

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BERAS HITAM
PADA TIKUS MODEL PREEKLAMPSIA TERHADAP
EKSPRESI ICAM-1 PADA PLASENTA DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI
PLASENTA**

SKRIPSI

Oleh :

ADE MAHENDRA

125130107111013



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BERAS HITAM PADA TIKUS
MODEL PREEKLAMPSIA TERHADAP EKSPRESI ICAM-1
PADA PLASENTA DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI PLASENTA

Oleh:
ADE MAHENDRA
125130107111013

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Herlina Pratiwi, M,Si
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ade Mahendra
NIM : 125130107111013
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BERAS HITAM PADA TIKUS
MODEL PREEKLAMPSIA TERHADAP EKSPRESI ICAM-1 PADA
PLASENTA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI PLASENTA.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 12 April 2017

Yang menyatakan,

(ADE MAHENDRA)
NIM. 125130107111013

repository.ub.ac.id

Pengaruh Pemberian Ekstrak Beras Hitam pada Tikus Model Preeklampsia Terhadap Ekspresi ICAM-1 pada plasenta dan Gambaran Histopatologi Plasenta

ABSTRAK

Preeklampsia adalah kelainan malfungsi endotel pembuluh darah atau vaskular yang menyebar luas sehingga terjadi vasospasme, mengakibatkan terjadinya penurunan perfusi organ dan pengaktifan endotel yang menimbulkan terjadinya tekanan darah tinggi (hipertensi), dan dijumpai protein dalam urine (proteinuria) pada kondisi kebuntingan. Beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) mengandung senyawa antosianin, fenol dan polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti inflamasi. Antosianin sebagai antioksidan yang efektif untuk inaktivasi radikal hidroksil, peroksidil dan dapat penurunan tekanan darah. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui efek dari suplementasi ekstrak beras hitam terhadap penurunan ekspresi ICAM-1 dan perbaikan jaringan plasenta pada tikus model preeklampsia. Hewan model yang digunakan tikus (*Rattus norvegicus*) betina bunting yang dibagi menjadi 5 perlakuan, yaitu Kelompok kontrol negatif, tikus bunting yang hanya diberi pakan dan minum *ad libitum*. Kelompok kontrol positif, tikus bunting yang hanya diberikan *suramin* 70 mg/kg. Sedangkan tiga kelompok terapi, tikus bunting yang diberikan *suramin* seperti kelompok kontrol positif dan disuplementasi dengan ekstrak beras hitam sesuai dosis perlakuan yaitu 12,5 mg/kg BB, 25 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB. Parameter yang diukur adalah penurunan ekspresi *intercellular cell adhesion molecule-1* yang diwarnai dengan metode IHK. Ekspresi ICAM-1 plasenta diolah menggunakan aplikasi *immunoratio* dan perbaikan jaringan plasenta yang diwarnai dengan pewarnaan HE dianalisis secara kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan pemerian ekstrak beras hitam dosis 50 mg/kg BB dapat menurunkan ekspresi ICAM-1 secara signifikan ($p < 0.05$). Penurunan ekspresi ICAM-1 terbaik dihasilkan dari pemberian ekstrak beras hitam dosis 50 mg/kg BB sebesar 93.06%. Histopatologi plasenta menunjukkan perbaikan jaringan pada daerah basal, berkurangnya kematian sel, dan perbaikan pembuluh darah. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak beras hitam dosis 50 mg/kg BB efektif dalam menurunkan ekspresi ICAM-1 plasenta dan mengurangi kerusakan gambaran histopatologi plasenta

Kata kunci : Preeklampsia, *Anthocyanin*, ICAM-1, histopatologi plasenta

The Potency of Black Rice Extract Therapy Toward The Expression of ICAM-1 and Histopathology Placenta on Preeclampsia Rats

ABSTRACT

Preeclampsia is a vascular endothelium malfunctions that causes vasospasm, reduces organ perfusion and endothelial activation which lead to the occurrence of high blood pressure (hypertension) and the presence of protein in the urine (proteinuria) on the condition of pregnancy. Black rice (*Oryza sativa L.indica*) has anthocyanins, phenols and polyphenols compounds that act as antioxidants and anti-inflammatory. As an effective antioxidant, anthocyanin has the ability to inactivate hydroxyl and peroxy radicals, and also can decrease blood pressure. The purpose of this research was to determine the effects of black rice extract supplementation to decrease the expression of ICAM-1 and placental tissue repair rats model of preeclampsia. Animal models used rat (*Rattus norvegicus*) pregnant females were divided into five grup, the negative control group, pregnant rats who were given feed and water ad libitum. Positive control group, pregnant rats were only given suramin 70 mg / kg on gestation days 9,10, and 11. While three treatment groups, pregnant rats with preeclampsia with various dose black rice extract there with dosis of 12,5 mg/kg BW, 25 mg/kg BW and 50 mg/kg BW. Parameters measured were decreased expression of intercellular cell adhesion molecule-1 were stained with CPI method. ICAM-1 expression is processed using the application immunoratio placenta and placental tissue repair stained by HE was analyzed qualitatively. The results showed of black rice extract doses 50 mg / kg body weight can decrease the expression of ICAM-1 was significantly ($P < 0.05$). The expression of ICAM-1 decreased up to 93.06% after administrasi therapy with dose of 50 mg/ BW. Histopathology of plasenta tissue area on basal zone, reduced cell death, and blood vessel repairs. It is concluded that black rice extract dose of 50 mg / kg are effective in reducing the expression of ICAM-1 placenta and reduce damage to the placenta histopathological.

Keywords: Preeclampsia, Antohocyanin, ICAM-1, histopathology of placental

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir /skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Beras Hitam pada Tikus Model Preeklampsia Terhadap Ekspresi ICAM-1 pada Plasenta dan Gambaran Histopatologi Plasenta”. Penelitian ini adalah bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh drh. Yudit Oktanella, M. Si dan didanai oleh RISBIN IPTEKDOK. Serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan drh. Herlina Pratiwi. M, Si sebagai pembimbing tugas Sarjana ini atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
2. Drh. Yudit Oktanella, M. Si, dan Drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
3. Drh. Aulia Firmawati, M.Vet, Drh. Yudit Oktanella, M. Si, Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt sebagai dosen payung penelitian bagi penulis yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.

5. Keluarga yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan studi serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
6. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
7. Teman seperjuangan Intan dan Meka atas kontribusi, bantuan dan inspirasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Seluruh teman dan sahabat di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya Balqis, Reza, Dhia, Iin, vide, Sandra, Andreas dan Deny, Tio dan teman-teman angkatan 2012 pada umumnya.
9. Teman-teman asisten laboratorium Reproduksi dan Higiene makanan yang telah memberikan dukungan kepada penulis.

Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan informasi yang sebaik-baiknya khususnya bagi penulis sendiri dan rekan-rekan mahasiswa yang lain. Penulis menyadari bahwa proposal skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut dan mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun untuk hasil yang lebih baik.

Malang, 12 April 2017

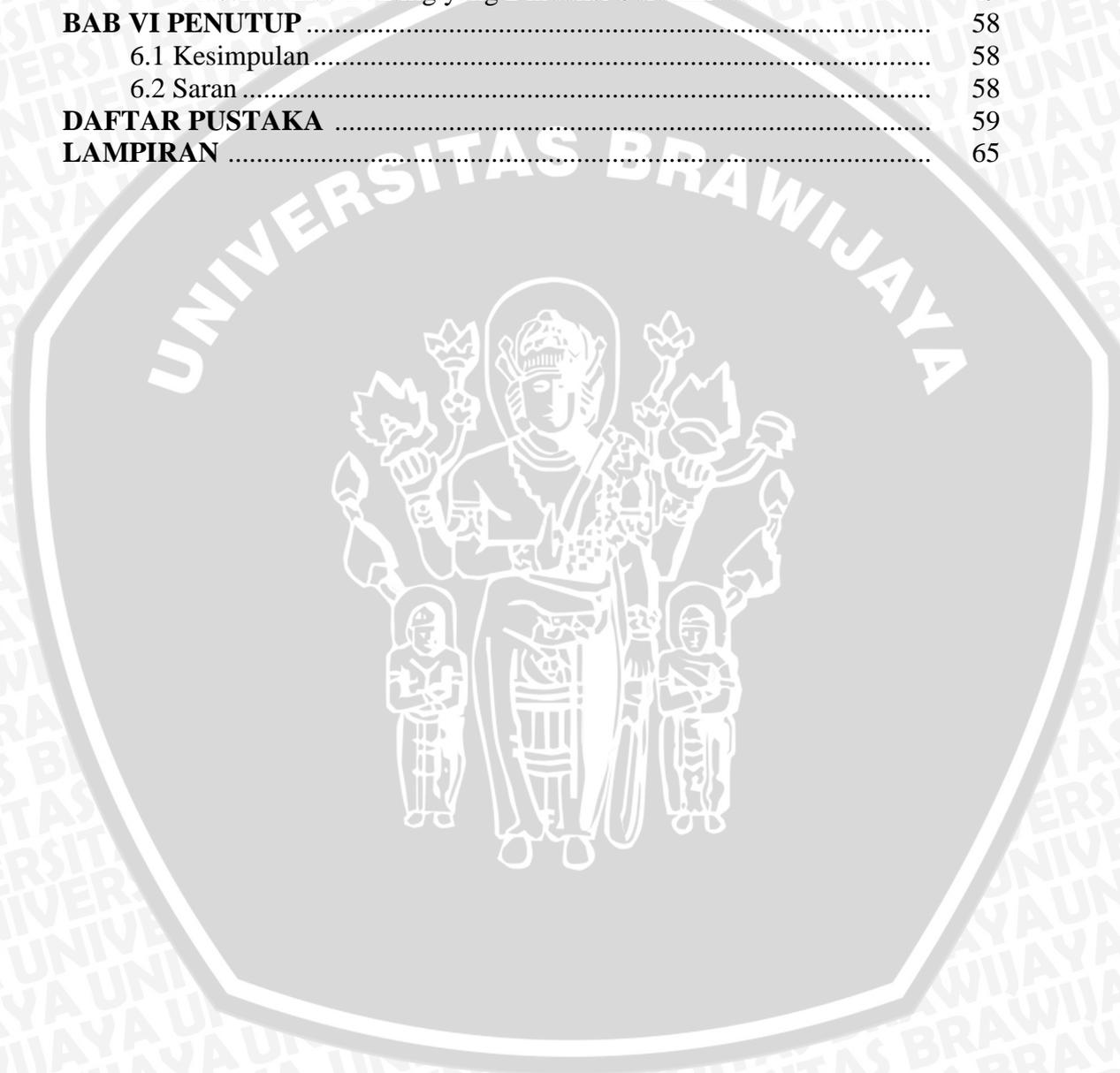
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Preeklampsia	5
2.1.1 Definisi Preeklampsia	5
2.1.2 Faktor Resiko	5
2.1.3 Etiologi Preeklampsia Plasenta	6
2.1.4 Patogenesis Preeklampsia	8
2.1.5 Faktor yang Berpengaruh pada Plasentasi Abnormal	10
2.2 Tikus Putih	13
2.2.1 Taksonomi Tikus Putih	13
2.2.2 Reproduksi Tikus dan Karakteristik Fisologi	14
2.2.3 Karakteristik Fisologi Tikus Putih	16
2.3 Beras Hitam	17
2.4 Plasenta	20
2.4.1 Perubahan Patologi Plasenta	22
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	28
3.1 Kerangka Konseptual	28
3.2 Hipotesis Penelitian	30
BAB IV. METODE PENELITIAN	31
4.1 Waktu dan Tempat	31
4.2 Alat dan Bahan	31
4.3 Tahapan Penelitian	32

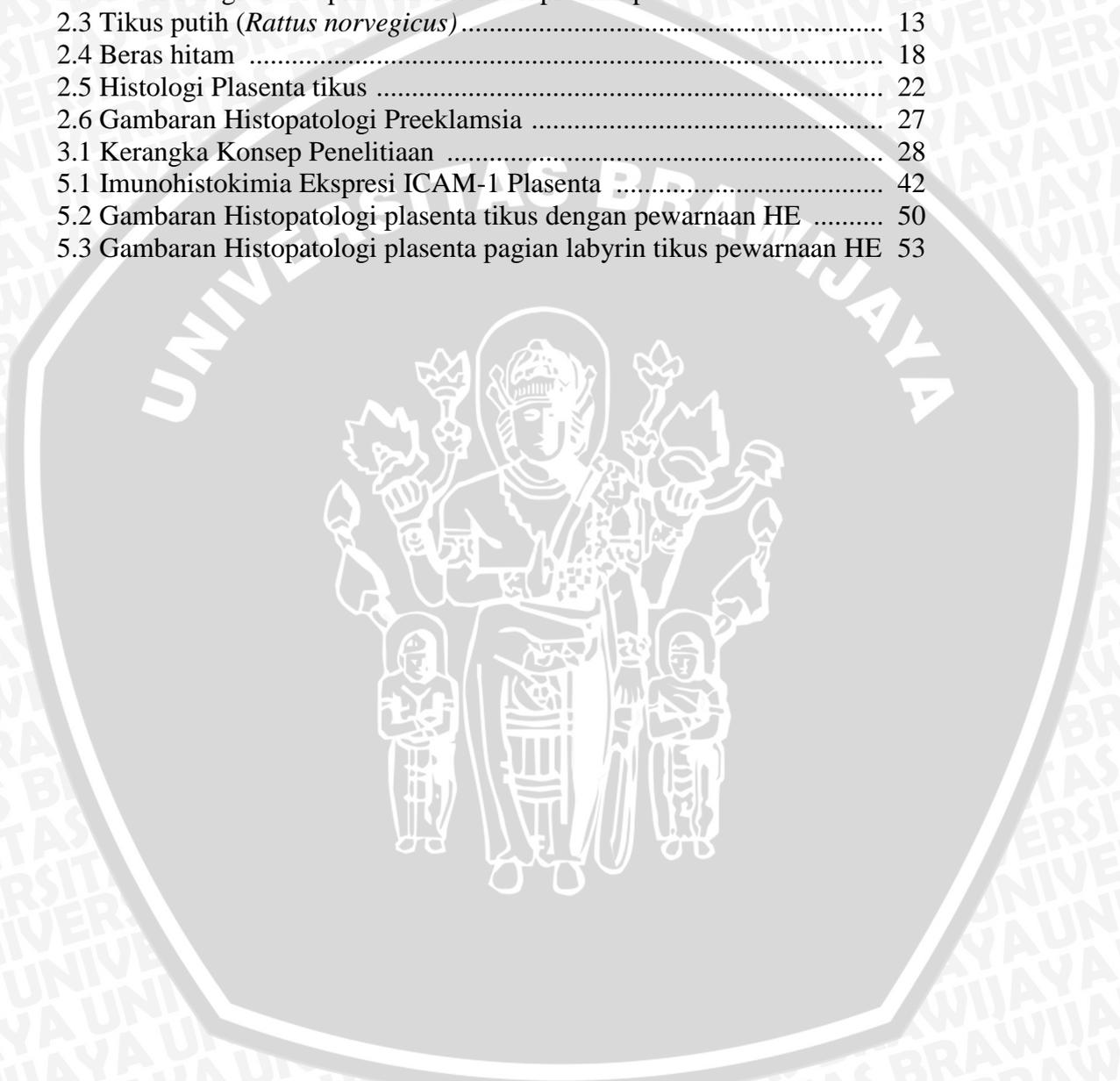


4.4	Prosedur Kerja	33
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
5.1	Efek Pemberian Ekstrak Beras Hitam (<i>Oryza Sativa L</i>) Terhadap Ekspresi Adhesi Intraseluler Molekul (ICAM-1) Plasenta Model Preeklmpsia	41
5.2	Efek Pemberian Beras Hitam terhadap Gambaran Histopatologi Plasenta tikus Bunting yang Dinduksi Suramin	49
BAB VI PENUTUP	58
6.1	Kesimpulan	58
6.2	Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	65



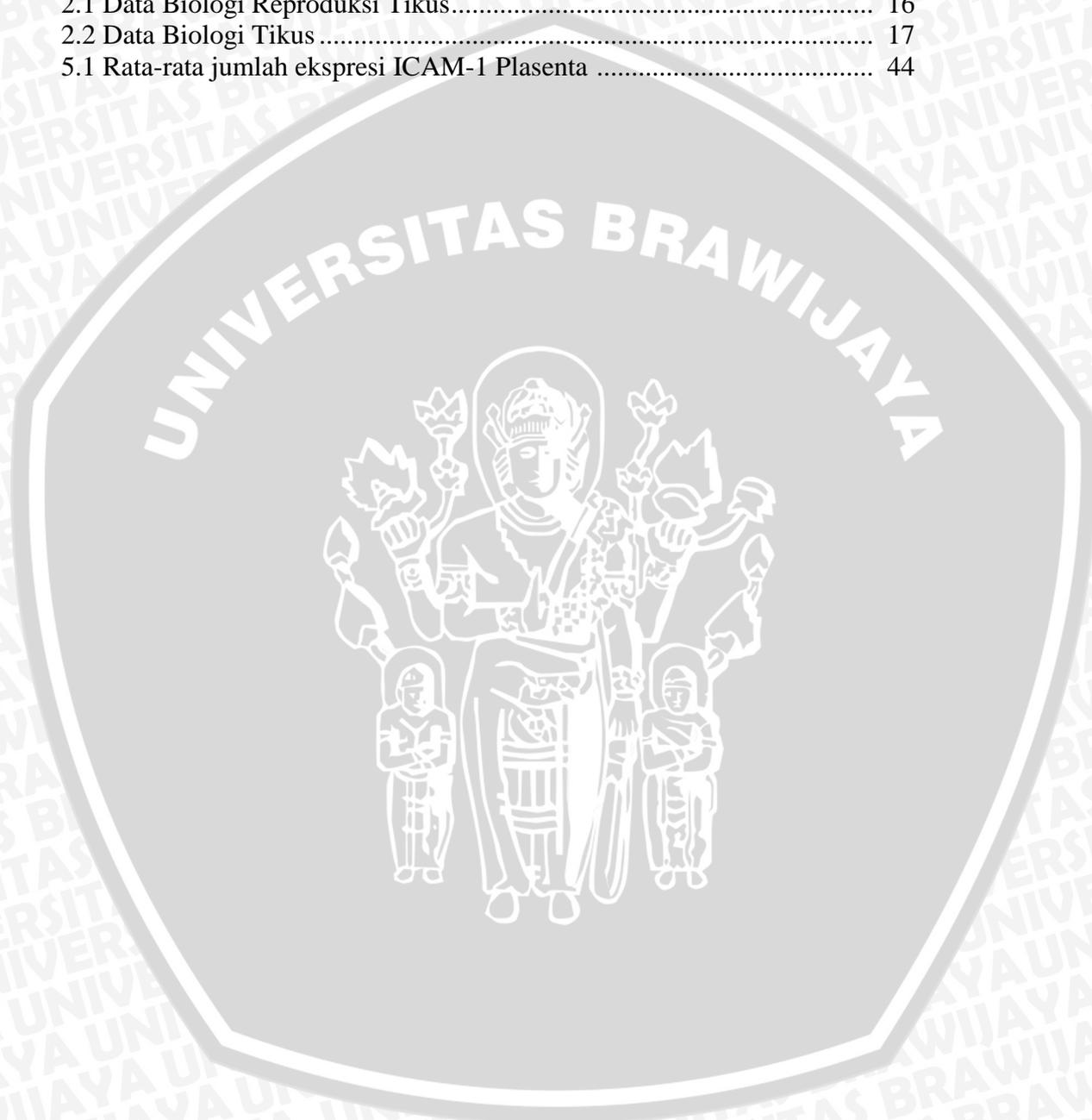
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Skema trofoblas pada kebuntingan normal dan preeklamsia.....	7
2.2 Patofisiologi arteri sprilasi normal dan preeklmpsia.....	11
2.3 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	13
2.4 Beras hitam	18
2.5 Histologi Plasenta tikus	22
2.6 Gambaran Histopatologi Preeklamsia	27
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
5.1 Imunohistokimia Ekspresi ICAM-1 Plasenta	42
5.2 Gambaran Histopatologi plasenta tikus dengan pewarnaan HE	50
5.3 Gambaran Histopatologi plasenta pagian labyrin tikus pewarnaan HE	53



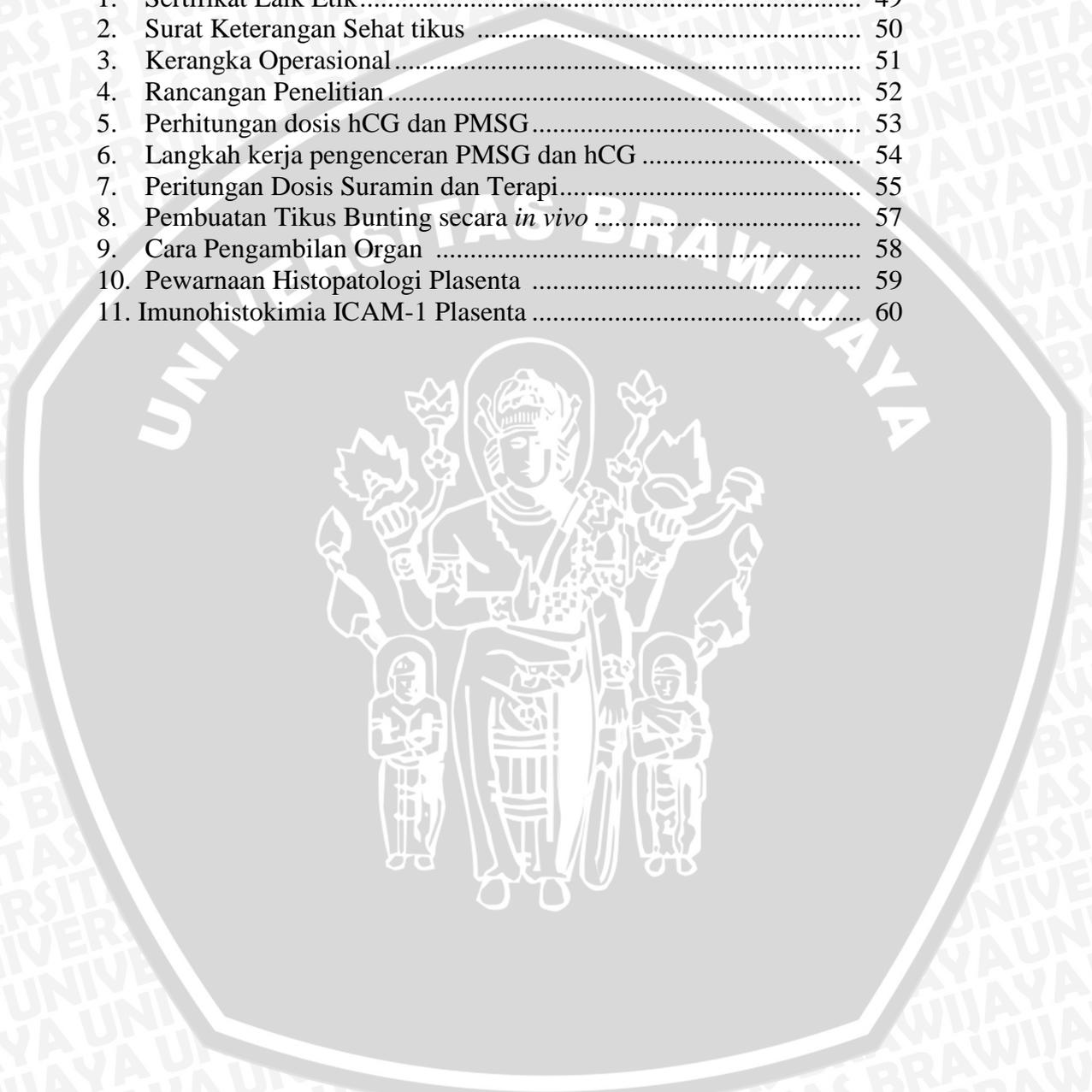
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Data Biologi Reproduksi Tikus.....	16
2.2 Data Biologi Tikus	17
5.1 Rata-rata jumlah ekspresi ICAM-1 Plasenta	44



DAFTAR LAMPIRAN

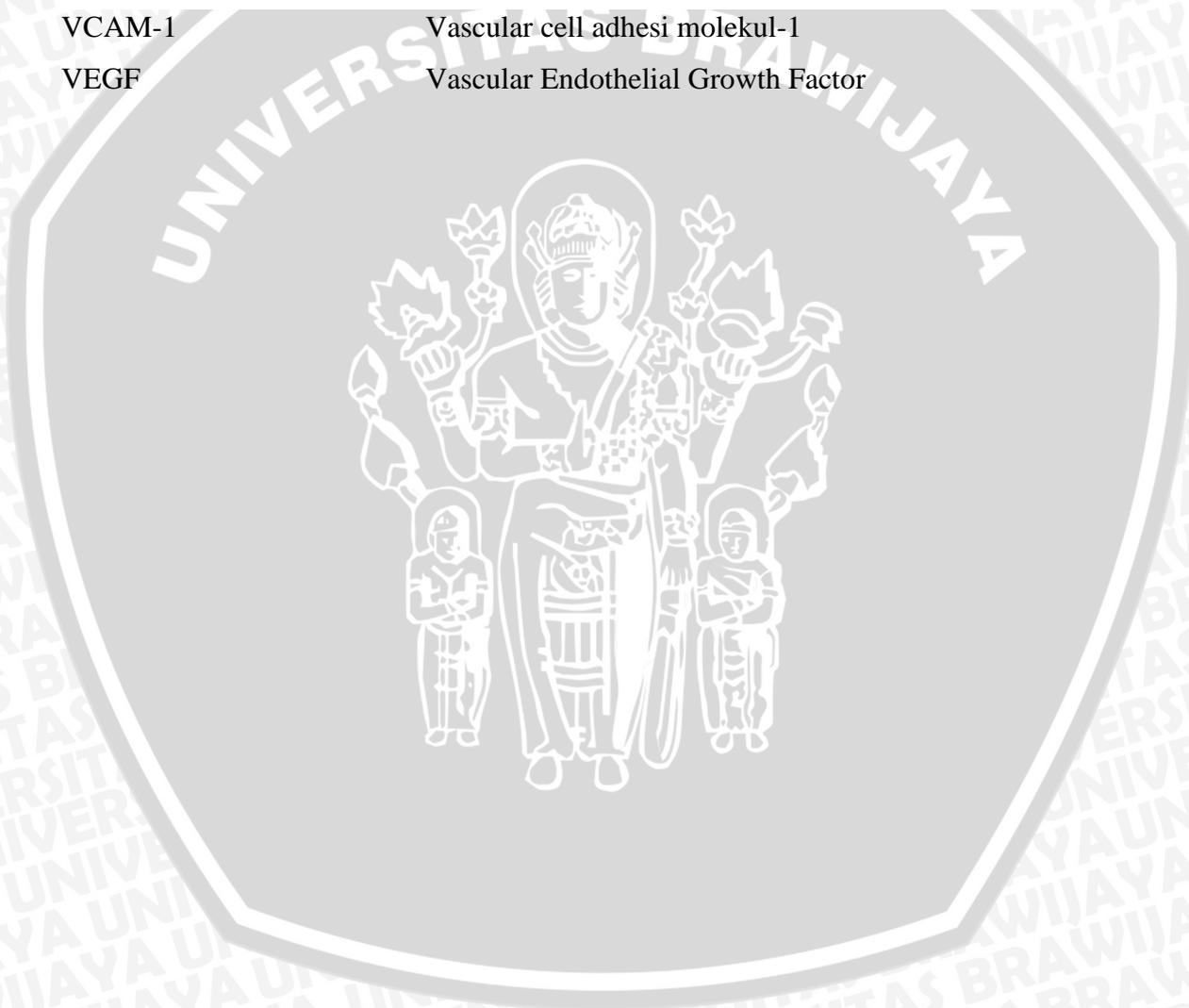
Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	49
2. Surat Keterangan Sehat tikus	50
3. Kerangka Operasional	51
4. Rancangan Penelitian	52
5. Perhitungan dosis hCG dan PMSG	53
6. Langkah kerja pengenceran PMSG dan hCG	54
7. Peritungan Dosis Suramin dan Terapi.....	55
8. Pembuatan Tikus Bunting secara <i>in vivo</i>	57
9. Cara Pengambilan Organ	58
10. Pewarnaan Histopatologi Plasenta	59
11. Imunohistokimia ICAM-1 Plasenta	60



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ANOVA	<i>Analisis of variant</i>
BB	Berat Badan
CL	Corpus Luteum
EDRF	Derived relaxing factor
gr	Gram
HE	<i>Haematoksin Eosin</i>
HELLP	Hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IHK	Immunohistokimia
Ig	Imunoglobulin
kg	Kilogram
LC-MS	<i>Liquid Chromatography dan Mass Spectrometer</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
mg	Miligram
mmHg	Milimeter Merkuri (Hydrargyrum)
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
ml	<i>mili liter</i>
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-B
NK	Natural killer
(-OH)	Hidroksil
PE	preeklampsia
PGF	Prostaglandin F
PGI ₂	Prostasiklin

PIGF	Placental growth factor
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
RAL	Rancangan acak lengkap
ROS	Reactive Oxygen Species
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
SOD	Superoxide dismutase
sFlt-1	Soluble fms-like tyrosine kinase-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Preeklampsia merupakan suatu gangguan multisistem idiopatik yang spesifik pada kebuntingan, ditandai dengan peningkatan tekanan darah (hipertensi), dan proteinuria yang timbul pada saat masa kebuntingan trimester ke-tiga. Jika terjadi preeklampsia berat maka gejala yang timbul disertai dengan kejang dan diikuti dengan koma, hal tersebut disebut sebagai eklampsia (Manuaba, 2007).

Disfungsi endotel pada plasenta diduga disebabkan oleh penurunan invasi trofoblas pada arteri spiralis uterus (Sankaralinga, *et al.*, 2006) sehingga mengakibatkan gangguan *remodelling* pembuluh darah maternal ke fetal dan menyebabkan penurunan perfusi plasenta. Jika endotel mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti stres hemodinamik, stres oksidatif maupun paparan dengan sitokin inflamasi dan hiperkolesterolemia, maka fungsi endotel menjadi abnormal dan disebut disfungsi endotel. Pada keadaan ini terjadi ketidakseimbangan substansi vasoaktif sehingga dapat terjadi hipertensi. Disfungsi endotel juga menyebabkan permeabilitas vaskular meningkat sehingga menyebabkan edema dan proteinuria. Jika terjadi disfungsi endotel maka permukaan endotel akan mengekspresikan molekul adhesi, seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1). Lesi pada plasenta akibat disfungsi endotel antara lain: atherosclerosis, infark, dan trombosis.

Beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) mengandung antioksidan flavonoid yaitu antosianin (Sunarni,2007). Ekstrak beras hitam merupakan varietas lokal yang mengandung pigmen (terutama antosianin) paling baik, berbeda dengan beras putih atau beras warna lain (Suardi dan Ridwan, 2009). Antosianin merupakan senyawa fenolik yang dapat menangkal radikal bebas. Antosianin mempunyai kemampuan antioksidan, antikanker, dan diketahui dapat mencegah penyempitan pembuluh arteri (Sutharut, 2012). Antosianin juga dikenal mampu melindungi integritas sel-sel endotel pada dinding pembuluh darah.

Meskipun kemajuan teknologi berkembang secara pesat namun, frekuensi preeklampsia masih tergolong tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini diharapkan dapat dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak antosianin dari beras hitam dalam menghambat disfungsi endotel plasenta yang dapat dilihat dari ekspresi ICAM-1 dan lesi yang tampak dari gambaran histopatologis plasenta.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L*) dapat menurunkan ekspresi ICAM-1 pada tikus model preeklampsia induksi suramin?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L*) pada tikus model preeklampsia induksi suramin terhadap perbaikan gambaran histopatologi plasenta?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu Tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang berasal dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta strain Wistar betina sejumlah 40 ekor, berusia 3-4 bulan dengan berat badan tikus 150 gr- 190 gr. Diberikan pakan komersial BR, air minum matang secara adlibitum. Hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik (Lampiran 1) dan surat keterangan sehat (Lampiran 2).
2. Induksi preeklampsia dengan injeksi Suramin secara intraperitoneal yang dilarutkan dengan aquades, dilakukan 3 kali pada hari kebuntingan 9, 10, 11 dengan dosis 70 mg/Kg BB (Nash, 2005) (Lampiran 12).
3. Terapi menggunakan ekstrak beras hitam dengan dosis 12,5 mg/Kg BB, 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB secara sonde lambung 1 kali sehari pada hari kebuntingan 10-17 hari.
4. Ekspresi *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) dalam plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dianalisa menggunakan metode IHK. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400X dengan 5 lapang pandang dan untuk membantu menganalisis menggunakan aplikasi *immunoratio*.
5. Histopatologi plasenta diamati dengan Heamatoksilin Eosin (HE) untuk diamati secara deskriptif seluruh lapang pandang.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L*) terhadap ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada tikus model preeklampsia induksi suramin
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L*) terhadap gambaran histopatologi plasenta pada tikus model preeklampsia induksi suramin

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan antosianin dari beras hitam (*Oryza sativa L*) terhadap ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) dan perbaikan jaringan plasenta pada preeklampsia.
2. Hasil penelitian ini dapat menjadikan beras hitam sebagai alternative antosianin untuk pencegahan terjadinya komplikasi pada preeklampsia pada dunia kedokteran hewan.

BAB II TINJUAN PUSTAKA

2.1 Preeklampsia

2.1.1 Definisi Preeklampsia

Preeklampsia adalah kelainan malfungsi endotel pembuluh darah atau vaskular yang menyebar luas sehingga terjadi vasospasme, mengakibatkan terjadinya penurunan perfusi organ dan pengaktifan endotel yang menimbulkan terjadinya tekanan darah tinggi (hipertensi), edema, dan dijumpai protein dalam urine (proteinuria) (Brooks, 2011). Preeklampsia berkaitan dengan adanya peningkatan terhadap resistensi pembuluh darah perifer dan juga penurunan perfusi organ. Kelainan seperti vaskular banyak terdapat pada sistem organ termasuk plasenta, dan juga peningkatan aktivitas trombosit, aktivitas sistem koagulasi. Preeklampsia digambarkan sebagai sindrom spesifik pada kebuntingan yang dapat mempengaruhi hampir semua sistem organ. Preeklampsia sering tidak diketahui gejalanya sehingga tanpa disadari preeklampsia ringan bisa berubah menjadi preeklampsia berat dan berlanjut menjadi eklamsia (Wiknjastro, 2002).

Hipertensi atau proteinuria adalah gejala yang belum tentu ditemukan pada preeklampsia. Temuan laboratorium abnormal pada tes ginjal, hati dan fungsi hematologi meningkatkan kepastian preeklampsia (Cunning, 2010)

2.1.2 Faktor Resiko

Preeklampsia dipicu oleh adanya invasi plasenta pada sisi maternal berupa reaksi sitemik yang menghasilkan gejala tertentu. Pada preeklampsia

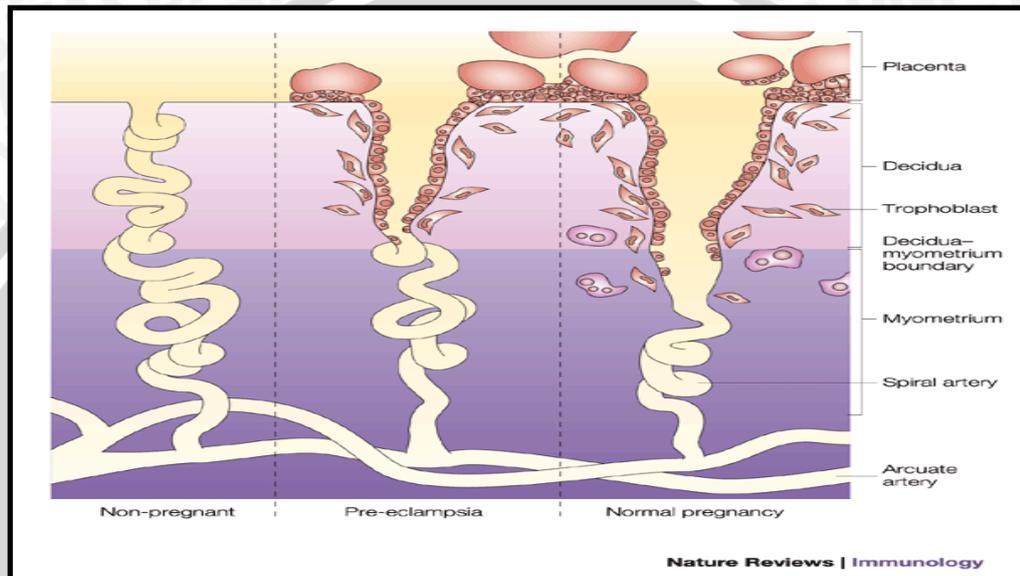
terjadi perubahan-perubahan fisiologis pada arteri spiralis segmen desidua. Perubahan kadar IL-6 akan mengakibatkan peningkatan aktifitas makrofag dan netrofil pada pembuluh darah arteri spiralis sehingga menyebabkan difungsi endotel (Prawirohardjo, 2005)

2.1.3 Etiologi Preeklampsia

Ada pun beberapa teori yang menjelaskan etiologi dari penyakit preeklampsia yang dijelaskan sebagai berikut :

1. Menurut Maryunani, 2012 peran prostasiklin dan tromboksan. Pada preeklampsia terdapat kerusakan pada sel endotel vaskular yang mengakibatkan penurunan produksi prostasiklin (PGI₂) yang pada kebuntingan normal meningkat, aktivitas penggumpalan dan fibrinolisis selanjutnya diganti dengan thrombin dan palsmin. Thrombin menggantikan antitrombin III sehingga terjadi deposit fibrin. Aktivitas trombosit menyebabkan pelepasan tromboksan dan serotonin sehingga terjadi vasospasme dan kerusakan endotel.
2. Menurut Winkjosastro (2002) teorinya sebagai berikut :
Pada kebuntingan normal, endometrium dan palsenta mendapat aliran darah dari cabang arteri uterine dan arteri ovarika yang menembus myometrium dan menjadi arteri arkuta yang akan bercabang menjadi arteri radialais. Arteri radialais menembus endometrium menjadi arteri basalis dan arteri basalis memberi cabang arteri spiralis. Pada gambar 2.1 Invasi trofoblas ke dalam lapisan otot oleh arteri spiralis menimbulkan degenerasi lapisan otot sehingga terjadi distensi dan

vasodilatasi arteri spiralis yang berdampak penurunan tekanan darah. Penurunan resistensi vaskular dan peningkatan tekanan darah di utero palsenta. Akibatnya aliran darah ke fetus cukup banyak dan perfusi jaringan meningkat. Proses ini disebut dengan remodeling arteri spiralis.



Gambar 2.1 Skema trofoblas pada kebuntingan normal dan preeklampsia (Holmes and McCance, 2005).

Pada preeklampsia terjadi kegagalan *remodeling*, menyebabkan arteri spiralis menjadi kaku dan keras sehingga arteri spiralis tidak mengalami distensi dan vasodilatasi. Karena tidak mengalami distensi dan vasodilatasi, aliran darah utero plasenta menurun dan terjadi hipoksia dan iskemia plasenta (Nhofer and Stepan, 2008).

Peningkatan tingkat peroksidasi lipid dan konsentrasi protein karbonil yang meningkat, bersama dengan tingkat dan aktivitas enzim antioksidan yang berkurang, termasuk SOD dan glutathione peroksidase, menunjukkan bahwa plasenta kemungkinan besar merupakan pusat untuk stres oksidatif dalam preeklampsia, penurunan kapasitas antioksidan dan

meningkatkan oksidasi dalam jaringan plasenta (Holmes and McCance, 2005).

Kegagalan remodeling arteri spiralis mengakaibatkan plasenta mengalami iskemik, yang merangsang pembentukan radikal bebas yaitu radikal hidroksil (-OH) yang dianggap sebagai toksin. Radikal hidroksil merusak membran sel menjadi peroksida lemak. Preoksida lemak merusak nukleus dan protein sel endotel (Cunningham, 2010).

2.1.4 Patogenesis Preeklampsia

Patogenesis preeklampsia sangat kompleks, banyak faktor yang mempengaruhi seperti faktor genetik, imunologi, perilaku dan lingkungan (Vatish *et al*, 2006); Hladunewich *et al.*, 2007. Tahapan dalam patogenesis preeklampsia menurut Hladunewich *et al.*, (2007) terjadi dalam dua tahap yaitu :

1. Tahap pertama : Kelainan Plasentasi

Merupakan tahapan asimtomatik, ditandai dengan perkembangan plasenta yang tidak normal selama trimester pertama yang berakibat terjadinya insufisiensi plasenta dan pelepasan partikel plasenta dalam jumlah yang berlebihan ke sirkulasi induks. Terdapatnya infark plasenta, penyempitan sklerotik arteri dan arteriol, hilangnya invasi endovascular oleh sitotrofoblas dan kurang memadainya renovasi arteri spiralis pada plasenta preeklampsia.

2. Tahapan kedua : Sindrom Maternal

Merupakan tahapan simptomatik, yang ditandai dengan hipertensi, kerusakan ginjal, proteinuria, eklampsia, sindrom HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets) dan kerusakan organ lainnya. Gejala ini seiringnya terjadi endoteliosis glomerulus, peningkatan permeabilitas vaskuler dan respon inflamasi sistemik yang mengakibatkan hipoperfusi dan kerusakan organ (Noris *et al.*, 2005).

Plasenta merupakan organ inti dalam pathogenesis preeklampsia (Powe *et al.*, 2011). Sistem vaskular plasenta berkembang oleh dua mekanisme yang berbeda yaitu vaskulogenesis dan angiogenesis. Proses implantasi dan plasentasi membutuhkan produksi berbagai faktor pertumbuhan angiogenik, molekul adhesi sel, sitokin dan faktor pertumbuhan, ekstraselular *matrix metalloproteinases* (MMPs), hormon dan faktor transkripsi (Vatish *et al.*, 2006). Selama plasentasi yang normal, sel-sel sitotrofoblas embrio menginvasi dinding rahim. Setelah invasi, sitotrofoblas ditemukan di otot polos dan lapisan endotel pembuluh darah desidua maternal. Interaksi ini bertindak untuk menginduksi renovasi pembuluh darah induk menjadi berkapasitas tinggi dan resistansi rendah yang menghubungkan oksigen induk dan nutrisi bagi plasenta dan perkembangan fetus. Sebagai bagian dari proses ini, sitofoblas mengadopsi fenotipe endotel, mengekspresikan molekul adhesi yang ditemukan pada permukaan sel endotel. Pada preeklampsia, proses ini menyimpan invasi sitotrofoblas tidak lengkap, dimana sel sitotrofoblas hanya terdapat dalam lapisan desidua. Arteri spiralis gagal untuk invasi atau remodelling, invasi

dangkal ini telah terbukti berhubungan dengan kegagalan dari sitotrofoblas untuk mengadopsi *adhesi phenotype endotel* (Powe *et al.*, 2011).

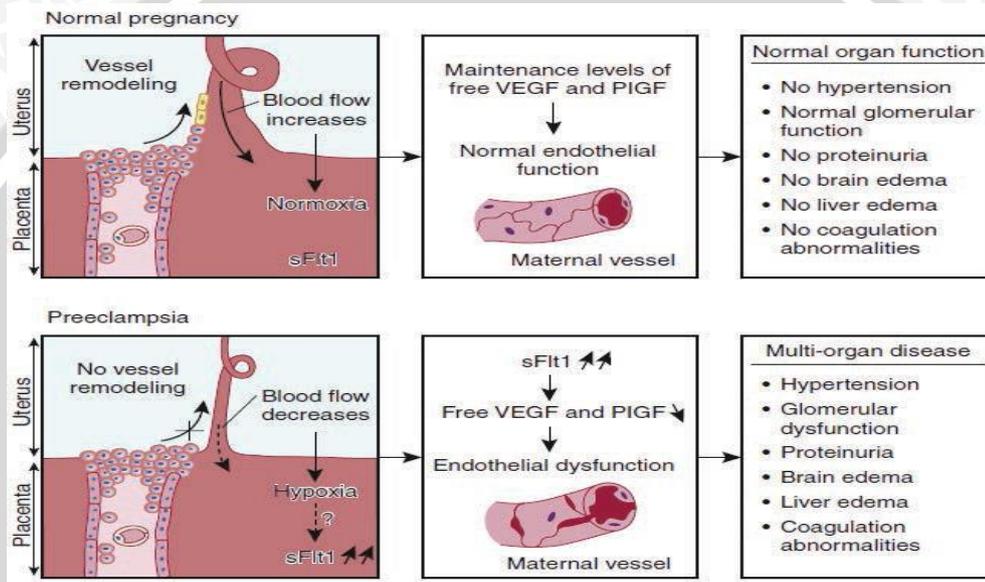
Pada preeklampsia sel-sel trofoblas yang menginvasi arteri spiral mengekspresikan karakteristik molekul adhesi yang berbeda dengan karakteristik sel-sel endotel. Sehingga sel-sel trofoblas yang menginvasi arteri spiralis tersebut gagal beradaptasi untuk menggantikan sel-sel endotel. Dalam keadaan normal sel-sel trofoblas yang menginvasi arteri spiralis akan mengekspresikan molekul adhesi *VE cadhrin*. Molekul adhesi *VE-cadherin* ini diperlukan untuk proses invasi sel-sel trofoblas berhasil menggantikan sel-sel endotel (Yelumalai *et al.*, 2010).

2.1.5 Faktor Yang Berpengaruh Pada Plasentasi Abnormal

Penelitian dasar dan data klinis menunjukkan bahwa maladaptasi dan inadkuat invasi uteroplasenta preeklampsia diakibatkan adanya faktor intrinsik, (abnormalitas trofoblas ekstravili) dan faktor ekstrinsik. Faktor-faktor ekstrinsik berdampak di sekitar arteri uteroplasenta, mengganggu remodeling, dan menghambat fungsi natural killer cell (*NK*) uterus dan endotel induk untuk mengekspresikan molekul adhesi (Noris *et al.*, 2005)

Sel *NK* dominan pada sel limfoid desidua selama awal kebuntingan jumlahnya menumpuk menginvasi di sekitar sel sitotrofoblas, bersama dengan trofoblas ekstravilli untuk *remodeling* arteri spiral dengan memproduksi sitokin yang terlibat dalam angiogenesis dan stabilitas veskular, seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular (*VEGF*, faktor pertumbuhan plasenta (*PIGF*) dan angiopoietin. Pada kebuntingan normal, sel *NK* menginvasi dinding

rahim, sitotrofoblas kehilangan kemampuan untuk membagi dan meningkatkan ekspresi matriks metaloproteinase, sehingga meningkatkan transformasi jaringan epitel ke endothelium sedangkan pada preeklampsia, transformasi ini terganggu dan sitotrofoblas tidak menginvasi dan diferensiasi dinding rahim (Noris *et al.*, 2005) yang dijelaskan pada gambar 2.3 :



Gambar 2.2 Patofisiologi arteri spiralis normal dan preeklampsia (Podymow, 2013)

Sel trofoblas yang gagal mengadakan *remodeling* dan adhesi ke dinding arteri spiralis memicu sitokin inflamasi dan juga meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 pada permukaan sel endotel. Munculnya sitokin inflamasi mengakibatkan peningkatan aktifitas makrofag dan netrofil pada pembuluh darah arteri spiralis sehingga akan mengakibatkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel merupakan kegagalan endotel dalam melakukan adaptasi adekuat terhadap stimulasi yang disebabkan paparan sitokin inflamasi dan peningkatan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 sehingga terjadi stres oksidatif (Robert and Cooper, 2001). Molekul adhesi memiliki peran dalam migrasi leukosit, pada

keadaan normal leukosit hanya sedikit yang melekat pada sel endotel, tapi karena adanya rangsangan inflamasi maka adhesi antara leukosit dan sel endotel semakin ditingkatkan. Interaksi adhesi diatur oleh ekspresi permukaan sel yaitu molekul adhesi serta ligan/reseptornya salah satunya ICAM-1 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) adalah tipe 1 transmembran glikoprotein, yang termasuk subfamili immunoglobulin (Ig). *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) berperan penting pada respon imun innet dan adaptive. *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) juga berperan dalam migrasi transendotel dari lekosit tempat terjadinya inflamasi. *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) tidak ditemukan pada sel endotel dalam keadan normal. Jumlahnya meningkat pada sel endotel yang diaktifkan oleh TNF- α , IL1 atau endotoksin. *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) biasanya diekspresikan pada permukaan sel endotel dalam menanggapi aktivasi sitokin inflamasi atau rangsangan lain dan mengikat molekul adhesi-leukosit tertentu, yang mengarah ke peningkatan afinitas leukosit di permukaan endotel dan akhirnya meningkatkan migrasi transendotel, tetapi ekspresinya meningkat dengan sitokin proinflamasi. Peningkatan beredaranya preoksidasi lipid pada pereklamsia bisa mengakibatkan endotel mengaktifasi NF- κ B merangsang ekpresi ICAM-1 (Takacs, *et al.*, 2001).

2.2 Tikus Putih

2.2.1 Taksonomi Tikus Putih

Tikus putih merupakan hewan yang sering digunakan sebagai hewan percobaan. Menurut Suckow *et al.*, (2006) klasifikasi taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah :

Kingdom : Animalia
Class : Mamalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus putih memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya seperti pada **Gambar 2.1**, pertumbuhannya cepat, temperamennya baik dan kemampuan laktasi tinggi. Penggunaan tikus putih sebagai hewan coba ini pernah dilakukan sebelumnya oleh Widjiati (2014) tentang pengaruh pemberian *partikulat matter* pada tikus bunting terhadap cacat konginetal dan resorbsi embrio.



Gambar 2.3 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010)

2.2.2 Reproduksi Tikus Betina Karakteristik Fisologi

Kemampuan reproduksi tikus sangat tinggi, dimana tikus dapat kawin sepanjang tahun dan mulai kawin pada umur 8-9 minggu. Siklus birahi tikus terjadi kira-kira tiap 4-5 hari, dan segera kembali sesudah beranak. Satu siklus birahi terdiri dari 4 fase yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus dimana estrus sering terjadi pada malam hari dibanding pada siang hari. Tikus termasuk hewan yang bersifat poliestrus, karena dalam setahun estrus terjadi lebih dari 2 kali dan berulang secara periodik tanpa banyak variasi. Terdapat estrus postpartum dalam waktu 48 jam sesudah partus, akan tetapi tikus tidak dikawinkan dalam masa estrus postpartum supaya anak-anak yang sedang disusui tidak terlantar. Tikus mempunyai kemampuan reproduksi tinggi karena ditunjang oleh kematangan seksual yang cepat yaitu antara 2-3 bulan, masa bunting yang singkat yaitu antara 21-23 hari dan melahirkan keturunan dalam jumlah yang banyak hingga mencapai 20 ekor persekelahiran.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina adalah mamalia yang tergolong ovulator spontan. Pada golongan ini ovulasi terjadi pada pertengahan siklus estrus yang dipengaruhi oleh adanya lonjakan LH (*Luteinizing hormone*). Tikus termasuk hewan yang bersifat poliestrus, memiliki siklus reproduksi yang sangat pendek. Setiap siklus lamanya berkisar antara 4-5 hari. Ovulasi sendiri berlangsung 8-11 jam sesudah dimulainya tahap estrus. Folikel yang sudah kehilangan telur akibat ovulasi akan berubah menjadi korpus luteum, yang akan menghasilkan progesteron atas rangsangan LH. Progesteron bertanggung jawab

dalam menyiapkan endometrium uterus agar reseptif terhadap implantasi embrio (Somala, 2006)

Siklus reproduksi tikus putih terdiri dari beberapa fase yaitu :

- a. Proestrus adalah fase persiapan, waktunya pendek dan terjadi perubahan tingkah laku serta alat kelamin bagian luar. Fase ini berlangsung selama 12 jam dan pada sediaan apus vagina terlihat adanya sel-sel kecil dengan inti bulat (Shearer, 2008).
- b. Estrus adalah periode yang ditandai oleh keinginan kelamin dan penerimaan pejantan oleh hewan betina sehingga ciri khas dari estrus adalah terjadinya kopulasi, menghampiri pejantan dan tidak lari bila pejantan menungganginya. Fase ini berlangsung selama 9-20 jam dan pada sediaan apus vagina terlihat sel epitel yang mengalami penandukan dan seringkali intinya piknotik atau tanpa inti (Rintafiani, 2014).
- c. Fase metaestrus ditandai dengan terhentinya birahi, ovulasi terjadi dengan pecahnya folikel, rongga folikel secara berangsur-ansur mengecil, dan pengeluaran lendir berhenti. Selain itu terjadi penurunan pada ukuran dan vaskularitas (Retno, 2011)
- d. Fase Diestrus adalah periode terakhir dari estrus, pada fase ini corpus luteum berkembang dengan sempurna dan efek yang dihasilkan dari progesteron (hormon yang dihasilkan dari corpus luteum) tampak dengan jelas pada dinding uterus serta folikel-folikel kecil dengan korpora lutea pada vagina lebih besar dari ovulasi sebelumnya (Retno, 2011)

2.2.3 Karakteristik Fisiologi Tikus Putih

Tabel 2.1 Data Biologi Reproduksi Tikus

Parameter	Keterangan
Lama Bunting	20-22 Hari
Siklus Kelamin	Poliestrus
Siklus Estrus	4-5 jam
Lama Estrus	9-20 jam
Fertilisasi	7-10 jam
Berat Lahir	5-6 gram
Jumlah Anak	Rata – rata 9 ekor
Tipe plasenta	Discoidal hemokorial
Uterus	Dupleks
Perkawinan kelompok	3 betina 1 jantan

(Wolfenshon and Lloyd, 2013).

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) lebih besar dari famili tikus umumnya dimana tikus ini panjangnya dapat mencapai 40 cm diukur dari hidung sampai ujung ekor, Tikus jantan biasanya memiliki ukuran yang lebih besar dari tikus betina, berwarna putih, memiliki ukuran ekor yang lebih panjang dari tubuhnya (Akbar, 2010).

Tabel 2.2 Data biologi tikus disajikan pada tabel berikut

Kondisi Biologi	Jumlah
Berat badan	
Jantan	300-400 gr
Betina	250-300 gr
Lama hidup	2,5-3 tahun
Temperatur tubuh	37,5°C
Kebutuhan air	8-11 ml/100 grBB
Kebutuhan makanan	5 gr/100 grBB
Umur dewasa	50-60 hari
Volume darah	57-70 ml/kg
Tekanan darah	
Sistolik	84-174 mmHg
Diastolic	58-145 mmHg
Frekuensi jantung	330-480 / menit
Frekuensi respirasi	66-114 / menit
Tidal volume	0,6-1,25 mm
Urine	
Warna	Kuning pucat – kuning
Berat jenis	1,016-1,022
Derajat keasaman (pH)	4,6-8,5
Kadar protein	<20 mg/dL
Kadar Urea	0,2-0,32 g/200g bb/hari
Kadar kreatinin	4,8-8,0 mg/200 g bb/hari

(Kusumawati, 2004).

2.3 Beras Hitam

Beras hitam merupakan varietas lokal yang mengandung pigmen (terutama antosianin) paling baik, berbeda dengan beras putih atau beras warna lain (Suardi dan Ridwan, 2009). Oki *et al.*, (2001) dalam Narwidina (2009) mengatakan bahwa beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) memiliki aleuron dan endosperm yang berwarna merah-biru-ungu pekat, warna tersebut menunjukkan adanya kandungan antosianin. Beras hitam mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa masing-masing sebesar 7,5% dan 5,8%, sedangkan beras putih hanya sebesar 5,4% dan 2,2%

Beras hitam berasal dari tanaman padi hitam. *Oryza sativa L.* adalah nama ilmiah padi. Menurut Tjitrosoepomo (2005), kedudukan taksonomi dari *Oryza sativa* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Monocotyledoneae

Bangsa : Poales (Glumiflorae)

Famili : Poaceae (Graminea)

Marga : *Oryza*

Spesies : *Oryza sativa L.indica*



Gambar 2.4 Tanaman Beras hitam (kiri) dan Beras hitam *Oryza sativa L* (kanan) (Tjitrosoepomo, 2005).

Kandungan antosianin pada beras hitam berkisar antara 159,31-359,51 mg/100 g dan aktivitas antioksidan pemerangkapan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sebesar 68,968-85,287%. kandungan antosianin beras hitam (Heugijjubyeo) yang terdiri dari sianidin 3-O-glukosida, peonidin 3-O-glukosida, malvidin 3-O-glukosida, pelagonidin 3-O-glukosida dan delphinidin

3-O-glukosida. Antosianin yang dominan adalah sianidin 3-glukosida (95%) dan peonidin 3-O-glukosida (5%) (Ratnaningsih, 2010).

Pada beras hitam, aleuron dan endospermia memproduksi antosianin dengan intensitas tinggi sehingga warna beras menjadi ungu pekat mendekati hitam. Beras hitam memiliki khasiat yang lebih baik dibanding beras merah atau beras warna lain. Beras hitam berkhasiat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit, memperbaiki kerusakan sel hati (hepatitis dan chirosis), mencegah gangguan fungsi ginjal, mencegah kanker/tumor, memperlambat penuaan, sebagai antioksidan, membersihkan kolesterol dalam darah, dan mencegah anemia.

Antosianin merupakan salah satu dari kelompok pigemen utama ada tanaman. Pigmen ini berada pada sebagian besar tanaman tingkat tinggi dan terdapat pada seluruh bagian tanaman. Pigmen antosianin sebagian besar terdapat pada tanaman yang berbunga dan menghasilkan warna dari merah tua sampai biru pada bunga, buah dan daun. Antosianin dapat larut dalam sel vakuola. Vakuola adalah organel sitoplasmik yang berisi cairan yaitu air, dibatasi oleh membran yang mungkin identik dengan membran sel tanaman (Leimena, 2008).

Antosianin memiliki manfaat kesehatan bagi tubuh dan digunakan sebagai komponen aktif dari beberapa produk kesehatan. Manfaat tersebut, menurut Leimena (2008), termasuk perlindungan terhadap kerusakan hati, penurunan tekanan darah, peningkatan kemampuan penglihatan, zat anti peradangan dan antiseptik, menghambat mutasi akibat mutagen yang berasal

dari makanan yang masak, dan menekan poliferasi sel kanker. Berbagai aktivitas fisiologis antosianin dapat memberikan dampak yang signifikan dalam mencegah kanker, diabetes serta penyakit kardiovaskular dan syaraf. (MacDougall *et. al.*, 2002) juga menyebutkan antosianin memiliki manfaat anti alergi dan antitrombotic.

Menurut Leimena (2008), ada 18 jenis antosianin yang telah ditemukan, namun hanya enam yang memegang peran penting dalam bahan pangan dan sering ditemukan yaitu pelargonidin, sianidin, delphinidin, peonidin, petunidin dan malvidin.

2.4 Plasenta

Plasenta adalah suatu organ yang tumbuh dari embrio dan induknya yang terjalin saat waktu proses pertumbuhan embrio. Dalam plasenta terdapat dua komponen ganda yaitu selaput embrional dan selaput lendir rahim (Sukra 2000). Plasenta terdiri dari susunan membran sedemikian rupa yang berisikan selaput chorion yang merupakan membran paling luar yang berkontak langsung dengan uterus maternal, allantois yang terletak diantara korion dan amnion, amnion merupakan membran yang paling dekat dengan fetus, dan kuning-kuning telur vestigial.

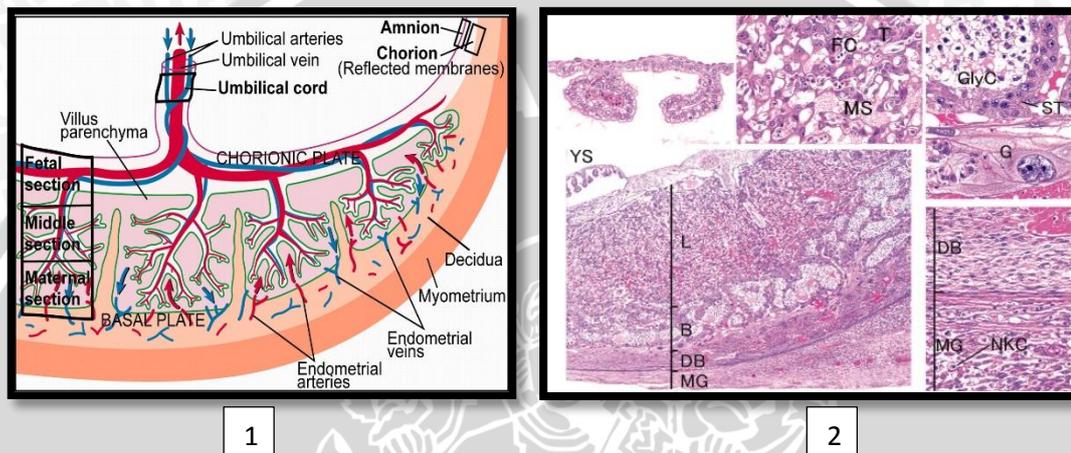
Tikus mempunyai bentuk plasenta tipe discoidal dan secara makroskopik susunan plasenta pada tikus yaitu hemoendothelial dimana pembuluh darah pada fetus masuk ke pool darah maternal, sehingga hanya endotel dari pembuluh darah fetal memisahkan sirkulasi induk dan anak Plasenta berfungsi untuk pertukaran produk-produk metabolisme dan produk gas antara induk dan

janin seperti oksigen, karbon monoksida yang berlangsung secara difusi primitif, pertukaran nutrien dan elektrolit seperti asam amino, asam lemak bebas, karbohidrat, dan vitamin yang berjalan seiring usia kebuntingan, dan pemindahan antibodi induk oleh sinsitiotrophoblas dengan cara pinositosis dan selanjutnya diangkut ke pembuluh darah janin, dengan demikian janin memperoleh antibodi induk (Sadler, 2000).

Peranan plasenta selama masa kebuntingan adalah sebagai transport, tempat penyimpanan, dan biosintetis. Pada blastosit, nutrisi berasal dari cairan uterine dan setelah terjadi perlekatan pada endometrium, nutrisi berasal dari produk yang dihasilkan dari metabolisme endometrium. Pada awal konseptus, embrio berkembang pada uterus (endometrium) dimana kebutuhan nutrisi diambil langsung dari maternal. Dan ketika sirkulasi antara maternal dan fetal sudah mencapai keseimbangan maka nutrisi diabsorpsi dari pembuluh darah maternal ke pembuluh darah fetal melalui *placental barrier* (Sadler, 2000).

Histologi plasenta terdapat dua lapisan yaitu pars fetalis yang terdiri dari chorionic plate dan vili chorion. Yang kedua pars maternalis yang terdiri dari decidua basalis. Decidua basalis sendiri terdapat sel-sel decidua dan septa plasental. Adapun septum atau pemisah dari sirkulasi maternal dari sirkulasi fetal yang disebut plasenta barrier yang terlihat pada gambar 2.4 Sel-sel trofoblas yang terletak di atas embrioblas yang berimplantasi di endometrium dinding uterus, mengadakan proliferasi dan berdiferensiasi menjadi dua lapis yang berbeda :

1. Sitotrofoblas : terdiri dari selapit sel kuboid, batas jelas, inti tunggal, di sebelah dalam (dekat embrioblas)
2. Sinsitiotrofoblas : terdiri dari selapit sel tanpa batas jelas, di sebelah luar (berhubungan dengan stroma endometrium) (Furukawa, 2011).



Gambar 2.5 Plasenta tikus (1) Bagian-bagian plasenta secara skematik, (2) Histologi plasenta tikus plasenta (B : zona basal; DB : desidua basalis; FC, fetal capillary ; G :giant cell trofoblas, GlyC : sel glikogen, L : zona labirin MG : metrial gland, MS : maternal sinusoid, NKC : uterine natural killer cells, ST : spongiotrofoblast, T :trofoblas, YS : yolk sac) pewarnaan HE. Perbesaran 400X (Furukawa, 2011).

2.4.1 Perubahan Patologi Plasenta

Perubahan patologi yang dasar dari plasenta pada preeklampsia adalah decidual vasculopathy, infark, abruptio placentae, villous maldevelopment dan diminished growth. Perubahan patologi ini tidak semestinya berhubungan dengan penyakit klinis. Meskipun pada penyakit klinis yang berat, perubahan ini tidak selalu dijumpai. Perubahan plasenta yang berat mungkin juga timbul ketika tidak dijumpai simptom pada maternal dan lesi plasenta mungkin timbul jauh sebelum adanya manifestasi klinis. Jadi lesi-lesi ini tidak patognomonik

untuk preeklampsia sehingga dapat juga dijumpai pada penyakit lain seperti lupus anticoagulant dan trombofilia. Akan tetapi lesi-lesi ini merupakan indikasi daripada perfusi uteroplasenta yang abnormal (Baergen, 2005).

Berbagai perubahan vaskular yang terjadi pada arteriol desidua dikenal sebagai decidua vasculopathy. Perubahan vaskular yang terjadi adalah kehilangan konversi fisiologik, trombosis, atherosclerosis dan nekrosis fibrinoid. Pada kondisi fisiologik, sel-sel trofoblas menginvasi arterial beds dari desidua dan miometrium superfisial, merusak dinding dari arteriol dan menggantikannya dengan fibrinoid. Infiltrasi ini membuka lumen arteriol dan membuat ketidakmampuan pembuluh darah untuk melakukan respon vasokonstriksi terhadap berbagai mediator vasoaktif. Sehingga pada konversi fisiologik yang normal, arteri berubah jadi membesar, berkelok-kelok dan kaku. Pada preeklampsia, invasi ini lebih superfisial dan terjadi kegagalan invasi trofoblas pada bagian proksimal dari percabangan di miometrium. Invasi trofoblas juga terhalang dengan berbagai derajat. Ini yang disebut dengan kehilangan konversi fisiologik (Baergen, 2005).

Infiltrasi lemak dapat juga diamati pada sel-sel endotel dan tampak makrofag yang mengandung lemak yang difagosit dari lipid laden myogenic foam cells yang degenerasi. Perubahan ini disebut dengan atherosclerosis (Raphael, 2008) perubahan inflamasi seperti inflamasi kronis pada jaringan desidua dan pembuluh darah desidua juga dijumpai dalam hubungannya dengan lesi vaskular yang dikenal dengan vaskulitis desidua. Walaupun mungkin dijumpai

sel-sel limfosit tetapi sel-sel plasma tidak dijumpai dan sering terjadi nekrosis pada jaringan desidual (Baergen, 2005).

Infark plasenta merupakan lesi yang paling umum dijumpai oleh patologis, dimana lesi infark ini menunjukkan jaringan villi yang sudah mati karena defisiensi sirkulasi maternal (intervillous). Infark itu padat, kenyal dan dapat meliputi semua ketebalan plasenta. Sering infark tersebut dijumpai pada dasar plasenta, khususnya pada bagian pinggir plasenta. Infark yang dijumpai pada trimester pertama dan kedua selalu abnormal. Secara makroskopis, infark lebih kenyal dari jaringan villi sekitarnya dan memiliki permukaan yang granular. Infark dini berwarna merah tua, kongesti dan dapat dibedakan dari jaringan normal dengan kekenyalannya dan ketiadaan tekstur seperti spon. Dengan bertambahnya umur infark menjadi kuning, kemudian coklat abu-abu dan terakhir putih. Secara mikroskopis, perubahan awal adalah kongesti kapiler villi, perdarahan intravillous yang diikuti dengan aglutinasi villi atau kolapnya ruang intervilli. Singkatnya basofilia inti dari sinsitium yang jelas hilang dengan gambaran inti yang kotor. Kemudian terjadi piknosis dan karioreksis. Endotel dan eritrosit intravaskular kehilangan warna dan menjadi pucat serta memberikan gambaran ghostlike. Kadang-kadang tampak sel-sel inflamasi akut pada bagian pinggir daerah infark. Pada saat ini, sel-sel trofoblas dan stroma villi lengkap kehilangan pewarnaannya yang karakteristik. Ghost villi lengkap kolaps dan hanya diantarai oleh suatu lapisan tipis dari material fibrinoid (Kumar, 2005).

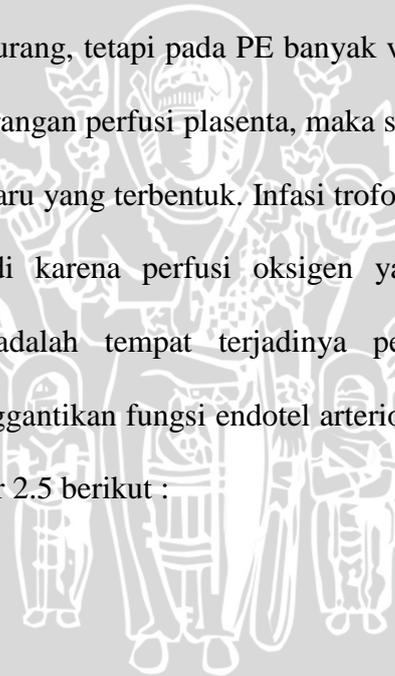
Abruption plasenta juga dapat dijumpai pada preeklampsia dimana terjadi perdarahan dengan lesi vaskular desidual, khususnya terjadi trombosis arteriolar desidual yang menyebabkan nekrosis dan perdarahan venous. Secara patologi ini menyebabkan terjadinya hematoma retroplasenta. Jaringan villi yang mendasari hematoma akan menjadi infark karena kehilangan suplai darah (Molavi, 2008).

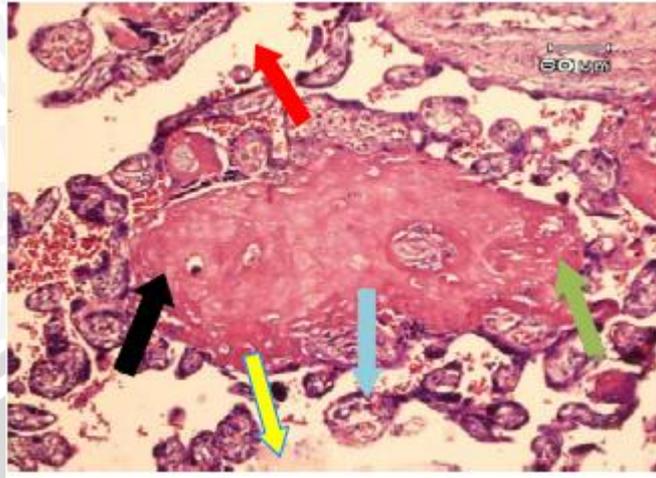
Pada preeklampsia terjadi peningkatan jumlah *syncytial knotting* yang merupakan indikator adanya iskemia plasenta dan ini terlihat pada villi terminal. Jika lebih dari 30% villi terminal menunjukkan *syncytial knotting*, khususnya pada plasenta prematur maka ini merupakan diagnostik perfusi yang buruk. Banyak pola *villous maldevelopment* yang muncul dan berhubungan dengan hipoksia preplasenta, uteroplasenta dan postplasenta. Pada preeklampsia terjadi hipoksia uteroplasenta atau postplasenta. Gambaran histologi pada setiap kasus ditentukan oleh banyak aspek dari perkembangan villi. Pertama adalah derajat maturasi villi dan yang kedua adalah derajat dan tipe angiogenesis fetoplasenta. Ini dikontrol oleh level oksigen intraplasenta (Benirschke, 2006).

Pada hipoksia postplasenta, dimana level oksigen cukup tinggi akan menginduksi terjadi *non branching* angiogenesis yang menghasilkan villi yang panjang, kurus, kurang berkembang atau villi terminal filiform dengan sedikit percabangan, sedikit *syncytial knot*, *capillary loop* yang panjang dan tidak bercabang. Keadaan ini disebut sebagai defisiensi villi terminal. Pada hipoksia preplasenta, dimana level oksigen rendah akan menginduksi

terjadinya branching angiogenesis yang menghasilkan kelompokan villi terminal yang kaya kapiler, pendek, banyak cabang dan peningkatan jumlah *syncycial knot* (Tenney-Parker changes). Pada hipoksia uteroplacenta terlihat perubahan pada villi yang serupa dengan yang terjadi pada hipoksia preplacenta (Benirschke, 2006).

Kelainan plasenta lain yang dapat dijumpai adalah perdarahan intravillous, chorangiosis dan chorangiomatosis. Peningkatan sitotrofoblas merupakan akibat dari kurangnya perfusi oksigen. Pada plasenta matur sel sitotrofoblas akan berkurang, tetapi pada PE banyak vili baru yang terbentuk untuk menunjang kekurangan perfusi plasenta, maka semakin banyak pula sel trofoblas dan vili-vili baru yang terbentuk. Infasi trofoblas yang akan menjadi sitotrofoblas ini terjadi karena perfusi oksigen yang inadequate. Fungsi sitotrofoblas sendiri adalah tempat terjadinya pertukaran gas dimana sitotrofoblas akan menggantikan fungsi endotel arteriol (Samuel, 2013), yang ditunjukkan pada gambar 2.5 berikut :





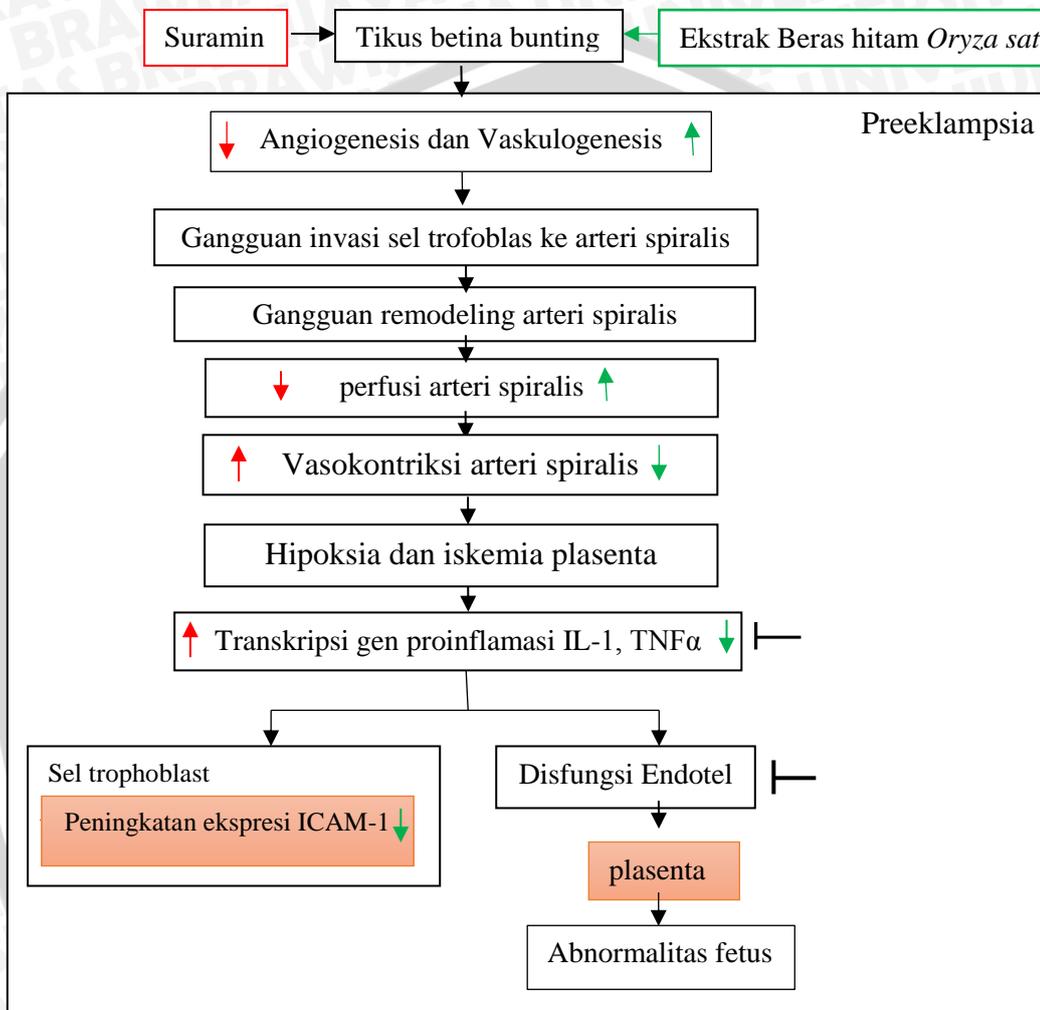
Gambar 2.6 Gambaran histologi plasenta pada preeklampsia.

Keterangan : Kalsifikasi (panah merah), simpul sinsitial (panah biru), peningkatan sitotrofoblas (panah kuning), nekrosis (panah hijau), dan trombosis (panah hitam) pewarnaan HE dengan prbesaran 400X (Samuel, 2013)

Selain merupakan kompensasi terhadap kebutuhan perfusi yang inadkuat, peningkatan sitotrofoblas juga dipengaruhi oleh Aktivin A. Aktivin A merupakan gliko-protein yang termasuk dalam keluarga *Transforming Growth Factor- β superfamily*, sebuah group protein yang mengontrol proliferasi dan diferensiasi sel dari banyak sistem tubuh. Keadaan hipoksia pada plasenta memicu pengeluaran TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) dan IL1 β (*Interleukin-1Beta*) dari plasenta serta suatu faktor yang disebut *hipoxia-inducible transcription factor* yang akan memacu trofoblas untuk menghasilkan Aktivin A lebih banyak. Hal ini di perlukan untuk memacu sitotrofoblas vilus bermigrasi lebih banyak untuk menjamin suplai oksigen yang adekuat untuk perkembangan fetus selama kebuntingan (Baergen, 2005).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- : Variabel tergantung
- : menghambat
- ↑↓ : efek suramin
- : menstimulasi
- ↑↓ : efek suplementasi antosianin
- : Pemberian terapi ekstrak
- : Pemberian suramin

Diawali dengan pemberian suramin untuk mendapatkan tikus bunting model preeklampsia dengan melakukan injeksi secara peritoneal pada usia kebuntingan H9, H10 dan H11. Pada plasenta gangguan invasi sel trofoblas ke arteri spiralis disebabkan adanya faktor efek obat suramin. Gangguan ini mengakibatkan penurunan perfusi arteri spiralis kemudian vasokonstriksi arteri spiralis sampai dengan terjadi hipoksia dan iskemia plasenta. Hal tersebut menyebabkan peningkatan ekspresi ICAM-1 yang diaktifasi oleh NF- κ B. *Nuclear Factor Kappa-B* (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi proinflamasi dan NF- κ B ditemukan pada plasma preeklampsia yang mengalami stress oksidatif. *Nuclear Factor Kappa-B* (NF- κ B) akan bertranslokasi dari sitoplasma ke inti sel sehingga terjadi transkripsi gen proinflamasi seperti TNF α , IL-1, IL-6. Peningkatan produksi sitokin proinflamasi akan memicu terjadinya disfungsi endotel (Ryu *et al.*, 2007)

Akibat dari terjadinya disfungsi endotel terjadinya penurunan perfusi darah plasenta. Penurunan perfusi plasenta dapat dilihat dari adanya gambaran histopatologi berupa membran basalis, dan trombosis pada plasenta, hal ini juga disebabkan terjadinya penurunan suplai darah plasenta dan mengakibatkan fetus mengalami hipoksia.

Ekstrak beras hitam mengandung senyawa antosianin yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Zat aktif antosianin memiliki kemampuan untuk menghambat sitokin proinflamasi seperti, TNF α , IL-1, IL-6 yang menghambat transkripsi inflamasi yang bekerja melalui jalur sebagai anti inflamasi. Antioksidan mampu mencegah terjadinya stres oksidatif pada hewan

model preeklampsia. Bila stres oksidatif dan inflamasi tidak terjadi maka NF- κ B tidak diaktifkan, sehingga ekspresi ICAM-1 akan menurun dan menghambat terjadinya disfungsi endotel dan antosianin mempunyai kemampuan antioksidan, antikanker, dan mencegah penyempitan pembuluh arteri (Sutharut, 2012). Kemudian antosianin juga melindungi integritas sel endotel yang melapisi dinding pembuluh darah sehingga tidak terjadi kerusakan. Kerusakan endotel merupakan awal mula pembentukan aterosklerosis sehingga harus dihindari. Selain itu antosianin juga merelaksasi pembuluh darah untuk mencegah aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular lainnya.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting preeklampsia dapat menurunkan ekspresi ICAM-1 pada plasenta
2. Pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting preeklampsia dapat memperbaiki kerusakan jaringan plasenta.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2016 hingga September 2016.

Induksi *suramin* dan terapi antosianin pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembuatan ekstrak beras hitam dilakukan di Laboratorium Materia Medica Batu, pengujian kadar antosianin atau uji LCMS dilakukan di Laboratorium Kimia Polinema Malang, sedangkan pembuatan histopatologi dan Imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Faal Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Box pemeliharaan, tempat minum dengan saluran air, alat bedah, alat sonde, *syringe* 1 ml, *syringe* 3 ml, mikroskop, *objek glass*, *cover glass*, *tail cuff*, *glove*, masker, kantung metabolik, *cotton bud*, kertas label, spidol, *analytic balance*, pot organ, kamera digital, *water bad*, papan pembedahan, inkubator.

4.2.2 Bahan

Tikus jantan 10 berumur 4-5 bulan dengan berat 250-300 gram, tikus betina 20 berumur 3 bulan dengan berat 200-250 gram, pakan komersial BR1, NaCl, Alkohol 70%, PBS, aquades, metylen blue, ekstrak beras hitam, suramin, hCG, PMSG, aquades, kloroform 10%, formaldehid 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, dan etanol 95%, xylol bertingkat (90%, 80%,

70%, 30%) larutan aseton 0,1 M buffer fosfat salin pH 7,4 proteinase-K (10 ug/ml), 0,1 M PBS, refrigerated, antibodi primer *monoclonal mouse anti human ICAM-1* (CD 54) cat. No: c2969 yang diencerkan 100 kali, antibodi sekunder *biotinylated goat anti-mouse* (1:200) (vector Elite, vector labs), Avidin-biotin-conjugated (Elite Vecta Stainer, Vector Lab. Cat, No: PK 6100) (1:200), fosfat buffer, larutan 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride DAB, sigma, cat. No. D-5905, 3% H₂O₂, alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, haematoksin-eosin.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, setiap kelompok perlakuan terdiri atas 4 ekor tikus. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok A sebagai kelompok kontrol negatif, kelompok B sebagai kelompok kontrol positif, kelompok C sebagai kelompok preeklampsia yang diberi terapi ekstrak beras hitam 12,5 mg/kg BB, kelompok D sebagai kelompok preeklampsia yang diberi terapi ekstrak beras hitam 25 mg/kg BB, dan kelompok E sebagai kelompok preeklampsia yang diberi terapi ekstrak beras hitam 50mg/kg BB. Adapun skema kelompok perlakuan dan skema kerja penelitian secara lengkap dapat dilihat pada **lampiran 4**.

Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus $t(n-1) \geq 15$.

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan pada perhitungan diatas, dilakukan 5 macam perlakuan, ulangan yang dibutuhkan 4 kali dalam setiap kelompok. Jumlah minimal tikus yang digunakan sebanyak 4 ekor, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini 20 ekor tikus.

4.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas : Terapi ekstrak beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) dan induksi suramin.
- Variabel Tergantung : Ekspresi ICAM-1 plasenta dan histopatologi plasenta tikus.
- Variabel kendali : Umur tikus, jenis kelamin, pakan dan suhu.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Pembuatan Ekstrak Beras Hitam

Bahan pembuatan ekstrak beras hitama dalah Beras hitam dengan menghaluskan beras hitam menjadi serbuk lalu dimaserasi dengan etanol 96% yang diasamkan dengan HCl 37% hingga pH 1,0 sebanyak 600 ml (1:6). Beras hitam dan pelarut diaduk menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 300 rpm selama 4 jam kemudian didiamkan hingga 24 jam di tempat gelap dan dibungkus aluminium foil. Setelah 24 jam, maserat disaring dengan corong *butchner* untuk memisahkan filtrate dan ampas. Maserat ditimbang dan

dihitung rendemen ekstraknya (Maulida, 2015). Uji dilanjutkan dengan uji kualitatif dengan *Liquid Chromatography* dan *Mass Spectrometer* (LC-MS) untuk membuktikan dalam ekstrak beras hitam mengandung antosianin.

4.4.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari dengan kondisi kandang dan pakan komersial berupa BR 1. Air minum yang diberikan merupakan air matang secara ad libitum. Tikus yang dipelihara dalam kandang yang dialasi dengan sekam kayu dalam suhu ruang 25-26°C dengan kelembapan 76-87%. Kandang ditutup dengan kawat berjaring.

4.4.3 Swab Vagina pada Tikus Betina

Swab vagina dilakukan dengan cara *cutton bud* dibasahi kemudian dimasukan dalam vagina diputar-putar, selanjutnya dioleskan pada obyek glas. Kemudian difiksasi dengan alkohol 70% selama 5 menit. Selanjutnya obyek glas ditetesi dengan pewarna *metilen blue*, dibiarkan selama 2-3 menit, kemudian dicuci dengan air dan dikeringkan Selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk menentukan tahapan siklus birahi yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Santoso, 2013).

4.4.4 Pembuatan Tikus Bunting Secara *in vivo*

Pembuatan tikus bunting dilakukan secara *in vivo*. Sebelum dilakukan pengawinan *monomating* yaitu pengawinan satu tikus jantan dengan satu tikus betina dalam satu kandang, dilakukan terlebih dahulu penyuntikan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dengan 10 IU. Setelah 48 jam kemudian disuntik *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) 10 IU dan dikawinkan.

Setelah 17 jam pasca perkawinan dilihat adanya sumbat vagina (*vaginal plug*). Sumbat vagina merupakan bagian dari cairan vagina beserta plasma semen yang sudah menggumpal. Apabila terdapat sumbat vagina maka tikus dianggap bunting hari ke nol, dan dikelompokkan pada populasi induk bunting. Kemudian dilakukan randomisasi untuk menentukan sampel penelitian. Tikus yang tidak terdapat *vaginal plug* dianggap negatif bunting dan tidak digunakan sebagai sampel (Siburian dan Marlinza, 2009).

4.4.5 Induksi Tikus Model Preeklampsia dengan Suramin

Suramin diinjeksikan secara intraperitoneal pada hari 9,10, dan 11 kebuntingan dengan dosis 70 mg/Kg BB secara intraperitoneal. Perhitungan volume suramin yang diberikan tercantum pada **lampiran 7**.

4.4.6 Pemberian Terapi Ekstrak Beras Hitam

Ekstrak beras hitam diberikan dengan cara dilakukan sonde lambung pada kebuntingan hari ke 10-17. Dosis yang diberikan pada tikus bunting adalah 12,5 mg/kg BB, 25 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB. Perhitungan volume ekstrak beras hitam yang diberikan tercantum pada **lampiran 7**.

4.4.7 Penentuan Kondisi preeklampsia.

Preeklampsia mengakibatkan terjadinya penurunan perfusi organ dan pengaktifan endotel yang menimbulkan terjadinya tekanan darah tinggi (hipertensi), dan dijumpai protein dalam urine (proteinuria). Pengukuran tekanan darah pada tikus dilakukan secara tidak langsung, yaitu menggunakan alat *tail cuff*. Pengukuran dilakukan pada hari ke 12 (setelah injeksi suramin) dan hari ke 17 (setelah pemberian antosianin). Teknik ini menggunakan tempat

khusus (*cuff*) dan detektor denyut, keduanya diletakkan pada ekor tikus dan dihubungkan dengan perekam tekanan darah. Pada permulaan, tikus harus dihangatkan dengan suhu 37°C pada papan yang hanga tsekitar 15 menit (jika tidak hangat denyut tidak terdeteksi pada detektor). Pada *cuff* dipasang karet disposibel, yang dipasang pertama pada tikus, kemudian diikuti dengan *cuff* sebagai detektor denyut. Pada permulaan denyut tikus dicoba dilihat terlebih dahulu hasilnya bagus atau tidak, jika bagus maka perekaman dimulai dan denyut tercatat. *Cuff* otomatis akan mengembang menekan ekor tikus yang dialiri darah, dan denyut alirana darh akan terdeteksi walaupun tidak lama. Biasanya dibutuhkan empat atau lebih pengukuran untuk masing-masing hewan coba, yang kemudian diambil rata-ratanya (Ciptaningsih, 2012)

Pengukuran proteinuria dilakukan pada hari ke 12 (setelah injeksi suramin) dan hari ke 17 (setelah pemberian antosianin). Pengukuran total protein dalam urin memakai metode *colori metric test pyrogallol red*. Reagen Pyrogallol red dan sodium molybdate di campur dengan sampel urin sebanyak 20 µl yang akan membentuk kompleks berwarna merah. Kemudian konsentrasi protein sampel di ukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm (Arcana, 2007).

4.4.9 Cara Pengambilan Plasenta

Pembedahan hewan coba dimulai dengan melakukan *dislokasio os cervicalis*, Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, dimana tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. kemudian

dilakukan sanitasi menggunakan alkohol 70% dibagian abdomen. Selanjutnya dilakukan pembedahan dengan cepat untuk mengambil organ plasenta. Pembedahan dilakukan dari bagian abdomen dilinea alba membentuk sayatan berbentuk huruf Y terbalik menggunakan gunting kecil. Kemudian dicari organ uterusnya dan dipisahkan dengan plasenta, selanjutnya plasenta disimpan dalam formalin untuk pembuatan preparat histopatologis (Widjiati, 2014).

4.4.12 Ekspresi ICAM-1 menggunakan Imunohistokimia

Pemeriksaan ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) dilakukan dengan menggunakan metode IHK atau imunohistokimia. Irisan jaringan organ plasenta dideparafinasi ke dalam xylol I, xylol II, ethanol absolute I, ethanol absolute II, ethanol bertingkat (90%, 80%, 70%, 30%), dan aquades selama masing-masing 15 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x. Selanjutnya preparat di *unmusking* dengan buffer sitrat pH 6 sebanyak 10 mM dan 1 mM EDTA pH 8 selama 10-20 menit pada suhu 90°C, kemudian *slide* dicuci dengan menggunakan aquades. Tahap selanjutnya adalah proses *blocking peroksidase* jaringan dengan menggunakan H₂O₂ 3% dalam methanol selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3x. Proses selanjutnya yaitu *blocking slide* dengan susu skim 1% dalam PBS-tween selama 30 menit, kemudian *slide* dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x. *Slide* selanjutnya diberi antibodi primer *monoclonal mouse anti human ICAM-1* dengan perbandingan 1:100 dalam susu skim 1% dan PBS-tween. *Slide* kemudian disimpan pada suhu 4°C selama kurang lebih 24 jam. Selanjutnya *slide* dicuci dengan PBS

sebanyak 3x. Proses selanjutnya yaitu penambahan antibodi antibody sekunder dengan perbandingan 1:300 dalam PBS dan dibiarkan selama 1 jam, kemudian *slide* dicuci dengan PBS sebanyak 3x. Preparat selanjutnya ditetesi SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) dengan perbandingan 1:500 dalam PBS dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, lalu ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. *Slide* kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, lalu dilakukan *counterstaining* slide dengan *Mayer Hematoxyler* selama 10 menit, kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan selama kurang lebih 1 malam. Tahap akhir yaitu proses *mounting* dengan menggunakan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass*. Hasil selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Ekspresi ICAM-1 ditandai adanya warna coklat pada sel sinsitotrofoblas setelah diberikan antibodi terhadap ICAM-1. Cara menghitung persen (%) sel yang terekspresi adalah jumlah sel yang terekspresi dibagi jumlah seluruh sel per slide pada preparat. Hasil selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan ekspresi reseptor progesteron dengan menghitung jumlah ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) melalui pengamatan 5 bidang pandang dan untuk membantu menganalisis menggunakan aplikasi *immunoratio*.

4.4.10 Pembuatan Preparat Histopatologi Plasenta

Setelah diterapi, tikus putih di (euthanasia) *dislokasio os cervicalis* kemudian diautopsi untuk diambil organ plasenta. Plasenta yang telah diambil kemudian difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 24 jam. Proses berikutnya dilakukan *trimming* untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam tempat jaringan khusus (*tissue cassette*) dalam proses *tissue processor*. Plasenta yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit lalu dimasukkan ke reagen dengan larutan alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, Alkohol absolut I, II, III, *xylol* I dan II masing-masing selama 30 menit. Jaringan dikeluarkan dari *tissue processor* kemudian dilakukan proses infiltrasi dan pembuatan blok parafin menggunakan alat *Automatic Tissue Embedding Apparatus Of Tissue-Tek®* (Sakura Corp. United States America). Setelah itu dilakukan pemotongan secara acak, yaitu tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7 μm , kemudian dicelupkan kedalam air hangat dengan suhu 20-30°C sampai jaringan mengembang dengan baik, kemudian diletakkan pada kaca objek yang sebelumnya diolesi dengan albumin telur, lalu dikeringkan dengan *hot plate*. Setelah kering, dilakukan pewarnaan dengan metode Harris Haematoxylin-Eosin (HE).

Pada pewarnaan HE, sediaan pada gelas objek direndam dalam *xylol* 1 selama tiga menit dan *xylol* 2 selama satu menit untuk dilakukan deparafinasi, kemudian didehidrasi dengan perendaman secara berurut dalam alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol 96%, 90%, 80%, 70% dan air selama satu menit. Jaringan dimasukkan ke dalam pewarna HE selama 5-10 menit. Selanjutnya di

masukkan ke dalam aquades selama lima menit. Setelah itu dimasukkan berturut-turut ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, masing-masing selama 30 detik dan masukkan ke dalam *xylol* I dan II, masing-masing selama dua menit. Kemudian bersihkan dari sisa-sisa pewarnaan. Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditutup dengan kaca penutup yang sebelumnya telah ditetesi dengan *entellan* dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop cahaya.

4.4.11 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi Plasenta dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan menggunakan perbesaran 40x, 100x, dan 400x. Pengambilan gambar histopatologi plasenta menggunakan kamera, setelah mendapatkan gambar yang diinginkan kemudian ditampilkan di layar monitor. Pengamatan histopatologi plasenta yang diamati berupa bagian penebalan membran basalis dan nekrosis pada sel sinsitotrofoblas.

4.5 Analisa Data

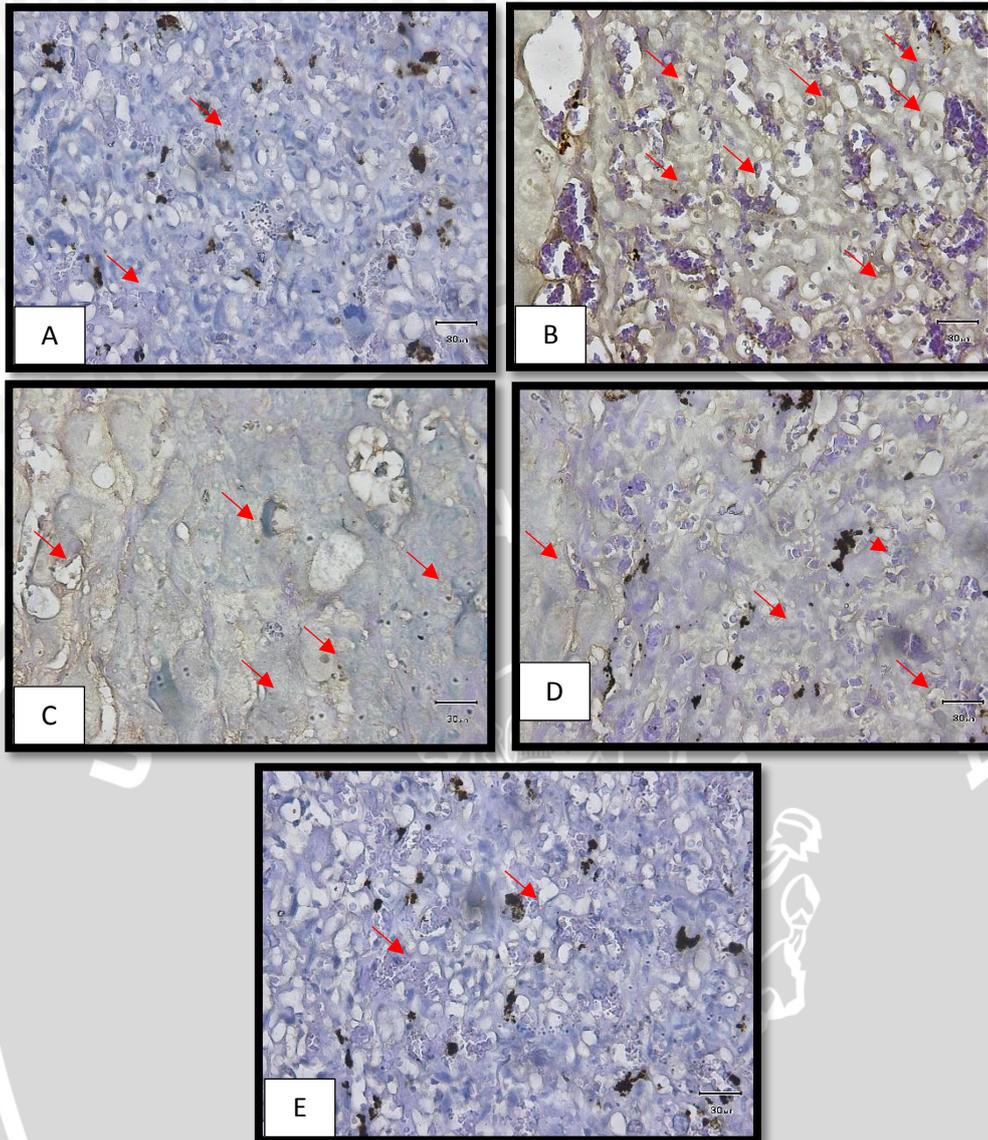
Semua data kuantitatif ekspresi *adhesi intraseluler molekul* (ICAM-1) diuji secara statistika menggunakan uji sidik ragam one way analysis of variance (ANOVA) dan apabila ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey untuk melihat ada tidaknya perbedaan nyata. Sedangkan hasil pengamatan histopatologi plasenta dianalisa secara deskriptif.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pemberian Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa L*) Terhadap Ekspresi Adhesi Intraseluler Molekul (ICAM-1) Plasenta Model Preeklampsia

Ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada plasenta tikus putih bunting model preeklampsia diamati melalui imunohistokimia dengan adanya ekspresi warna coklat pada permukaan sel sinsitotofoblas. Pewarnaan jaringan plasenta dengan metode imunohistokimia disajikan **Gambar 5.1**.

Berdasarkan **Gambar 5.1** dapat dilihat bahwa pada **gambar A**. Kontrol (-) atau tikus Bunting sehat terdapat sedikit ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada sel sinsitotofoblas. Sedangkan pada gambar B, kontrol (+) atau tikus bunting yang diinduksi dengan suramin yang terlihat ekspresi adhesi intraseluler molekul tampak adanya warna kecoklatan pada permukaan sel sinsitotofoblas. Sel dapat menghasilkan protein molekul adhesi yang akan bereaksi membentuk ikatan dengan antibodi terhadap anti-ICAM-1. Gambar C. Kelompok terapi 1 tampak adanya warna kecoklatan pada permukaan sel sinsitotofoblas dan gambar D Kelompok terapi 2 masih tampak adanya warna coklat pada permukaan sel sinsitotofoblas, Sedangkan gambar E. Kelompok terapi 3 terlihat jumlah ekspresi ICAM-1 yang sedikit.



Gambar 5.1 Immunohistokimia Ekspresi ICAM-1 Plasenta

Keterangan : **A.** Plasenta Kontrol (-) ; tikus bunting sehat ; jumlah ekspresi ICAM-1 normal. **B.** Plasenta Kontrol (+) ; tikus bunting yang diinduksi suramin ; jumlah ekspresi ICAM-1 meningkat. **C.** Plasenta terapi 1 ; tikus bunting yang mendapat induksi suramin dan diterapi dengan ekstrak beras hitam dosis 12,5 mg/kgBB ; jumlah ekspresi ICAM-1 meningkat. **D.** Plasenta Terpai 2 ; tikus bunting yang diinduksi suramin dan diterapi ekstrak beras hitam dosis 25 mg/kgBB ; jumlah ekspresi ICAM-1 meningkat. Peningkat terhadap Kontrol (-), penurunan terhadap kontrol (+). (▲) menunjukkan gambar ekspresi ICAM-1 pada sel sinsitotrofoblas. **E.** Plasenta Terapi 3 ; tikus bunting yang diinduksi suramin dan diterapi dengan ekstrak beras hitam dosis 50 mg/kgBB ; jumlah ekspresi ICAM-1 menurun. Peningkatan terhadap kontrol (-), Penurunan terhadap kontrol (+). menunjukkan gambar ekspresi ICAM-1 pada sel sinsitotofoblas. Perbesaran 400 X.

Berdasarkan **Gambar 5.1** dapat dilihat bahwa pada **gambar A**. Kontrol (-) atau tikus Bunting sehat terdapat sedikit ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada sel sinsitotofoblas. Sedangkan pada gambar B, kontrol (+) atau tikus bunting yang diinduksi dengan suramin yang terlihat ekspresi adhesi intraseluler molekul tampak adanya warna kecoklatan pada permukaan sel sinsitotofoblas. Sel dapat menghasilkan protein molekul adhesi yang akan bereaksi membentuk ikatan dengan antibodi terhadap anti-ICAM-1. Gambar C. Kelompok terapi 1 tampak adanya warna kecoklatan pada permukaan sel sinsitotofoblas dan gambar D Kelompok terapi 2 masih tampak adanya warna coklat pada permukaan sel sinsitotofoblas, Sedangkan gambar E. Kelompok terapi 3 terlihat jumlah ekspresi ICAM-1 yang sedikit.

Pada proses implantasi dan plasentasi membutuhkan produksi berbagai faktor pertumbuhan angiogenik, molekul adhesi sel, sitokin dan faktor pertumbuhan, ekstraselular *matrix metalloproteinases* (MMPs), hormon dan faktor transkripsi. Selama plasentasi yang normal, sel-sel sitotrofoblas embrio menginvasi dinding rahim. Interaksi ini bertindak untuk menginduksi pembuluh darah induk menjadi berkapasitasi tinggi dan resistansi rendah yang menghubungkan oksigen induk dan nutrisi bagi plasenta dan perkembangan fetus. Sebagai bagian dari proses ini, sitotrofoblas mengadopsi fenotipe endotel, mengekspresikan molekul adhesi yang ditemukan pada permukaan sel (Vatish *et al*, 2006). Hal tersebut menunjukkan pada perlakuan kontrol (+) terdapatnya ekspresi ICAM-1. Ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada permukaan sel sinsitotofoblas ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada

gambaran imunohistokimia (IHK) plasenta yang ditunjukkan dengan tanda panah berwarna merah. Hasil ekspresi (ICAM-1) menunjukkan adanya warna coklat pada bagian permukaan sel sinsitotofoblas seperti ditunjukkan **Gambar 5.1** kemudian diproses dengan imunoratio dengan jumlah rata-rata ekspresi ICAM-1 plasenta pada **Tabel 5.1** dengan output uji ANOVA pada **Lampiran 14**.

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah ekspresi ICAM-1 plasenta

Kelompok	Rata-rata ekspresi ICAM-1 area DAB (%)±standar deviasi	Ekspresi ICAM-1 aera DAB (%)	
		Peningkatan dari kontrol negatif	Penurunan dari kontrol positif
Kontrol (-)	3,67±1,93 ^a	-	-
Kontrol (+)	59,45±4,32 ^d	151,76	-
Terapi 1 (12,5 mg/kgBB)	32,76±1,16 ^c	-	44,89
Terapi 2 (25 mg/kgBB)	16,63±1,57 ^b	-	71,01
Terapi 3 (50 mg/kgBB)	4,12±1,93 ^a	-	93,06

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0.05$).

Hasil uji ANOVA diperoleh perbedaan rata-rata jumlah ekspresi ICAM-1 plasenta yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok penelitian. Pada kelompok kontrol (+) mengalami peningkatan rata-rata jumlah ekspresi adhesi intraseluler molekul (ICAM-1) pada plasenta dibandingkan dengan kelompok kontrol (-) dengan rata-rata jumlah ekspresi ICAM-1 3.67 ± 1.93 (**Tabel 5.1**). Pada kelompok terapi 1, 2, dan 3 terjadi penurunan rata-rata jumlah ekspresi ICAM-1 dibandingkan dengan kontrol (+).

Pada **Tabel 5.1** berdasarkan uji perbandingan menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna kadar ICAM-1 plasenta antara kelompok kontrol positif (tikus model preeklampsia) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak beras hitam dosis 12,5 mg/kgBB yaitu 32.76 ± 1.26 . Hal ini berarti bahwa dosis tersebut tidak berpengaruh terhadap kadar ICAM-1 plasenta pada tikus model preeklampsia. Nilai rataannya ada penurunan kada ICAM-1, tetapi penurunan ini tidak bermakna secara statistik.

Pada hasil **Tabel 5.1** menunjukkan ada perbedaan ratan kadar ICAM-1 dengan dosis 25 mg/kgBB yaitu 16.63 ± 1.57 dibandingkan kadar ICAM-1 plasenta dengan kontrol (+) 59.450 ± 4.32 , akan tetapi ratan kadar ICAM-1 masih tinggi. Berdasarkan uraian dari **tabel 5.1** diatas maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian ekstrak beras hitam berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap penurunan kadar ICAM-1 plasenta pada tikus model preeklampsia. Demikian pula diperoleh dosis ekstrak beras hitam yang paling optimum menurunkan ICAM-1 adalah dosis 50 mg/kg BB 4.12 ± 1.93 dengan penurunan dibandingkan dengan kontrol (+) yaitu 93,06 %.

Menurut Sankaralingga (2006) bahwa peningkatan NF-kB berpengaruh terhadap ekspresi ICAM-1 pada kondisi preeklampsia. Ekspresi ICAM-1 pada plasenta yang diberi suramin jumlahnya terus meningkat menunjukkan adanya korelasi bahwa jumlah ekspresi ICAM-1 meningkat pada sel sinsitotofoblas yang diaktifkan oleh TNF-a, IL-1 (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010). Bahan-bahan sitokin (TNF-a, IL-1, NF-kB) menginduksi reaksi inflamasi sehingga mengandung bahan stres oksidatif dan memproduksi anion superoksida (O_2^-)

lebih tinggi dan akan meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM pada permukaan sel yang berinteraksi dengan ligannya pada permukaan leukosit. Hal ini sesuai dengan **Gambar 5.1 B**, dan menurut riset yang dilakukan Inoue (2006) yang menyatakan molekul TNF- α secara biologis mengaktifasi gen dari sel-sel endotel dalam mengatur berinteraksinya sel endotel dengan leukosit seperti VCAM-1, ICAM-1, P-selektin, Faktor jaringan, sitokin dan kemokin. Ketika anion superoksidasi menangkap oksida nitrat (NO) yang diproduksi oleh endotel oksida nitrat sintase (eNOS) untuk menghasilkan peroksinitrit (ONOO^-). Peroksinitrit diinduksi sehingga meningkatkan dan mengaktifasi NF- κ B sehingga mengekspresikan ICAM-1, Peningkatan ICAM-1 sebagai penanda terjadinya disfungsi endotel.

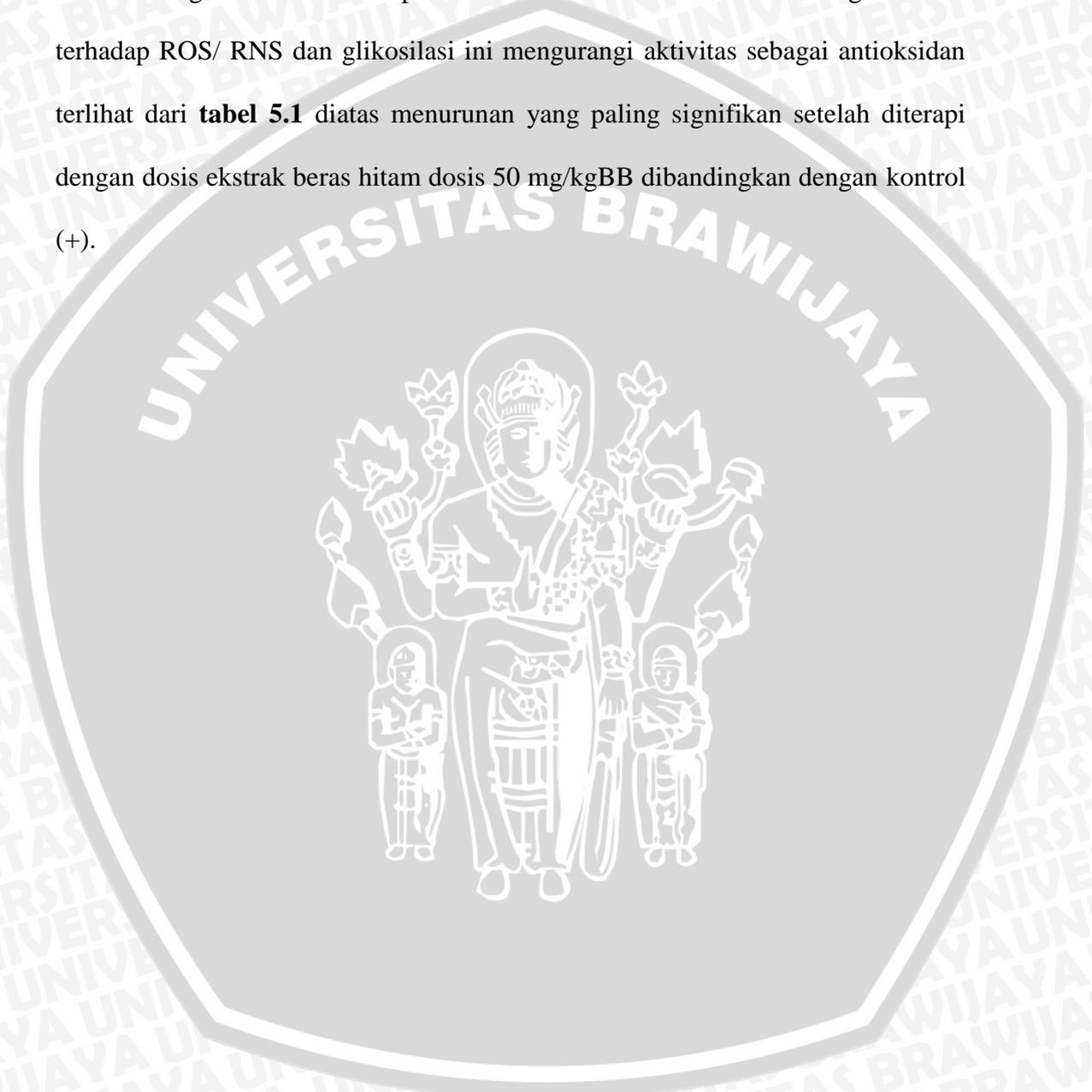
Pada penelitian ini tikus model preeklampsia telah terjadi peningkatan ekspresi ICAM-1 diduga karena adanya pengeluaran sitokin inflamasi dan terjadinya stres oksidatif. Pada penelitian ini, tikus bunting yang diberi induksi suramin 70 mg/kg BB, akan mengalami gangguan angiogenesis dan vaskulogenesis sehingga akan mengganggu aliran darah maternal dan fetal yang memicu pelepasan radikal bebas. ICAM-1 diatur oleh faktor transkripsi NF- κ B menyebabkan peningkatan ICAM-1. Peningkatan ICAM-1 terjadi pada preeklampsia yang disebabkan tidak adekuatnya trofoblas, invasi pada desidua dan *remodeling* pada arteri spiralis. Menurut Lawason (2009) yang menyatakan bahwa pada kebutuhan normal proses inflamasi terjadi tetapi dalam batas normal. pada penelitian ini terjadinya peningkatan ICAM-1 di duga karena adanya pengeluaran sitokin proinflamasi.

Menurut penelitian Libby (2002) yang menyatakan penurunan ekspresi ICAM-1 menurun dengan pemberian antioksidan dan antiinflamasi. Berdasarkan penelitian tersebut tanaman yang mengandung antioksidan antiinflamasi terdapat pada antosianin pada beras hitam. secara kimia, antosianin merupakan hasil dari glikosidasi polihidroksi dan turunan polimetoksi dari garam 2-benzopirilium atau dikenal struktur flavilium.

Pada penelitian ini dilaporkan penurunan ekspresi ICAM-1 pada plasenta diduga karena pemberian ekstrak beras hitam yang mengandung antosianin yang bekerja sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan berperan penting dalam mencegah stres oksidatif pada awal pembentukan plasenta mulai muncul generasi peroksida lipid pada preeklampsia melalui produksi superoxide anion berlebih yang bereaksi cepat dengan NO untuk membentuk peroxynitrite. Menurut Miguel (2001), antioksidan memiliki fungsi yang berbeda sesuai dengan aktivasi antioksidan. Fungsi antioksidan yaitu (a) penurunan konsentrasi oksigen lokal, (b) mencegah rantai inisiasi dengan oksigen reaktif dan atau nitrogen (ROS/RNS), misalnya anion superoksida, hidrogen peroksida, hidroksil radikal, (c) mengikat ion logam sehingga tidak akan menghasilkan spesies seperti HO- dan peroksida lipid. Namun pada penelitian ini tidak dilakukan uji fitokimia sehingga tidak diketahui aktivitas antioksidan dalam ekstrak beras hitam.

Pada penelitian ini dilaporkan bahwa penurunan ekspresi ICAM-1 setelah pemberian ekstrak beras hitam pada tikus bunting yang diinduksi suramin diduga karena dipengaruhi oleh penurunan ekspresi NF-kB. Yang terlihat pada **Gambar 5.1 C, D dan E**. Menurut Inoue (2006) yang menyatakan penurunan ekspresi

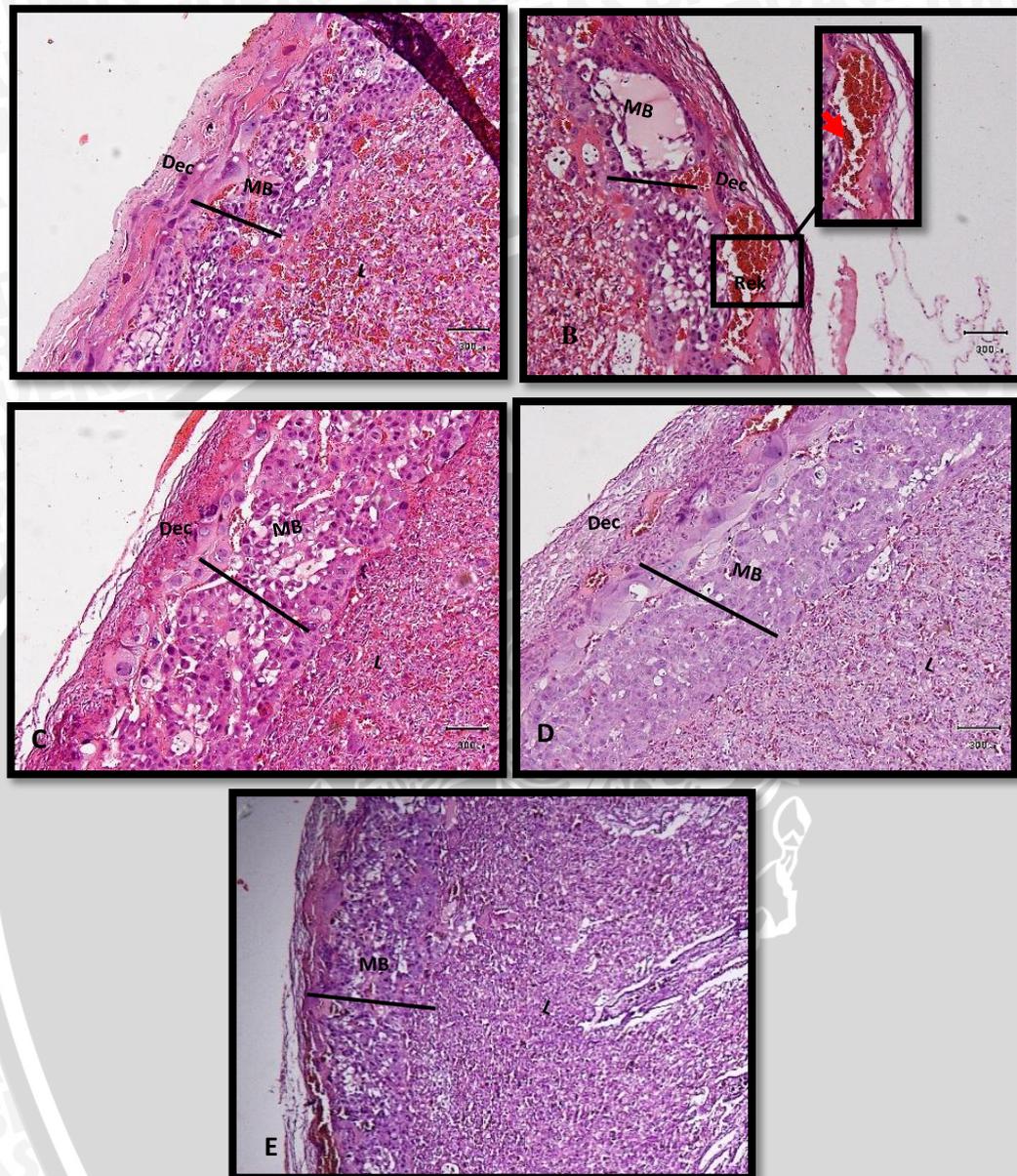
TNF- α secara biologis akan menurunkan ekspresi ICAM-1, sehingga ekstrak beras hitam yang senyawa aktif berupa antosianin yang berfungsi menghambat mutasi akibat mutagen dan menekan proliferasi sel inflamasi. Antosianin sangat reaktif terhadap ROS/ RNS dan glikosilasi ini mengurangi aktivitas sebagai antioksidan terlihat dari **tabel 5.1** di atas penurunan yang paling signifikan setelah diterapi dengan dosis ekstrak beras hitam dosis 50 mg/kgBB dibandingkan dengan kontrol (+).



5.2 Efek Pemberian Beras Hitam terhadap Gambaran Histopatologi Plasenta Tikus Bunting yang Dinduksi Suramin

Gambaran histopatologi plasenta dapat dilihat melalui pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Pewarnaan jaringan plasenta dengan HE dengan perbesaran 100X dan 400X disajikan pada **Gambar 5.2** Analisa gambaran histopatologi plasenta pada tikus putih bunting dilakukan secara diskriptif diamati seluruh lapang pandang.

Berdasarkan **Gambar 5.2** dapat dilihat bahwa pada **Gambar 5.2 A** pada Kontrol (-) dapat diamati bahwa bagian dari desidua, basal zone dan labirin pada plasenta tidak ditemukan adanya kerusakan, ditandai dengan bentuk dan susunan yang tersusun teratur dan rapi. Terlihat dengan jelas tidak adanya kerusakan pembuluh darah dan kematian sel trofobals (MB), sel sinsitiotrofobalas. Pada daerah membran basalis dilakukan pengukuran jaringan menggunakan aplikasi Image J yaitu 270,61 μm . Histologi plasenta terdapat 2 lapisan pars fetalis yang terdiri dari chorionic dan vili chorion dan pars maternalis terdiri dari decidua basalis. Decidua basalis sendiri terdapat sel-sel decidua dan septa plasenta (zona basalis). Sel-sel trofoblas yang terletak di atas embrioblas yang berimplantasi di endometrium mengadakan proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sititrofobals dan sinsitorofobals (Furukawa, 2011).



Gambar 5.2 Gambaran histopatologi plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE dengan perbesarn 100 X.

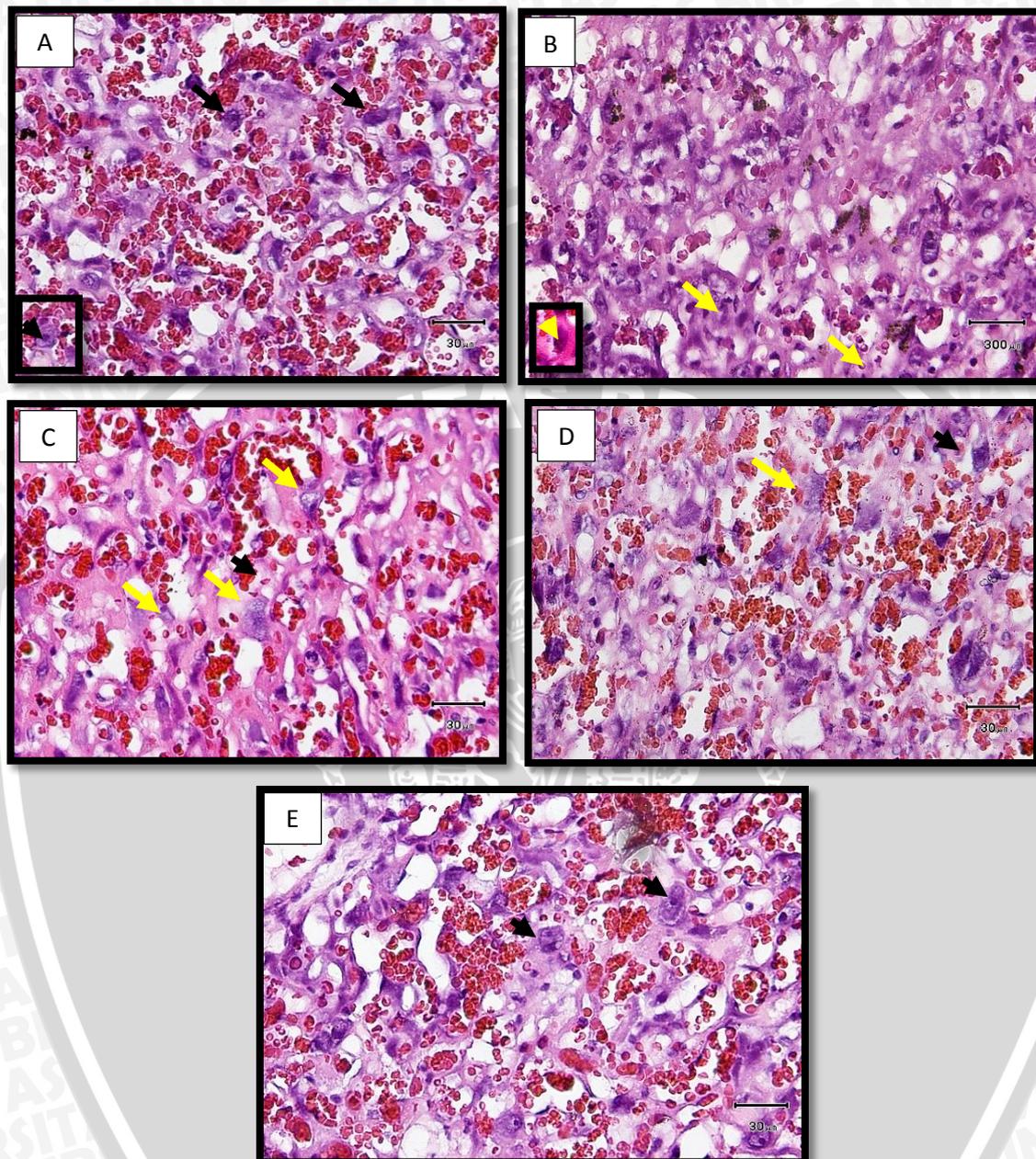
Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (K-), (B) kelompok kontrol positif (K+), (C) kelompok terapi 1 ekstrak beras hitam dosis 12,5 mg/kg BB, dan (D) kelompok terapi 2 ekstrak beras hitam dosis 25 mg/kg BB. menunjukkan Dec : Desuda basalis, MB : membran basalis, L ; Labyrin, Rek : reksis dan tanda panah merah (↘).

Gambaran histologi pada kelompok (K+) (**Gambar 5.2 B**) menunjukkan terjadinya penebalan pada bagian zona basalis dan dilanjutkan dengan aplikasi Image J mengukur panjang membran basalis yaitu 400,35 μm . Penebalan membran basalis trofoblastis, seperti yang sering ditemukan pada keadaan iskemia, diduga merupakan ikatan proliferasi sel-sel sitotrofoblastis. Dikarenakan sel sitotrofoblastis juga menghasilkan protein untuk pembentuk membran basalis trofoblastis, maka dapat dimengerti bahwa proliferasi sel sitotrofoblastis akan disertai dengan bertambahnya material membran basalis. Dugaan lain tentang terjadinya penebalan membran basalis ini akibat reaksi imunologi. Terdapatnya reksis yang ditunjukkan pada anak panah warna merah (➔) **Gambar 5.2B (Rek)** kelainan ini terjadi karena dilatasi dan ruptur daerah pembuluh darah yaitu arteri spiralis. Pada preeklampsia tingginya tekanan darah dan adanya kelainan pada dinding arteri spiralis menyebabkan mudahnya reksis terjadi. Kerusakan jaringan lain terlihat adanya nukleus sinsiotrofoblastis sudah tidak tampak hanya berupa masa yang disebut *ghost villi*. Terlihat pada gambar pada anak panah warna kuning (➔).

Menurunnya aliran darah pada ruang intervili akibat stenosi dan okulasi arteri spiralis akan menyebabkan perubahan gambaran histologi plasenta. Sel-sel sitotrofoblastis merupakan sel bening trofoblastis (*trophoblastic stem cells*) yang diperlukan saat pertumbuhan trofoblastis. Sel inilah terjadi aktivasi sintesis DNA dan mitosis, sehingga dengan demikian sel-sel sitotrofoblastis merupakan sel yang membentuk daerah germinal (*germinative zone*). Sedangkan sel sinsiotrofoblastis terbentuk dari perubahan (*breakdown*) membran sel sitotrofoblastis dan merupakan hasil akhir proses diferensiasi.

Disisi lain pada preeklampsia, respons pembuluh darah terhadap angiotensin II dan kadar tromboksan (suatu vasokonstriktor yang poten) meningkat. Tetapi dilain pihak, protasiklin yang berperan dalam reaksi pembuluh darah dan dihasilkan oleh sel endotel uterus, arteri umbilikus dan vena plasenta menurun, sehingga efek vasokonstriksi dari angiotensin II dan tromboksan tidak dapat dicegah secara efektif. Hal inilah yang diduga menyebabkan perubahan gambaran histologi berupa penebalan dinding pembuluh darah dan berkurangnya pembuluh darah didaerah villi.

Hambatan angiogenesis saat plasentasi memicu gangguan perkembangan fetus dan plasenta. Menurut Gagliardi *et al.*, (2008) suramin berpotensi sebagai inhibitor angiogenesis dan antagonis *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), melalui kemampuannya dalam meningkatkan produksi sFlt-1 plasenta, dimana sFlt1 mengalami peningkatan secara signifikan pada kondisi preeklampsia (Lai *et al.*, 2011). Ketika sFlt1 meningkat pada tikus bunting, efek yang timbul berupa hipertensi, proteinuria sehingga mendukung pernyataan bahwa sFlt1 berperan dalam kerusakan endotel pada kasus preeklampsia (Maynard *et al.*, 2003; Bergmann, 2010).



Gambar 5.3 Gambaran histopatologi plasenta bagian labirin tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE dengan perbesaran 400X.

Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (K-), (B) kelompok kontrol (K+), (C) kelompok terapi 1, (D) kelompok terapi 2, dan (E) kelompok terapi 3 anak panah warna hitam (▲) menunjukkan bagian sel sinsitotrofoblas dalam keadaan normal dan sedangkan anak panah kuning (▲) menunjukkan sel sinsitotrofoblas mengalami *ghos villi*. (E) kelompok terapi 3 anak panah warna hitam (▲) menunjukkan bagian sel sinsitotrofoblas dalam keadaan normal dan sedangkan anak panah kuning (▲) menunjukkan sel sinsitotrofoblas mengalami *ghos villi*.

Defek utama terjadi pada plasenta dimana terdapat invasi trofoblas yang tidak adekuat pada arteri spiralis yang menyebabkan hipoperfusi plasenta dengan akibat iskemia plasenta. Pada kehamilan normal, invasi trofoblas ke dalam sel desidua menghasilkan suatu perubahan fisiologis pada arteri spiralis. Hasil akhir dari perubahan tersebut adalah arteri yang tadinya tebal dan muskularis menjadi lebih lebar berupa pembuluh darah yang berdinding tipis, lemas dan berbentuk seperti kantong yang memungkinkan terjadinya dilatasi secara pasif untuk menyesuaikan dengan kebutuhan aliran darah yang meningkat. pada **Gambar 5.2 B**. Sebagai kontrol (+) yang terlihat Pembuluh darah didaerah labirin di sinusoid maternal mengalami penyempitan. Adapun terjadinya nekrosis pada sel sintotrofoblas. Pada preeklampsia proses placentasi tersebut tidak berjalan sebagaimana mestinya oleh karena tidak semua arteri spiralis mengalami invasi oleh sel-sel trofoblas.

Kelainan plasenta yang terjadi dapat dilihat adanya *ghos villi* kelainan pembuluh darah pada plasenta preeklampsia disebabkan karena tidak terjadinya ataupun hanya sebagian dari arteri spiralis yang diinvasi oleh sel-sel trofoblas. Invasi yang terjadi adalah untuk menggantikan dinding dari arteri spiralis yaitu muskulo-elastik menjadi dinding yang diisi oleh material-material fibrinoid. Material fibrinoid pada dinding arteri spralis memungkinkan arteri spiralis menyerupai kantong dan mempunyai dinding yang tipis sehingga dapat menyesuaikan dengan aliran darah yang dibutuhkan. Nekrosis yang terjadi karena kurangnya oksigen akibat rusaknya arteri spiralis dan trofoblas yang mengalami hipoksia mengeluarkan tromboksan sebagai faktor vasoaktif yang mengakibatkan

terjadi trombosis. Tromboksan sebagai vasoaktif diproduksi sebagai kompensasi adanya kerusakan endotel. Kerusakan pembuluh darah juga memicu penurunan dari protasiklin yang dibentuk di endotel (Furukawa, 2011).

Menurut Mabie (2006) Pada preeklampsia terjadi penyempitan lumen dan juga didapatkan penurunan perfusi plasenta yang menyebabkan aliran darah menuju ke ruang intervilli berkurang. Penurunan aliran darah pada ruang intervilli menyebabkan perubahan gambaran histologi plasenta. Perubahan gambaran histopatologi ini yang terlihat pada **gambar 5.2 B** adalah proliferasi sel-sel sinsitorofoblas terjadinya nekrosis, berkurangnya sel darah merah dibagian labyrin dan adanya penyempitan sinusoid.

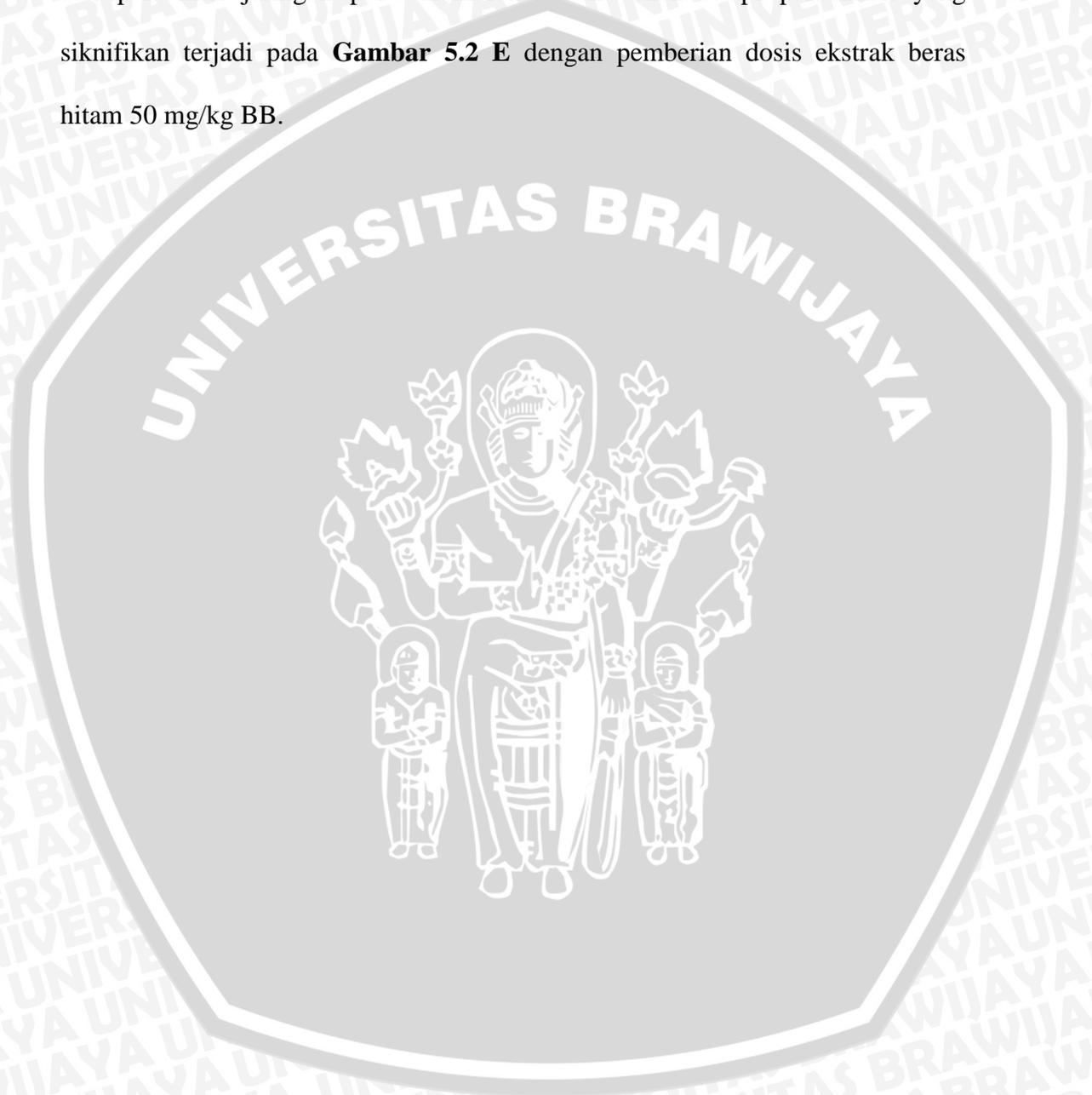
Pada **Gambar 5.2 C, D dan E** menunjukkan adanya perbaikan jaringan pada membran basalis dan tidak terjadinya reksis pada plasenta yang diberikan terapi ekstrak beras hitam sesuai dosis. Pada dosis 12,5 mg/kg BB dan dosis 25 mg/kg BB masih terjadinya kematian sel sinsitorofobals anak manah merah dibagian membran basalis dan masih terjadinya penebalan membran basalis dibandingkan kontrol positif, sedangkan pada **Gambar 5.2 E** menunjukkan perbaikan jaringan membran basalis dan berkurangnya *ghos villi* sel sinsitorofobals.

Beras hitam atau *Oryza sativa L.indica* mengandung senyawa antosianin yang berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah berbagai penyakit degeneratif. Antosianin mempunyai kemampuan mencegah penyempitan pembuluh arteri (Sutharut, 2012), kemudian antosianin juga melindungi integritas sel endotel yang melapisi dinding pembuluh darah sehingga tidak terjadi kerusakan. Kerusakan endotel merupakan awal mula pembentukan aterosklerosis

sehingga harus dihindari. Selain itu antosianin juga merelaksasi pembuluh darah untuk mencegah aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular lainnya.

Senyawa yang terdapat pada beras hitam diduga menjadi senyawa bioaktif yang bertanggung jawab untuk menurunkan tekanan darah diduga memberi efek antihipertensi dari antosianin melalui penghambatan angiotensin converting enzyme II (ACE) dan karenanya efek vasodilatasi. antosianin sebagai penghambat dari hipertensi, dimana senyawa dalam antosianin yang termasuk dalam senyawa flavonoid dapat sebagai obat alternative sebagai antihipertensi yang memiliki kemampuan menghambat aktifitas *ACE (Angiotensin Converting Enzyme)*. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai vasodilator adalah peran otot polos dan pembuluh darah. Flavonoid bekerja langsung pada otot polos pembuluh arteri dengan menstimulasi atau mengaktifasi endothelium derived relaxing factor (EDRF) sehingga menyebabkan vasodilatasi. Pada hipertensi, flavonoid berguna untuk menghambat ACE sehingga angiotensin I tidak dapat diubah menjadi angiotensin II, dimana angiotensin II berfungsi untuk menaikkan aktivitas sistem saraf simpatis, vasokonstriksi otot polos vaskular dan meningkatkan retensi air dan natrium. Dengan adanya flavonoid maka angiotensin II tidak dapat terbentuk. Seperti yang diketahui, ACE memegang peran penting dalam pembentukan angiotensin II yang merupakan salah satu penyebab hipertensi. Angiotensin II menyebabkan penyempitan pembuluh darah, yang dapat menaikkan tekanan darah. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor membiarkan pembuluh darah melebar dan membiarkan lebih banyak darah mengalir ke jantung, sehingga menurunkan tekanan darah (Depkes, 2006). Yang terlihat pada **Gambar 5.2 C, D**

E. Terlihat bagian pembuluh darah maternal mengalami perbaikan dengan perbaikan sel sinsitotrofoblas pembuluh yang terjadi terlihat pada anak panah (↘) dan perbaikan jaringan pada membran basalis akan tetapi perbaikan yang signifikan terjadi pada **Gambar 5.2 E** dengan pemberian dosis ekstrak beras hitam 50 mg/kg BB.



BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian Ekstrak Beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) dapat memperbaiki kerusakan jaringan plasenta yang ditandai dengan perbaikan bagian dari desidua, basal zone dan labirin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting yang diinjeksi suramin dengan dosis efektif yaitu 50 mg/kg BB.
2. Pemberian Ekstrak Beras hitam (*Oryza sativa L.indica*) dapat menurunkan jumlah ekspresi ICAM-1 plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting yang diinjeksi suramin dengan dosis terbaik yaitu 50 mg/kg BB.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji fitokimia untuk menentukan standat antosianin pada ekstrak beras hitam untuk menurunkan kerusakan jaringan plasenta dan menurunkan ekspresi ICAM-1 pada penyakit preeklampsia.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia press. Jakarta
- Baergen R.N. 2005. *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta*. Springer. New York. Page 332-363.
- Baratawidjaja, K. G and I. Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. IX ed. Jakarta : Balai Penerbit FKUI.
- Beaudet AL. 2013. *The utility of chromosomal microarray analysis in developmental and behavioral pediatrics*. Child Devel 84:121-132.
- Benirschke K. P. Kaufmann. R Baergen. 2006. *Pathology of Human Placenta*. Springer. New York. Fifth Edition. Page 212, 491-516.
- Brooks MD., 2011. Pregnancy, Preeclampsia. Dalam: S.k. Wulan. 2012. *Karakteristik Penderita Preeklampsia dan Eklampsia di RSUP Haji Adam Malik Medan Tahun 2009 – 2011*. Medan.
- Cunning, F.G, K.J. Leveno, S.L. Bloom, J.C. Hauth, D.J. Rouse, C.Y. Spong. 2010. Pregnancy hypertension. In : *Williams Obstetrics 23rd Edition*. New York : McGraw Hill. p. 709-710.
- Cunningham, L. B. H. R. S., 2010. *Williams Obstetric*. 23 ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Endermann, D and Schiffrin, E. L. 2004. Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, volume 15, p 1983-1992.
- Furukawa S, H. Seigo, U. Koji, A. Masayoshi, H. Soichiro, and O. Izumi. 2011. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *US National Library of Medicine National Institutes of Health. J Toxicol Pathol*. 2011 Jun; 24(2): 95–111.
- Hacker N. F., 2001. *Esensial Obstetri dan Ginekologi*. Jakarta : Hipokrates, pp. 179-85.
- Hladunewich, M, A. Karumanchi, and L. Richard. 2007. Pathophysiology of the Clinical Manifestations of Preeclampsia. *Stanford University, Stanford, California. Clin J Am Soc Nephrol* 2: 543-549,

- Holmes V, McCance DR. 2005. Could antioxidant supplementation prevent pre-eclampsia? The Proceedings of the Nutrition Society. ; 64 (4) (4):491-501.
- Hubel, C.A. 1999. *Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia*. Procsocepxbiol med. N222: 222-235.
- Huppertz B, JSHunt.2000. Trophoblast apoptosis and placental development a workshop report. Placenta 2000; 21: 74-6
- Inoue, K. M. Et al., 2006. Histon Deacetylase Inhibitor Reduce Monocyte Adhesion to Endothelium Through the Suppression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression Atherosclerosis, thrombosis and vascular biology, Volume 26, pp. 2626-2652.
- Tziotisa J. 2002. Adhesion molecules expression in the placental bed of pregnancies with pre-eclampsia. BJOG: an International Journal of *Obstetrics and Gynaecology*, Vol. 109, pp. 197-201
- Kumalaningsih, S. 2007. *Antioksidan Alami*, Surabaya: Trubus Agrisarana.
- Kumar V. Abbas A.K. Fausto N. Robbins and Cotran's Pathologic Basic of Disease : Toxemia of Pregnancy. Elsevier Saunders. Philadelphia. *Seventh Edition*. 2005. Page 305, 1106-1110.
- Kusumawati, D., 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Lawson, C and S. Wolf.2009. *Karakterisasi dan Purifikasi Antosianin pada Buah Duwet (syzigium cumini)*, Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Levi R, MD. 2005. The Role of Apoptosis in Preeclampsia; IMAJ ; 7: 178-8.
- Libby, P. 2002. Inflamasi in Atherosclerosis. *Nature*, Volume 42, pp. 868-874.
- Mabie WC, BM Sibai. 2006. Hypertensive state of pregnancy. In : DeCherney AH, Pernoll ML, eds. *Current obstetric and Gynecologic diagnosis and treatment*. 8th ed. Connecticut : Appleton & Lange. P. 380-97.
- Manuaba I. B. G., 2007. Pengantar Kuliah Obstetri .Jakarta : EGC, pp 401-31
- M.E. Anderson, T.J. Siahaan. 2003 Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 24, 487-501

- Molavi D.W. The Practice of Surgical Pathology: Placenta. Springer. New York. 2008. Page 171-178.
- Maryunani, A. 2012. *Asuhan Kegawat Daruratan Dalam Kebidanan*. TransInfo Media, Jakarta.
- Narwidina, P. 2009. Pengembangan Minuman Isotonik Antosianin Beras Hitam (*Oryza sativa L.indica*) dan Efeknya Terhadap Kebugaran dan Aktivitas Antioksi dan pada Manusia Pasca Stres Fisik: *A Case Control Study*. Program Pasca sarjana Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gadjah Mada. Tesis.
- Nhofer, N. D. and H. Stepann, 2008. Preeclampsia – More Than A Pregnancy Complication. *Human Ontogenet*, 2(1), pp. 29-38.
- Noris, M, N. Perico and G. Remuzzi. 2005. Mechanisms of Disease : Preeclampsia., 1(2), pp. 96-114.
- Podymow T, P. August. 2013. Hypertension in pregnancy. In: Black HR, Elliott WJ, eds. Hypertension: A companion to Braunwald's heart disease. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013:327–35.
- Powe, C. E., R.J. Levine, and S. A. Karumanchi. 2011. Basic Science for Clinicians Preeclampsia , a Disease of the Maternal Endothelium The Role of Antiangiogenic Factors and Implications for Later Cardiovascular Diseases, 2856-2869.
- Prawirohardjo S. 2005. *Pre-eklampsia dan Eklampsia, dalam Ilmu Kebidanan*, edisi ke-3. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 2005: 281-301
- Raphael R. Strayer D.S. Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2008. Page 832-833.
- Redman, C.W.G., I.L. Sargent. 2001. *The pathogenesis of pre-eclampsia*. *Gynecol.Obstet.Fertil.* 2001; 29,518-522.
- Ratnaningsih N, Ekawatiningsih P. 2010.Potensi Beras Hitam Sebagai Sumber Antosianin dan Aplikasinya pada Makanan Tradisional Yogyakarta. *Bidang MIPA dan Sains*. 2010:173-174.
- Rintafiani. 2014. *Siklus Estrus pada Mencit (Mus Musculus)*. Surabaya : Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

- Robert J. M., Carl A Hubel. 2004. *Oxydativestree in Preeclampsia*. AJOG 2004 : 190 : 117-8
- Ryu , S., A.R. Huppmann, N. Sambangi, P. Takacs, and S.W. Kauma. 2007. Increased leukocyte adhesion to vascular endothelium in preeclampsia is inhibited by antioxidants, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(4), 1-8
- Samuel E, Meilany D. 2013. *Gambaran Histopatologi Plasenta Pada kehamilan Dengan Preeklamsia*. Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*. Volume 1, Nomor 2, hlm. 1069-1074.
- Sankaralinga, S., I. A. Arenas, and S.T. Davidge. 2004. Preeclampsia : Current Understanding Of The Molecular Basis of Vascular Dysfunction. *Expert review in molecular medicine*, 8(3)
- Sadler TW. 2000. *Langman's Medical Embriology* (Embriologi kedokteran Langman). Jakarta: EGC. Brools MD, 2011
- Shearer, J. K. 2008. *Reproductive Anatomy and Physiology of Dairy Cattle*. University of Florida, Florida
- Siburian, J., dan R. Marlinza. 2009. Efek Pemberian Ekstrak Akar Pasak Bumi (*Eurycoma Longifolia Jack*) Pada Tahap Prakopulasi Terhadap Fertilitas Mencit (*Mus Musculus L.*) Betina. *Jurnal Biospecies*, Volume 2 No. 2, Juni 2009, hlm 24 – 30.
- Somala, L. 2006. Sifat Reproduksi Mencit (*MusMusculus*) Betina yang Mendapat Pakan Tambahan Kemangi (*Ocimum Basilicum*) Kering. Program Studi Teknologi Produksi Ternak Fakultas Peternakan. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suardi D dan I Ridwan 2009. Beras Hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 31(2): 9-10.
- Suckow, M.A., S.H. Weisbroth., and C.L Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier. San Diego.
- Sukra Y. 2000. *Wawasan Ilmu Pengetahuan Embrio Benih Masa Depan*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional Pasca sarjana, Institut Pertanian Bogor
- Sunarni, T. 2007. Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepal (*Stelechcarpus burahol (Bl.) Hook f & Th*). *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(3), 111-116.

- Sutharut, J., and J. Sudarat. 2012. Total Anthocyanin Content And Antioxidant Activity Of Germinated Colored Rice. *International Food Research Journal* 19(1): 215-221
- Taddei S, A. Viridis, L Ghadom, I Sudono, and A. Salvetti. 2002. Effects Antihypertensive Drugs on Endothelial Dysfunction. *Drugs*, 62: 265-284.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Vatish,. M. 2006. *Hormonal Regulation of Placental Nitric Oxide and Pathogenesis of Pre-Eclampsia*. Endocrinology and Metabolism, Division of Clinical Sciences, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK. *Trends Mol Med* 12 (5), 223-233.
- Wang Y, J.S Alexander. 2000. Placental Pathophysiology in Preclampsia. *Pathophysiology* ; 6: 261-270.
- Wang Z., C. Liu, B. Zhao, K. Pei, L. Tian, X. Ma. 2009 Expressional and epigenetic alterations of placental matrik metalloproteinase-9 in preeclampsia, *Gynecologic Endocrinology* 26 (2): 96-102.
- Wibowo B., T. Rachimhadi, 2006. Preeklampsia dan Eklampsia, dalam : Ilmu Kebidanan. Edisi III. Jakarta.Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, pp. 281-99.
- Wiknjosastro, H., 2002. *Ilmu Kebidanan*. Ketiga ed. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Widjiati. E.P., V.F. Hestianah, E.M. Hendrawan, Luqman, dan R. Sukamto. 2014. Pengaruh pemberian partikulat matter pada tikus (*Rattusnovergicus*) bunting terhadap cacat konginetal dan resorbsi embrio. *Jurnal Veterinaria Medika* 7 (1), 31-36.
- Wim T. Komplikasi Akut Pada Preeklampsia. Palembang.Universitas Sriwijaya. 2002.
- Wolfensohn, S., and M, Lloyd. 2013, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 4th ed., Wiley-Blackwell, West Sussex, 234.
- Yasemin, Azize dan dkk 2012. Significance of platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressions in preeclamptic placentae. *Endocrine* (2012) 42:125–13.

Yelumalai, S, K. Subramanian, S.Z. Omar, R. Qvist, S. Muniandy. 2010. Angiogenic Factors in the pathogenesis and Pathophysiology of Preeclampsia : A Mini review : *Biomedical Research*, 21(3), pp. 246-251.





LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:487-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PERBANDINGAN PEMBERIAN NIPEDIPINE DENGAN
ANTOSIANIN (*Oryza sativa* L.) PADA TIKUS MODEL
FRE-EKLAMSA YANG DIINDUKSI SURAMIN
TERHADAP KADAR ANGIOSTENSIN II PADA UTERUS
DAN ICAM-1 PADA PLASENTA SERTA BERAT BADAN
LAHIR DAN DAN PLASENTA FETUS

PENELITI : YUDIT OKTANELLA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 10 Februari 2016
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Surat Keterangan Sehat Tikus



UNIVERSITAS GADJAH MADA

**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT – UGM)**

Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan

Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM

Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN

NO : 372/LP3HP/25/V/2016

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : drh. Yudit Oktanella, M.Si.
NIM : -
Institusi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang

Pada bulan Mei 2016 membeli Tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) Srain Wistar betina usia 3 bulan sejumlah 40 (Empat puluh) ekor dan jantan sejumlah 10 (Sepuluh) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih vertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang Jawa Timur dan akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian.

Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

Yogyakarta, 25 Mei 2016
Kabid Unit Pra- Klinik LPPT UGM

Dr. drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012

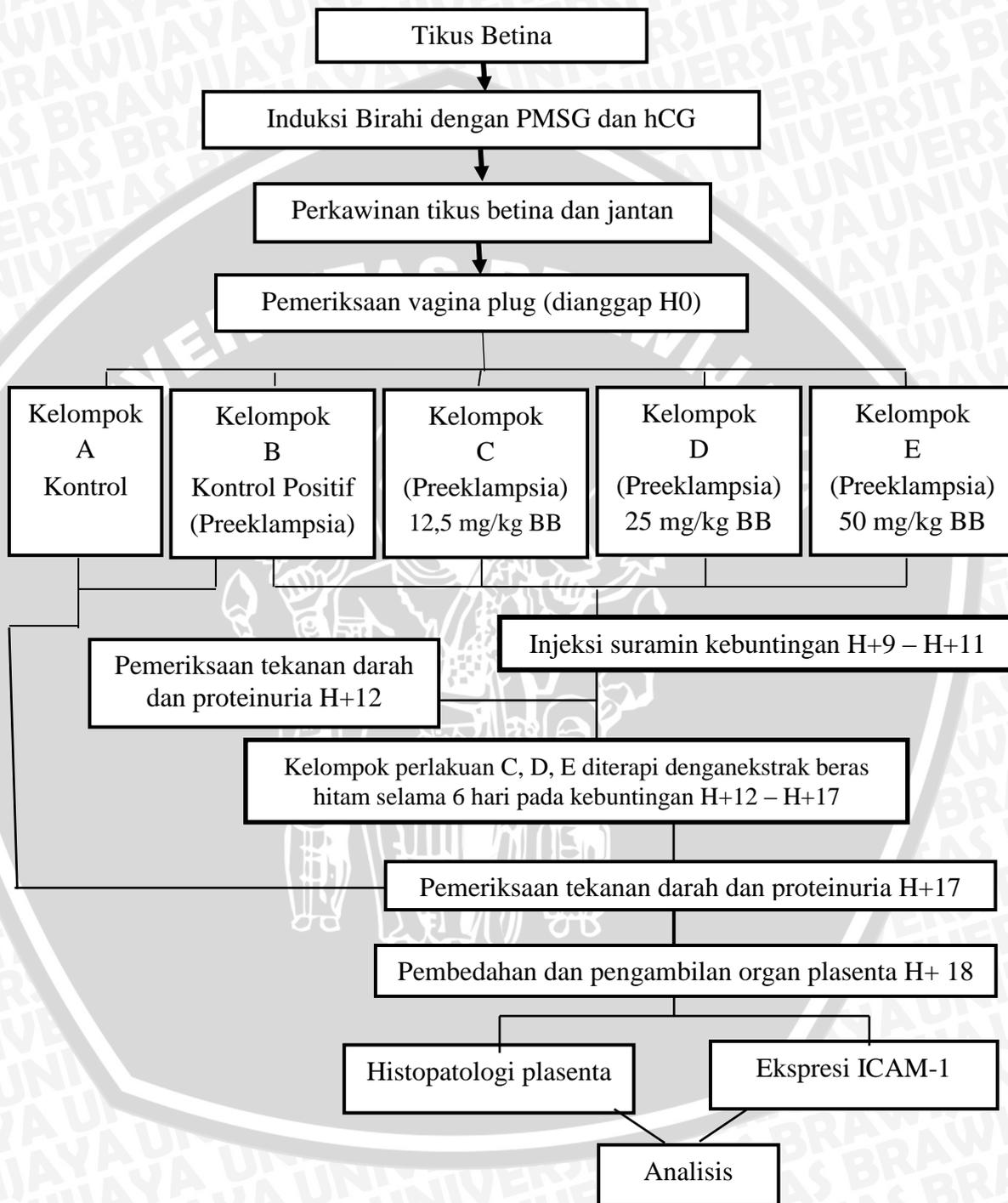


Lampiran 3. Kerangka Operasional

A. Rancangan Perlakuan

1. Tikus betina diberikan induksi birahi dengan PMSG dan hCG, kemudian dikawinkan dengan pejantan. Pemeriksaan vagina plug, jika terdapat vagina plug dianggap (H₀).
2. Pemeriksaan tekanan darah dan proteinuria pada hari kebuntingan H+8
3. Injeksi suramin secara intraperitoneal 70mg/Kg BB pada hari kebuntingan H+9, H+10, H+11
4. Pemeriksaan tekanan darah dan proteinuria pada hari kebuntingan H+12
5. Pemberian terapi dengan ekstrak beras hitam dengan dosis 12,5 mg/KgBB dan 25 mg/KgBB dan 50 mg/ Kg BB secara per-oral menggunakan sonde lambung pada hari kebuntingan H+10 sampai dengan H+17. Kelompok control positif tidak diberikan terapi ekstrak beras hitam.
6. Pemeriksaan tekanan darah dan proteinuria pada hari kebuntingan H+12 dan H+ 17.
7. Pembedahan dilakukan pada hari kebuntingan H+18 pada semua kelompok perlakuan.
8. Pengambilan organ plasenta dilakukan untuk pemeriksaan gambaran histopatologi plasenta dengan pewarnaan Hematoxylin eosin serta pemeriksaan ekspresi *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) dengan metode imunohistokimia.

Lampiran 4. Rancangan Penelitian



LAMPIRAN 5**Penghitungan Dosis hCG dan PMSG****- PMSG 1000 IU**

Dosis untuk setiap ekor tikus = 10 IU

Pengenceran 1 = 1000 IU = 1 mL

$$100 \text{ IU} = n \text{ mL}$$

$$n \text{ mL} = 1 \times 100 / 1000$$

$$= 1/10$$

1 mL PMSG 1000 IU + 9 mL pengencer = 100 IU PMSG (dalam 10 mL larutan mengandung 100 IU PMSG)

Pengenceran 2 = 100 IU = 1 mL

$$10 \text{ IU} = n \text{ mL}$$

$$n \text{ mL} = 1 \times 10 / 100$$

$$= 1/10$$

1 mL PMSG 100 IU + 9 mL pengencer = 10 IU PMSG (dalam 10 mL larutan mengandung 10 IU PMSG)

Pemberian untuk setiap ekor tikus = 0,1 mL

Jumlah total tikus = 20 ekor

Jumlah PMSG yang dibutuhkan = 0,1 mL X 20 ekor = 2 mL

Jadi dilakukan pengenceran sebanyak 0,2 mL PMSG 100 IU dan ditambahkan 1,8 mL pengencer

- hCG 1500 IU

Dosis untuk setiap ekor tikus = 10 IU

Pengenceran 1 = 1500 IU = 1 mL

$$100 \text{ IU} = n \text{ mL}$$

$$n \text{ mL} = 1 \times 100 / 1500$$

$$= 1/15$$

1 mL hCG 1000 IU + 14 CC pengencer = 100 IU hCG

Pengenceran 2 = 100 IU = 1 mL

$$10 \text{ IU} = n \text{ mL}$$

$$n \text{ mL} = 1 \times 10 / 100$$

$$= 1/10$$

1 mL hCG 100 IU + 9 mL pengencer = 10 IU hCG

Pemberian untuk setiap ekor tikus = 0,1 mL

Jumlah total tikus = 20 ekor

Jumlah hCG yang dibutuhkan = 0,1 mL X 20 ekor = 2 mL

Jadi dilakukan pengenceran sebanyak 0,2 mL hCG 100 IU dan ditambahkan 1,8 mL pengenceran

lampiran 6

Pengenceran PMSG dan hCG

Langkah Kerja Pengenceran PMSG

PMSG 1000

- diambil 1 mL PMSG 1000 IU dan ditambahkan dengan 9 mL pengencer sehingga menjadi PMSG 100 IU sebanyak 10 mL
- diambil 0,2 mL PMSG 100 IU dan ditambahkan 1,8 mL pengencer sehingga menjadi PMSG 10 IU sebanyak 2 mL

Hasil

Langkah Kerja Pengenceran hCG

hCG 1500

- diambil 1 mL PMSG 1500 IU dan ditambahkan dengan 14 mL pengencer sehingga menjadi hCG 100 IU sebanyak 15 mL
- diambil 0,2 mL hCG 100 IU dan ditambahkan 1,8 mL pengencer sehingga menjadi hCG 10 IU sebanyak 2 mL

Hasil

Lampiran 7

1. Perhitungan dosis pemberian suramin

Diketahui pemberian pada yaitu 70 mg/kg BB.

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= 0,2 \text{ kg} \times 70 \text{ mg/kg BB} \\ &= 14 \text{ mg/ ekor} \end{aligned}$$

2. Perhitungan perlakuan pemberian ekstrak beras hitam

Dosis Ekstrak beras hitam yang diberikan = 12,5 mg/kg BB; 25 mg/kg BB; 50 mg/kg BB

Perlakuan 1

$$\text{Dosis} : \frac{\text{BB (kg)} \times \text{dosis ekstrak beras hitam}}{\text{Kosentrasi mg/ml}}$$

$$: \frac{0,2 \text{ kg} \times 12,5 \text{ mg/kg BB}}{1000 \text{ mg/ml}}$$

$$: 0.0025 \text{ mL / tikus}$$

Total ekstrak beras hitam yang dibutuhkan pada 1 kelompok perlakuan 1 adalah

$$: 0.0025 \text{ mL} \times 4 \text{ ekor tikus}$$

$$: 0.01 \text{ mL dilarutkan dalam 4 mL CMC-Na}$$

Pemberian dilakukan dengan cara disondekan pada masing-masing tikus sebanyak 1 mL.

Perlakuan 2

$$\text{Dosis} : \frac{\text{BB (kg)} \times \text{dosis ekstrak beras hitam}}{\text{Kosentrasi mg/ml}}$$

$$: \frac{0,2 \text{ kg} \times 25 \text{ mg/kgBB}}{1000 \text{ mg/mL}}$$

$$: 0.005 \text{ mL / tikus}$$

Total ekstrak beras hitam yang dibutuhkan pada 1 kelompok perlakuan 1 adalah

$$: 0.05 \text{ mg} \times 4 \text{ ekor tikus}$$

$$: 0.02 \text{ mL dilarutkan dalam 4 mL CMC-Na}$$

Pemberian dilakukan dengan cara disondekan pada masing-masing tikus sebanyak 1 mL.

Perlakuan 3

$$\text{Dosis} : \frac{\text{BB (kg)} \times \text{dosis ekstrak beras hitam}}{\text{Kosentrasi mg/ml}}$$

Kosentrasi mg/mL

: $0,2 \text{ kg} \times 50 \text{ mg/kgBB}$

1000 mg/mL

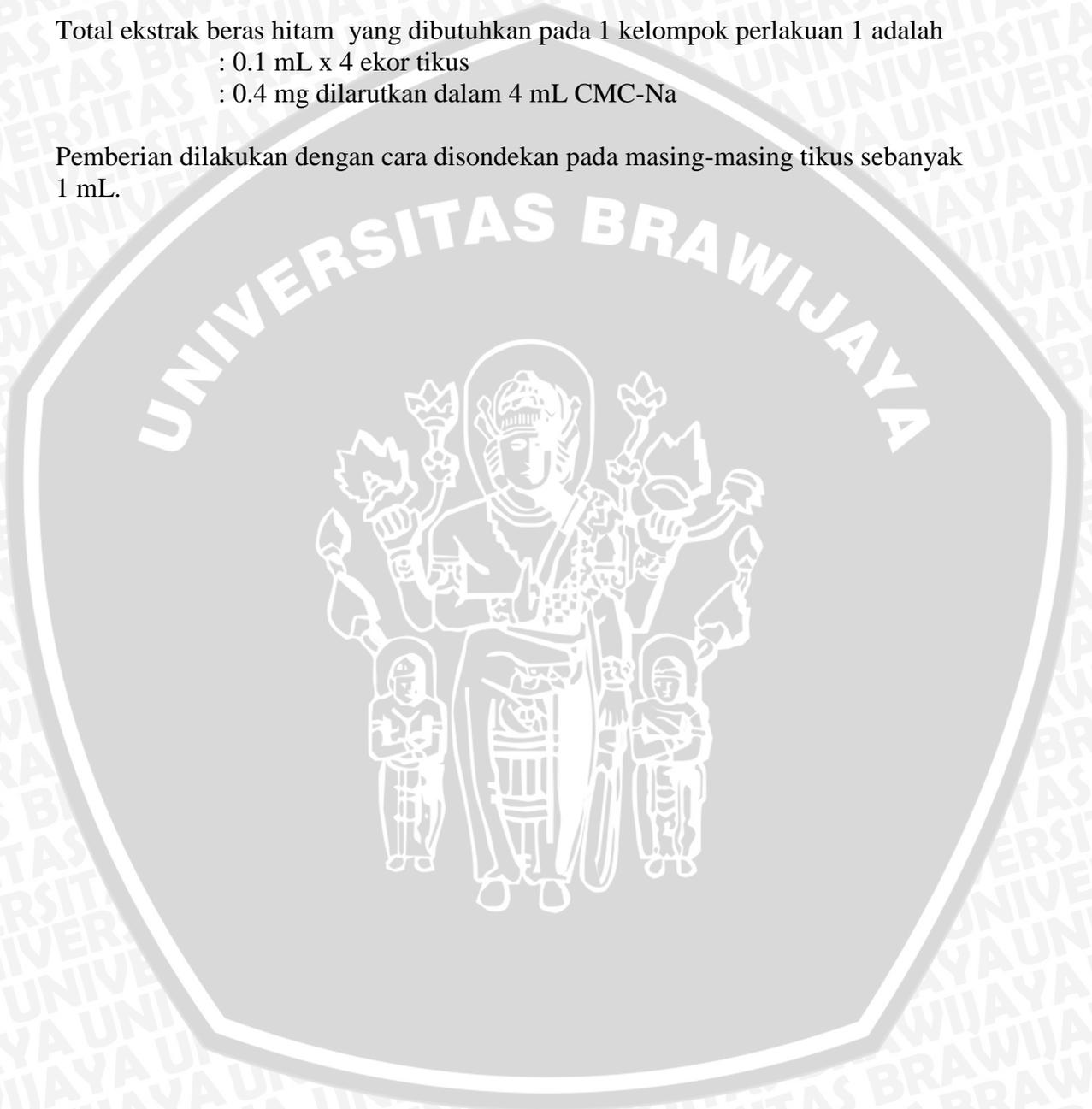
: 0.01 mL / tikus

Total ekstrak beras hitam yang dibutuhkan pada 1 kelompok perlakuan 1 adalah

: 0.1 mL x 4 ekor tikus

: 0.4 mg dilarutkan dalam 4 mL CMC-Na

Pemberian dilakukan dengan cara disondekan pada masing-masing tikus sebanyak 1 mL.



Lampiran 8Pembuatan Tikus Betina Bunting secara *in vivo*Tikus putih (*Rattus norvegicus*) Betina

- Dilakukan penyuntikan PMSG 10 IU
- Dilakukan penyuntikan HCG 10 IU setelah 48 jam
- Dikawinkan dengan tikus jantan secara *monomating*
- Diperiksa adanya sumbat vagina setelah 17 jam pasca perkawinan
- Dianggap bunting hari ke nol bila terdapat sumbat vagina

Hasil



Lampiran 9

Cara Pengambilan Organ

Tikus (*Rattus norvegicus*) bunting

- Dilakukan dislokasio os. Servicalis
- Diletakkan di atas papan seksi
- Dilakukan desinfeksi menggunakan alkohol 70%
- Dilakukan pembedahan dengan cepat dari bagian abdomen menuju ke arah os coste
- Diambil organ uterusnya
- Dipisahkan uterus dengan plasenta
- Disimpan plasenta pada pot sampel yang berisi formalin 10%

Hasil



Lampiran 10

IHK ICAM-1 Plasenta

Plasenta

- Dilakukan deparafinisasi sediaan jaringan yang telah dipotong dari blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μ m
- Dilakukan rehidrasi dengan alcohol bertingkat
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x
- *Diummusking* dengan buffer sitrat pH 6 sebanyak 10mM dan 1 mM
- EDTA pH 8 selama 10-20 menit pada suhu 90oC
- Dicuci dengan menggunakan aquades
- Di *blocking peroksidase* jaringan dengan menggunakan H₂O₂ 3% dalam methanol selama 10 menit
- Dicuci dengan PBS sebanyak 3x
- *Diblocking slide* dengan susu skim 1% dalam PBS-tween selama 30 menit
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x
- Diberi antibodi primer *monoclonal mouse anti human ICAM-1 (CD 54)* cat. No: c2969 yang diencerkan 100 kali dengan perbandingan 1:100 dalam susu skim 1% dan PBS-tween
- Disimpan pada suhu 4oC selama kurang lebih 24 jam
- Dicuci dengan PBS sebanyak 3x
- Ditambahkan antibodi sekunder *biotinylated goat anti-mouse* dengan perbandingan 1:300 dalam PBS dan dibiarkan selama 1 jam,
- Dicuci dengan PBS sebanyak 3x
- Ditetesi SA-HRP (*Strept Avidin Horse Radish Peroxysidase*) dengan perbandingan 1:500 dalam PBS dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang
- Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x
- Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang
- Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x
- Dilakukan *counterstaining slide* dengan *Mayer Hematoxyler* selama 10 menit
- Dibilas dengan aquades dan dikeringkan selama kurang lebih 1 malam
- Diproses *mounting* dengan menggunakan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass*.
- Diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x

Hasil

Lampiran 11

Pewarnaan Histopatologi Plasenta

Plasenta

- Difiksasi dengan formalin 10%
- Dilakukan *Stopping point* dengan alcohol 70%
- Dilakukan dehidrasi menggunakan alcohol dengan kosentrasi bertingkat mulai 80% sampai 100%
- Dijernihkan dengan *xylol*
- Ditanam dalam parafin
- Disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 50 μm
- Diletakkan pada gelas objek yang telah dilapisi alcohol 70%
- Disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam
- Diwarnai dengan haematoksilin-eosin

Hasil



Lampiran 12.

Data tekana darah dan proteinuria

Perlakuan	Rata-rata TD H+12 (mmHg)±SD	Rata-rata TD H+17 (mmHg)±SD
Kelompok A	112,40±3,55	131,52±2,86
Kelompok B	189,47±13,38	196,18±2,86
Kelompok C	186,75±6,84	180,58±6,13
Kelompok D	187,92±6,16	167,98±2,76
Kelompok E	189,70±4,24	121,82±8,71

Data Proteinuria

Perlakuan	Rata-rata Proteinuria+12 (mg/dL)±SD	Rata-rata Proteinuria H+17 (mg/dL)±SD
Kelompok A	7,76±1,76	7,40±1,56
Kelompok B	20,67±0,93	21,52±0,86
Kelompok C	20,35±0,52	19,18±0,46
Kelompok D	20,42±0,46	12,19±1,44
Kelompok E	20,33±0,68	6,85±0,39

Keterangan :A (Kontrol negatif), B (Kontrol positif), C (Terapi dosis 12,5 mg/kg BB),
D (Terapi dosis 25 mg/kg BB), E (Terapi dosis 50 mg/kg BB)

Lampiran 13.

Perhitungan peningkatan dan penurunan ekspresi ICAM-1 plasenta.

- a. Presentasi Peningkatan % = $\frac{\text{Rataan Kontrol (+)} - \text{Rataan Kontrol (-)}}{\text{Rataan kontrol (-)}} \times 100\%$
- b. Presentasi Penurunan % = $\frac{\text{Rataan Kontrol (+)} - \text{Rataan Perlakuan}}{\text{Rataan Kontrol (+)}} \times 100\%$
- c. Presentasi Peningkatan % = $\frac{59,4500 - 3,6750}{3,6750} \times 100\%$
= 151.76 %
- d. Presentase Penurunan % = $\frac{59,4500 - 32,7575}{59,4500} \times 100\%$
= 44,89 %
- e. Presentasi penurunan % = $\frac{59,4500 - 16,6375}{59,4500} \times 100\%$
= 72.01 %
- f. Presentasi penurunan % = $\frac{59,4500 - 4,1250}{59,4500} \times 100\%$
= 93.06 %



Lampiran 14. Data Uji Statistika Ekspresi ICAM-1 Plasenta

Tabel 1. 15.1 Uji Normalitas data

		Perlakuan
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	3.0000
	Std. Deviation	1.45095
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.692
Asymp. Sig. (2-tailed)		.725

P > 0,05

Data terdistribusi normal

Tabel L 15.2 Uji Homogenitas

ICAM1			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.743	4	15	.068

P > 0,05

Data homogen

Tabel L 15.3 Uji Statistik ANOVA

ANOVA					
ICAM1	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8773.891	4	2193.473	163.902	.000
Within Groups	200.742	15	13.383		
Total	8974.633	19			

P > 0,05



Tabel L 15.4 Uji Lanjutan BNJ

ICAM1

Tukey HSD

(I) perlakuan n	(J) perlakuan n	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-55.77500*	2.58678	.000	-63.7628	-47.7872
	3	-29.08250*	2.58678	.000	-37.0703	-21.0947
	4	-12.96250*	2.58678	.001	-20.9503	-4.9747
	5	-.45000	2.58678	1.000	-8.4378	7.5378
2	1	55.77500*	2.58678	.000	47.7872	63.7628
	3	26.69250*	2.58678	.000	18.7047	34.6803
	4	42.81250*	2.58678	.000	34.8247	50.8003
	5	55.32500*	2.58678	.000	47.3372	63.3128
3	1	29.08250*	2.58678	.000	21.0947	37.0703
	2	-26.69250*	2.58678	.000	-34.6803	-18.7047
	4	16.12000*	2.58678	.000	8.1322	24.1078
	5	28.63250*	2.58678	.000	20.6447	36.6203
4	1	12.96250*	2.58678	.001	4.9747	20.9503
	2	-42.81250*	2.58678	.000	-50.8003	-34.8247
	3	-16.12000*	2.58678	.000	-24.1078	-8.1322
	5	12.51250*	2.58678	.002	4.5247	20.5003
5	1	.45000	2.58678	1.000	-7.5378	8.4378
	2	-55.32500*	2.58678	.000	-63.3128	-47.3372
	3	-28.63250*	2.58678	.000	-36.6203	-20.6447
	4	-12.51250*	2.58678	.002	-20.5003	-4.5247

P> 0.05.



Tabel L 15.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

ICAM1

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	4	3.6750			
5	4	4.1250			
4	4		16.6375		
3	4			32.7575	
2	4				59.4500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

