *immobilized antibody. Wells* dicuci kemudian ditambahkan *biotinylated antibody.* Setelah dicuci, untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan, *HRP-conjugated streptavidin* ditambahkan pada well. Kemudian well kembali dicuci dan ditambahkan *TMB substrat solution* pada well dan perubahan warna pada proporsi menunjukkan jumlah ikatan dari PIGF. Pemberian solution dihentikan pada saat terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Intensitas dari warna diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Metode pengukuran yang dilakukan adalah :

1. 

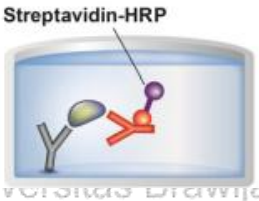
Mempersiapkan semua reagent, sampel dan standart sesuai dengan instruksi.

2. 

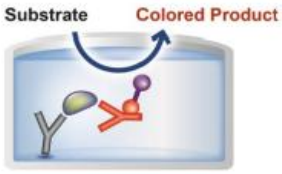
Menambahkan 100 µl standar atau sampel pada masing-masing well. Inkubasi 2.5 jam pada suhu ruang atau *over night* pada suhu 4°c

3.

Menambahkan 100 µl biotin antibodi yang telah disiapkan pada masing-masing well. Inkubasi 1 jam pada suhu ruang.

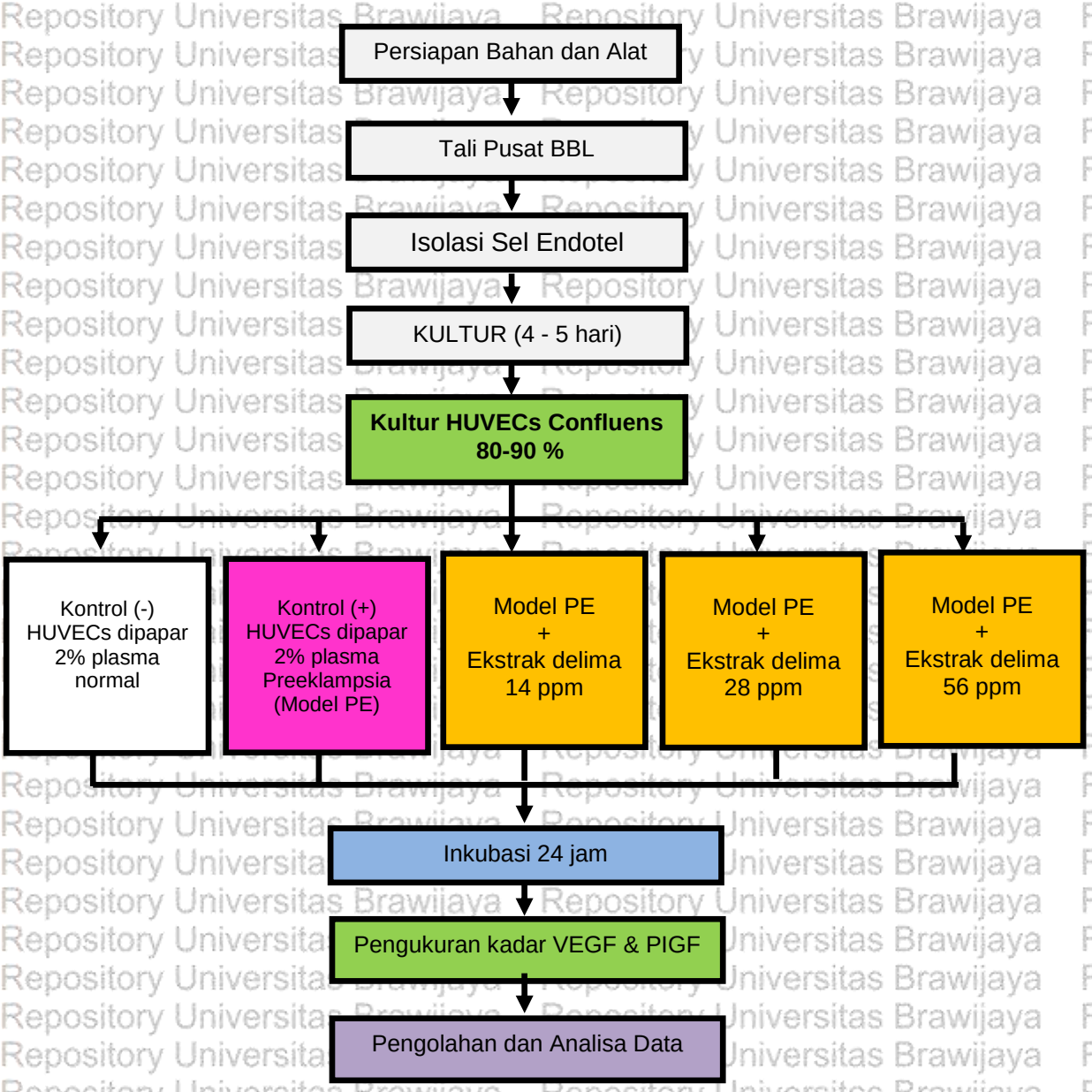
4. 

Menambahkan 100 µl streptavidin solution yang telah diasiapkan. Inkubasi 45 menit pada suhu ruang.

5. 

Menambahkan 100 µl *TMB one step substrate reagent* pada masing-masing well. Inkubasi 30 menit pada suhu ruang dan menambahkan 50 µl stop solution pada masing-masing well dan hasilnya dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

4.11. Alur Penelitian



4.12. Pengolahan dan Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan dengan 3 tahapan penghitungan. Adapun 3 tahapan berturut – turut yaitu : (1) uji asumsi normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro – Wilk* dan homogenitas ragam dengan menggunakan uji *Levene* sebagai prasyarat pengujian statistika parametrik, (2) uji *Anova One Way* (Uji F), dan (3) uji korelasi *Pearson*. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak *(software) SPSS for Windows* 19.0. Secara lengkap dijelaskan dibawah ini :

4.12.1 Uji Asumsi (Prasyarat parametrik)

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro – Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p – value*. Jika nilai Sig atau *p – value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi α = 0.05, maka akan disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan. Sedangkan jika nilai Sig atau *p – value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi α = 0.05, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santoso, 2005).

Selain menguji normalitas, asumsi yang melandasi dalam pengujian statistika parametrik adalah uji homogenitas ragam (Hanafiah, 2012). Proses pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Jika nilai Sig atau *p – value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi α = 0.05, maka akan disimpulkan homogenitas ragam terpenuhi,

sehingga uji parametrik dapat digunakan. Adapun variabel terukur yang diuji prasyarat parametrik adalah kadar VEGF dan PlGF

4.12.2 Uji *Anova One Way*

Pengujian dengan *Anova One Way* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol positif (Kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsi) dengan kelompok perlakuan (Kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsi + ekstrak buah delima berbagai dosis). Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data kadar VEGF dan PIGF. sTujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian ekstrak delima merah berbagai dosis pada kultur yang telah dipapar plasma penderita preeklampsi sebelumnya. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan Ho ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu dipilih Beda Nyata Terkecil / BNT (*Least Significant Difference / LSD).* Tujuan digunakan uji *LSD* adalah untuk menemukan dosis ekstrak delima merah berapa yang paling berpengaruh terhadap kadar VEGF dan PlGF pada kultur tersebut.

4.12.3 Uji Korelasi

Uji korelasi tidak lain adalah menguji ada atau tidaknya tingkat keeratan hubungan dua variabel terukur, yaitu korelasi antara dosis ekstrak buah delima merah dengan kadar VEGF & PIGF. Dalam penelitian ini digunakan uji korelasi *Pearson* jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak terdistribusi normal maka digunakan uji *Spearman's rho.* Kriteria keputusan berdasarkan berdasarkan nilai Sig atau *p–value,* jika *p–value* > = 0.05 maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel.

Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi / KK) dapat diartikan kedalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut :

KK = 0, tidak ada korelasi

0 < KK ≤ 0.20, korelasi sangat rendah / lemah tapi pasti

0.20 < KK ≤ 0.40, korelasi rendah / lemah tapi pasti

0.40 < KK ≤ 0.70, korelasi yang cukup berarti

0.70 < KK ≤ 0.90, korelasi yang tinggi / kuat

0.90 < KK ≤ 1.00, korelasi sangat tinggi / kuat sekali, dapat diandalkan

KK = 1, korelasi sempurna

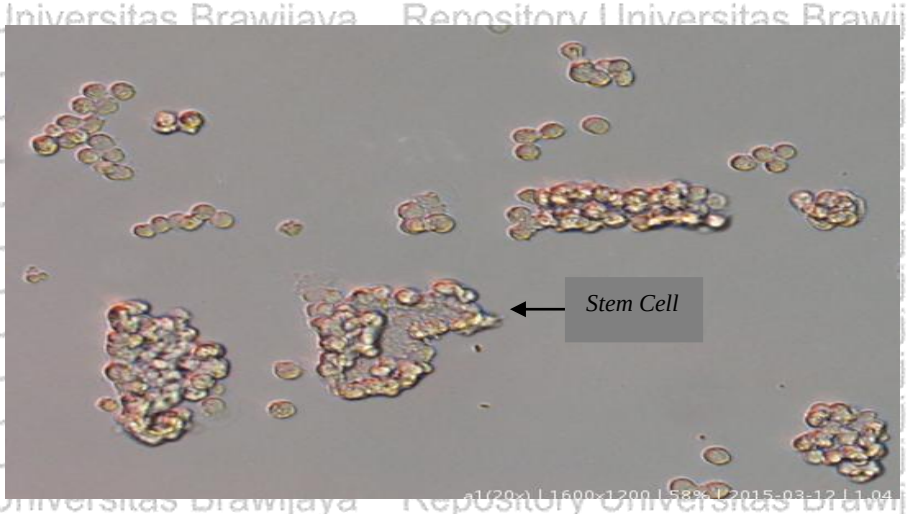
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Gambaran Umum Kultur Sel Endotel

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober s/d Desember 2014 dan Januari s/d April 2015 di Laboratorium Biomedik FKUB. Penelitian dilaksanakan secara eksperimental laboratorik/*true eksperimental* pada *in vitro.* Sampel yang digunakan berasal dari sel endotel pembuluh darah (*vena umbilikalis)* yang berasal dari talipusat bayi baru lahir (BBL) yang berasal dari ibu yang bersalin dengan cara *sectio caesarea* (SC) tanpa komplikasi ataupun persalinan normal. Kultur sel endotel diinkubasi pada suhu 37°c selama 4-5 hari dalam medium 199 (M199) yang mengandung 20% FBS. Sampel baik ditandai dengan tidak terjadi kontaminasi yang dapat dilihat dalam 24 jam pertama dan setelah 30 menit penanaman pada cawan petri/well, sel endotel mampu memperbanyak diri dan dapat melekat pada dasar tempat penanaman (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Sel Endotel 30 Menit Setelah Penanaman

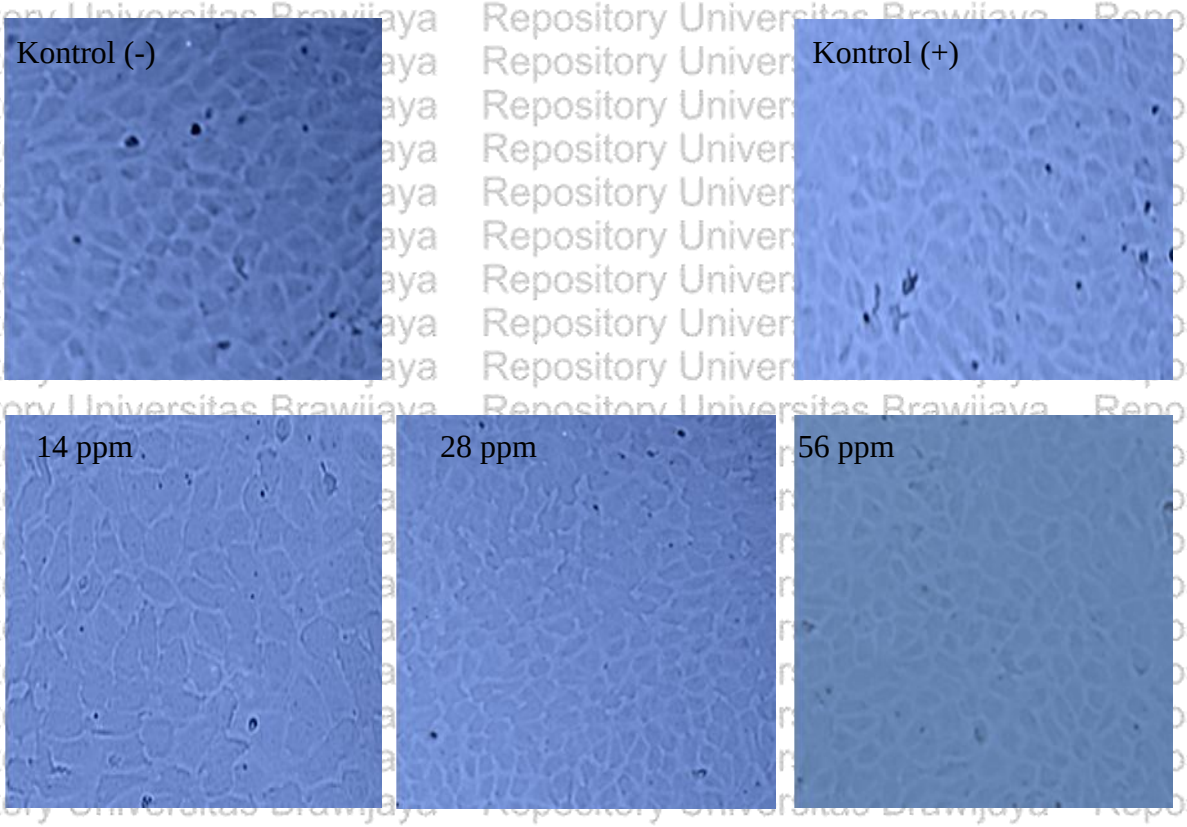
Sel endotel tampak menempel pada dasar well dan tampak *stem cell* yang mulai memperbanyak diri. Pengamatan dengan mikroskop cahaya Olympus Inverted DP73 dengan perbesaran 100x

Pada hari ke-5, kultur sel endotel konfluen 80-90% (gambar 5.2) yang ditandai dengan (1) Identifikasi sel endotel pembuluh darah ditetapkan secara mikroskopis yang terlihat gambaran seperti *cabble stone.* (2) Kultur sel endotel pembuluh darah telah dibuktikan melepaskan *endothel derived relaxing factor* yang dievaluasi dengan menggunakan metode bioassay, mengekspresikan VE cadherin, von Willebrand factor dan CD 146. (3) Kultur sel endotel sebagai sampel bila pada satu lapis sel terdapat sedikitnya 90% sel endotel pembuluh darah. (4) Kultur sel endotel pembuluh darah secara mikroskopis terlihat sehat yang ditandai dengan sel dapat mengalami replikasi, membran sel utuh dan bertepi halus, inti sel terlihat jelas dan membentuk gambaran (*cabblestone*).

Gambar 5.2 Sel Endotel Inkubasi Hari ke 5.
Sel endotel memberikan gambaran seperti *cabblestone.* Tanda panah hitam A menunjukkan gambaran inti sel dan tanda panah hitam B menunjukkan membran sel utuh dan bertepi halus. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus Inverted DP73 dengan perbesaran 100x.

Kultur sel endotel diperkirakan konfluen 80-90%, dilanjutkan dengan pemaparan plasma normal pada kontrol (-), plasma PEB pada kontrol (+) dan campuran plasma PEB dan ekstrak delima dengan konsentrasi dosis berbeda

yaitu 14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm (medium komplet PEB) pada kelompok perlakuan. Setelah dilakukan perlakuan untuk selanjunya kultur sel endotel diinkubasi selama 24 jam (Gambar 5.3).



Gambar 5.3 Sel Endotel Inkubasi 24 Jam Setelah Perlakuan

Kontrol (-) adalah sel endotel yang dipapar plasma normal 2%. Kontrol (+) adalah sel endotel yang dipapar plasma preeklampsia 2%. 14 ppm adalah sel endotel yang dipapar plasma preeklampsia 2% dan ekstrak buah delima merah dengan dosis 14 ppm. 28 ppm adalah sel endotel yang dipapar plasma preeklampsia 2% dan ekstrak buah delima merah dengan dosis 28 ppm. 56 ppm adalah sel endotel yang dipapar plasma preeklampsia 2% dan ekstrak buah delima merah dengan dosis 56 ppm. Secara morfologi tidak terdapat perbedaan sehingga secara fenotip tidak bisa dinilai. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus Inverted DP73 dengan perbesaran 200x.

Setelah kultur sel diinkubasi selama 24 jam kemudian dilakukan pengamatan untuk melihat morfologi sel dan dilakukan panen sel untuk koleksi elisa yaitu medium diambil dan diletakkan pada *ependorf.* Medium merupakan supernatan yang dirilis oleh sel. apabila supernatan tidak langsung diukur, supernatan disimpan pada suhu -40°c.

5.2. Analisa Data

5.2.1. Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Pengujian kadar VEGF dan kadar PIGF dengan menggunakan 2 kelompok kontrol yaitu K (-) dan K (+) serta 3 level konsentrasi ekstrak buah delima merah dengan dosis berbeda (14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm) dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Sebelum dilakukan pengujian kadar VEGF dan kadar PIGF dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari α = 0,05. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.1. Uji Asumsi Normalitas

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Kadar VEGF	0.952	0.392	Normal
Kadar PIGF	0.932	0.172	Normal

Berdasarkan pada tabel 5.1 di atas, pada variabel kadar VEGF dan PIGF didapatkan p-value lebih dari α = 0,05 (p>0,05). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada kedua variabel telah terpenuhi.

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada α = 0,05.

Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam :

Tabel 5.2. Uji Asumi Homogenitas Ragam

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Kadar VEGF	1.355	0.296	Homogen
Kadar PIGF	12.590	0.000	Tidak Homogen

Berdasarkan pada hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa pada variabel Kadar VEGF didapatkan p-value lebih dari 0.05 (p > 0.05). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam variabel Kadar VEGF telah terpenuhi, tetapi pada variabel kadar PIGF, didapatkan p-value kurang dari 0,05 (p < 0.05). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam pada variabel kadar PIGF tidak terpenuhi. Oleh karena itu, diperlukan proses transformasi data. Terdapat beberapa metode transformasi data, salah satunya adalah logaritma natural (Ln). Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam variabel kadar PIGF pada data yang telah ditransformasi

Tabel 5.3. Uji Asumsi Homogenitas Ragam Pada Data Hasil Transformasi

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Kadar PIGF	2.651	0.074	Homogen

Berdasarkan pada hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada data hasil transformasi, ditunjukkan bahwa pada variabel kadar PIGF, didapatkan p-value lebih dari 0,05 (p > 0.05). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam pada variabel kadar PIGF telah terpenuhi. Oleh karena itu, proses pengujian pengaruh ekstrak delima merah terhadap kadar PIGF dilakukan secara parametrik dengan menggunakan data hasil transformasi.

5.2.2. Pengujian Efek Ekstrak Buah Delima Merah Terhadap Kadar VEGF dengan ANOVA

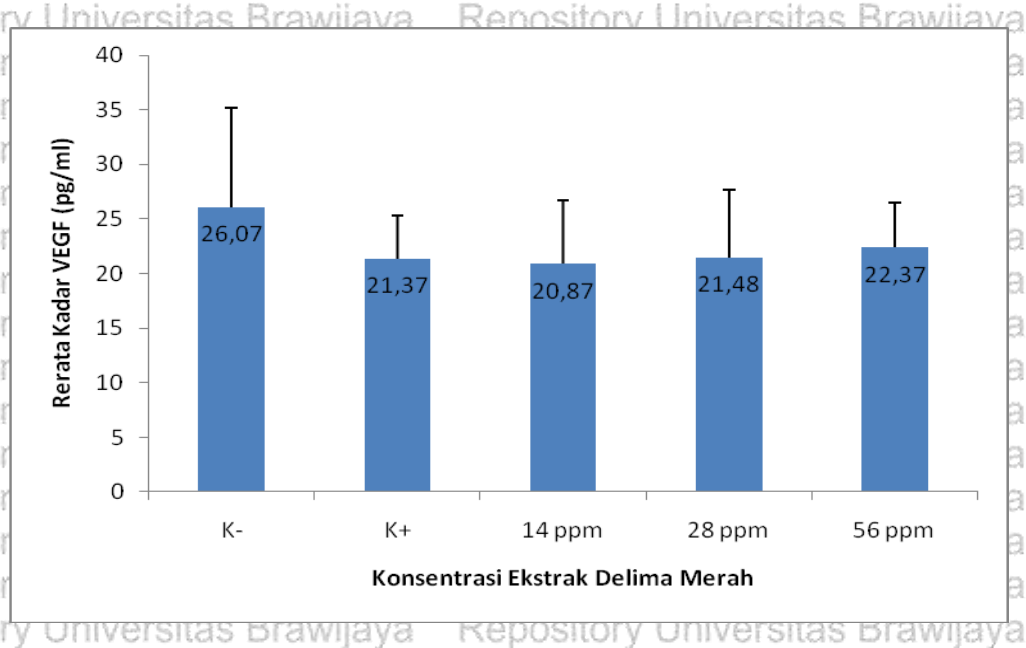
Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel kadar VEGF telah terpenuhi asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui efek pemberian ekstrak buah delima merah terhadap kadar VEGF secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Berikut hasil pengujian efek

pemberian ekstrak buah delima merah dengan beberapa level konsentrasi dosis terhadap kadar VEGF dengan menggunakan uji ANOVA :

Tabel 5.4. Efek Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Terhadap Kadar VEGF Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia

Perlakuan Dengan Ekstrak Buah Delima Merah	Mean ± SD (pg/ml)		p-value
K-	26.066 ± 9.098	a	0.758
K+	21.372 ± 3.994	a	
14 ppm	20.873 ± 5.822	a	
28 ppm	21.479 ± 6.228	a	
56 ppm	22.366 ± 4.149	a	

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,758 (p>0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat efek yang signifikan pemberian ekstrak buah delima merah terhadap kadar VEGF atau dengan kata lain, tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar VEGF akibat pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi dosis yang berbeda. Rata-rata kadar VEGF kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.4. Rata-Rata Kadar VEGFPada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia

Pada Gambar 5.4 ditunjukkan rata-rata kadar VEGF pada kelompok kontrol dan perlakuan. Tampak rata-rata kadar VEGF paling tinggi pada kelompok kontrol negatif (K-). Rata-rata kadar VEGF meningkat pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak buah delima merah seiring dengan peningkatan konsentrasi dosis ekstrak buah delima merah yang diberikan. Namun, peningkatan yang terjadi tidak signifikan secara statistik.

5.2.3. Pengujian Efek Ekstrak Buah Delima Merah Terhadap Kadar PIGF dengan ANOVA

Berikut hasil pengujian efek pemberian ekstrak buah delima merah dengan beberapa level konsentrasi terhadap kadar PIGF dengan menggunakan ANOVA.

Tabel 5.5. Efek Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Terhadap Kadar PIGF Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia

Perlakuan Dengan Ekstrak Buah Delima Merah	Mean ± SD (pg/ml)			p-value
	Data Asli	Data Hasil Transformasi		
K-	151.943 ± 107.079	4.803 ± 0.791	b	
K+	37.578 ± 17.391	3.560 ± 0.399	a	
14 ppm	53.726 ± 25.221	3.909 ± 0.436	ab	0.040
28 ppm	64.896 ± 20.633	4.136 ± 0.309	ab	
56 ppm	83.880 ± 33.549	4.348 ± 0.503	b	

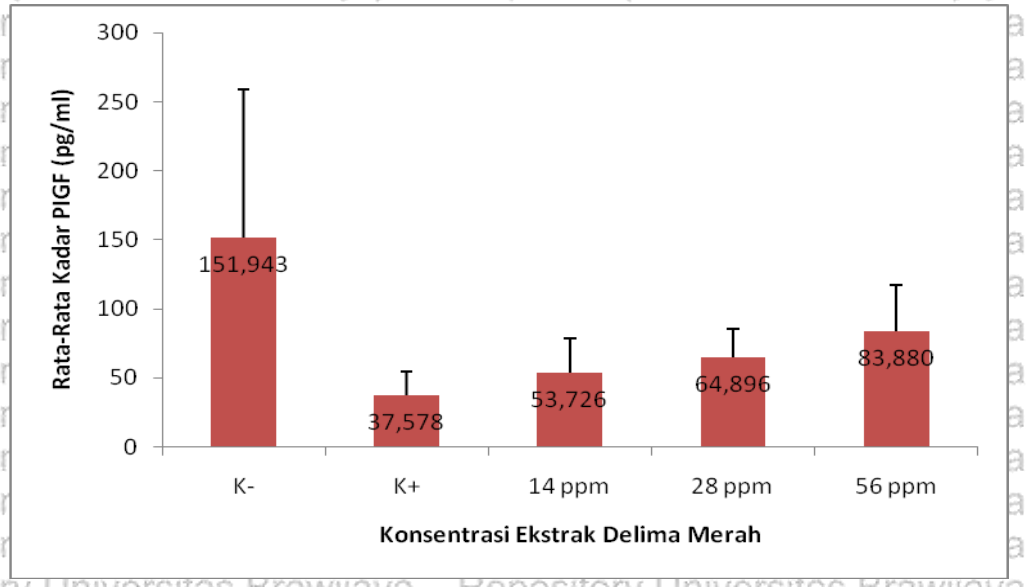
Keterangan : Pada rata-rata ± sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,040, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan pemberian ekstrak buah delima merah terhadap kadar PIGF. Atau

dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan kadar PIGF akibat pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi yang berbeda.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) memiliki rata-rata kadar PIGF berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (K+). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd memuat huruf yang berbeda.

Peningkatan kadar PIGF secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian ekstrak buah delima merah pada konsentrasi 56 ppm. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian ekstrak delima merah pada konsentrasi 56 ppm memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif (K+). Bahkan, jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 56 ppm memuat huruf yang sama dengan kelompok kontrol negatif (K-). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 56 ppm mampu meningkatkan kadar PIGF dan kadar PIGF sudah kembali pada kondisi normal.



Gambar 5.5. Rata-Rata Kadar PIGF Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia

Pada Gambar 5.6 ditunjukkan rata-rata kadar PIGF pada semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K (+) dengan rata-rata PIGF terendah kemudian rata-rata PIGF meningkat pada kelompok perlakuan seiring dengan konsentrasi dosis ekstrak buah delima merah yang diberikan. Peningkatan signifikan secara statistik terjadi pada konsentrasi 56 ppm.

5.2.4. Pengujian Hubungan antara Konsentrasi Dosis Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum)* Dengan Kadar VEGF dan PIGF

Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi dosis ekstrak buah delima merah dengan Kadar VEGF dan PIGF dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil uji korelasi sebagai berikut :

Tabel 5.6. Uji Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Delima Merah dengan Kadar VEGF dan PIGF

Hubungan Variabel	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Konsentrasi Ekstrak Delima Merah dengan Kadar VEGF	0.128	0.692	Tidak Signifikan
Konsentrasi Ekstrak Delima Merah dengan Kadar PIGF	0.610	0.012	Signifikan

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara ekstrak buah delima merah dengan kadar VEGF, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.028 dengan p-value sebesar 0.692. P-value lebih dari 0.05 menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak delima merah dengan kadar VEGF.

Pada pengujian korelasi Pearson antara ekstrak buah delima merah dengan kadar PIGF, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.610 dengan p-value sebesar 0.012. P-value kurang dari 0.05 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak buah delima merah dengan kadar

PIGF. Koefisien korelasi bernilai positif menunjukkan bahwa hubungan yang terbentuk antara ekstrak buah delima merah dengan kadar PIGF bersifat positif, yang mengandung pengertian bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak buah delima merah, akan diikuti peningkatan kadar PIGF, begitu pula sebaliknya. Koefisien korelasi sebesar 0.610 menunjukkan bahwa hubungan yang terbentuk berada pada kategori kuat.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Kadar *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) Pada Kultur HUVECs.

6.1.1. Efek Pemaparan Plasma Preeklampsia 2% Terhadap Kadar VEGF Pada Kultur HUVECs.

Sel endotel merupakan monolayer sel datar poligonal yang berkembang secara terus-menerus diatas *luminal surface* pada seluruh pembuluh darah. Tahanan biologikal yang strategis terletak diantara otot polos pembuluh darah dan aliran darah. Sel endotel berperan dalam modulasi vaskular, kontrol hemostasis primer, pertahanan dan inflamasi, transportasi nutrisi dan soluble faktor lainnya dengan aktivasi atau inaktivasi hormon vasoaktif (Rodrigo *et al.,* 2009). Pada preeklampsia terjadi disfungsi endotel. Stres oksidatif pada plasenta menyebabkan pelepasan beberapa faktor plasenta seperti faktor antiangiogenik dan sitokin proinflamasi ke dalam sirkulasi maternal (Luo *et al.,* 2011; Young *et al.,* 2010; Gilbert *et al.,* 2008). Pada preeklampsia terjadi proses antiangiogenik yang berlebihan dimana kadar sFlt1 berlebihan dapat menyebabkan ketidakseimbangan angiogenik yaitu terjadinya penurunan VEGF dan PIGF. Penurunan VEGF dan PIGF dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel (Shenoy *et al.,* 2010).

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa *circulating factor* pada plasma preeklampsia adalah sitotoksik pada kultur sel endotel. Faas *et al.,* (2010) melaporkan bahwa plasma dari ibu hamil dengan preeklampsia dapat mengaktivasi sel endotel *in vitro.* Plasma penderita preeklampsia merangsang migrasi transendotelial dari neutrofil pada *in vitro.* Neutrofil tersebar merata pada endotel dan infiltrasi *pada intimal space.* Infiltrasi neutrofil berhubungan dengan marker inflamasi pada endotel. Neutrofil pada endotel memperburuk kondisi

endotel dengan melepaskan ROS, TNF-α dan *myeloperoxidase* (Walsh., 2006). Plasma penderita preeklampsia mengandung oksidan, sitokin proinflamasi (TNF-α dan IL-6) dan Angiotensin II (Wang *et al.,* 2007; Sankaralingam *et al.,* 2006).

Dari tabel 5.4 terlihat bahwa pemberian plasma preeklampsia 2% tanpa disertai ekstrak buah delima merah pada kontrol (+) memiliki rata-rata kadar VEGF lebih rendah yaitu 21.372 ± 3.994 pg/ml dibanding pada kontrol (-) yaitu 26.066 ± 9.098 pg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi disfungsi endotel pada kultur HUVECs Preeklampsia yang dipapar plasma preeklampsia 2% yang ditandai dengan penurunan kadar VEGF. Pada kondisi hipoksia *in vitro,* sFlt1 berikatan dengan faktor angiogenik yaitu VEGF dan PIGF dan meningkatkan sintesa trofoblas plasenta yang berhubungan dengan kondisi stres oksidatif. Peningkatan sFlt1 berhubungan dengan penurunan konsentrasi VEGF dan PIGF (Poston., 2006). Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa penurunan VEGF dapat mengubah keseimbangan dari *superoxide anion* dan NO sehingga menyebabkan terjadinya disfungsi endotel (Bridges *et al.,* 2009).

6.1.2. Efek Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Terhadap Peningkatan Kadar VEGF Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia.

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA (tabel 5.4) didapatkan bahwa p-value sebesar 0.758 (p>0.05). sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan dari pemberian ekstrak buah delima merah terhadap kadar VEGF. Pemberian plasma preeklampsia dengan atau tanpa ekstrak buah delima merah tidak dapat meningkatkan kadar VEGF pada sel endotel.

Stres oksidatif mempunyai peranan penting dalam patogenesis terjadinya preeklampsia. Untuk mengatasi radikal bebas yang berlebihan akibat stres

oksidatif diperlukan mekanisme pertahanan tubuh baik secara endogen ataupun eksogen (Han *et al.,* 2007). Konsumsi antioksidan mampu meningkatkan antioksidan endogen dalam tubuh sehingga dapat menekan kerusakan sel yang berlebihan dan mempertahankan antioksidan seluler (Amjad *and* Shafighi., 2012; Sreekumar *et al.,* 2014).

Berbagai senyawa kimia baik alami maupun sintetis dapat bertindak sebagai *inducer* terhadap ekspresi gen penyandi antioksidan. Salah satu golongan inducer adalah golongan fenol. Senyawa fenol merupakan kelompok zat kimia yang ditemukan sangat luas pada tanaman (Kosem *et al.,* 2007). Senyawa fenol banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, biji, bunga, teh dan anggur merah (Middleton *et al.,* 2000). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ada korelasi sangat kuat antara aktivitas antioksidan dengan total fenol dari ekstrak buah-buahan sehingga disimpulkan bahwa senyawa fenol berperan sebagai antioksidan pada buah-buahan (Mahattanatawee *et al.,* 2006; Isabelle *et al.,* 2010; Nurliyana *et al.,* 2010). Inducer lainnya adalah ROS seperti H_2O_2. Dalam kondisi normal, ROS dihasilkan sebagai produk samping dari metabolisme aerobik untuk membentuk ATP dalam mitokondria. Dalam reaksi tersebut dibutuhkan oksigen dimana oksigen akan bereaksi dengan hidrogen untuk membentuk air, tetapi sejumlah kecil oksigen dapat berubah menjadi radikal bebas.

Inducer tersebut bekerja melalui mekanisme *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2). Senyawa fitokimia seperti epicatechin telah diketahui dapat memicu ekspresi gen penyandi antioksidan melalui aktivasi Nrf2 (Granado *et al.,* 2010; Shah *et al.,* 2010). Senyawa fitokimia tersebut mengaktivasi Nrf2 secara langsung yang diperantarai oleh interaksi dengan protein spesifik seperti p38, *protein kinase C* (PKC), *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK), *c-jun N-terminal kinase (*JNK) dan *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K). Dalam

kondisi normal, Nrf2 terikat pada *keap1* dan terdapat dalam sitoplasma bersama protein aktin sitoskeleton (Mann *et al.,* 2007). Sebaliknya dalam kondisi terpapar oleh senyawa yang bertindak sebagai inducer, maka inducer bereaksi dengan sistein pada *keap1* mengakibatkan pelepasan Nrf2 dari *Keap1* mengakibatkan pelepasan Nrf2 dari *Keap1.* Nrf2 kemuadian mengalami translokasi menuju nukleus dan berikatan dengan ARE bersama protein *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) untuk mengaktivasi ekspresi gen sitoprotectif seperti Heme Oxygenase-1 (HO-1).

Radikal bebas dapat berfungsi sebagai sinyal untuk mengaktivasi Nrf2 yang terikat pada Keap1 dalam sitoplasma sehingga mengalami disosiasi dan translokasi menuju nukleus. Dalam nukleus Nrf2 akan berasosiasi pada bagian promotor gen yang disebut ARE (*antioxidant response element*) untuk mengaktivasi gen penyandi antioksidan sehingga berekspresi. Antioksidan tersebut akan menangkal dampak negatif dari radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas sehingga aktivitasnya bisa dihambat. Dalam kondisi stres oksidatif antioksidan endogen tidak mampu mengimbangi pembentukan radikal bebas.

Nrf2 menengahi respon seluler akibat terpapar berbagai macam inducer seperti oksidan dengan cara berikatan pada elemen dari promotor gen sitoprotektif. Nrf2 diaktivasi oleh perubahan kondisi redoks sel dan berfungsi memulihkan homeostasis dengan mengontrol antioksidan, xenobiotic dan enzim sitoprotektif lainnya (Baird *et al.,* 2011).

Buah delima merah mengandung antosianin dan tanin yang merupakan bagian dari polifenol yang berperan sebagai antioksidan kuat dengan aktivitas inflamasi (Rasheed *et al.*, 2009). Sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yamagata, *et al* (2015) melaporkan bahwa antosianin dapat meningkatkan produksi VEGF pada vaskular dengan menghambat aktivasi dari p38 MAPK dan

JNK. Hasil yang tidak signifikan pada penelitian ini diduga disebabkan karena pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum*) dengan konsentrasi dosis 14 ppm, 28 ppm dan 56 ppm masih kurang signifikan untuk merangsang Nrf2 berasosiasi pada bagian promotor gen yaitu ARE untuk mengaktivasi gen penyandi antioksidan sehingga belum mampu meningkatkan kadar VEGF pada kultur sel endotel yang dipapar plasma penderita preeklampsia. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari dosis ekstrak buah delima merah yang optimum. Pada penelitian ini tidak dilakukan studi optimasi dosis ekstrak buah delima merah yang efektif untuk meningkatkan kadar VEGF tetapi studi optimasi dosis hanya dilakukan untuk mengetahui apakah dosis ekstrak buah delima merah aman untuk sel. Penentuan dosis ekstrak buah delima berdasarkan de Nigris, *et al* (2007) yaitu pemberian ekstrak buah delima pada kondisi disfungsi endotel karena stres oksidatif pada *atherosklerosis.* Penentuan dosis lainnya juga berdasarkan Singh, *et al* (2001) yaitu tentang studi aktivitas antioksidan dari ekstrak buah dan biji delima dengan menggunakan model *in vitro.*

Penelitian lain tentang pemanfaatan antioksidan untuk meningkatkan VEGF adalah dengan pemberian kurkumin. Gururaj *et al.,* (2002) dan Wijaya (2007) melakukan penelitian dengan pemberian kurkumin dosis 0.01 mM dan vitamin E dosis 20 mg/L pada aktivitas angiogensis pada plasenta preeklampsia. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa pemberian kurkumin dapat meningkatkan aktivitas angiogenesis plasenta dan kurkumin terbukti sebagai antioksidan yang dapat meningkatkan sekresi faktor angiogenik VEGF. Hal ini sesuai dengan penelitian Anand *et al* (2007) bahwa kurkumin merupakan jenis polifenol yang mempunyai aktivitas farmakologi pada anti kanker, anti malaria, antioksidan, anti mutagen, anti bakterial, antiangiogenik dan antiinflamasi. Target molekular kurkumin adalah pada faktor transkripsi, enzim, faktor pertumbuhan, reseptor dan ekspresi gen. VEGF merupakan faktor pertumbuhan angiogenik yang

merangsang proliferasi dan migrasi pada sel endotel primer melalui reseptor KDR (Ushio-Fukai., 2006). Kurkumin sebagai antioksidan dapat menangkap radikal bebas seperti radikal oksigen (O_2^-) dan radikal hidroksil (OH^-) secara langsung, juga dapat menginduksi antioksidan enzimatik di dalam sel seperti SOD dan GPx yang dapat mencegah pembentukan peroksida lipid membran sel yang selanjutnya dapat mencegah kerusakan sel plasenta dan memelihara fungsi sel plasenta.

Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Wei, *et al.* (2009) melaporkan bahwa teh mengandung flavonoid tinggi yang dapat digunakan sebagai antioksidan tetapi hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dapat menyebabkan peningkatan produksi ROS dan peningkatan stres oksidatif intraseluler *in vitro*. Ekstrak teh hijau menghambat proliferasi sel dan pengurangan ekspresi VEGF dan penurunan ekspresi Flt1. Perubahan ini berhubungan dengan disfungsi endotel pada preeklampsia.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian diatas, peneliti dapat berasumsi bahwa buah delima merah dan kurkumin mengandung bahan aktif polifenol yang sama-sama dapat meningkatkan kadar VEGF. Berbeda dengan teh hijau ternyata tidak memberikan efek dalam peningkatan kadar VEGF. Ekstrak buah delima merah memberi hasil yang seiring dengan ekstrak kurkumin dan berbeda dengan ekstrak teh hijau. Untuk mengetahui perbedaan dan persamaan hasil tersebut diperlukan pengkajian lebih lanjut.

6.2. Kadar *Placental Growth Factor* (PlGF) Pada Kultur HUVECs.

6.2.1. Efek Pemaparan Plasma Preeklampsia 2% Terhadap Kadar *Placental Growth Factor* (PlGF) Pada Kultur HUVECs.

Pada tabel 5.5 menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif (K-) memiliki rata-rata kadar PlGF berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (+). Hal ini

ditunjukkan dengan nilai rata-rata ± sd pada kelompok (K-) yaitu 4.803 ± 0.791 pg/ml. lebih rendah dibandingkan pada (K+) yaitu 3.560 ± 0.399 pg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pemaparan plasma preeklampsia 2% pada kultur HUVECs dapat menyebabkan penurunan kadar PIGF. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wardhani, (2010) yaitu rerata kadar PIGF pada kelompok preeklampsia lebih rendah dibandingkan pada kelompok normotensi dan perbedaan ini bermakna secara statistik (79.8±58.5 vs 877.4±500.1 pg/ml) Rerata kadar PIGF pada kelompok preeklampsia sepuluh kali lipat lebih rendah dibandingkan rerata kadar PIGF pada kelompok normotensi.

Penurunan kadar PIGF pada kultur HUVECs diduga disebabkan karena *circulating factor* yang terdapat pada preeklampsia. Pada HUVECs, PIGF dan Flt1 berikatan sehingga menyebabkan aktivasi pada regulasi sinyal ekstraseluler kinase 1 dan 2 (ERK 1/2) yang menyebabkan pelepasan NO. Ekspresi monosit Flt1 dan stimulasi dengan PIGF mengaktifkan p38 dan ERK 1/2 yang menyebabkan terjadinya migrasi monosit yang terlibat dalam regulasi pada proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis dan juga respon dari rangsangan stres yang berbeda (Elmer., 2009).

Pada *in vitro*, endotel yang telah dipapar plasma penderita preeklampsia 2% dibandingkan dengan plasma pasien normotensi 2%. Hasil dari percobaan tersebut adalah sel endotel memproduksi NO lebih tinggi setelah dipapar plasma penderita preeklampsia dibandingkan pada kelompok kontrol. Jadi endotel yang telah dipapar plasma penderita preeklampsia meningkatkan produksi NO dan sintesa NO (Baker *et al.*, 1995). *Circulating factor* yang ada pada plasma preeklampsia diduga dapat meningkatkan produksi NO. Reaksi NO dengan anion superoksida menjadi peroksinitrit. Peroksinitrit meningkatkan ekspresi protein *inducible* (i) NOS pada isolasi sel endotel melalui aktivasi dari NF-$_{\kappa}$B, kemudian rangsangan peroksinitrit meningkatkan NO yang dapat meningkatkan stres

oksidatif. Selain itu, peroksinitrit menurunkan ekspresi sintesa *prostacyclin*, yang dapat mengubah keseimbangan vasokonstriksi (Sankaralingam *et al.,* 2006). Pada kondisi disfungsi endotel terjadi ketidakseimbangan antara faktor vasodilatasi dan vasokonstriksi (Gilbert *et al.,* 2007).

Pada kultur HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia 2% menunjukkan bahwa sitokin proinflamasi diduga memproduksi *superoxide anion* (O_2^-) lebih tinggi dan terjadi peningkatan H_2O_2 dibandingkan pada kelompok kontrol negatif (K-) yang dipapar plasma kehamilan normal (Baktiyani *et al.,* 2007). O_2^- dimutasikan oleh enzim SOD menghasilkan H_2O_2 karena adanya logam transisi, seperti Fe^{2+}, Cu^{2+} akan menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif ($O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH^- + O_2$) (Miguel., 2011). Radikal hidroksil akan menyerang membran sel, ikatan ganda asam lemak tak jenuh sehingga terbentuk radikal lipid. Radikal lipid ini berinteraksi dengan molekul oksigen (O_2) menjadi lipid peroksida. Lipid peroksida dan peningkatan stres oksidatif dapat mengakibatkan penurunan antioksidan enzimatis (Miguel., 2011).

6.2.2. Efek Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Terhadap Peningkatan Kadar PIGF Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar Plasma Penderita Preeklampsia.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA didapatkan p-value sebesar 0.040 lebih kecil daripada $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan pemberian ekstrak buah delima merah terhadap kadar PIGF. hasil LSD 5% menunjukkan bahwa peningkatan kadar PIGF secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi dosis 56 ppm. Hal ini ditunjukkan dengan nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian ekstrak delima merah pada konsentrasi dosis 56 ppm lebih tinggi bila dibandingkan dengan

kelompok (K+). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi dosis 56 mampu meningkatkan kadar PIGF dan kadar PIGF sudah kembali pada kondisi normal.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah (*Punica* granatum) mempunyai aktivitas antioksidan sehingga mampu mencegah penurunan kadar PIGF pada sel endotel akibat adanya oksidan yang berasal dari plasma penderita preeklampsia 2%. Aktivitas antioksidan ekstrak buah delima merah dan ekstrak daun yang mengandung air dapat *scavenger* secara efektif dari ROS atau RNS yaitu $O_2^{\cdot}$, H_2O_2, OH^- dan NO pada *in vitro* (Wang *et al.,* 2010). Pada *in vitro,* buah delima memiliki efek sebagai antioksidan yang memiliki aktivitas antioksidan tiga kali lebih tinggi dibandingkan pada anggur merah dan teh hijau (Christaki *et al.,* 2011; Jurenka *et al.,* 2008). Buah delima merah mengandung antosianin dan tanin yang merupakan bagian dari polifenol yang berperan sebagai antioksidan kuat dengan aktivitas inflamasi (Rasheed *et al.,* 2009). Antosianin yang terkandung dalam buah delima merah adalah 12.8 mg dalam 100 gram buah delima (Gadze *et al.,* 2012). Menurut Miguel, (2011) antosianin sangat reaktif terhadap ROS/RNS sedangkan bila dilihat dari hubungan antara struktur dan potensial reduksi menunjukkan bahwa kelompok 3-hidroksil (cincin C), glikosilasi ini mengurangi aktivitas sebagai antioksidan. Antosianin pada buah delima diduga mampu meningkatkan enzim antioksidan dalam menscavenger superoksida dan peroksinitrit.

Buah delima juga mengandung antioksidan non enzimatik yaitu vitamin A, C (10.2 mg) dan E (0.60 mg) yang tinggi (Marhari dan Dewi., 2014). Vitamin C (*ascorbic acid)* merupakan katalis redoks yang dapat mengurangi dan menetralisir ROS. Vitamin C mengurangi ROS melalui reaksi GSH dan dapat dikatalisasi oleh protein disulfida isoerase dan *glutaredoxin* (Agarwal *et al.,* 2012). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Poston, *et al* (2006) yang

melaporkan bahwa pemberian vitamin C dan E pada *in vitro,* tidak menurunkan insiden terjadinya preeklampsia tetapi pemberian suplementasi antioksidan (vitamin C dan E) menyebabkan penurunan yang signifikan pada konsentrasi plasma dari sFlt1 dan peningkatan konsentrasi plasma dari PIGF. Berdasarkan pada percobaan *in vitro* tersebut tampaknya manfaat potensial dari antioksidan dapat digunakan untuk pencegahan dan memperbaiki preeklampsia.

Sedangkan pada *in vivo* jus delima merah dapat meningkatkan kadar *glutation peroksidase* (GSH-Px) darah mencit (*Mus musculus*) dengan aktivitas fisik maksimal (Sugianto., 2011). GSH-Px adalah enzim antioksidan yang mengandung selenium (Se) pada sisi aktifnya. Kerja enzim ini adalah mengubah molekul hidrogen peroksida dan berbagai hidro serta lipid peroksida menjadi air. GSH-Px sebagai enzim antioksidan yang bekerja sebagai peredam (*quenching*) radikal bebas (Winarsi., 2011). Sejalan dengan hasil penelitian Chen., *et al* (2012) yaitu jus delima menunjukkan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan Hsp 90 pada ibu yang mengkonsumsi jus delima sedangkan pada *in vitro,* jus delima juga menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu penurunan ekspresi Hsp 90 pada model yang terpapar hipoksia. Jadi asupan buah delima selama kehamilan mungkin membatasi plasenta rusak dan mungkin untuk perlindungan bayi.

6.3. Korelasi Hubungan Antara Konsentrasi Dosis Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum)* dengan Kadar VEGF dan PIGF

Hasil analisis korelasi dengan menggunakan Uji korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan antara dosis ekstrak buah delima merah dengan kadar PIGF didapatkan koefisien korelasi 0.610 dengan p-value sebesar 0.012 menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak buah delima merah dengan kadar PIGF.

Berbeda dengan hasil analisis korelasi antara dosis ekstrak buah delima merah dengan kadar VEGF dengan koefisien korelasi 0.099 dengan p-value sebesar 0.714 yaitu tidak signifikan.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum*) tidak dapat meningkatkan kadar VEGF secara signifikan pada kultur HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia.
2. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum*) dapat meningkatkan kadar PIGF secara signifikan pada kultur HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut terhadap kandungan dari buah delima merah yang dapat berperan pada peningkatan faktor angiogenik dengan menggunakan dosis yang lebih besar sehingga mampu meningkatkan kadar VEGF.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang aktivasi dari Nrf2 dan HO-1 yang berperan sebagai penyandi antioksidan yang dapat mempengaruhi ekspresi dari VEGF *in vitro*.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA