

**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL (EVOO)
DALAM MENURUNKAN KADAR TUMOR NECROSIS
FACTOR ALPHA (TNF- α) DAN MENINGKATKAN
NITRIC OXIDE (NO) PADA TIKUS WISTAR MODEL
PREEKLAMPSIA**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :
DWI NORMA RETNANINGRUM
176070400111029**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

TESIS

PENGARUH *EXTRA VIRGIN OLIVE OIL* (EVOO) DALAM MENURUNKAN KADAR *TUMOR NECROSIS FACTOR* *ALPHA* (TNF- α) DAN MENINGKATKAN *NITRIC OXIDE* (NO) PADA TIKUS WISTAR MODEL PREEKLAMPSIA

Oleh :

DWI NORMA RETNANINGRUM

176070400111029

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal: 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING

Dr.dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K)

NIP 196902041999031008

Ketua

Dr. rer. nat. Tri Yudani MR, M. App. SC

NIP 196511051993032001

Anggota

Malang, 29 JUL 2019

Universitas Brawijaya

Fakultas Kedokteran

Dekan,



Dr. dr. Wisnu Barlianto, M. Si. Med., Sp.A (K)

NIP 1973072620050411008



TESIS

**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL (EVOO) DALAM
MENURUNKAN KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR
ALPHA (TNF- α) DAN MENINGKATKAN NITRIC OXIDE (NO)
PADA TIKUS WISTAR MODEL PREEKLAMIA**

Oleh :

DWI NORMA RETNANINGRUM
176070400111029

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr.dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG (K)
NIP 196902041999031008

Ketua

Dr. rer. nat. Tri Yudani MR, M. App.SC
NIP 196511051993032001

Anggota Penguji

Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp.OG (K)
NIP 197103232006041009
Anggota Penguji

Dr. Sri Winarsih, Apt., M. Si
NIP195408231981032001
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 23 Juli 2019

Mahasiswa,



Nama : Dwi Norma Retnaningrum
NIM : 176070400111029
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

HALAMAN PERUNTUKAN



Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Ayahanda dan ibunda tercinta,
Suamiku dan anak tersayang
Teguh Satria Wibawa dan
Kamelia Azkya Wibawa

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas Tesis dengan judul “Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) Dalam Menurunkan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Tnf- α) dan Meningkatkan *Nitric Oxide* (NO) Pada Tikus Wistar Model Preeklamsia”.

Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kajian tentang Preeklamsia, Kadar *Tumor Necrosis Factor- α* (Tnf- α), *Nitric Oxide* (NO), *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO), dan Tikus galur wistar model preeklamsia. Dengan tulus hati penulis sampaikan timakasih kepada STIKES Widyagama Husada Malang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis menempuh studi lanjut di Pascasarjana Universitas Brawijaya melalui program ijin belajar.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan rasa hormat, timakasih an penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR,M.S selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenapajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Keokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si. Med., Sp.A (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Univesitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan, sekaligus sebagai

pembimbing 1 yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan selama penyusunan tesis.

4. Dr. rer. nat. Tri Yudani MR., M.App., SC selaku pembimbing 2 yang telah banyak memberikan semangat, bimbingan dan arahan selama penyusunan tesis.

5. Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp. OG (K) selaku penguji yang telah mendidik, membimbing dan memberikan bekal ilmunya.

6. Dr. Sri Winarsih, Apt., M.Si selaku penguji yang telah memberikan masukan, arahan dan teknik penulisan untuk kesempurnaan penyusunan tesis ini.

7. Dr. Dra. Ettie Rukmigarsari, M.Kes selaku konsultan penelitian dan analisis data statistik atas bantuannya dalam penelitian hingga selesai.

8. Kedua orang tua, kedua mertua, suami dan putri tercinta yang selalu memberikan dukungan penuh untuk kesuksesan ini.

9. Teman-teman 1 tim penelitian, Afniari Maharani, Agnestia naming, Alfima Rahasti, Wenny Rahmawati dan Yulia Silvani atas dukungn, support dan segala bantuan selama menyelesaikan tesis ini.

10. Teman-teman magister Kebidanan angkatan tahun 2017 yang telah berjuang bersama menempuh pendidikan dan menyelesaikan studi ini.

Penulis mohon maaf apabila dalam penulisan proposal tesis ini terdapat banyak kesalahan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari dewan penguji. Semoga tesis ini dapat berjalan sampai dengan akhir penelitian dengan baik dan memberikan manfaat.

Atas perhatiannya, penulis sampaikan terimakasih.

Malang, Juli 2019

Penulis

RINGKASAN

Dwi Norma Retnaningrum

Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) Dalam Menurunkan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan Meningkatkan *Nitric Oxide* (NO) Pada Tikus Wistar Model Preeklamsia. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K); Anggota: Dr. rer. Nat. Tri Yudani MR., M. App., SC

Belum adanya penyebab pasti awal terjadinya preeklamsia, namun diduga disebabkan oleh hipoksia plasenta dan disfungsi endotel. Kondisi tersebut mengakibatkan terjadi menurunnya aliran darah arteri spiralis yang berakibat terjadinya kegagalan invasi trofoblas atau remodeling arteri spiralis pada awal kehamilan sehingga tidak mampu melebar dengan sempurna. Sitokin-sitokin pro inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) akan terpicu karena kondisi hipoksia. Pada kondisi preeklamsia TNF- α berperan sebagai pemicu peran aktif terjadinya disfungsi endotel. Keadaan disfungsi endotel akan memicu terjadinya vasokonstriksi yang menyebabkan tekanan regulasi pada arteri, sehingga menyebabkan berkurangnya pembentukan vasodilatasi diantaranya adalah *nitric okside* (NO).

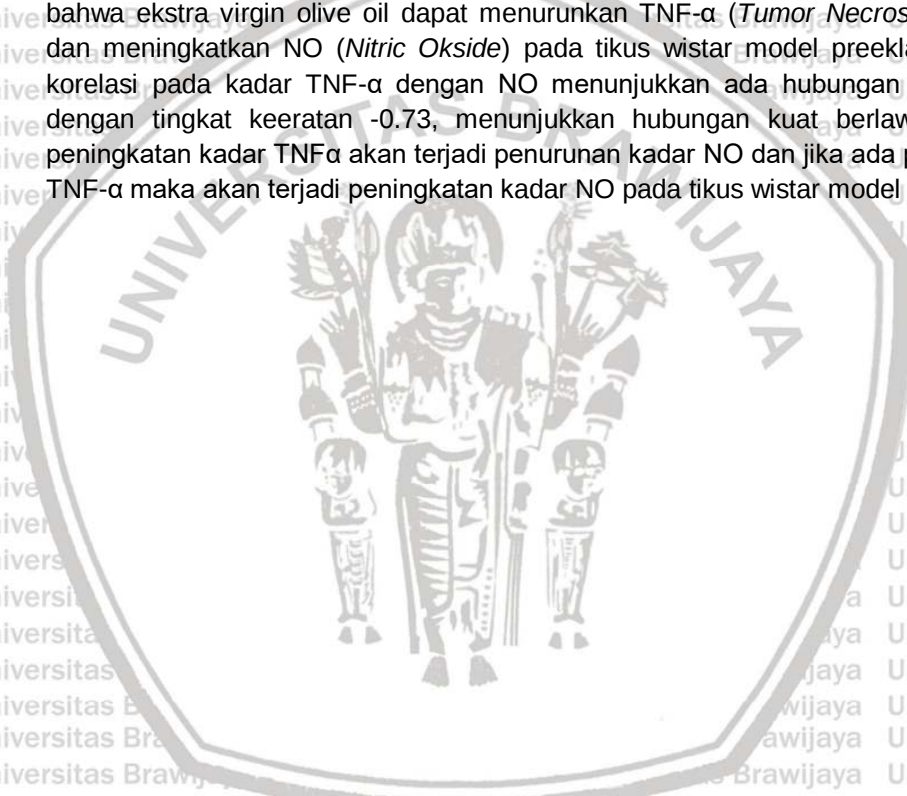
TNF- α merupakan salah satu sitokin pro inflamasi yang dapat memicu terjadinya disfungsi endotel karena kebocoran pada pembuluh darah endotel dan apoptosis pada sel-sel endotel. Disfungsi endotel akan mengakibatkan ketidakseimbangan antara vasokonstriktor dan vasodilator. NO adalah salah satu zat mediator parenkin yang merupakan vasodilator dan menstimulasi otot polos. Beberapa penelitian tingkat NO yang rendah menunjukkan peningkatan vasokonstriksi yang berakibat tekanan darah meningkat.

Zaitun merupakan tanaman yang banyak ditemukan di daerah mediterania yang dimanfaatkan untuk kesehatan sejak zaman dahulu. *Extra virgin olive oil* (EVOO) diperoleh dari zaitun dengan cara mekanik yang tidak menyebabkan perubahan pada komposisi minyak. Penelitian tentang EVOO telah dilakukan oleh berbagai peneliti dalam spektrum luas yang mengeksplorasi kandungannya sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Kandungan polifenol dan tokoferol dapat digunakan sebagai anti inflamasi dan juga antioksidan. Hasil pemeriksaan kandungan antioksidan didalam EVOO sebesar 48,56 yang berarti sangat kuat. Kandungan hidroksitirosol pada polifenol didalam EVOO dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi dengan inaktivasi NF- κ B sehingga menghambat produksi TNF- α . EVOO sebagai antioksidan bekerja dengan menghambat ROS dengan mengikat $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ dan $ONOO^{\cdot}$ sehingga menyebabkan disfungsi endotel yang berakibat terjadinya penurunan kadar NO.

Studi ini bertujuan untuk membuktikan peranan EVOO dalam menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan NO pada tikus wistar model preeklamsia. Penelitian eksperimental ini menggunakan pendekatan *post test only control group design*. Kadar TNF- α dan NO pada tikus wistar model preeklamsia akan diukur setelah diberikan perlakuan dengan pemberian berbagai dosis EVOO dengan cara di sonde. Pada studi ini menggunakan 20 ekor tikus wistar bunting yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok 4 ekor tikus wistar bunting. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tikus wistar bunting normal dengan injeksi PBS. Kelompok kontrol positif adalah kelompok tikus wistar bunting yang diinjeksi L-NAME 125 mg/kgBB. Kelompok perlakuan 1 merupakan kelompok tikus wistar bunting di injeksi L-NAME 125 mg/kgBB dan diberikan EVOO 0,5 mL/hari. Kelompok perlakuan 2 adalah kelompok tikus wistar bunting di injeksi L-NAME dan diberikan EVOO 1 mL/hari. Kelompok perlakuan 3 adalah

kelompok tikus wistar bunting di injeksi L-NAME 125 mg/kgBB dan diberikan EVOO 2 mL/hari. Analisis data menggunakan bantuan SPSS 23 for Windows, dilakukan uji normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk dengan $p\text{-value} > 0.05$ yang menunjukkan data terdistribusi normal. Tikus wistar model preeklamsia mengandung kadar TNF- α sangat tinggi bila dibandingkan dengan bunting normal ($p\text{-value} = 0.002$). Serta nilai rerata kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia lebih rendah dari pada tikus bunting normal ($p\text{-value}=0.004$).

Berdasarkan hasil uji Anova one way pada data kadar TNF- α dan NO pada kelima kelompok pengamatan didapatkan ada perbedaan bermakna. Pada pemeriksaan kadar TNF- α ($p\text{-value}=0.011$) dan pemeriksaan kadar NO ($p\text{-value}=0.15$). Hasil dari uji LSD kadar TNF- α didapatkan bahwa dari ketiga dosis perlakuan menunjukkan ada perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol positif. Untuk uji LSD pada kadar NO menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 3. Sedangkan dosis yang paling optimum untuk menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar NO adalah dosis 2 mL/hari. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstra virgin olive oil dapat menurunkan TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) dan meningkatkan NO (Nitric Okside) pada tikus wistar model preeklamsia. Untuk uji korelasi pada kadar TNF- α dengan NO menunjukkan ada hubungan yang bermakna dengan tingkat keeratan -0.73, menunjukkan hubungan kuat berlawanan. Bila ada peningkatan kadar TNF α akan terjadi penurunan kadar NO dan jika ada penurunan kadar TNF- α maka akan terjadi peningkatan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia.



SUMMARY

Dwi Norma Retnaningrum

The Effect of *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) on *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) Level and Increase *Nitric Oxide* (NO) on *Preeclampsia Wistar Rat*. Midwifery Master Degree Program. Faculty of Medicine. The University of Brawijaya. Head of Supervisory Board: Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K); Member of Supervisory Board: Dr. rer. Nat. Tri Yudani MR., M. App., SC

The initial exact cause of preeclampsia has not been found, but it is suspected to be caused by placental hypoxia and endothelial dysfunction. This condition results in decreased spiral artery blood flow which results in trophoblast invasion failure or spiral artery remodelling at the beginning of pregnancy which is not able to widen perfectly. Proinflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) is triggered due to hypoxic conditions. In the condition of preeclampsia, TNF- α acts as a trigger for endothelial dysfunction. The condition of endothelial dysfunction will trigger vasoconstriction which causes regulatory pressure in the arteries, causing a reduction in vasodilation formation including nitric oxide (NO).

TNF- α is one of the proinflammatory cytokines that can lead to endothelial dysfunction due to leaks in the endothelial arteries and apoptosis in endothelial cells. Endothelial dysfunction will result in an imbalance between vasoconstrictor and vasodilator. NO is one of the parenkin mediators which is a vasodilator and stimulates the smooth muscle. In some studies, low levels of NO showed increased vasoconstriction which resulted in increased blood pressure.

Olive is a plant that is commonly found in the Mediterranean region which has been used for health since ancient times. Extra virgin olive oil (EVOO) is obtained from olives in a mechanical way that does not cause changes in the composition of the oil. Research on EVOO has been conducted by several researchers in a broad spectrum that explores its content as an anti-inflammatory and antioxidant. The content of polyphenols and tocopherols can be used as anti-inflammatory and antioxidants. The result of the antioxidant content in the EVOO is 48.56 which means it is very strong. The hydroxytyrosol content of polyphenols in EVOO can inhibit the production of proinflammatory cytokines by inhibiting NF-kB so that inhibiting TNF- α production

This study aims to prove the role of EVOO in reducing TNF- α levels and to increase NO in Wistar rats in the model of preeclampsia. This experimental study used a post-test only control group design approach. The levels of TNF- α and NO in Wistar rats in the model of preeclampsia will be measured after being treated with various doses of EVOO use of sonde. This study used 20 pregnant Wistar rats divided into 5 groups, each group has 4 pregnant Wistar rats. The negative control group was a group of normal pregnant Wistar rats with PBS injection. A positive control group is a group of pregnant Wistar rats injected with L-NAME 125 mg / kgBB. Treatment group 1 was a group of pregnant Wistar rats at L-NAME injection 125 mg kgBB and given EVOO 0.5 mL/day. The second treatment group was pregnant Wistar rats in L-NAME injection and given EVOO 1 mL/day. The treatment group 3 was a group of pregnant Wistar rats at L-NAME injection 125 mg/kg body weight and given EVOO 2 mL/day. The data was analysed using SPSS 23 for Windows, the normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test with p value > 0.05 which was normally distributed. Wistar rats in the preeclampsia model contain very high levels of TNF- α when compared to normal pregnant (p = 0.002). As well as the mean value of NO levels in Wistar rats, was lower than in normal pregnant rats (p = 0.004).

Based on the results of the One Way Anova test on TNF- α and NO levels in the five observation groups, there were significant differences. On examination of TNF- α levels (p-value = 0.011) and NO levels (p-value = 0.15). The results of the LSD test for TNF- α levels showed that from the three treatment dose these were significant differences with the positive control group. For the LSD test at the NO level, there is a significant difference between the positive control and the treatment group 3. The most optimum dose for reducing TNF- α levels and increasing NO levels is a dose of 2 mL/day. From this study, it can be concluded that extra virgin olive oil can reduce TNF- α (tumour necrosis factor-alpha) and increase NO (nitric oxide) in Wistar rats in the preeclampsia model. To test the correlation on levels of TNF- α with NO, there is a significant relationship with the level of closure -0.73, indicating a strong opposite relationship. If there is an increase in TNF- α levels there will be a decrease in NO levels. Whereas if there is a decrease in TNF- α levels, there will be an increase in NO levels in Wistar rats in the preeclampsia model.



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	5
1.3 Tujuan penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Konsep Dasar Preeklamsia	7
2.1.1 Definisi Preeklamsia	7
2.1.2 Klasifikasi Hipertensi	7
2.1.3 Patofisiologi Preeklamsia	8
2.2 Inflamasi Pada Preeklamsia	15
2.2.1 Definisi Inflamasi	15
2.2.2 Proses Inflamasi	15
2.2.3 Peran Sitokin Dalam Inflamasi	15
2.2.4 Respon Inflamasi Pada Preeklamsia	16
2.2.5 Peran TNF- α Pada preeklamsia	17
2.3 Disfungsi Endotel Pada Preeklamsia	17
2.3.1 Definisi Disfungsi Endotel	17
2.3.2 Marker Disfungsi Endotel	18
2.3.3 Akibat Disfungsi Endotel	19
2.4 <i>Tumor Necrosis Factor α</i> (TNF- α)	20
2.5 <i>Nitric Oxide</i> (NO)	22
2.6 N(G)-Nitro-L-Arginine MethylEster (L-NAME)	23
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Galur Wistar	24

2.7.1	Karakteristik tikus wistar.....	24
2.7.2	Siklus Reproduksi	26
2.7.3	Macam-Macam Cara Membuat Tikus Model Preeklamsia.....	27
2.8	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO).....	31
2.8.1	Tanaman Zaitun (<i>Olea europaea</i>).....	31
2.8.2	Taksonomi Tanaman Zaitun (<i>Olea europaea</i>).....	31
2.8.3	Kandungan dalam <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO)	32
2.8.4	Kualitas Minyak Zaitun	36
2.8.5	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> sebagai antioksidan dan antiinflamasi.....	37
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN		
3.1	Kerangka Teori Penelitian.....	41
3.2	Kerangka Konsep Penelitian	44
3.3	Hipotesis	46
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Jenis dan Desain Penelitian	48
4.2	Sampel Penelitian	48
4.2.1	Besar Sampel.....	48
4.2.2	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	49
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	50
4.4	Bahan dan Alat.....	50
4.4.1	Bahandan Alat Pemeliharaan Hewan Coba.....	50
4.4.2	Bahan dan Alat Perlakuan Hewan Coba.....	51
4.4.3	Bahan dan Alat Pembedahan Hewan coba	51
4.4.4	Bahan dan Alat Pemeriksaan NO	51
4.4.5	Bahan dan Alat Pemeriksaan TNF- α	52
4.4.6	Bahan dan Alat Perlakuan Hewan Cobal.....	52
4.5	Variabel Penelitian	52
4.6	Definisi Operasional	52
4.7	Prosedur Penelitian	54
4.7.1	Aklimatisasi Hewan Coba	54
4.7.2	Pemeliharaan Hewan Coba.....	54
4.7.3	Prosedur Pengawinan dan Pembuntingan Hewan Coba	55
4.7.4	Prosedur Pembuatan Hewan Coba Model Preeklamsia	56
4.7.5	Pengukuran Tekanan darah	57
4.7.6	Pengukuran Protein Urin	57
4.7.7	Penentuan Dosis EVOO.....	57
4.7.8	Pembedahan dan Pengambilan Bahan Pemeriksaan.....	59
4.7.9	Metode Pengukuran TNF- α	60
4.7.10	Metode Pengukuran NO.....	61
4.8	Alur Penelitian	62
4.9	Analisis Data	63
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		
5.1	Pembuatan Tikus Model Preeklamsia	64
5.2	Analisa Data.....	68
5.2.1	Hasil Uji Prasyarat Parametrik.....	68
5.2.2	Hasil Uji One Way ANOVA dan Multiple Comparasion	69
5.2.3	Hasil Uji Korelasi	74
BAB 6 PEMBAHASAN		

6.1 Pembuatan Tikus Model Preeklamsia	76
6.2 Pengaruh Pemberian EVOO terhadap Kadar TNF- α pada Tikus Model Preeklamsia	78
6.3 Pengaruh Pemberian EVOO terhadap Kadar NO pada Tikus Model Preeklamsia	81
6.4 Hubungan antara Kadar TNF- α dan Kadar NO Pada Tikus Wistar Model Preeklamsia	85
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	88
7.2 Saran	88
DAFTAR PUSTAKA	90
LAMPIRAN	104
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	120



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Data Nilai Fisiologis Tikus Wistar	25
Tabel 2.2 Kandungan <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO).....	33
Tabel 2.3 Komposisi Asam Lemak yang Terkandung Dalam Minyak Zaitun	34
Tabel 2.4 Manfaat Fenolat Zaitun/Minyak Zaitun pada Kesehatan.....	38
Tabel 2.5 Informasi Gizi <i>Borges Extra Virgin Olive Oil</i>	40
Tabel 4.1 Kelompok Penelitian	49
Tabel 4.2 Kadar Nutrisi Hewan Coba.....	50
Tabel 5.1 Karakteristik Tikus Model Preeklamsia.....	65
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Data	68
Tabel 5.3 Perbandingan Kadar TNF- α	69
Tabel 5.4 Perbandingan Kadar NO	72
Tabel 5.5 Hasil Uji Korelasi.....	75



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Perbandingan Invasi Trofoblas.....	10
Gambar 2.2 Kerja Sel-Sel Endotel.....	14
Gambar 2.3 Tanaman <i>Olea europaea</i>	32
Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian.....	41
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	44
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	62
Gambar 5.1 Tekanan Darah Sistolik Tikus Wistar Bunting Model Preeklamsia.....	66
Gambar 5.2 Tekanan Darah Diastolik Tikus Wistar Bunting Model Preeklamsia.....	67
Gambar 5.3 Rerata Kadar TNF- α Pada Tikus Wistar Bunting Model Preeklamsia	71
Gambar 5.4 Rerata Kadar NO Pada Tikus Wistar Bunting Model Preeklamsia.....	74



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kelaikan Etik	104
Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi	105
Lampiran 3. Bukti Accepted Jurnal	106
Lampiran 4. Analisa Data	107
Lampiran 5. Surat Keterangan Pembelian Tikus	112
Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian	113
Lampiran 7. Pencatatan Berat Badan Janin dan Induk Tikus Bunting	117
Lampiran 8 Hasil Uji Antioksidan EVOO	119



DAFTAR SINGKATAN

ACOG	: American Congress of Obstetricians and Gynecologists
Ach	: Asetilkolin
ADMA	: Asymmetrical demethylarginine
ATR	: Reseptor Angiotensin
AKI	: Angka Kematian Ibu
AT1-AA	: Angiotensin II Type 1-Receptor Autoantibody
CO	: Carbon Monoxide
CAT	: Catalase
CVD	: Cardio Vascular disease
cNOS	: Constitutive Nitric Oxide Sintase
DIC	: Disseminated Vascular Coagulation
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
EDHF	: Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDRFs	: Endothelium Derived Relaxing Factor
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	: Endothelial Nitric Oxide Sintase
EVOO	: Extra Virgin Olive Oil
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GPx	: Glutathione Peroxidase
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HELLP Syndrome	: Hemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, and Low Platelet Levels (HELLP) Syndrome
HIF-1 α	: Hipoxia Inducible Factor-1 α
HO-1	: Heme oxygenase

INOS	: <i>Inducible Nitric Okside Sintase</i>
IUFD	: <i>Intra Uterine Fetal Death</i>
IUGR	: <i>Intra Uterine Growth Restriction</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
KH	: <i>Kelahiran hidup</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
L-NAME	: <i>NG – Nitro – L – Arginine Methyl Ester</i>
LOX-1	: <i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MDG's	: <i>Milenium Development Goals</i>
MUFA	: <i>Monounsaturated Fatty Acid</i>
nNOS	: <i>Neuronal Nitric Okside Sintase</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Faktor Keppa Beta</i>
NHBPEP	: <i>National Higt Blood Pressure Education Program</i>
NK cell	: <i>Natural Killer Cell</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
NO ₂	: <i>Nitrogen Dioksidan</i>
Nrf2	: <i>Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2</i>
O ₂	: <i>Superoksida</i>
OH ⁻	: <i>Radikal Hidroksil</i>
ONOO ⁻	: <i>Peroxynitrite</i>
oxLDL	: <i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PE	: <i>Preeklamsia</i>

PGI2	: Prostasiklin
PIGF	: Placental Growth Factor
PGH2	: Prostaglandin H2
PGE2	: Prostaglandin E2
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acid
RAL	: Rencana Acak Lengkap
RNS	: Reactive Nitrogen Species
RI	: Republik Indonesia
ROS	: Reactive Oxygen Species
SFA	: Saturated Fatty Acid
SDG's	: Sustainable Development Goals
SDKI	: Survei Demografidan Kesehatan Indonesia
sEng	: Soluble Endoglin
sFlt-1	: Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1
SOD	: Superoxide Dismutase
TD	: Tekanan Darah
TGFβ	: Transforming Groeth Factor Beta
TM	: Trombomodulin
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor – α
TXA2	: Tromboxsan A2
UPAS	: Survei Penduduk Antar Sensus
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1 / Flt-1	: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – 1 / fms-like tyrosine kinase receptor
VEGFR-2 / Flk-1	: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – 2 / kinase insert domain receptor

WHO : World Health Organization
 Th : T helper
 RNS : Reactive Nitrogen Species
 kD : Kilo Dalton
 HLA : Human Leukocyte Antigen
 NK sel : Natural Killer sel
 NF- κ B : Nuclear Factor Kappa Beta
 IL : Interleukin
 TGF : transforming growth factor



BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Tingkat kesejahteraan suatu negara dapat dilihat dari salah satu indikator berupa angka kematian ibu (AKI). Angka kematian ibu dalam 100.000 kelahiran hidup (KH) sebesar 239 pada negara berkembang, dan kondisi di negara maju dari 100.000 KH hanya 12 (WHO, 2015). Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia (SDKI) mendapatkan data pada tahun 2012 AKI per 100.000 KH sebesar 359, sedangkan pada tahun 2015 menurut Survei Penduduk Antar Sensus (SUPAS) 2015 menunjukkan berkurangnya AKI menjadi 305/100.000 KH (Lapthah Dit Kesga, 2016). Tetapi hal tersebut masih tergolong tinggi bila dilihat dari target Milenium Development Goals (MDG's) tahun 2015 yaitu per 100.000 KH AKI sebesar 102. Sekarang Indonesia memiliki target yang sesuai dengan Sustainable Development Goals (SDG's) yaitu AKI 70/100.000 KH pada tahun 2030 (Kemenkes RI, 2015). Angka kematian Ibu di Jawa Timur dari tahun 2013-2015 cenderung turun, tetapi di tahun 2016 mengalami peningkatan lagi mencapai 91,00 per 100.000 KH (Dinkes Jatim, 2017).

Penyebab terbesar terjadinya AKI di Indonesia menurut Direktorat Kesehatan Ibu tahun 2013 adalah perdarahan, sedangkan preeklamsia menempati posisi ke dua sebagai penyebab AKI. Tetapi di Jawa Timur preeklamsia yang merupakan penyebab tertinggi AKI pada tahun 2016 yaitu sebanyak 165 atau sebesar 30,90% orang. Kejadian preeklamsia cenderung meningkat sejak tahun 2012 (Dinkes Jawa Timur, 2017).

Preeklamsia timbul pada usia kehamilan diatas 20 minggu dengan munculnya tanda hipertensi dan proteinurin. Sebelumnya, edema merupakan salah satu penanda terjadinya preeklamsia, tetapi saat ini hal tersebut dianggap

merupakan kondisi fisiologis dan kurang spesifik dalam menetapkan diagnosa preeklamsia. Sejauh ini upaya yang sering dipilih agar kondisi ini tidak membahayakan bagi pasien adalah dengan mengakhiri kehamilan (Delta, 2004). Proses terjadinya preeklamsia hingga saat ini masih belum diketahui secara pasti. Faktor janin dan juga faktor ibu sangat berperan terhadap kejadian preeklamsia (*Report of the national institutes of health*, 2000; Leeners *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2012).

Terjadinya hipoksia plasenta, disfungsi endotel dan juga penambahan sitokin proinflamasi disinyalir berhubungan dengan terjadinya preeklamsia. Sel endotel merupakan sel yang terletak diantara pembuluh darah dan jaringan pada manusia. Selain sebagai penghalang terhadap difusi makromolekul ke jaringan, terdapat fungsi lain yaitu sebagai pengaturan tonus otot polos pembuluh darah, koagulasi dan haemostasis, angiogenesis dan pertahanan tubuh. Disfungsi endotel mengakibatkan terjadinya hipoksia dan hipertensi akibat dari kegagalan sel endotel dalam menjaga keseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi dalam substansi. Hal ini disebabkan adanya kegagalan saat remodeling vaskuler trofoblas pada arteri, dengan ditandai oleh plasentasi yang tidak memadai (Dharma *et al.*, 2005; Susianto *et al.*, 2009).

Hipoksia menyebabkan pengembangan pengaturan sekresi mediator-mediator inflamasi dari plasenta yang bekerja pada endotel vaskuler, termasuk faktor imun, dan sitokin inflamasi diduga berperan penting pada proses patologi penyakit ini. Respon inflamasi melibatkan aktivasi dari berbagai faktor transkripsi. Salah satu yang berperan penting pada respon inflamasi adalah Nuclear Faktor Keppa Beta (NF- κ B). Suatu studi menunjukkan bahwa NF- κ B merupakan pengatur dari ekspresi gen inflamasi, dan memicu produksi sitokin yang mempengaruhi inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *interleukin-6* (IL-6) (Laresgoiti-servitje, 2012). Meningkatnya sebagian sitokin

seperti TNF- α terbukti terjadi pada kondisi preeklamsia, oleh karena itu bisa dijadikan penanda kejadian preeklamsia. Paparan sitokin inflamasi, juga akan mengganggu kerja sel endotel, selain itu stres hemodinamik, stres oksidatif dan juga hiperkolesterolema juga akan mempengaruhi kerja sel endotel (Dharma *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2012; Laresgoiti-Servitje and Gomes-Lopez, 2012; Anom & Kusuma, 2012; Laksana, 2013; Rahardjo *et al.*, 2014; xie *et al.*, 2014).

Stres oksidatif pada preeklamsia menyebabkan bertambahnya produk lipid peroksidasi yang sangat dicurigai mengganggu fungsi endotel dan timbulnya gejala klinik pada preeklamsia. Stres oksidatif mengakibatkan ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi yang mengarah pada hipertensi dan hipoksia. Salah satu faktor vasodilator adalah *nitric oksida* (NO). Berkurangnya jumlah NO akan menyebabkan terjadinya vasokonstriksi. Pengeluaran lipid peroksida dalam darah bisa diketahui melalui pengukuran NO yang merupakan marker vasodilator sangat kuat dan dianggap memiliki efek besar pada fungsi endotel gestasional (Santosa *et al.*, 2007; Trachtenberg and Here, 2009; Nagai *et al.*, 2012; Motta-Mejia *et al.*, 2017).

Kondisi stres oksidatif bisa mereda dengan pemberian antioksidan. Mengonsumsi antioksidan dapat menangkap radikal bebas dan menurunkan dampak negatif dari oksidan. Berdasarkan sumbernya antioksidan berasal dari endogen (enzim/dalam tubuh) dan eksogen (dari luar tubuh/makanan). Salah satu sumber alami antioksidan dari tumbuhan adalah zaitun (*olea europaea*) yang merupakan penghasil *extra virgin olive oil* (EVOO). EVOO merupakan minyak zaitun murni yang komposisinya masih asli dari minyak zaitun karena pemrosesannya dengan pemerasan buah zaitun dibawah suhu yang sesuai dengan menggunakan alat, sehingga tidak ada perubahan akibat panas pada komponen-komponen minyak (IOC, 2013). EVOO mengandung senyawa fenolik (polivenol) yang sangat tinggi sehingga disebutkan dapat menangkal radikal

bebas, juga sebagai antiinflamasi dengan cara menekan aktivasi NF- κ B sehingga dapat mengganggu pengeluaran sitokin inflamasi (Keceli *et al.*, 2001; Aisah *et al.*, 2010; Aisyah *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa L-NAME dapat menyebabkan hipoksia pada plasenta tikus. L-NAME merupakan anti eNOS yang dapat meningkatkan ROS yang mengakibatkan terjadinya hipoksia pada plasenta. Dari kondisi hipoksia tersebut membuat timbulnya beberapa kondisi yang dapat memicu munculnya gejala klinis preeklamsia pada tikus hamil dengan terjadinya disfungsi endotel. Kadar TNF- α meningkat 2 kali lipat pada kondisi kehamilan dengan preeklamsia (Catarino *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, penderita preeklamsia mengalami kondisi hipoksia plasenta yang menyebabkan peningkatan TNF- α sehingga memicu disfungsi endotel yang berakibat penurunan NO. Kondisi hipoksia plasenta menjadi penyebab bertambahnya radikal bebas yang berakibat terjadinya stres oksidatif dan berdampak pada disfungsi endotel. EVOO dengan kandungan polifenol tinggi berperan sebagai anti inflamasi dan antioksidan sehingga diasumsikan dapat mengurangi kondisi disfungsi endotel yaitu dengan menurunkan TNF- α dan meningkatkan *nitric oxide* (NO). Selain itu EVOO juga merupakan antiinflamasi dengan menghambat aktivasi NF- κ B sehingga kadar TNF- α menurun (Dharma *et al.*, 2005; Susianto *et al.*, 2009; Laresgoiti-servitje, 2012). Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai pengaruh EVOO terhadap kadar TNF- α dan NO pada Tikus putih wistar model preeklamsia adalah untuk membuktikan asumsi tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut:

1.2.1 Rumusan masalah umum

Apakah pemberian EVOO dapat menyebabkan penurunan kadar *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan peningkatan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada tikus wistar model preeklamsia?

1.2.2 Rumusan masalah khusus

1. Apakah pemberian L-NAME 125 mL/kgBB dapat meningkatkan kadar TNF- α dan menurunkan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia?
2. Apakah pemberian EVOO dapat menurunkan kadar *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) pada tikus wistar model preeklamsia?
3. Apakah pemberian EVOO dapat meningkatkan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada tikus wistar model preeklamsia?
4. Apakah terdapat hubungan antara dosis *extra virgin olive oil* terhadap kadar TNF- α dan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia?
5. Apakah terdapat hubungan antara kadar TNF- α dengan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan efek pemberian EVOO terhadap penurunan kadar *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan peningkatan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada tikus wistar model preeklamsia.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk menganalisa hubungan pemberian L-NAME 125 mL/kgBB dalam meningkatkan kadar TNF- α dan menurunkan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia
- b. Untuk menganalisis efek pemberian EVOO terhadap penurunan kadar *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) pada tikus wistar model preeklamsia.

c. Untuk menganalisis efek pemberian EVOO terhadap peningkatan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada tikus wistar model preeklamsia.

d. Untuk menganalisa korelasi antara dosis EVOO dengan kadar *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan kadar (*Nitric Oxide*) NO pada tikus wistar model preeklamsia.

e. Untuk menganalisa adanya hubungan antara kadar TNF- α dengan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Menjadi dasar penggunaan antioksidan dari bahan alami zaitun beserta produk olahannya, sehingga bisa dimanfaatkan untuk mencegah preeklamsia pada kehamilan.

1.4.2 Manfaat Praktis

a. Membuka kemungkinan antioksidan dari bahan alami EVOO dan produk olahannya, sebagai alternatif pencegahan terjadinya preeklamsia pada kehamilan.

b. Memberikan prospek yang lebih baik terhadap pengembangan dan budi daya tanaman zaitun (*Olea europea*) beserta hasil olahannya, sehingga memiliki banyak manfaat dibidang pangan dan kesehatan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Konsep Dasar Preeklamsia**2.1.1 Definisi Preeklamsia**

Preeklamsia adalah gangguan pada kehamilan dengan terjadinya peningkatan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan diastolic ≥ 90 mmHg, diukur setidaknya dua kali empat jam terpisah, dan proteinuria $> 0,3$ g per 24 jam atau $\geq 1+$ dengan menggunakan dipstick urin setelah 20 minggu kehamilan (Gathiram & Moodley, 2016).

The International Society for the Study mendefinisikan bahwa preeklamsia merupakan kondisi yang ditandai dengan hipertensi setidaknya 140/90 mmHg pada dua kesempatan terpisah minimal 4 jam dengan proteinuria dalam 24 jam $\geq 0,3\%$ (rasio protein/kreatinin 0,30 mg/mmol), pada kehamilan setelah 20 minggu pada wanita normal tensi dan selesai sampai 6 minggu postpartum (Streegers, 2010; Kenney et al., 2015).

The National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) tahun 2000 *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* menjelaskan bahwa preeklamsia merupakan peningkatan tekanan darah $\geq 140/90$ mmHg dan proteinuria ≥ 1 dipstick yang terjadi sesudah usia kehamilan 20 minggu (Cunningham et al., 2013).

2.1.2 Klasifikasi Hipertensi

Sesuai dengan *American Congress of Obstetricians and Gynecologi (ACOG)* (2013) hipertensi pada kehamilan dapat digolongkan menjadi 4 kategori yaitu:

1. Hipertensi kronik

Yaitu hipertensi yang sudah terjadi sebelum kehamilan atau didiagnosa sebelum usia 20 minggu. Terjadinya hipertensi yang didiagnosa pada awal kehamilan dan

berdiam sampai 12 minggu setelah melahirkan juga dapat dikatakan sebagai hipertensi kronis.

2. Preeklamsia-eklamsia

Kondisi dimana terjadi hipertensi pada saat kehamilan setelah usia 20 minggu sampai postpartum dengan disertai proteinuria pada wanita yang sebelumnya dalam kondisi normal. Sedangkan eklamsia adalah kondisi preeklamsia dengan disertai kejang.

3. Preeklamsia *superimposed* pada hipertensi kronik

Kondisi akibat terganggunya hipertensi kronik yang menimbulkan resiko terjadinya PE/E yang bertumpang tindih dengan hipertensi kronik sehingga kondisi tersebut semakin meningkat. Preeklamsia *superimposed* didiagnosa bila sudah terjadi hipertensi dalam kehamilan sebelumnya dan cenderung memiliki resiko yang lebih berat terhadap pertumbuhan janin.

4. Hipertensi gestasional

Hipertensi yang terdeteksi pada saat pertengahan kehamilan dan tidak disertai proteinuria. Bila tidak diikuti dengan preeklamsia, tekanan darah pada hipertensi gestasional/transisional akan kembali setelah 12 minggu (Cunningham *et al.*, 2013).

2.1.3 Patofisiologi Preeklamsia

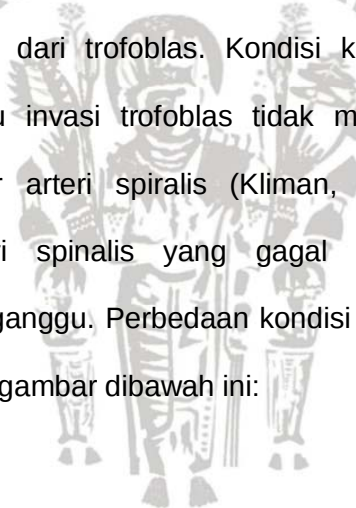
Banyak penelitian yang sudah dilakukan tentang preeklamsia, tetapi penyebab preeklamsia belum diketahui dengan pasti. Maka preeklamsia disebut "*the disease of theories*" karena begitu banyaknya mekanisme yang dijelaskan tentang penyebab preeklamsia, tetapi belum juga menjelaskan secara pasti penyebab preeklamsia. Diduga bahwa preeklamsia merupakan penyakit multifaktorial yang melibatkan ibu, janin dan plasenta (Cunningham *et al.*, 2013).

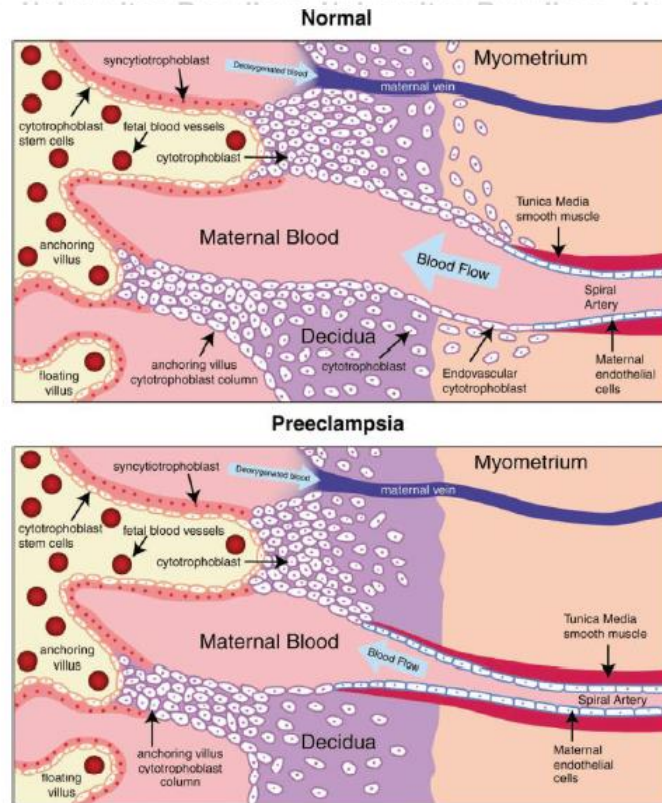
Berikut merupakan faktor-faktor penyebab terjadinya preeklamsia diantaranya:

2.1.3.1 Iskemia Plasenta

Pada invasi normal, invasi lapisan meometrium dan desidua terjadi dua tahap dilakukan oleh proliferasi trofoblas, yaitu endovaskuler dan intersisial. Pertama, arteri spiralis ibu di invasi oleh trofoblas dengan mengganti endometrium oleh material jaringan fibrinoid dengan menghancurkan jaringan otot polos dinding arteri dan jaringan elastis pada tunika media. Kondisi seperti ini selesai pada 12 minggu dan terjadi proses sampai *deciduo myomaterial junction* (DeChemey, 2003).

Pada kasus preeklamsia terjadi disfungsi trofoblas. Kondisi tersebut disebabkan adanya peningkatan kolagen tipe IV sehingga trofoblas mengalami kesulitan invasi melalui matrik ekstra selular. Pada kasus ini menunjukkan kurangnya invasi dari trofoblas. Kondisi klinis yang ditemukan pada kasus preeklamsia yaitu invasi trofoblas tidak mampu menembus meskipun telah mencapai sekitar arteri spiralis (Kliman, 2000). Hal ini akan diikuti oleh remodeling arteri spinalis yang gagal sehingga menyebabkan sirkulasi uteroplasenta terganggu. Perbedaan kondisi kehamilan normal dan preeklamsia bisa terlihat pada gambar dibawah ini:





Gambar 2.1 Perbandingan invasi trofoblas pada kehamilan normal dan preeklamsia.

Keterangan: Pada kehamilan normal, invasi endovaskuler cytotrofoblas menyebabkan terjadi remodeling arteri spiral. Kondisi tersebut menghasilkan melebarnya arteri spiral maternal dan membentuk saluran dengan ketahanan yang rendah dan tidak memberikan respon terhadap pengaruh vasomotor. Keseluruhan isi trofoblas akan berubah menjadi sel-sel fenotip endotel selama proses invasi, yang disebut "pseudovaskulogenesis" (atas). Invasi trofoblas abnormal pada karakteristik preeklamsia diikuti dengan gangguan remodeling vaskuler dari arteri spiral (bawah). Kegagalan sitotrofoblas dalam meniru fenotip vaskuler mengakibatkan invasi yang dangkal sehingga berakibat transformasi arteri spiral yang sempit. Hal tersebut berakibat adanya arteri miometrium yang sempit dan shunt arterivenosa yang minimal pada morfologi plasenta (Wathen, 2011).

Kondisi tersebut menyebabkan iskemia plasenta yang terjadi akibat penurunan sirkulasi darah menghasilkan bahan vasoaktif yang ditransfer ke sirkulasi maternal, diantaranya ROS dan sitokin yang akan menyebabkan terjadinya disfungsi endotel. Produksi ROS secara berlebihan dapat memicu

terjadinya stres oksidatif karena konsentrasi antioksidan yang berlebihan.

Selanjutnya akan mengakibatkan rusaknya lemak, DNA dan juga protein yang dapat mengakibatkan kelainan fungsi organ dan jaringan (Hung *et al.*, 2002).

2.1.3.2 Stres Oksidatif

Preeklamsia merupakan sindrom pada kehamilan dengan gejala tekanan darah dan protein urin yang meningkat. Teori stres oksidatif merupakan salah satu teori yang berkaitan dengan patofisiologi preeklamsia. Hal ini terjadinya karena kegagalan invasi trofoblas pada saat implantasi. Stres oksidatif akan memicu kerusakan sel endotel dan akan memicu manifestasi klinis preeklamsia (Subandrete, 2007).

Stres oksidatif merupakan kondisi ketidakseimbangan antara antioksidan dengan jumlah oksidan, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Pada kondisi stres oksidatif muskuler dinding arteri spiralis menjadi kaku, sehingga membuat tidak lancarnya perfusi ke plasenta. Kondisi-kondisi tersebut terjadi secara bersamaan menyebabkan terjadinya sumbatan trombotik kemudian terjadi disolusi yang menyebabkan kondisi diplasenta mengalami hipoksia-reoksidatif secara berulang. Kondisi tersebut memicu aktivasi xiatin oksidase (Cunningham *et al.*, 2013).

Xiatin oksidase merupakan sumber penting yang menghasilkan superoxide pada sinsitiotrofoblas, dan sel vilus stromal. Selain itu xiatin oksidase juga berperan dalam terjadinya kerusakan plasenta yang diakibatkan oleh radikal bebas. Terjadinya kematian sel plasenta dan perfusi yang tidak memadai mengakibatkan terlepasnya mikrovesikal sinsitiotrofoblas ke saluran maternal.

Pada kondisi preeklamsia ditemukan mikrovesikal sinsitiotrofoblas yang meningkat dan berkaitan langsung dengan neutrofil maternal. Kondisi tersebut selanjutnya berperan pada keadaan disfungsi endotel (Hubel, 1999; Hung, 2007; Cunningham *et al.*, 2013).

Radikal bebas pada kondisi preeklamsia dilepaskan oleh desidua menyebabkan kerusakan sel endotel. *Reactive Oxygen Species* (ROS), seperti anion peroksida dan radikal hidroksil menyebabkan asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid mengalami konversi menjadi peroksida lipid. Terjadinya pembentukan peroksida lipid mengakibatkan rusaknya sel endotel karena radikal bebas lebih toksik. Produksi NO menjadi terganggu akibat kerusakan pada sel endotel, oleh sebab itu mempengaruhi keseimbangan pada TXA₂ dan PGI₂ berupa akselerasi produksi TXA plasenta dan inhibisi produksi PGI₂. Stres oksidatif mengakibatkan bertambahnya produksi sel makrofag lipid (Munzel et al., 2005).

2.1.3.3 Inflamasi

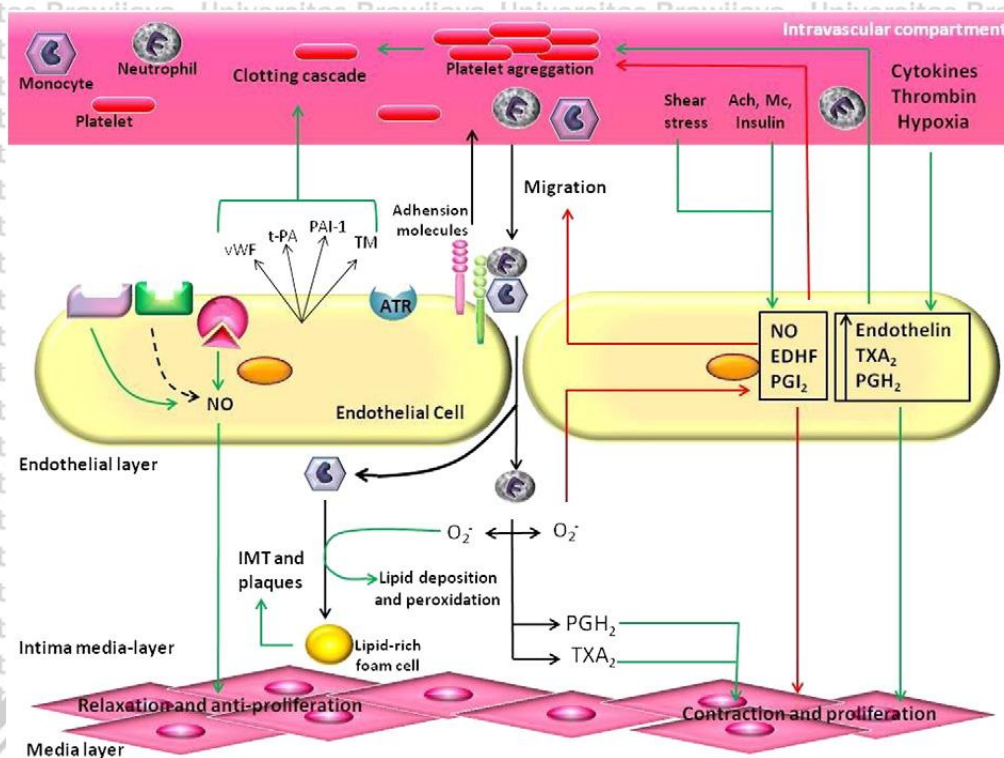
Inflamasi merupakan suatu kondisi tubuh dengan gejala rubor, tumor, color, dolor dan fungsi untuk pertahanan tubuh karena suatu infeksi atau kerusakan jaringan. Awal dari suatu inflamasi melibatkan pembuluh darah dengan berkumpulnya leukosit pada bagian yang mengalami peradangan karena suatu proses transduksi plasma dan peredaran darah yang merupakan mekanisme migrasi sel-sel leukosit. Sitokin yang keluar disaat terjadi peradangan adalah IL-1, TNF- α dan kemokin seperti IL-8. Protein-protein pengatur sistem komplemen pada peradangan yaitu PGE₂, IL-10, TGF β , dan glukokortikoid (Abbas, 2005).

Pada ibu hamil didapatkan peningkatan respon inflamasi seperti leukositosis, produksi sitokin proinflamasi diantaranya IL-6, IL12 dan TNF- α , bertambahnya aktivitas fagosit dan priming monosit. Pada kehamilan preeklamsia kondisi diperparah akibat dari meningkatnya sitokin proinflamasi diantaranya IL-6, IL-1 β , IL8 dan TNF- α . Pada NK sel, makrofag/monosit dan trofoblas memproduksi TNF- α yang menyebabkan terjadinya kebocoran pada pembuluh darah endotel dan apoptosis sehingga berakibat aktivasi endotel sitemik. Kondisi tersebut membuat perubahan fungsi dan struktur dalam sel termasuk didalamnya terjadinya stres

oksidatif, sekresi vasokonstriktor, mikrotrombosis. Aktivitas kaskade komplemen dan tingginya tingkat tromboksan. Bisa disebutkan bahwa respon inflamasi ini menyebabkan banyaknya perubahan lokal dan sistemik sebagai penanda preeklamsia karena mempengaruhi regulasi tekanan arteri dan aliran darah menyebabkan disfungsi pada endotel vaskuler ibu sehingga berakibat terjadinya vasokonstriktor (Saucedo *et al.*, 2014; Szarka *et al.*, 2010).

2.1.3.4 Disfungsi endotel

Disfungsi endotel merupakan suatu kondisi dimana terjadi kegagalan adaptasi adekuat endotel terhadap stimulasi spesifik. Kondisi tersebut ditandai dengan peningkatan proinflamasi, penurunan vasodilatasi dan sifat protrombin. Fungsi endotel terganggu ditandai dengan adanya peningkatan molekul adhesi karena adanya paparan stres hemodinamik, stres oksidatif dan paparan sitokin inflamasi. Selain itu sitokin juga dapat diproduksi oleh sel endotel. Sitokin merupakan penjaga komunikasi dengan jaringan dan leukosit yang merupakan sebagai mediator peptide. Melalui thrombus dan inflamasi sitokin mengaktifasi endotel. Terjadinya aktivasi thrombus akan menghambat fibrin di hancurkan dan merangsang aktivitas prokoagulan protein C. Pada kondisi preeklamsia terjadi pengurangan pada zat yang bersifat vasodilator diantaranya NO, PGI₂ dan *endotel derived relaxing* (ADRF) (Endemann *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2007).



Gambar 2.2. Kerja sel-sel endotel

Keterangan: Sel endotel yang bertanggung jawab untuk sejumlah fungsi fisiologis, diantaranya: 1) pengaturan tonus pembuluh darah melalui produksi seimbang vasodilator dan vasokonstriktor; 2) pengendalian fluiditas darah dan koagulasi melalui produksi faktor-faktor yang mengatur aktivitas trombosit, sistem fibrinolitik dan kaskade pembekuan dan 3) pengaturan inflamasi melalui proses ekspresi sitokin dan adhesi molekuler. Ach (asetilkolin); ATR (Reseptor Angiotensin-II); BK (Bradikinin); EDHF (Faktor hyperpolarization endothelium yang diturunkan); NO (nitric oxide); PAI-1 (Plasma activator inhibitor activator plasminogen-1); PGH₂ (Prostaglandin H₂); PGI₂ (Prostasiklin); O₂⁻ (Onion superoksida); t-PA (activator Plasminogen jaringan); TM (Thrombomodulin); TxA₂ (A₂ tromboksan); vWF (factor von Willebrand) (Cristina et al., 2013).

Vasodilator yang berkurang mengakibatkan peningkatan vasokonstriktor antara lain kadar endothelin plasma sehingga berakibat penurunan nutruiresis, filtrasi ginjal, resistensi perifer sehingga memicu terjadinya hipertensi yang merupakan manifestasi dari preeklamsia. Turunnya perfungsi plasenta juga berkaitan dengan faktor imun. Faktor imun yang terganggu akan mempengaruhi invasi dari plasenta. Sitokin proinflamasi merusak/mengaktivasi sel endotel sehingga berakibat terjadinya perfusi abnormal (Baratawijaya & Rengganis, 2010)

2.2 Inflamasi pada preeklamsia

2.2.1 Definisi Inflamasi

Inflamasi yaitu suatu respon perlindungan dengan tujuan menghilangkan penyebab gangguan sel dengan cara membuang sel dan jaringan yang rusak karena kerusakan asal (Baratawidjaja & Rengganis, 2013). Inflamasi adalah respon protektif suatu lokasi yang ditimbulkan oleh cedera atau gangguan jaringan, dengan merusak, memangkas atau mengurung baik agen penyebab masalah ataupun jaringan yang cedera. Tanda terjadinya inflamasi pada kondisi klinis yaitu nyeri (dolor), panas (color), kemerahan (Rubor), bengkak (tumor) dan berkurangnya fungsi (Subowo, 2013).

2.2.2 Proses inflamasi

Proses inflamasi diawali dengan keterlibatan pembuluh darah dan berkumpulnya sel leukosit didalam sel darah akibat peradangan karena suatu mekanisme perpindahan sel-sel leukosit dari peredaran darah dan transduksi plasenta. Ekspresi molekul adesi di atur oleh mediator pada permukaan sel endotel dan leukosit, yang berakibat adesi sel-sel leukosit di seluruh permukaan sel endotel pembuluh darah di daerah peradangan. Setelah itu akan diikuti terjadinya migrasi yang melewati celah antar sel endotel dengan tujuan jaringan dalam daerah peradangan yang dipengaruhi oleh perbedaan kadar kemotaktik. Sitokin TNF, IL-1 dan IL-8 terlibat pada proses peradangan yang diatur oleh protein-protein sistem komplemen (Subowo, 2009).

2.2.3 Peran Sitokin dalam Inflamasi

Berbagai sel menghasilkan sitokin mengatur respon terjadinya inflamasi.

TNF- α , IL-6 dan IL-1 adalah sitokin yang sangat berperan terjadinya inflamasi.

Sitokin tersebut memiliki berbagai macam fungsi, ada yang bersifat pleiotropik yaitu dapat menghasilkan efek lebih dari satu gen. Peran sitokin termasuk memicu terjadinya perubahan pada endotel vaskuler yang mendorong masuknya leukosit ke lokasi inflamasi. Sitokin-sitokin tersebut juga dapat menimbulkan

respon fase akut dan berlanjut pada proses perbaikan jaringan (Playfair & Chain, 2013).

Monosit/sel makrofag merupakan penghasil dari ke tiga sitokin tersebut.

Ketiga sitokin tersebut sangat berkaitan karena akan mempengaruhi pengeluaran dari sitokin lain, diantaranya TNF dan IL-1 dapat merangsang pelepasan IL-6, pelepasan TNF dan IL-1 dapat terinduksi dari IL-6, TNF dapat menginduksi pembebasan IL-1 dan IL-6. Peredaran darah dapat membawa ketiga sitokin tersebut sehingga menimbulkan terjadinya peradangan yang disebut "respon fase akut". Manifestasi hal tersebut adalah timbulnya demam dan perubahan kandungan beberapa jenis protein yang dihasilkan oleh hepatosit di dalam serum (Subowo, 2009).

Pada tahap awal terjadinya peradangan, terjadi pelepasan mediator yang mengatur molekul adesi pada sel endotel dan leukosit. Proses tersebut menyebabkan beberapa tahap ekstrasvasi leukosit, yaitu Bergeraknya ke dinding pembuluh darah sampai dengan keluarnya dari pembuluh darah sampai menuju tempat inflamasi. Kemudian proses peradangan akan di pertahankan oleh IL-1, TNF- α dan IL-8. Komplemen yang mengatur peradangan adalah PGE2, TGF β , IL-10 dan Glukokortikoid (Subowo, 2009).

2.2.4 Respon Inflamasi Pada Preeklamsia

Inflamasi merupakan reaksi lokal jaringan terhadap luka atau infeksi yang menyertakan lebih banyak mediator dari pada respon imun yang didapat. Setelah terjadi luka timbul vasodilatasi di dalam jaringan yang memproduksi peningkatan volume darah sehingga terjadi perdarahan. Permeabel jaringan yang bertambah berakibat terjadinya edema, TNF α dan IL-1. Pada saat inflamasi terjadi perpindahan leukosit melalui daerah inflamasi dan berpindah ke rongga jaringan melalui dinding kapiler yang disebut ekstrasvasi. Pada inflamasi dini terjadi fase

puncak pada 6 jam pertama pada migrasi neutrofil (Baratawidjaja & Rengganis, 2010).

2.2.5 Peran *tumor necrosis factor* (TNF- α) pada preeklamsia

TNF- α dihasilkan oleh makrofag, sel T, *nature killer cell*, sel mast dan beberapa sel lain salah satunya adalah endotel. Efek yang timbul dari peningkatan TNF- α adalah pleiotropik pada sistem imun, perkembangan embrio, tissue homeostasis, dan plasentasi. Dalam pengaturan proses inflamasi peran sitokin ini sangat penting karena berpengaruh terhadap keluarnya sitokin yang lain seperti IL-1, IL-6, *monocyl chemotractant* protein (Cackovic et al., 2008; Subowo, 2009; Baratawidjaja & Reganis, 2013; Gathiram, 2016).

Produksi TNF- α yang berlebihan dapat merusak fungsi endotel sehingga berakibat okulasi pada pembuluh darah, mengurangi aliran darah dan meningkatkan permeabilitas endothelium. TNF- α diaktifasi oleh sistem kekebalan tubuh sehingga berakibat pada sekresi zat vasoaktif oleh endotel dan menyebabkan koagulasi intravaskuler. Gangguan endotel yang merupakan mekanisme preeklamsia berawal dari faktor plasenta yang merangsang monosit dan neutrofil untuk merangsang produksi TNF- α . Oleh karena itu temuan tersebut menunjukkan meningkatnya serum TNF- α diduga menjadi bagian dari patogenesis preeklamsia. Dalam kehamilan normal, TNF- α memberikan peran dalam memodifikasi pertumbuhan dan invasi trofoblas pada arteri spiralis maternal. Di samping itu, kontribusi dari TNF- α adalah berperan pada plasentasi abnormal, stres oksidatif dan gangguan endotel (Cackovic et al., 2008; Baratawidjaja & Rengganis, 2010).

2.3 Disfungsi Endotel pada Preeklamsia

2.3.1 Definisi Disfungsi Endotel

Sel endotel adalah pembatas antara rongga ekstrasvaskuler dan darah. Pada kondisi normal sel endotel berfungsi menghambat adhesi sel, keluarnya cairan

rongga intravaskuler dan koagulasi. Selain itu sel endotel berfungsi sebagai pencegah terjadinya thrombosis, pengatur otot vaskuler, dan mengatur perfusi jaringan dengan pelepasan komponen vasodilatator (prostasiklin/PG12, adhenosin dan *nitric oxide* (NO) dan juga komponen endotelin. Pada kondisi preeklamsi terjadi kerusakan pada sel endotel yang luas akibat dari plasenta yang mengalami hipoksia (Lyall & Greer, 1996; Walsh, 2006; Powe *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2010).

Kondisi penurunan perfusi pada plasenta dan hipoksia akan mengakibatkan pelepasan dan mensintesis lebih banyak faktor-faktor vasoaktif seperti sitokin proinflamasi, *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1), angiotensin II (ANG II) dan juga *type 1 receptor autoantibodies* (AT₁-AA). Disfungsi endotel disebabkan oleh faktor-faktor tersebut (Chen 2009; gilbert, 2010; Powe *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2013; Masoura *et al.* 2014).

2.3.2 Marker Disfungsi Endotel

Senyawa yang dikeluarkan oleh endotel adalah *Endothelium Derived Factors* (EDRFs) diantaranya *Nitric Oxide* (NO), Prostrasiklin dan Faktor relaksasi hiperpolarisasi (*Endotelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF)). NO sebagai reseptor endotel spesifik berdasarkan asetilkolin, bradikinin dan serotonin yang mempengaruhi dalam pembentukannya. Sintesis NO pada pembuluh darah berpengaruh terhadap tonus pada pembuluh darah sehingga berperan pada pengaturan pembuluh darah. Prostrasiklin dihasilkan oleh endotel sebagai bentuk respon terjadinya hipoksia dan adanya stres. Kondisi prostrasiklin meningkatkan CAMP pada tromosit dan otot polos. Selain mengeluarkan EDRTs, endotel juga mengeluarkan substansi faktor kontriksi disebut *Endotelium Derived Contracting factor* (EDCFs) yaitu Endotelin-1 (ET-1), tromboksan A₂ (TXA₂), Prostaglandin H₂ (PGH₂) dan angiotensin II (ANG II). ET-1 menyebabkan iskemi pada konsentrasi yang tinggi akibat kontraksi. Angiotensin II menyebabkan

vasokonstriksi poten dan menstimulasi garam dan air karena akibat proliferasi dan migrasi sel otot polos (:). Disfungsi endotel menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pada seluruh arteri didalam tubuh, dimana kondisi vasokonstriksi jangka panjang dapat menyebabkan tekanan regulasi dalam arteri, sehingga dapat menyebabkan terjadinya penurunan pembentukan vasodilator seperti NO. Kondisi vasodilator akan memicu pembentukan dari vasokonstriktor seperti ET-1, ANG II yang mengakibatkan terjadinya hipertensi dan juga retensi air dan garam yang menjadi penanda terjadinya preeklamsia (Sowinski, 2000; Galigorsky and Gross, 2001; Taddei et al., 2002; Ana et al., 2013).

2.3.3 Akibat Disfungsi Endotel

Keadaan hipoksia akan mengaktifasi faktor transkripsi didalam sel yaitu *Hipoksia Inducible Factor* (HIF) dan *Nuclear Factor-Kappa Beta* (NF- κ B). Faktor transkripsi tersebut adalah faktor penting dalam adaptasi selular. HIF dalam makrofag yang mengalami hipoksia akan merangsang terbentuknya sFlt1 dan TNF- α berlebihan (Patot et al., 2004).

Pengeluaran TNF- α yang berlebihan okulasi pada pembuluh darah, aliran darah regional berkurang dan meningkatkan permeabilitas dari endotel sehingga akan mengakibatkan rusaknya sel endotel. Aktivitas dari TNF α diperantarai oleh kekebalan tubuh yang dapat mensekresi zat vasoaktif akibat dari rusaknya endotel dan menyebabkan koagulasi intravascular dan permeabilitas vascular (Roudsari et al., 2009).

Preeklamsia mempunyai karakteristik adanya disfungsi endotel. Sel endotel memberikan respon yang beragam pada sirkulasi darah. Terjadinya kondisi tersebut diproduksi oleh matriks sel endotel akibat dari interaksi dengan sirkulasi darah. Pada kondisi ini terjadi ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilator (NO). Disfungsi endotel atau aktivasi endotel yang berlebihan merupakan manifestasi klinis pada preeklamsia, termasuk didalamnya

peningkatan permeabilitas sel endotel dan agresi trombosit. Respon sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 dan IL-6) abnormal berperan dalam patogenesis preeklamsia. Peningkatan stres oksidatif adalah komponen dasar dari keadaan yang memberikan keterkaitan antara plasentasi abnormal dan sindrom maternal. Peningkatan stres oksidatif yang dipengaruhi oleh produksi *reaktif oksigen species* (ROS) yang berlebihan dan *reaktif nitrogen species* (RNS), seperti superoksida (O_2^-), radikal peroksid (H_2O_2), radikal hidroksil (OH^-), menyebabkan pengikatan antioksidan terhadap radikal bebas tidak adekuat. Yang termasuk RNS adalah *nitric oxide* (NO), peroxynitrite ($ONOO^-$) dan nitrogen dioksida (NO_2). RNS terutama berasal dari NO, yang terbentuk dari O_2 L-arginine dan reaksi dengan superoxide anion yang membentuk peroxynitrit. Peroxynitrit mampu merangsang lipid peroksidasi dan nitrosation dari banyak molekul tirosin yang biasanya bertindak sebagai mediator fungsi enzim dari signal transduksi (Lopez et al., 2001; Parra, 2009; Agarwal et al., 2011; Proston et al., 2012).

2.4 Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin multipoten kuat karena memberikan respon pada berbagai variasi sel termasuk didalamnya yaitu autokrin dan parakrin pusat reproduksi. Yang termasuk didalam proses tersebut adalah pengembangan embrio, pengembangan luteal dan juga diferensiasi plasenta. Hal tersebut sudah banyak yang membuktikan bahwa TNF- α mempengaruhi pada proses terjadinya awal kehamilan (Agius & Press, 2012; Azizieh & Raghupatty, 2014).

Reseptor TNF- α (TNF-Rs) ada dua yaitu TNF-R1 (dikenal sebagai p55/p60, tipe-I, TNF-R55, TNF-R β atau CD120a) dengan masa molekul 55-60 kDa dan TNF-R2 (p75/p60, tipe II, TNF-R75, TNF-R α atau CD120b) dengan berat molekul 75-80 kDa. Kedua reseptor tersebut memiliki pengaruh pada kehamilan manusia. Dari masing-masing reseptor tersebut memiliki pengaruh terhadap

sinyal intraseluler yang berbeda, selain itu mereka juga memiliki peran yang tumpang tindih dan juga efek kooperatif. Pada membrane yang terikat TNF-R1 memiliki fungsi melakukan kegiatan sebgai besar proinflamasi TNF pada kondisi yang cepat, sedangkan TNF-R2 terlibat pada jangka panjang sampai akhir dari sitokin ini. Bentuk-bentuk yang larut pada reseptor ini dapat menetralkan efek. Pada saat kehamilan normal, sitokin ini muncul pada sirkulasi ibu, cairan amnion dan plasenta (Agius & Press, 2012).

Pada manusia TNF- α mengakibatkan proses apoptosis vili primer sel trofoblas, membuat perkembangan janin tikus terhambat dan secara in vitro terjadi proses proliferasi sel trofoblas. Pada tikus hamil yang normal pemberian TNF- α mengakibatkan abortus (Haider & Knofler, 2009).

Pada kondisi preeklamsia TNF- α berperan sebagai mediator terjadinya disfungsi endotel sel. Produksi TNF- α berlebihan dihasilkan oleh vili plasenta diinduksi oleh terjadinya cedera hipoksia yang mempengaruhi sel-sel endotel, dengan menyebabkan apoptosis dan regulasi molekul adhesi. Kelebihan faktor produksi plasenta seperti faktor pertumbuhan endotel vaskuler reseptor-1 (dikenal sebagai *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1)), dan anti angiogenik yang merupakan pengikat faktor pertumbuhan endotel-endotel vaskuler dan pertumbuhan plasenta. Akibatnya melepaskan endothelium sistemik, faktor survival penting, mengurangi jumlah kompleks adhesi pada membrane sitoplasma, yang menuju ke permeability vaskuler. Angiotensin II tipe-1 (ATI-AA) meningkat bersamaan-sama dengan sitokin, membuat terjadinya disfungsi endotel vaskuler ibu (Agius & Press, 2012; Redman & Sargent, 2010).

Pengaruh biologis TNF- α adalah sebagai berikut:

- a. Penyaluran monosit dan neutrofil ke tempat yang mengalami infeksi untuk membunuh mikroba.
- b. Merangsang keluarnya molekul adhesi sel endotel vaskuler untuk leukosit.

c. Menginduksi makrofak dalam memproduksi kemokin dan ketotaksis dan penyaluran leukosit.

d. Merangsang sekresi IL-1 oleh fagosit mononuclear memiliki efek seperti TNF- α .

2.5 Nitric Oxide (NO)

Nitric oxide merupakan suatu molekul yang diproduksi dari berbagai macam tipe sel yang mempunyai efek menguntungkan dan juga merugikan ditingkat vaskuler maupun seluler (Moncada & Higgs, 2002). *Nitric oxide* (NO) merupakan suatu zat mediator parenkin yang sangat penting karena meregulasi otot vaskuler dan homeostasis. Selain itu vasodilator dan menstimulasi otot polos. *Nitric oxide* (NO) juga memberikan efek antiaterogenik yang poten, termasuk agregasi platelet, inhibisi proliferasi sel otot halus dan interaksi leukosit dengan endotel. Selain itu NO terbukti mempengaruhi tonus moigenik dan pada uterus mempengaruhi resistensi vaskuler arteri pada kehamilan normal, sebagai faktor relaksasi dari miometrium, dan pada preeklamsi mempengaruhi sirkulasi uteroplasenter (Santosa *et al.*, 2007).

Endotelium merupakan organ endokrin yang dapat mengatur fungsi mikrosirkulasi. Salah satu yang dihasilkan adalah NO, yang merupakan sebagai vasodilator endogen. Fungsi utamanya adalah inhibisi agregasi trombosit dan vasodilatasi lokal. NO merupakan *endotelin derived relaxing factor* (EDRFs) yang merupakan transformasi asam amino L-arginin menjadi sitrulin dengan jalur L-*arginine-nitric oxide* dengan enzim NO sintase (NOS) yang diperatarai oleh cGMP. Asam amino dalam sirkulasi dan ADMA (asymmetrical demethylarginine)

dapat menghambat NOS. NO diproduksi oleh pengaruh asetil kolin, bradikinin, serotonin dan merupakan endotel spesifik (Szabo *et al.*, 2004).

Famili-famili yang termasuk didalam enzim NO sintase yaitu kalsium dependent diantaranya *constitutive Nitric Okside Sintase* (cNOS), didalamnya

termasuk *neuronal Nitric Okside Sintase* (nNOS), dan *endotelial Nitric Okside Sintase* (eNOS), sedangkan *calcium independent* yaitu *inducible isoform Nitric Okside Sintase* (iNOS). nNOS berfungsi sebagai neurotransmitter pada kardiovaskuler pada sistem otonom, selain itu juga terdapat pada otot rangka, ginjal, pankreas dan miokard. eNOS beberapa dapat ditemukan pada sel imun, eNOS dapat bekerja lokal dalam pengaturan tekanan darah pada endotel pembuluh darah (Szabo *et al.*, 2004).

iNOS dapat ditemukan di beberapa sel, tetapi pada kondisi normal tidak aktif. Ekspresi dari iNOS bisa terjadi pada paru-paru, ginjal, pembuluh darah, sel imun, otot polos dan pankreas. Pemicu aktivasi dari iNOS adalah adanya sitokin proinflamasi seperti *endotoxin*, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *interleukin-1* (IL-1) dan *interferon-gamma* (IFN- γ). Dalam mengaktifkan iNOS pada manusia hal yang memberikan peranan yaitu transkripsi dari messenger ribonucleic acid (mRNA) berikatan dengan faktor transkripsi seperti *IFN regulatory factors-1* (IRF-1) dan juga *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). Terbentuknya NO dapat dipengaruhi aktivasi iNOS selain itu juga mempengaruhi jumlah L-arginine (Moncada and Higgs 2002).

2.6 N(G)- Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME)

Telah banyak diketahui bahwa *Nitric Oxide* (NO) dalam pembuluh darah sel endotel sangat penting untuk pengaturan ketegangan pembuluh darah. *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) merupakan *inhibitor* NO synthase (NOS), yaitu dengan aktivitas dari *nitro L-arginine methyl ester* (L-NAME) di pusat. Perubahan produksi NOS sangat berpengaruh pada perubahan tekanan darah. Pemberian L-NAME secara akut maupun kronis dapat menyebabkan perubahan tekanan darah dan reaktivitas vaskuler karena penurunan dari *Nitric Okside* (NO) (Kopincova, 2012). Pemberian *nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) terbukti dapat menginduksi preeklamsia (Amaral *et al.*, 2017).

Relaksasi dan regulasi tegangan pada vaskuler sangat dipengaruhi oleh sintesis NO pada kehamilan normal. Terjadinya peningkatan tekanan darah merupakan gejala bila terjadi hambatan dalam produksi NO. selain itu hambatan dapat menumbulkan karakter fisiologis dan juga patologis yang serupa/mirip dengan kondisi hipertensi primer. Penghambatan L-NAME pada NO dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah dan terjadinya vasokonstriksi (Shu *et al.*, 2018).

2.7 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar

Tikus wistar banyak dimanfaatkan sebagai hewan coba karena sifatnya yang mudah dikembangbiakan, dapat beradaptasi dengan baik, mudah dipelihara dalam jumlah besar, dan berukuran lebih besar dari mencit (Akbar, 2010).

2.7.1 Karakteristik Tikus Wistar

Menurut Hendrich (2006) klasifikasi tikus wistar dalam hewan coba sebagai berikut: Fillum: Chordate; Subfilum: Vertebrata; Classis: Mammalia; Subclassis: Placentalia; Ordo: Rodentia; genus: *Rattus*; Spesies: *Rattus Norvegicus*; Familia: Muridae.

Tikus wistar memiliki karakteristik yang sangat cerdas dan resisten terhadap infeksi. Memiliki ukuran tidak begitu besar dan suka hidup bergerombol dan juga tidak begitu fototobik, selain itu kegiatannya tidak terganggu keberadaan manusia disekitarnya. Terdapat dua ciri yang membedakannya dengan mencit atau hewan coba yang lain, yaitu kondisi yang tidak dapat muntah pada tikus putih karena struktur pencernaan yang tidak memiliki empedu dan anatomi yang tidak begitu lazim pada esophagus. *Rattus Norvegicus* (galur Wistar) merupakan salah satu contoh hewan coba penelitian yang sering digunakan baik penelitian biomedis atau biologi, karena mempunyai kelebihan yaitu kondisi fisiologi yang mirip mamalia lain pada umumnya (Mangkoewidjojo, 1988). *Rattus Norvegicus* mudah dipelihara dan beradaptasi (Hem, 2005). Kemampuan reproduksinya

sangat bagus dengan masa kehamilan yang pendek, sehingga sangat cocok bila digunakan dalam jumlah besar (Hendrich, 2006). Selain itu pemantauan masa subur tidak lama karena memiliki siklus estrus yang pendek (4-5 hari) (Lohmiller & Swing, 2006). Jenis yang banyak digunakan sebagai model penelitian adalah long evans, Sprague dawley dan wistar (Akbar, 2010).

Tabel 2.1 Data nilai Fisiologis Tikus Wistar

Kriteria	Nilai
Berat badan dewasa	Jantan : 300-400g; Betina : 180-250g
Berat lahir	5-6
Lama siklus birahi	4-5 hari
Lama kebuntingan	21-23 hari
Oestrus postpartum	Fertile
Jumlah anak	6-12 ekor
Usia lepas sapih	21 hari
Usia pubertas	6-8 minggu
Usia dewasa	6-9 minggu
Usia dikawinkan	10 minggu
Bobot lahir	5-6 gram
Implantasi	5-6 hari setelah fertilisasi
Konsumsi makanan per berat badan per hari	10 g/100g/hari
Konsumsi minuman per berat badan perhari	10-12/100g/hari
Waktu pemeliharaan komersil	4-5 bulan
Komposisi air susu	13% lemak, 9,7% protein,
Jangka hidup	3-4 tahun
Temperatur rectal	36-40°C
Detak Jantung	250-450 kali/menit
Tekanan darah	
Sistol	84-134 mmHg
Diastol	60mmHg
Laju Pernafasan	70-115 kali/menit
SerumProtein (g/dl)	5.6-7.6
Kreatinin	0,2-0,8

Sumber : Wolfensohn (2013)

Tikus *rattus norvegicus* pada masih muda sudah dapat dibedakan antara jantan ataupun betina yaitu pada tikus jantan jarak antara pepila genitalia dan anogenital yang lebih panjang dari pada betina. Pada jantan umur 7 hari jaraknya

5mm, sedangkan pada betina hanya 2,5 mm. pada betina putting susu sudah terlihat sejak usia 8-15 hari (Malole dan Pramono, 1989).

2.7.2 Siklus Reproduksi

Siklus estrus (birahi) merupakan nama untuk beberapa mamalia pada siklus reproduksi. Estrus merupakan kondisi dimana tikus betina secara fisiologis dan psikologis menginginkan jantan untuk berkopulasi. Pada kondisi estrus terjadi perubahan tingkah laku dan organ reproduksi seksual yang dipengaruhi oleh hipofisis, hipotalamus dan juga ovarium. Kondisi tersebut mampu berubah karena pengaruh faktor dari luar yaitu dari suhu, hubungan sosial, status nutrisi, cahaya (Akbar 2010). Untuk memastikan masa estrus dapat dilakukan dengan cara ulas vagina/apus vagina dan melihat kondisi epitel sel vagina dengan berbagai tingkat diferensiasi. Menurut Partodiharjo (1992) siklus estrus memiliki empat fase yaitu diantaranya adalah:

1. Proestrus

Kondisi tersebut merupakan kondisi menjelang terjadinya estrus biasanya berlangsung kurang lebih 12 jam. Gejala-gejala yang timbul adalah birahi mulai timbul tetapi masih belum mau menerima jantan (Smith & Mangkoewidjojo, 1988). Folikel di ovarium selama 2-3 hari tubuh semakin cepat sebelum terjadinya estrus, hal tersebut terjadi karena melakukan persiapan pelepasan ovum dari ovarium (ovulasi), pada kondisi ini folikel dengan dipengaruhi oleh FSH dan estrogen. Pengurangan sekresi progesterone dan peningkatan estrogen berakibat terjadinya perubahan fisiologis (perubahan folikel, uteri, servik, meningkatnya vaskularisasi, meningkatnya pertumbuhan endometrium, meningkatnya keratinisasi epitel vagina) dan juga munculnya birahi (Akbar, 2012; Nursyah, 2012). Fase ini dapat diketahui dari hasil ulas vagina terdapat kemunculan tunggal atau bertumpuk dari dominasi sel epitel berinti (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988) dan sel darah putih

berkurang, terdapat lendir yang banyak dan sel epitel bertanduk (Akbar, 2010).

2. Estrus

Fase lanjutan dari proestrus adalah estrus. Fase ini terjadi kurang lebih 12 jam. Pada kondisi ini tikus jantan sudah diterima oleh tikus betina dan sudah siap untuk kopulasi. Selain itu kondisi folikel de graf sudah siap untuk menghasilkan estradiol yang dapat mempengaruhi perubahan pada saluran reproduksi betina (Toelhere, 1985).

3. Metestrus

Fase ini merupakan kelanjutan dari estrus berlangsung selama 21 jam (Beker *et al.*, 1990). Stadium pada metestrus terbagi menjadi 2 yaitu yang pertama terjadi selama 15 jam dan kedua selama 6 jam. Pada kondisi ini perkawinan tidak terjadi, pada uterus sedang fase sekretoris, di ovarium terdapat corpora luteal dan folikel-folikel kecil, mulai muncul CL dan sel granulosa folikel yang diperankan oleh LH dari adenohipofisa (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

4. Diestrus

Kelanjutan dari fase metestrus adalah diestrus. Fase ini merupakan fase terakhir dengan lama 60-70 jam. Pada kondisi ini terjadi penebalan endometrium, berkurangnya kontraksi uterus, hipertropi pada kelenjar, mukosa vagina menipis, perpindahan leukosit bertambah banyak (Turner Bagnara, 1988). Kondisi tersebut dipengaruhi oleh hormon progesterone, sehingga terjadi pematangan korpus luteum (Akbar, 2010).

2.7.3 Macam-macam cara membuat tikus model preeklamsia

Beberapa cara dapat digunakan untuk membuat tikus model preeklamsia yaitu diantaranya resistensi insulin, membuat uterus iskemia, membuat gangguan pada sistem NO, merangsang keaktifan saraf otonom, aktivasi pada

respon inflamasi dan aktivasi sirkulasi protein yang mengganggu angiotensin (Podjarny, 2004).

2.7.3.1 Model preeklamsia inflamasi

Kondisi peradangan karena kehamilan normal, pada kasus preeklamsia terjadi inflamasi yang lebih kuat oleh karena itu sitokin inflamasi lebih banyak yang diproduksi dari pada kehamilan normal (Redman, 2003). Sitokin inflamasi, yang diproduksi oleh plasenta, lebih banyak pada preeklamsia dibandingkan kehamilan normal. Pada plasenta normal, terdapat konsentrasi L-arginine yang adekuat, yang memungkinkan aktivitas eNOS normal untuk membentuk NO. Pada preeklamsia, konsentrasi L-arginine yang lebih rendah dari normal disebabkan oleh overekspresi arginase II. Kondisi ini, bersama dengan keadaan oksidan yang tinggi menginduksi eNOS uncoupling dengan peningkatan pembentukan *spesies oksigen reaktif* (ROS), lebih banyak sintesis peroxynitrite, dan stres oksidatif lanjutan (Noris, 2004).

Pada tikus bunting, ada peralihan dari sitokin anti-inflamasi ke pro-inflamasi setelah pemberian lipopolisakarida. Pada tikus, injeksi dosis rendah lipopolisakarida menyebabkan peningkatan tekanan darah, proteinuria, jumlah trombosit rendah. Selanjutnya, pada tikus hamil yang diberikan lipopolisakarida ditemukan berkurangnya NO, yang ditunjukkan oleh kadar arginin plasma menurun mendekati nol. Perfusi plasenta yang buruk pada preeklamsia, dapat menyebabkan peningkatan sekresi TNF α . TNF α pada tikus preeklamsia berhubungan dengan penurunan kadar NOS dan berkurangnya relaksasi pembuluh darah (Alexander, 2002; Giardina, 2002).

2.7.3.2 Model preeklamsia sistem saraf simpatis

Pada wanita hamil dengan kondisi stres akan meningkat pada kondisi preeklamsia dan juga kejadian IUFD. Pada ibu hamil kondisi stres akan hilang ketika setelah melahirkan (Greenwood, 2001). Saraf simpatis meningkat pada

studi yang dilakukan pada tikus, kondisi tersebut dapat memicu sindrom preeklamsia. Kondisi tikus karena stres kronis akibat tekanan seperti jumlah populasi dikandang yang terlalu banyak dan juga kondisi yang terlalu bising menyebabkan tekanan darah tinggi, disfungsi endotel, penurunan berat badan dan juga IUGR. Rendahnya kondisi trombosit pada tikus akibat dari hiperstimulasi yang menginduksi enzim hati. Pada tikus tidak hamil dan hamil normal tidak terjadi peningkatan kadar norepinefrin dibandingkan dengan tikus dengan preeklamsia (Takiuti, 2002).

2.7.3.3 Model Preeklamsia Dengan Iskemia Uteri

Dasar dari model preeklamsia model ini adalah pada kondisi preeklamsia aliran darah pada uteroplasenta berkurang antara 50% sampai 70%. Terjadinya hipertensi dapat diakibatkan karena iskemia uteroplasenta. Pada kondisi hamil normal terjadi pelebaran arteri spinalis pada trimester yang berfungsi meningkatkan aliran uteroplasenta dan mengurangi resistensi pembuluh darah (Lunell, 1984).

Pada tikus kondisi hipertensi dan proteinuria dapat diakibatkan karena terjadinya konstriksi aorta. Cara yang digunakan untuk menjadikan preeklamsia pada model ini yaitu dengan membuat penyempitan aorta perut bawah serta kedua arteri ovarium dilakukan untuk menekan kompensasi aliran darah plasenta. Setelah itu di amati proteinuria, hipertensi dan penurunan fungsi ginjal pada ibu hamil (Cavanagh, 1985).

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Granger (2006) mengurangi perfusi uteroplasenta dengan memasang klip perak hari ke 14 dan 21 pada aorta dan ovarium rahim. Pada kebuntingan hari ke-19 terdapat peningkatan spesifik pada tekanan darah rata-rata 20-30 mmHg, disfungsi endotel, proteinuria, dan hambatan pertumbuhan janin (Gilbert, 2010).

2.7.3.4 Model Preeklamsia penghambatan sintase nitrit oksida

Pada penelitian dengan menggunakan babi, kelinci dan juga tikus, tindakan blockade pada sintesis NO dapat meningkatkan tekanan darah sistemik. *Nitric Oxide* (NO) merupakan vasodilator sangat kuat yang disintesis oleh asam amino L-arginine, oleh *Nitric okside synthase* (NOS). Selanjutnya pembuatan model preeklamsia dengan pemberian *nitroL-Arginine metal ester* (L-NAME) pada tikus bunting. Pemberian L-NAME berakibat terjadi perkembangan model preeklamsia dengan ditandai peningkatan tensi, proteinuria, trombositopenia, dan pembatasan pertumbuhan intrauterine (Salas, 1995; Heffler, 2001).

Pemberian L-NAME berakibat terjadinya gangguan pensinyalan NO disemua arteri. Kekurangan produksi NO pada kehamilan menyebabkan manifestasi menyerupai preeklamsia. Model ini sangat berguna untuk menunjukan manifestasi defisiensi NO pada preeklamsia (Paulus, 2008).

2.7.3.5 Model Preeklamsia Hiperinsulin

Pada beberapa penelitian menyebutkan bahwa wanita dengan preeklamsia mengalami hiperinsulinemia dan resisten terhadap insulin meskipun sudah dua bulan pasca bersalin, sehingga beberapa peneliti melaporkan terdapat hubungan yang kuat antara preeklamsia dan hiperinsulinemia. Smith (2006) menyebutkan bahwa terdapat data klinis menunjukkan kondisi hiperglikemia yang terjadi pada awal atau pertengahan kehamilan dapat menjadi pemicu terjadinya hipertensi pada kehamilan dengan prosentase terjadinya sekitar 5-10%.

Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba yang diberikan insulin secara subkutan sehingga berakibat hiperinsulinemia menunjukkan peningkatan tekanan darah pada tikus hamil, hipertrigliseridemia, dan pengurangan ekskresi natrium meskipun proteinuria tidak berubah. Kondisi diabetes sendiri berkaitan dengan peningkatan stres oksidatif dan aktivasi ROS, sehingga mengakibatkan penurunan NO dan peningkatan peroksinitrite (Podjamy, 2001; McCarthy, 2011).

2.8 Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

2.8.1 Tanaman Zaitun (*Olea europaea*)

Zaitun (*Olea europaea*) merupakan pohon perdu, tergolong family *Oleaceae* dan merupakan tanaman daerah tropis di dunia. Pohon zaitun apabila sudah hidup puluhan, ratusan hingga ribuan tahun dapat tumbuh menjadi besar. Usia agar tumbuhan ini dapat memproduksi secara maksimal yaitu pada usia 15-20 tahun. Pohon zaitun terkenal karena buahnya dan meruakan tanaman komersial di daerah Mediterania dan merupakan sumber utaman minyak zaitun. Meskipun sekarang banyak wilayah didunia membudidayakan tanaman zaitun, mediterania masih tetap berfungsi sebagai area produksi utama penanaman zaitun yang terhitung sekitar 98% dari produksi dunia (Ghanbari, 2012).

Diantara tanaman tua di Mediterania, pohon zaitun (*Olea europaea*) adalah spesies yang paling ikonik karena kepentingan ekologis, ekonomi, dan kulturalnya. Tanaman ini dianggap sebagai indikator biologis terbaik dari iklim mediterania dan penanamannya telah menyertai munculnya peradaban Mediterania awal. Zaitun telah digunakan sebagai sumber makanan dan pengobatan selama berabad abad, juga dalam ritual agama. Misalnya untuk mengawetkan orang mati, sehelai daun zaitun pada kisah pelarian nabi Nuh dari banjir dan dalam Al-Quran memuji zaitun sebagai buah berharga (Besnard et al., 2013; Diez et al., 2015).

2.8.2 Taksonomi Tanaman Zaitun (*Olea europaea*)

Kingdom : Green Plantae

Devisi : Magnoliophyta-flowering plants

Kelas : Magnoliopsida-Dicotyledons

Subklas : Asteridae

Famili : Oleaceae-ash, privet,lilac and olives

Genus : *Olea*

Spesies : *Europaea*

(Wani, 2015)



Gambar 2.3 Tanaman *Olea europaea*

Keterangan: Tanaman zaitun merupakan tanaman perdu yang memiliki buah yang kecil. Buah zaitun ketika muda berwarna kehijauan dan ketika sudah tua berwarna gelap keunguan (Fehri et al., 1998).

2.8.3 Kandungan dalam *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) didapatkan hanya melalui sarana fisik yaitu dengan penekanan mekanis atau langsung pada buah zaitun dibawah kondisi termal ringan yang tidak menyebabkan perubahan dalam komposisi minyak. Pada tindakan ini tidak menggunakan perawatan apapun kecuali dengan mencuci, dekantasi, sentrifugasi dan filtrasi (Nugraheni, 2012).

Keuntungan dari minyak zaitun dalam kesehatan terutama berasal dari kandungan didalamnya yang banyak akan asam lemak tak jenuh tunggal (MUFAs), bioaktif fungsional diantaranya tokoferol, karotenoid, fosfolipid dan phenolic, dengan aktifitas biologis yang bermacam-macam (Covas, 2008).

Komponen-komponen tersebut sangat bervariasi berkaitan dengan rasa yang unik pada minyak zaitun. Unsur-unsur gizi yang terkandung di dalam *Extra Virgin*

Oil antara lain air (50), protein (1.6%) minyak (22%), karbohidrat (19,1%), selulosa (5.8%), zat anorganik (1,5%) dan senyawa fenolik (1-3%). Senyawa penting lain yang terdapat dalam zaitun adalah pektin, asam organik dan pigmen.

Asam organik menunjukkan aktivitas metabolik yang dihasilkan dari pembentukan dan degradasi senyawa lainnya (Cunha, 2001).

Menurut Assy (2009) pada setiap 100 g EVOO terdapat kandungan lemak 95 g (90-99% fraksi gliserol) dengan komposisi MUFA 73,7 g; SFA 13,5 g; dan PUFA 7,9 g. Di dalam minyak zaitun mengandung asam lemak yang cukup banyak yaitu SFA (asam palmitat, asam stearat), MUFA (asam oleat, asam palmitoleat) dan PUFA (asam linoleat, asam linolenat). Pada EVOO memiliki komponen paling banyak adalah asam oleat (golongan MUFA), dengan kandungan sekitar 55-57% dari jumlah asam lemak (Nugraheni, 2012).

Kandungan gizi yang dimiliki EVOO dinilai berasal dari adanya kandungan asam lemak tak jenuh tunggal (MUFAs) yang besar, seperti asam oleat, sterol (terutama β -sitosterol), hidrokarbon (squalene, senyawa vlatil, tokoferol (terutama α -tokoferol), pigmen seperti klorofil, karotenoid (β Karoten), Lutein dan antioksidan. EVOO diketahui memiliki kandungan senyawa fenolik dan vitamin E (tokoferol) yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan jenis minyak lainnya (Jadhay, 2010).

(Kochhar, 2001).

Tabel 2.2 Kandungan Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

Kandungan EVOO	Per sendok / 15 mL
Energi	0g
Karbohidrat	91 g
Asam Lemak	13 g
Asam Lemak Tak Jenuh Tunggal (MUFA)	66 g
Asam Lemak Tak Jenuh Ganda (PUFA)	12 g
Omega-3	<1,5 g
Omega-6	3,5 - 21 g
Protein	0 g
Vitamin E	14 mg (93%)
Vitamin K	62 mg (59%)

(USDA, 2012)

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) banyak digunakan untuk persiapan makanan, kosmetik dan industri farmasi (Ghanbari *et al.*, 2012). Pengaruh EVOO karena fraksi gliserol sejal dulu berpengaruh terhadap kesehatan Asam oleat disinyalir dapat meningkatkan kadar HDL plasma dan dapat mengurangi LDL. Oleh karena itu asam oleat dianggap mampu mencegah penyakit penyebab kematian di negara industri yaitu kardiovaskular.

Tabel 2.3 Komposisi Asam Lemak yang Terkandung Dalam Minyak Zaitun

Jenis Asam	Kadar (%)
Asam Oleat	55-83
Asam Linoleat	3,5-21
Asam Palminat	7,5-20
Asam Streatat	0,5-5
Asam α-Linolenat	0-5
(USDA, 2012)	

Fraksi non-gliserol yang berfungsi sebagai antioksidan senyawa fenolik, squalene, klorofil, tokoferol, klorofil (pigmen warna) dan β-karoten

- Senyawa Fenolik

Merupakan antioksidan alami yang kuat. Bersama vitamin E dan karotenoid memainkan peran penting melawan peradangan, kanker, penyakit arteri coroner, diabetes, penyakit saraf degeneratif. Senyawa fenolik didalam minyak zaitun (hidrokortisol, oleuropein, caffeic acid, coumaric acid, vanillic acid. Senyawa fenolik dapat disintesis secara alami oleh tanaman sebagai respon terhadap kondisi stres seperti infeksi, luka, dan radiasi UV (Ghanbari *et al.*, 2012.
- Tokoferol (Vitamin E)

Vitamin yang larut lemak yang terdapat di minyak zaitun dalam porsi banyak adalah vitamin E. Tokoferol dibagi menjadi 4 jenis yaitu tokoferol alfa, beta,

gamma dan delta. Pada keempat jenis tokoferol tersebut kandungan paling tinggi konsentrasinya adalah jenis alfa. Kandungan hampir 90% dari total tokoferol dalam minyak zaitun (Beltran et al., 2014).

- Squalene

Konsentrasi squalene dalam minyak zaitun berkisar 2.500-9.250 mikrogram per gram. Sedangkan di minyak lain hanya 16-370 mikrogram per gram.

Secara alamiah squalene tersebar diseluruh organ dan jaringan diseluruh tubuh. Squalene merupakan bagian dari sintesis kolesterol, hormon steroid dan vitamin dalam tubuh. Squalene memiliki sifat anti kanker.

- Klorofil dan β -Karoten

Warna minyak zaitun murni dari kandungan klorofil, feofinin dan karotenoid.

Tinggi kandungan kadar tergantung dari kematangan buah, kultivasi zaitun, tanah dan kondisi iklim, prosedur ekstraksi dan pengolahan. Klorofil dan feofitin mampu melindungi minyak terhadap oksidasi dalam keadaan gelap, sedangkan karotenoid melindungi dari oksidasi dalam keadaan terang.

Ketiga pigmen tersebut memudahkan penyerapan minyak di dalam tubuh.

Polifenol didalam *extra virgin olive oil* bekerja sebagai antioksidan yang sangat baik. Polifenol didalam AVOO menurut Cunha (2001) berkisar 1-3%. Hasil pemeriksaan antioksidan (nomor: 0263/THP/LAB/2018) di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Universitas Brawijaya dengan hasil IC50 sebesar 48,56. Dengan range nilai sangat kuat bila kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (101-150), dan rendah (151-200). Antioksidan tersebut merupakan suatu enzim yang dapat melindungi tubuh dengan cara menangkap radikal bebas dan membuangnya sebelum menimbulkan masalah). Polifenol biasanya dapat ditemukan pada tumbuhan lain. Tanda kas dari zat ini adalah memiliki gugus fenol yang banyak didalam molekulnya. Kandungan polifenol mempengaruhi dari

warna tumbuhan tersebut. Selain zaitun tanaman yang mengandung polifenol antara lain teh hijau, teh putih, anggur merah, anggur putih, delima dan coklat hitam. Kadar polifenol pada teh putih adalah 0,99. Oleh karena itu lebih besar kandungan polifenol dalam zaitun karena didalam zaitun sebesar 1-3 (Cunha, 2001; Orey, 2008; Widyasanti, 2016).

2.8.4 Kualitas minyak zaitun

Berikut ini merupakan hasil-hasil pemrosesan Zaitun:

- Extra virgin merupakan hasil dari zaitun nomor 1. Produk ini memiliki keasaman kurang dari 1% dapat langsung diminum tanpa pengolahan kimia dan memiliki rasa buah yang kuat. Produk ini sangat dianjurkan untuk kesehatan.
- Virgin merupakan memproses minyak melalui proses mekanik yaitu dengan perasan tanpa pemanas, tingkat keasaman pada produk ini adalah 1-5%.
- Pure merupakan bahan yang diolah dengan bahan kimia. Produk ini merupakan bahan sulingan yang dicampur dan memiliki tingkat keasaman 3-4%.
- Extracted and refined merupakan bahan dengan menggunakan pelarut kimia pada sisa perasan pertama.
- Pomace merupakan hasil yang diperoleh dari pengolahan ke dua dan mengandung keasaman 5-10%.

Dr Deane adalah pakar minyak zaitun berpendapat bahwa extra virgin merupakan suatu produk minyak yang dapat langsung dikonsumsi tanpa pengolahan lebih lanjut. Kandungan dalam *extra virgin olive oil* masih memiliki seluruh kandungan alami yang dimiliki zaitun yaitu vitamin, mineral, antioksidan dan produk-produk kesehatan yang lain yang dimiliki oleh buah zaitun yang telah matang (Orey, 2008).

2.8.5 *Extra virgin olive oil* sebagai antioksidan dan antiinflamasi

Reactive Oxygen Species (ROS) terbentuk akibat dari stres oksidatif, diketahui memiliki peran terhadap terjadinya dari beberapa penyakit yang sasarannya adalah lipid, protein dan asam deoksiribonukleat (DNA) pada mahluk hidup (Jenifer, 1996). Pada penelitian *in vivo* didapatkan bahwa kandungan polifenol didalam zaitun berperan sebagai antioksidan dengan menunda aterosklerosis (Visioli, 2000). Beberapa penelitian baik pada wanita atau pria menunjukkan bahwa dengan mengganti *saturated fatty acid* (SFA) dengan *monounsaturated fatty acid* (MUFA) pada zaitun dapat menurunkan tekanan darah (Mensink, 1988). Kandungan yang menguntungkan pada minyak zaitun yaitu adanya polifenol yang tinggi dapat memberikan perlindungan pada fungsi endotel vaskuler sehingga dapat menjaga tekanan darah. Senyawa fenolik pada EVOO telah terbukti memberikan efek yang menguntungkan pada oksida lipid, kerusakan oksidatif DNA dan stres oksidatif baik secara *in vivo* ataupun *in vitro*. Oksidasi LDL (oxLDL) dianggap sebagai resiko utama terjadinya aterosklerosis dan CVD, karena menginduksi terbentuknya plak di dalam dinding arteri. Pada studi manusia dan hewan secara *in vivo* menunjukkan penurunan oksidasi LDL dengan mengkonsumsi fenolik minyak zaitun. Menurut penelitian lain kandungan polifenol dalam EVOO terbukti mengurangi *reaktif oksigen spesies* (ROS) dan juga memiliki efek pembersihan radikal bebas yang secara efektif. Sebuah studi *cross over* acak menemukan bahwa asupan minyak zaitun yang diperkaya fenolik (400 mg/kg) secara signifikan menurunkan kadar F2-isoprostane. F2-isoprostane merupakan hasil dari peroksidasi radikal bebas yang diinduksi dari asam arakidonat, asam lemak yang terikat membrane (Ruano et al., 2005; Marrugat et al., 2004; Covas et al., 2006; Covas, 2007; Goya et al. 2007; De la Torre-Carbot et al., 2010; ; Cioffi et al., 2010).

Selain berpotensi sebagai antioksidan, aktivitas biologis fenolat minyak zaitun pada enzim telah diuji dalam bermacam-macam model seluler (misal platelet, leukosit dan makrofag) yang relevan untuk kondisi manusia. Kebanyakan fenolat minyak zaitun bersifat amphiphilic dan mempunyai kesanggupan untuk memodulasi enzim seperti cyclo dan lioxygenase, NADPH oxidase dan nitric oxide synthase, didalam fungsi-fungsi dari sel-sel tersebut. Hidroksitirosol merupakan komponen dari polifenol yang bekerja menghambat produksi molekul pro-inflamasi dan juga menghambat aktivitas lipoksigenase arakidonat (Kohyama, 1997; Puerta, 1999).

Tabel 2.4 Manfaat fenolat zaitun/minyak zaitun pada kesehatan

Aktivitas Biologis	Potensi target klinis
Aktivitas antioksidan	Kardiofaskular dan penyakit degenerative
Aktivitas anti peradangan	Menghambat enzim proinflamasi
Aktivitas anti aterogenik	Penyakit jantung korones, pukulan
Aktivitas antimikroba	Penyakit menular
Aktivitas anti tumor	Berbagai jenis kanker
Agregasi anti platelet	Penyakit jantung koroner, pukulan
Aktivitas anti Hipertensi	Hipertensi
Peningkatan vitamin A dan aktivitas B-karoten	Antiaging/perlindungan kulit
Meningkatnya aktivitas kekebalan tubuh	Penyakit manular, berbagai kanker
Penurunan kadar plasma kolesterol dan LDL teroksidasi	Penyakit jantung koroner

Sumber: Ghanbari, 2012.

Senyawa phenolic yang terkandung didalam EVOO menurut Santangelo (2017) dapat digunakan sebagai anti inflamasi dan juga antioksidan dengan memicu bertambahnya sitokin antiinflamasi misalnya IL-10, enzim anti oksidan glutathione peroxidase (GPx) dan transkripsi antioksidan factor Nrf2 yang meningkat. Menurut berbagai penelitian mengatakan proses polifenol dalam

EVOO dalam menghambat inflamasi yaitu dengan menghambat pada NF- κ B dan p38MAPK (Richard, 2011; Lu, 2013; Sato, 2016). Telah dilakukan penelitian senyawa fenolik didalam EVOO memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi yang signifikan. Dalam penelitian yang dilakukan baik secara in vivo ataupun in vitro, senyawa fenolik didalam EVOO mampu mengurangi respon inflamasi dalam tubuh sehingga mampu mengurangi peradangan kronis. Bukti lain menunjukkan fenolik, oleuropein aglikon dapat menghambat *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) menginduksi matriks metalloprotein 9 (MMP-9) di sel monosit, dan ini memiliki implikasi terhadap beberapa penyakit berbasis inflamasi. Camargo (2009) menyebutkan kandungan fenolik EVOO dengan dosis 70 mg/kg sampai 398 mg/kg dapat menurunkan beberapa gen inflamasi termasuk NF- κ B dan COX-2 (Khymenets *et al.*, 2009; Corona *et al.*, 2009; Konstantinidou *et al.*, 2010; Dell'Agli *et al.*, 2010; Cicerale *et al.*, 2012).

Jenis Virgin Olive Oil dikatakan cocok untuk dikonsumsi karena pada dasarnya dibuat tanpa bahan tambahan sedangkan *Extra Virgin Olive Oil* adalah sebutan yang diakui untuk sebagian kecil minyak zaitun yang lolos standar ketat *International Olive Association* (IOC). Minyak zaitun yang diizinkan untuk disebut *Extra Virgin* sangat langka dan jumlahnya sedikit. Produsen utama *Extra Virgin Olive Oil* adalah Italia dengan persentase 45% dan Spanyol berada pada posisi kedua dengan persentase 30%. Borges merupakan nomor 2 yang direkomendasikan *Extra Virgin Olive Oil* terbaik. Borges dihasilkan dari zaitun yang berkualitas tinggi di dataran mediterania (Mybest, 2018). Informasi gizi Borges *Extra Virgin Olive Oil* dalam 1 porsi (10 mL) adalah:

Tabel 2. 5 Informasi Gizi Borges Extra Virgin Olive Oil

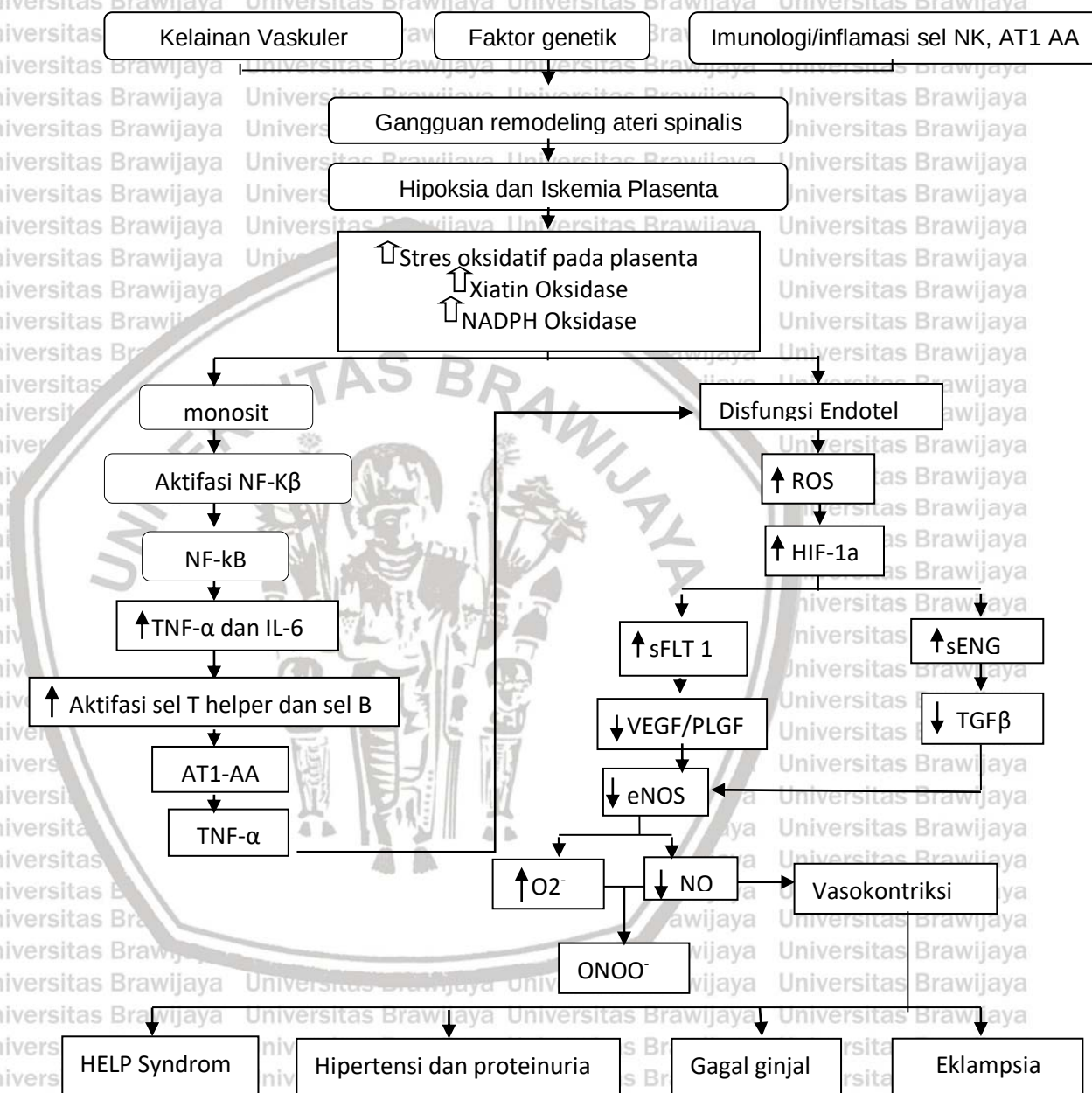
Per porsi	
Energi	377 kJ 90 kkal
Lemak	10 g
Lemak Jenuh	1,5 g
Lemak Trans	0 g
Lemak Tak Jenuh Tunggal	8 g
Kolesterol	0 g
Protein	0 g
Karbohidrat	0 g
Serat	0 g
Gula	0 g
Sodium	0 mg
Kalium	0 mg

Sumber: Fatsecret Platform API, 2018

BAB 3

KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 kerangka teori penelitian

Penjelasan:

Penyebab terjadinya preeklamsia sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. Dari berbagai penelitian terdahulu yang telah dilakukan salah satu penyebab dari preeklamsia dapat dari faktor genetik, inflamasi, peningkatan stres oksidatif, iskemia plasenta dan disfungsi endotel. Selain itu beberapa ahli menyatakan pengaruh implantasi plasenta yang abnormal merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya preeklamsia yaitu kegagalan sel trofoblas dalam melakukan invasi pada dinding arteri spiralis sehingga menyebabkan penurunan aliran darah pada plasenta karena arteri spiralis tidak melebar yang berakibat terjadinya hipoksia dan iskemia plasenta (Dharma *et al.*, 2005; Susianto *et al.*, 2009).

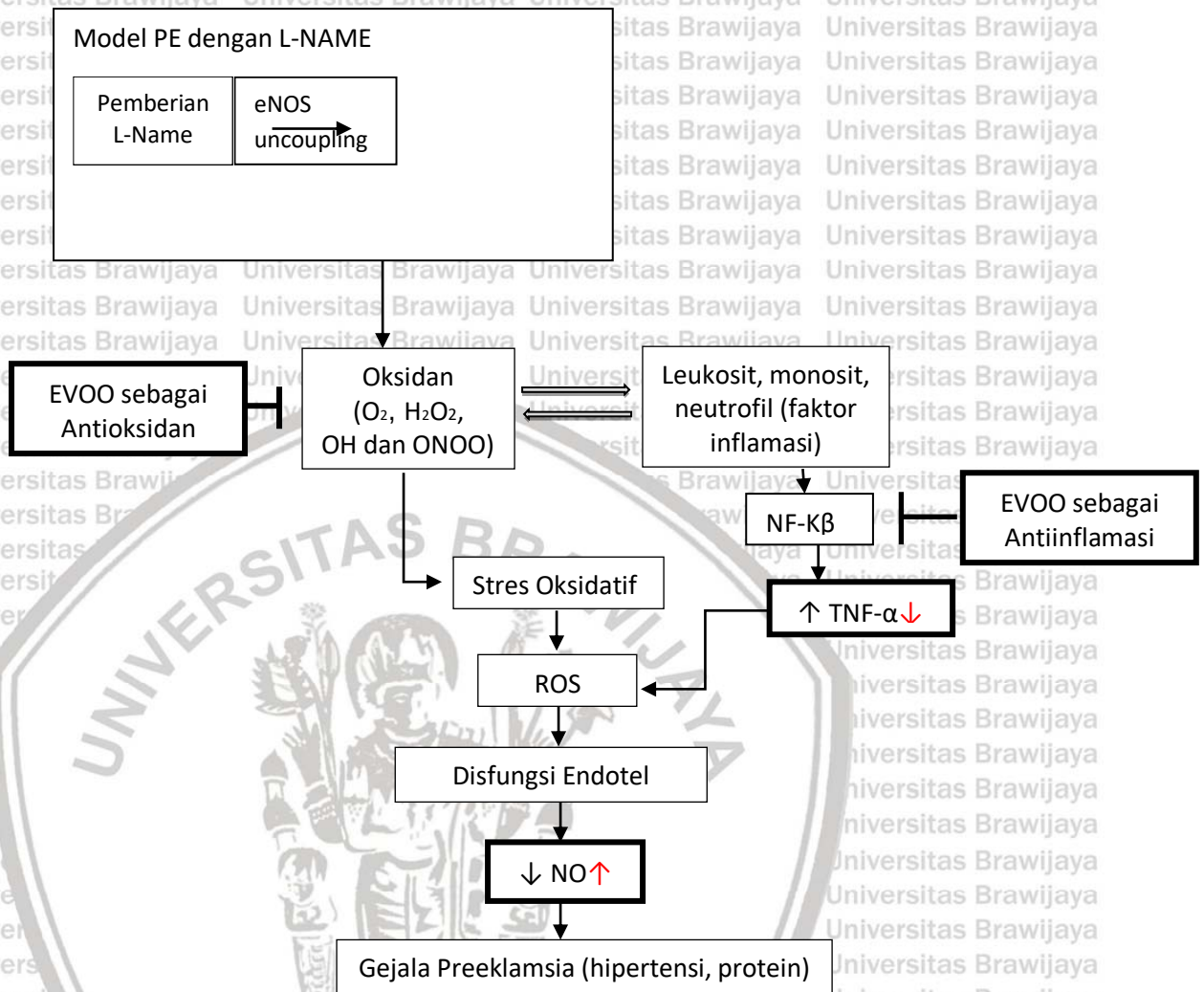
Hipoksia yang berkelanjutan akan mengaktifasi pembentukan Nf-kB sehingga memicu diproduksi sitokin proinflamasi salah satunya adalah TNF- α , yang berdasarkan Xie (2011) sering dijadikan marker dari aktivasi sistem imun dan menyebabkan disfungsi endotel (Abbas & Lichtman, 2008; Xie *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012; Baratawidjaja & rengganis, 2013). Respon dari suatu inflamasi melibatkan beberapa faktor transkripsi diantaranya adalah Nf-kB yang sangat berpengaruh pada respon inflamasi (Rahardjo *et al.*, 2014).

Kondisi iskemia plasenta juga dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang ditandai oleh peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan radikal bebas yang berakibat terbentuknya peroksida lemak. Akumulasi peroksida lemak akan mengakibatkan rusaknya endotel akibat dari terbentuknya radikal toksik, kondisi tersebut akan merubah produksi nitrit oksida dengan mengganggu keseimbangan prostaglandin. Akibat lain dari stres oksidatif adalah pembentukan produksi sel busa yang merupakan awal pembentukan lemak pada aterosclerosis, aktivitasi koagulasi mikrovaskuler, yang ditandai dengan peningkatan permeabilitas kapiler dan trombositopenia dengan bermanifestasi klinis odem dan proteinuria (Cunningham, 2013).

Inflamasi dan stres oksidatif memicu terjadinya kerusakan endotel, kondisi ini terjadi ketidak seimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi, sehingga menyebabkan terjadi hipertensi dan peningkatan permeabilitas vaskuler yang manifestasi klinisnya edema dan proteinuria.



3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka konsep

Keterangan :



: penghambat

: variable yang diteliti

Wana hitam pada panah ↓↑ : efek sebelum perlakuan

Warna merah pada panah ↓↑ : efek setelah pemberian EVOO

Penjelasan :

Pemberian *nitro-L-arginine methyl ester* (L-Name) terbukti dapat menginduksi preeklamsia (Amaral *et al.*, 2017). Peningkatan anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksi ($OH^\cdot$) dan peroksinitrit ($ONOO^\cdot$) merupakan penanda dari peningkatan stres oksidatif (Baktiyani, 2010). Sel inflamasi seperti monosit, leukosit dan neutrofil akan teraktivasi dengan berubahnya fungsi endotel pada sirkulasi maternal (Wang *et al.*, 2007, Faas *et al.*, 2010). Perubahan tersebut akan mengakibatkan terjadinya aktivasi oksidan pada sel endotel (Faas *et al.*, 2010).

Oksidan meningkat pada sirkulasi maternal yang terdapat di plasma preeklamsia. Peningkatan oksidan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif (Baktiyani, 2010). Stres oksidatif terjadi disproporsion antara antioksidan dan prooksidan yang ditandai dengan bertambahnya kadar ROS (O_2^- , $OH^\cdot$, H_2O_2 dan $ONOO^\cdot$) atau berkurangnya antioksidan dan penurunan NO.

Stres oksidatif akan mempengaruhi fungsi endotel dengan mengaktivasi sel inflamasi yaitu monosit, leukosit dan neutrofil. Aktivasi leukosit pada sirkulasi maternal merupakan sumber potensial peningkatan ROS yaitu dengan pelepasan protease pada sel endotel oleh leukosit. Injeksi L-NAME mengakibatkan eNOS uncoupling sehingga mengakibatkan peningkatan oksidan yang dapat memicu terjadinya inflamasi dengan mengaktivasi NF- κ B. Factor transkripsi NF- κ B teraktivasi akan memicu sekresi sitokin proinflamasi TNF- α . Peningkatan TNF- α akan menyebabkan terjadinya disfungsi endotel yang diawali dengan memicu ROS. Disfungsi pada sel endotel mengakibatkan terjadinya vasokonstriksi dengan timbulnya gejala preeklamsia seperti hipertensi dan protein urin (Saucedo *et al.*, 2014).

Ekstrak methanol dari *evoo* polifenol terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan. Polifenol memiliki kemampuan menghambat sitokin pro inflamasi dengan mekanisme penghambatan NF- κ B dan p38MAPK (Richard,

2011; Lu, 2013; Sato, 2016). EVOO merek Borges telah diuji kadar kandungan antioksidan IC50 di laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Universitas Brawijaya didapatkan hasil 48,56 (nomor: 0263/THP/LAB/2018) dengan keterangan kandungan antioksidan dari suatu senyawa dianggap sangat kuat bila kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (101-150), dan kurang (151-200), pada pengukuran antioksidan IC50.

Preeklamsia mengalami kondisi hipoksia plasenta yang berakibat terjadinya peningkatan TNF- α yang akan mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel yang memicu penurunan NO. Kondisi hipoksia plasenta menjadi penyebab terjadinya stres oksidatif dan berdampak pada disfungsi endotel (Dharma *et al.*, 2005; Susianto *et al.*, 2009). EVOO dengan kandungan polifenol yang tinggi berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi sehingga di asumsikan dapat mengurangi terjadinya disfungsi endotel dengan menghambat aktivasi NF-kB sehingga menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan NO. Oleh karena itu dilakukan penelitian pada tikus putih (*ratus norvergicus*) model preeklamsia adalah untuk membuktikan asumsi tersebut.

3.3 Hipotesis

Pemberian EVOO dapat menurunkan kadar *tumour necrosis factor alpha* (TNF- α) dan meningkatkan *nitric oksida* (NO) pada *Rattus norvergicus* model preeklamsia.

3.3.1 Sub Hipotesis

1. Pemberian L-NAME 125 mL/kgBB dapat meningkatkan kadar TNF- α dan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia
2. Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) menurunkan kadar TNF- α pada tikus model preeklamsia.
3. Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) meningkatkan kadar NO pada tikus model preeklamsia.

4. Terdapat korelasi antara dosis EVOO dengan kadar TNF- α dan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia.

5. Terdapat korelasi antara kadar TNF- α dengan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *posttest only control group design*. Dalam studi ini dilakukan intervensi terhadap tikus wistar yang diberikan ekstrak EVOO (*Ekstrak Virgin Olive Oil*) dengan berbagai dosis kemudian dilanjutkan dengan paparan L-NAME. Subjek pada penelitian ini berjumlah 5 kelompok. Parameter yang diamati akibat adanya perlakuan tersebut pada penelitian ini adalah kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan *Nitric Oxide* (NO) pada tikus wistar model preeklamsia.

4.2 Sampel Penelitian

Tikus wistar (*Rattus Novergicus*) diperoleh dari LPPM UGM.

4.2.1 Besar Sampel

Dalam studi ini estimasi besar sampel pada tiap perlakuan ditentukan berdasarkan jumlah sampel tiap perlakuan atau jumlah pengulangan (n) dan jumlah kelompok perlakuan (p) sebanyak 5 kelompok, kemudian dihitung sebagai berikut dengan rumus Solimun (2002):

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

$$Pn - p \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hasil dari penghitungan didapatkan banyak sampel minimal 4 ekor tikus putih bunting tiap kali pengulangan. Dengan demikian 4 ekor tikus bunting masing-masing kelompok untuk 5 kelompok. Jadi total sampel adalah 20 ekor

tikus putih bunting di tambah 10% dari jumlah sampel sebagai cadangan pada setiapkelompok perlakuan, sehingga menjadi 28 ekor tikus putih bunting.

Tabel 4.1. Kelompok penelitian

SUBYEK	L-NAME	EVOO
Kontrol Negatif (K-)	-	-
Kontrol Positif (K+)	125 mg/KgBB	-
Kontrol perlakuan 1 (P1)	125 mg/KgBB	0,5 mL/hari
Kontrol perlakuan 2 (P2)	125 mg/KgBB	1 mL/hari
Kontrol perlakuan 3 (P3)	125 mg/KgBB	2 mL/hari

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Sampel penelitian ini diilih berdasarkan ketentuan:

1. Kriteria inklusi:

a. Tikus wistar

- 1) Tikus putih bunting dengan usia gestasi hari pertama kebuntingan
- 2) Usia minimal 8 minggu
- 3) Berat badan 150-200 gram
- 4) Sehat dalam arti mampu bergerak aktif, bulu lebat berwarna putih dan tidak cacat
- 5) Tekanan darah sistole ≥ 140 mmHg dan atau protein urin $\geq +1$ setelah di injeksi L-Name

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang melahirkan sebelum penelitian selesai dilakukan.
- b. Tikus yang keadaannya melemah (sakit) atau mati saat penelitian berjalan.
- c. Tikus pernah mendpat perlakuan sebelumnya pada penelitian lain.

4.3 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biosains, Laboratorium Biomedik, dan laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2019.

4.4 Bahan Dan Alat

4.4.1 Bahan dan alat pemeliharaan hewan coba

- a. Pakanan hewan coba adalah makanan ternak (PT. Japfa Comfeed Indonesia, TBK. Buduran Sidoarjo) sesuai standar operasional prosedur (SOP) di laboratorium farmakologi fakultas kedokteran universitas brawijaya Malang dengan komposisi jagung kuning, asam amino esensial, wheat bran, palm olein, mineral esensial, premix dan vitamin dengan kandungan sebagai berikut:

Tabel 4.2 Kadar Nutrisi Hewan Coba

NO	Kandungan	Jumlah
1	Air	Maksimum 12%
2	Protein kasar	Minimum 12%
3	Lemak kasar	3-7%
4	Serat kasar	Maksimum 8%
5	Abu	Maksimum 10%
6	Kalsium	0.9 – 1.2%
7	Fosfor	0.7 – 1.0%
8	Coccidiostat	+
9	Antibiotic	+

Keterangan: Pakan diproduksi oleh PT. Japfa Comfeed Indonesia, TBK. Buduran-Sidoarjo.

Pakan diberikan pada tikus bunting 40 gram per ekor setiap hari.

- b. Air minum yang digunakan adalah air mineral saat adaptasi dan selanjutnya diberikan air keran yang dimasukkan dalam botol/nipple dan diletakkan diatas sangkar. Pemberian air minum secara *ad libitum*.
- c. Kandang tikus yang digunakan dari box plastic dengan ukuran 45 cm x 35 cm x 12 cm dan ditutup dengan kawat berjaring. Masing-masing kandang

ditempati 4 tikus putih bunting dan menjadi 1 kelompok. Dilakukan pengantian sekam setiap 3 hari sekali.

- d. Mengukur berat badan tikus bunting dengan menggunakan timbangan balance analitik dengan satuan gram. Menimbang berat badan tikus putih dilakukan setiap minggu, pada hari pertama kehamilan, hari ke 7 kehamilan, hari ke 14 kehamilan dan hari ke 19 kehamilan.
- e. Handscoon dan masker.

4.4.2 Bahan dan Alat Perlakuan Hewan Coba

4.4.2.1 Pemberian EVOO

- a. Bahan : EVOO (Borges Spanyol).
- b. Alat : Spuit 1 cc, sonde lambung.

4.4.2.2 Paparan L-NAME

- a. Bahan : L-NAME ($C_7H_{15}N_5O_4.HCl$) merek Cayman Chemical cas registry no. 51298-62-5, PBS, Aquades, Kapas alcohol.
- b. Alat : Spuit 1cc, Timbangan mikro digital, mortar, gelas ukur.

4.4.3 Bahan dan alat Pembedahan Hewan Coba

- a. Bahan: NaCl
- b. Alat: stik besi, sarung tangan, jarum, timbangan mikro digital, spuit 5cc, pinset, gunting bedah, jarum, vacutainer, klem dan papan bedah (tempat pembedahan).

4.4.4 Bahan dan alat Pemeriksaan NO

- a. Alat: Elabscience NO colorimetric Assay Kit (no catalog Elabscience E-BC-K036, dengan panjang gelombang 550 nm), tubes, micropipette, vortex mixer, microplate reader (550 nm), larutan cromogenik, griess reagent R1, reagent R2, reagent R3, reagent R4, reagent R5, dan reagent R6.
- b. Bahan: serum tikus yang dijadikan subyek penelitian.

4.4.5 Bahan dan alat untuk pemeriksaan TNF- α

Melakukan pemeriksaan kadar TNF- α dengan menggunakan metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) menggunakan Elabscience ELISA kit with pre-coated plates Rat TNF- α no. E-EL-R0019.

a. Bahan ELISA kit: Wash buffer, Matrix A, reference standart, Standard dilutions, Biotinylated Detection Ab Diluent, HRP Conjugate Diluent, Substrate reagent, Stop Solution.

b. Alat pada pemeriksaan kadar TNF- α : Tabung eppendorf, santrifuse dengan pengaturan suhu (Mikro 2206 A Hettic Zentrifugen), micro ELISA Plates, Pipet mikro, tip biru, tip putih, tip kuning, vortex, ELISA reader, microplate reader dengan filter panjang gelombang 450 nm.

4.4.6 Bahan dan alat perlakuan Hewan Coba

a. Alat pemaparan L-NAME

sprit 1 cc, tourniquet, kapas alkohol, senrifuse, plain vacunttainer

b. Pemaparan EVOO

Sprit 3cc, sonde lambung dan kapas alkohol

4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independent): polifenol dari *extra virgin olive oil* (evoo) dengan dosis berbeda yaitu 0,5 ml, 1 ml, dan 2 ml.

2. Variabel Tergantung (Dependent): kadar TNF- α dan NO pada tikus wistar bunting model preeklamsia.

4.6 Definisi Operasional

1. Tikus bunting

Tikus wistar betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dan telah memiliki tanda-tanda seperti vaginal plug sebagai tanda telah terjadinya kopulasi dan adanya peningkatan berat badan secara progresif sebagai tanda kebuntingan (Heyne, 2015).

2. Tikus model preeklamsia

Tikus wistar bunting yang diinjeksi L-NAME secara intra peritoneal dengan dosis 125mg/kgBB diberikan tiap hari sejak usia kehamilan 13-18 dan didiagnosa preeklamsia dengan kriteria tensi sistole ≥ 140 mmHg dan atau proteinurin $\geq +1$ (Zhu, 2016).

3. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α yang merupakan sitokin pro-inflamasi, berperan pada proses inflamasi dan produksi oleh makrofag. Kadar TNF- α diambil dari bahan serum darah jantung kemudian diukur menggunakan metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dengan no catalog Elabscience TNF- α E-EL-R009. Hasil pengukuran menggunakan satuan pg/ml.

4. Kadar NO

Didapat dengan mengukur produk akhir yang stabil dari oksidasi NO yaitu sampel berupa serum dan diperiksa menggunakan metode colorimetric dengan no catalog Elabscience E-BC-K036, dengan panjang gelombang 550 nm. Hasil pengukuran menggunakan satuan $\mu\text{mol/L}$

5. *Extra virgin olive oil* (EVOO) adalah *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan merek dagang Borges. Pemberian melalui peroral menggunakan sonde lambung pada perlakuan 1, 2 dan 3 dengan dosis masing-masing 0,5 ml/hari, 1 ml/hari dan 2 ml/hari setiap hari mulai dari kebuntingan hari pertama sampai hari ke 18.

6. Paparan L-Name

L-NAME merupakan NOS inhibitor ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\text{HCl}$) berupa kristal padat dengan berat molekul 269,7kDa dan kemurnian 99%. Pemberian injeksi L-NAME secara intra peritoneal sebanyak 125 mg/KgBB per hari mulai hari ke 13-18 kebuntingan.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Melakukan aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) tikus putih sebagai sampel selama 1 minggu (7hari) sebelum diberikan perlakuan (Ridwan, 2013). Selama aklimatisasi tikus putih ditempatkan dalam kandang, diberikan pakan dan minuman mineral secara *ad libitum*. Melakukan aklimatisasi supaya tikus putih beradaptasi dengan lingkungan sekitar tempat tinggal, pakan, minuman, suhu dan cahaya sehingga menegah terjadinya stres pada tikus wistar (Widiartini *et al*, 2013).

4.7.2 Pemeliharaan hewan coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus wistar yang diperoleh dari LPPT UGM, Pemeliharaan dilakukan dengan cara:

- a. Tikus wistar ditempatkan dalam kandang yang berasal dari plastik dengan ukuran 45 cm x 35 cm x12 cm setiap kandang ditepati 4 ekor tikus wistar.

Memberikan kandang alas dari sekam padi dengan ketebalan 1,5cm – 2cm.

Tutup kandang terbuat dari kawat seperti jaring. Mengganti sekam setiap 3 hari sekali pada pagi hari untuk menjaga kebersihan kandang, mempertahankan kelembapan ruangan dengan suhu ruangan yang baik untuk tikus sekitar 27-28°C. mengatur pencahayaan ruangan 12 jam terang (06.00-18.00) dan 12 jam gelap (18.00-06.00) (Zade, 2014).

- b. Tikus wistar diberikan pakan standar berbentuk pallet, terbuat dari jagung, dedek, asam amino esensial, minyak, mineral, vitamin dan garam.

Presentase kandungan bahan pakan adalah air maksimum 12%, protein kasar minimum 12%, lemak kasar 3-7%, sarat kasar maksimum 8%, abu maksimum 10%, kalsium 0,9-1,2% dan fosfor 0,7-1,0% dan antibiotic.

Mencampur makanan dengan menambahkan air. Mencampur semuanya

secara merata dengan konsistensi tidak keras. Memberikan tikus makan 50 gr/ekor/hari.

- c. Memberikan tikus wistar air minum berupa air mineral secara *ad libitum* menggunakan botol sebanyak 60 cc saat aklimatisasi. Selanjutnya selesai aklimatisasi memberikan air minum dari air keran secara *ad libitum*.

4.7.3 Prosedur Pengawinan dan Pembuntingan hewan coba

Tikus wistar yang dikawinkan berusia lebih dari 8 minggu. Mengawinkan tikus wistar bertujuan mendapatkan tikus yang bunting. Proses membuntingkan dilakukan berdasarkan fenomena biologis berupa *lee boot effect*, *Pheromone effect* dan *Whitten effect*. Fenomena biologis ini diterapkan selama masa aklimatisasi. Pertama menerapkan *lee boot effect*, yaitu beberapa tikus betina ditempatkan dalam satu kandang, saat ini tikus putih dalam fase un-estrus. Kedua menerapkan *Pheromone effect*, yaitu memebrikan paparan bau-bauan yang berasal dari tikus jantan dan memberikan sekam dari kandang tikus jantan ke kandang tikus betina. Ketiga terjadi *Whitten effect* yaitu setelah 72 jam pemaparan sekam tikus putih jantan tikus putih betina mengalami birahi atau fase estrus (Fitri et al., 2015).

Tikus wistar betina dikawinkan dengan mencampur tikus putih jantan dengan tikus betina dalam 1 kandang dengan perbandingan 1:1 pada pukul 16.00 – 05.00 WIB dengan dibiarkan selama 1 malam. Keesokan harinya pada pagi hari (05.00), jika ditemukan atau tidak ditemukan vaginal plug maka dihitung hari pertama kehamilan (Zade, 2014; Samsuria, 2009). Memberikan label (*permanen board marker*) pada semua tikus yang dianggap bunting, selanjutnya memasukkan tikus putih kedalam kelompok secara random. Tikus putih yang tidak bunting atau tidak digunakan akan disumbangkan ke laboratorium Biosain untuk dimanfaatkan sebagai hewan percobaan dalam praktikum. Observasi

kebuntingan dapat dilakukan berdasarkan peningkatan berat badan secara progresif (Heyne, 2015) dan pembesaran abdomen tikus.

4.7.4 Prosedur Pembuatan Hewan Coba Model Preeklamsia

Tikus wistar model preeklamsia dibuat dengan cara melarutkan L-NAME secara intraperitoneal sebanyak 125 mg/kgBB per hari, sejak kebuntingan hari ke 13-18 (Zhu, 2016). Injeksi L-name dilakukan satu kali sehari yaitu jam 15.00.

Pemberian injeksi intraperitoneal pada tikus maksimal 0,2 ml. Dosis L-name yang digunakan sebanyak 125 mg/kgBB (Zhu, 2016). Satu tablet PBS dilarutkan dalam 100 cc aquades.

Perhitungan dosis pemberiannya adalah sebagai berikut:

1. Dosis L-Name yang digunakan 125 mg/KgBB. Pemberian secara intraperitoneal maksimal diberikan 0,2 cc setiap tikus.
2. Perhitungan dosis L-NAME setiap tikus estimasi BB 200 gram

$$\text{L-NAME } 125 \text{ mg/KgBB} = 125/1000 \times 200 = 12,5 \text{ mg/ tikus}$$
3. Pelarutan L-NAME menggunakan cara:
 Larutan PBS = 1 tablet PBS (Phosphate Buffer Saline) dilarutkan dengan 100 cc aquades.
4. Pada kontrol negatif, diberikan injeksi PBS sebanyak 0,2 cc secara intraperitoneal dilakukan 1 kali sehari dari kebuntingan 13-18.

Langkah-langkah pemberian injeksi sebagai berikut:

- a. Masing-masing serum L-NAME dimasukkan kedalam spuit 1 ml sebanyak 0,2 cc.
- b. Kaki sampai pangkal ekor dipegang.
- c. Telapak tangan mencengkeram mulai bagian belakang tubuh dengan telunjuk dan jempol secara perlahan diletakkan disamping kiri leher.
- d. Tangan yang lain digunakan untuk menyuntik.

- e. Tentukan lokasi penyuntikan yaitu secara intraperitoneal, jarum diinjeksikan dari abdomen yaitu pada daerah dibawah permukaan kulit, dengan menarik kulit tikus agar tidak terkena kandung kemih, hati dan rahim (Anonim, 1995).
- f. Setelah itu melepaskan tikus dan mengembalikan kekandang.

4.7.5 Pengukuran tekanan darah

Pengukuran tekanan darah sebanyak 3 kali pada kebuntingan 12, 15 dan 19.

Pengukuran tekanan darah dengan cara *Tail Cuff method* menggunakan alat Kent scientific CODA.

Prosedur pemeriksaan di laboratorium Fisiologi FK UB disesuaikan pada prosedur alat pengukuran tekanan darah sebagai berikut:

- a. Sebelum memulai pengukuran, angkat CODA dan mengukur suhu ekor hewan dengan menunjuk thermometer infamerah di dasar ekor itu.

Pengukuran tekanan darah diukur jika suhu 32 dan 35°C

- b. Memposisikan hewan coba pada pegangan yang berbentuk seperti tabung dengan memastikan ekor hewan coba berada diluar.
- c. Menggeser manset VPR sampai ekor, dengan ujung diameter yang lebih besar pertama, seperti mencapai manset oklusi. Gunakan manset satu ukuran lebih besar dari bagian ekor.

4.7.6 Pengukuran protein urin

Pengukuran protein urin dilakukan pada usia hari 12, 15 dan 19 kebuntingan, yaitu dengan cara tikus ditempatkan pada kandang metabolit. Urin diukur menggunakan urinalysis reagen test strips dengan merek Uriscan 3GPH strip.

4.7.7 Penentuan dosis EVOO

Pemberian EVOO mengacu pada penelitian Nugraheni (2012) dan Irianti *et al* (2017). Mengacu pada diet masyarakat Mediterania, kebutuhan minyak zaitun harian adalah 30-50 gram. Jika dikonversikan dalam dosis sesuai berat badan

tikus, maka = $30 \times 0.018 = 0.54 \approx 0.5$ gram/ hari. Evoo yang diberikan pada tikus

Wistar bunting model preeklamsia dengan dosis :

- Perlakuan 1 : 0,5 gr/hari
- Perlakuan 2 : 1 gr/hari
- Perlakuan 3 : 2 gr/hari

Sediaan EVOO dalam penelitian ini berupa cairan sehingga ketiga dosis tersebut diubah kedalam satuan millimeter dengan rumus (Nugraheni, 2012):

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Keterangan:

ρ (rho) = masa jenis (g/cm³)

m= masa (gr)

V= Volume (cm³)

Diketahui :

ρ EVOO = 0,92 gran/cm³

1 cm³ = 1ml

Untuk menghitung volume maka $V = \frac{m}{\rho}$. Diketahui masa jenis cairan (EVOO)

0.92 gr/ cm³. Dengan demikian penghitungan volume EVOO masing-masing dosis adalah:

$$\text{Perlakuan 1: } V = \frac{m}{\rho} = \frac{0,5}{0,92} = 0,54 \text{ ml} = 0,5 \text{ mL}$$

$$\text{Perlakuan 2: } V = \frac{m}{\rho} = \frac{1}{0,92} = 1,09 \text{ ml} = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Perlakuan 3: } V = \frac{m}{\rho} = \frac{2}{0,92} = 2,17 \text{ mL} = 2 \text{ mL}$$

Langkah pemberiannya adalah sebagai berikut:

1. Memasukkan EVOO ke dalam spuit 3 cc yang telah disambung dengan sonde dibagian ujungnya.

2. Memegang bagian tengkuk tikus dengan pelan dan hati-hati.
3. Memasukkan sonde ke dalam mulut tikus melalui langit-langit secara perlahan sampai ke faring lalu esophagus
4. Selanjutnya mendorong EVOO yang ada didalam spuit kedalam esophagus hingga mencapai lambung
5. Setelah itu melepaskan mencit dan mengembalikannya ke kandang.

4.7.8 Pembedahan dan Pengambilan Bahan Pemeriksaan

Pengambilan serum dilakukan dalam beberapa tahap:

1. Disiapkan set alat dan bahan untuk bedah minor: gunting, pinset, spuit 1 cc, mikropipet dan tabung ependorf
2. Tikus dieksekusi pada usia gestasi ke 19 dengan menggunakan metode *Cervical dislocation*.
3. Tikus yang sudah tidak bergerak, diletakkan ke alas papan dengan posisi terlentang, keempat telapak kaki ditancapkan pada nahl. Perut mencit dibedah menggunakan *minor surgery set*. Dilakukan sayatan vertikal pada dinding perut, dilanjutkan ke samping kiri dan kanan sampai terlihat organ jantung.
4. Darah mencit diambil langsung dari jantung kanan dengan menggunakan spuit 5 cc.
5. Sampel darah didiamkan selama 12 jam dalam suhu 4°C kemudian disentrifugasi. Serum darah yang telah terpisah diambil dengan menggunakan mikropipet dan masukkan ke dalam ependorf.
6. Serum darah disimpan dalam suhu -40°C sampai saat dilakukan pengukuran.

4.7.9 Metode Pengukuran TNF- α

Pemeriksaan kadar TNF- α dilakukan dengan menggunakan metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) menggunakan Elabscience ELISA kit with pre-coated plates Rat TNF- α no. E-EL-R0019 pada serum tikus dengan tahapan sebagai berikut:

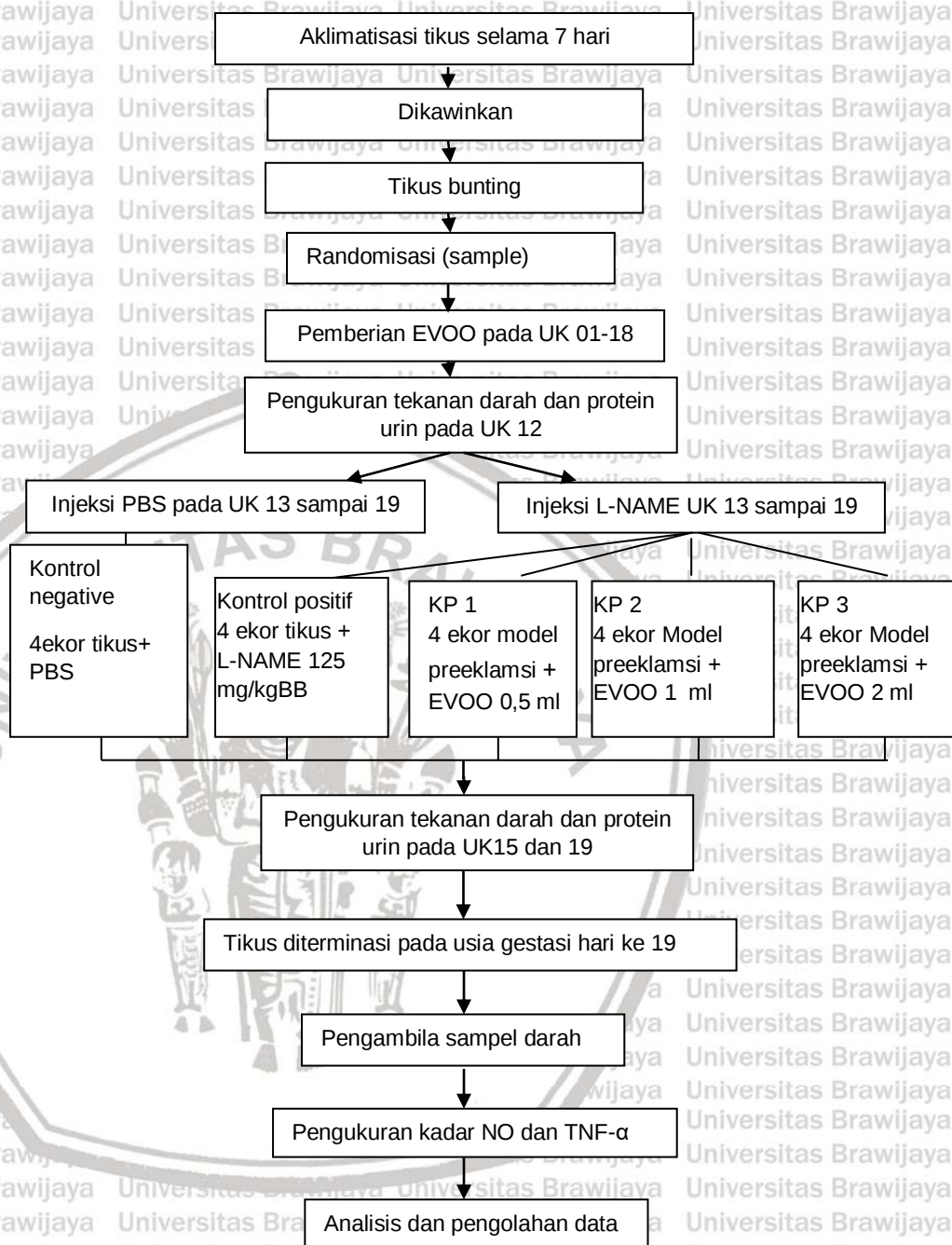
1. Ditempatkan semua reagen pada suhu kamar sebelum digunakan. Dilanjutkan mengerjakan standard dan sampel rangkap dua atau rangkap tiga. Menggunakan satu buah kurva standar untuk masing-masing esaaay.
2. Tambahkan solution standar ke dua kolom pertama: setiap konsentrasi larutan ditambahkan duplikat. Isi setiap wel dengan 100 μ L. Inkubasi selama 90 menit dengan suhu 37°C.
3. Buang sampel tanpa dicuci. Segera tambahkan 100 μ L Biotinylated pada masing-masing well. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
4. Tuang larutan dari masing-masing well. Tambahkan 350 μ L buffer, dimkan selama 1-2 menit kemudian buang larutan dari masing-masing well dan tepuk kering di atas kertas penyerap yang bersih. Ulangi langkah sampai 3 kali.
5. Tambahkan 100 μ L solusio HRP konjugate pada masing-masing well. Tutup dengan sealer plat. Inkubasi selama 30 menit di suhu 37°C ditempat gelap.
6. Aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing well. Ulangi pencucian lima kali seperti langkah 4.
7. Tambahkan 90 μ L substrat reagen kes etiap lubang. Tutup sealer plat baru. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C ditempat gelap.
8. Tambahkan 50 μ L dari stop solution ke masing-masing wel.
9. Membaca absorbansi pada 450 nm dalam waktu 30 menit dengan ELISA reader.

4.7.10 Metode Pengukuran NO

Pemeriksaan NO menggunakan Colorimetri dari catalog Elabscience E-BC-K036, dengan panjang gelombang 550 nm. Ringkasan prosedur dapat dijelaskan sebagai berikut.

1. Sampel di encerkan sampai 200 mcl.
2. Sampel diberi reagent 1(200 mcg) dan reagent 2 (100 mcg), kemudian divortek.
3. Sampel disentrifuse dngan kecepatan 3100 g/rcf selama 10 menit pada suhu kamar.
4. Setelah itu sampel dilarutkan dalam larutan campuran cromogenik dengan air 1,9ml.
5. Larutan cromogenik dicampur reagent 3, reagent 4 dan reagent 5 dengan perbandingan 3: 3: 2.
6. Reagent 6 diencerkan untuk membuat standart sesuai dengan konsentrasi 300, 200, 150, 100, 40, 20, 10, 0 $\mu\text{mol/L}$.
7. Setelah diencerkan sesuai standart kemudian diberi air sesuai dengan standart.
8. Kemudian dicampur reagent 1 dan 2 (standart direaksikan dicampur reagent 1 dan 2.
9. Selanjutnya di vortex, kemudian disentrifuse selama 10 menit dengan suhu 20°C dengan kecepatan 3100gaus.
10. Kemudian mereaksikan dengan diberi cromogen 80 μl .
11. Baca absorbansi pada panjang gelombang 550 nmmenggnakan pembaca plat.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisa data dimulai dengan melakukan Shapiro-Wilk untuk uji normalitas data. Pengujian ini digunakan untuk membuktikan normalitas data sebagai syarat uji parametrik atau non parametrik yang akan digunakan. Kriteria data terdistribusi normal jika $p\text{ value} > 0.05$ (Santoso, 2005).

Uji hipotesa menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh variable dan membandingkan rerata variable terukur antara kelompok kontrol dengan perlakuan. Jika pada uji tersebut didapatkan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu dipilih uji Beda Nyata terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) (Steel and Torrie, 1995). Tujuan dilakuka LSD untuk menemukan dosis berapa yang mempunyai pengaruh yang paling bermakna.

Untuk melihat nilai pengaruh dari kedua variabel menggunakan analisis korelasi.

Analisi ini digunakan untuk menentukan pengaruh EVOO terhadap kadar TNF- α dan kadar NO pada wistar model preeklamsia. Semua perhitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (software) *SPSS for Windows 23*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Pembuatan Tikus Model Preeklamsia

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian EVOO dengan dosis 0.5 ml, 1 ml dan 2 ml dari awal kebuntingan terhadap kadar NO dan TNF- α pada tikus model preeklamsia, dengan jumlah kelompok sampel sejumlah 4 ekor tikus bunting dengan usia gestasi 1-19 hari setiap kelompok.

Tikus yang digunakan adalah tikus betina galur wistar dengan berat badan 150-250 berjumlah 50 ekor dan menghasilkan 26 ekor.

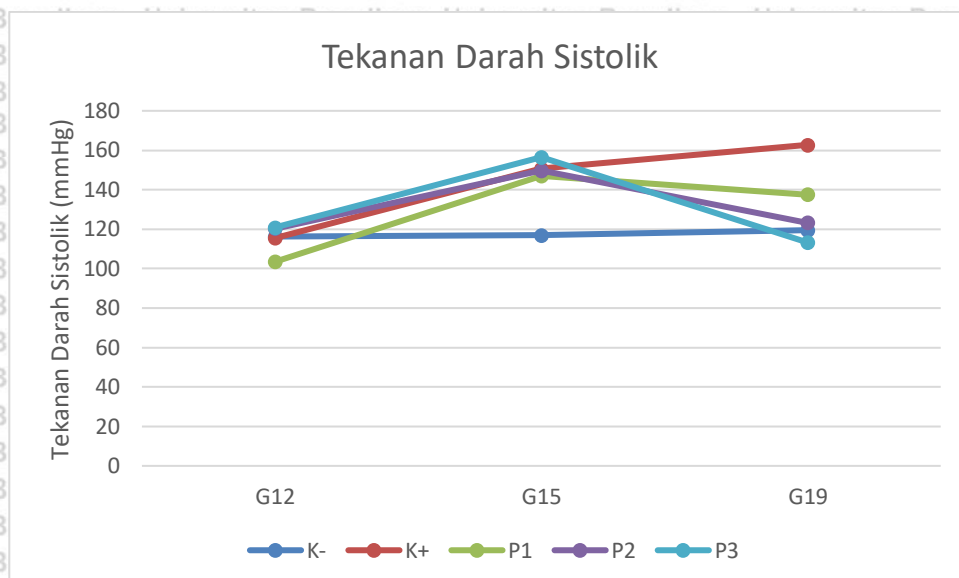
Tikus bunting model preeklamsia dibuat dengan menginjeksi L-NAME dosis 125 mg/kgBB pada usia gestasi hari 13 sampai 18 (Zhu *et al.*, 2016). Untuk mengkonfirmasi tikus dalam kondisi preeklamsia dilakukan pengukuran tekanan darah dan pengecekan protein urin. Kondisi preeklamsia ditandai dengan tekanan darah > 140 mmHg pada sistole dan > 90 mmHg pada diastole (Johns *et al.*, 1996) dan protein $\geq$ positive satu (+) (Kusumawati, 2004). Karakteristik dasar tikus berdasarkan kelompok perlakuan dapat dilihat pada table 5.1 berikut ini.

**Tabel 5.1 Karakteristik Tikus Bunting Model Preeklamsia yang Diberi
Extra Virgin Olive Oil**

Kelompok	Tekanan darah (mmHg)						Protein urin (g/L)		
	Sistolik			Diastolik					
	G12	G15	G19	G12	G15	G19	G12	G15	G19
Kontrol negatif	122.25 ±14.17	128.75 ± 9.3	124 ± 29.6	86 ± 5.65	96.5 ±	96.75 ± 32.7	negatif	negatif	Negatif
Kontrol positif	115.5 ± 14.97	150.75 ± 9.5	162.75 ± 25.1	86.75 ±	109 ± 6.27	117.2 ± 31.5	negatif	0.3	0.475 ± 0.35
P1	101.5 ± 20.3	149.75 ±1.25	138 ±8.75	66.75 ±	112.0 ± 2.9	103 75 ± 7.27	negatif	0.475±0. 35	0.15 ± 0.17
P2	124.75 ± 7.97	149.5 ± 12.5	123.25 ± 7.27	79.25 ± 9.3	113.2 ±	87 ± 4.08	negatif	1.00	0.225 ± 0.15
P3	120.75 ± 16.4	156.5 ± 6.85	113.25 ±	86.5 ± 8.5	131.0 ±	81 ± 8.01	negatif	0.15 ± 0.17	0.075 ± 0.15

Keterangan: Karakteristik pemilihan tikus model preeklamsia berdasarkan hipertensi dan protein urin. Tekanan darah di ukur tiga kali yaitu pada usia gestasi 12(G12), gestasi 15(G15) dan gestasi 19 (G19) dalam satuan mmHg. Kontrol negatif merupakan tikus bunting normal. Kontrol positif merupakan tikus model preeklamsia dengan injeksi L-NAME 125 mg. P1 adalah tikus model preeklamsia dengan pemberian EVOO 0.5mg/hari. P2 adalah tikus model preeklamsia dengan pemberian EVOO 1 mg/hari. P3 adalah tikus model preeklamsia dengan pemberian EVOO 2mg/hari. Protein urin 0.3 setara dengan (+). Protein urin 1.0 setara dengan (++). Protein urin 3.0 sama dengan (+++). Protein urin >10 sama dengan (++++)(Cunningham *et al.*, 2013).

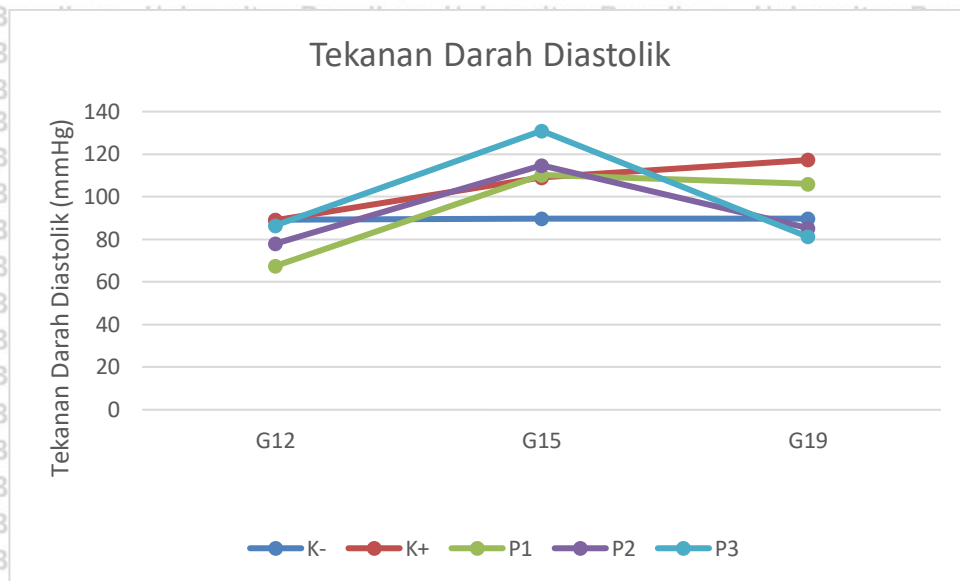
Tampak jelas menggambarkan karakteristik tikus dari masing-masing kelompok. Setelah diinjeksi L-NAME 125 mg/kg/BB tikus bunting pada usia gestasi hari ke 13 sampai 18 baik kelompok kontrol positif maupun kelompok perlakuan mengalami hipertensi. Gambaran tekanan darah sistolik dan diastolic dapat dilihat dalam grafik berikut.



Gambar 5.1 Hasil Pengukuran Tekanan Darah Sistolik Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberi Extra Virgin Olive Oil.

Keterangan: Rerata tekanan darah sistolik tikus bunting model preeklamsia diukur hari ke 12, 15, dan 19 kebuntingan pada kelompok tikus wistar bunting normal (kontrol-), tikus wistar model preeklamsia (kontrol +), tikus Wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 0.5 mL/hari (P1), tikus wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 1 mL/hari (P2) dan tikus wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 2 mL/hari (P3).

Terjadi peningkatan tekanan darah tikus wistar bunting pada kontrol positif, P1, P2 dan P3 setelah diberikan injeksi L-NAME pada hari ke 15. Pada kontrol positif terlihat tekanan darahnya tetap tinggi sampai hari ke 19. Pada grafik tersebut juga terlihat penurunan tekanan darah setelah hari ke 19 pada P1, P2 dan P3. Sedangkan perubahan tekanan darah diastolik dapat dilihat pada grafik berikut.



Gambar 5.2 Hasil Pengukuran Tekanan Darah Diastolik Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberi Extra Virgin Olive Oil.

Keterangan: Rerata tekanan darah sistolik tikus bunting model preeklamsia diukur hari ke 12, 15 dan 19 kebuntingan pada tikus wistar bunting normal (kontrol -), tikus wistar model preeklamsia (kontrol +), tikus Wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 0.5mL/hari (P1), tikus wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 1mL/hari (P2) dan tikus wistar model preeklamsia dengan pemberian EVOO 2mL/hari (P3).

Tampak terjadi peningkatan darah diastolik pada usia gestasi 15 pada kontrol (+), P1, P2 dan P3. Pada kontrol (+) terlihat tekanan darah tetap tinggi sampai usia gestasi 19, sedangkan pada kelompok dosis pemberian EVOO P1, P2 dan P3 terjadi penurunan pada gestasi 19.

Pemilihan tikus model preeklamsia yang akan diberikan perlakuan dilakukan secara randomisasi. Setelah ditemukan vaginal plug dan diperkirakan hamil seluruh mencit dipelihara sampai 19 hari. Kelompok kontrol negatif dan positif dipelihara sampai 19 hari dengan makanan standar, tetapi kelompok kontrol positif pada hari ke 13 diberi injeksi L-NAME 125 mg/kgBB. Sedangkan pada kelompok perlakuan pada hari 1 sampai 18 kebuntingan diberikan berbagai dosis *extra virgin olive oil* (EVOO) yaitu 0.5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari.

5.2 Analisa Data

5.2.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Pada studi ini variabel kadar TNF- α dan kadar NO berskala data rasio, sehingga untuk membuktikan hipotesis penelitian dipilih pendekatan analisis statistik parametrik. Untuk membuktikan hipotesis data di analisis terlebih dahulu.

Analisis yang dilakukan sebagai prasyarat parametrik adalah data terbukti terdistribusi normal. Apabila data tidak terdistribusi normal digunakanlah analisis statistik non parametrik. Pada studi ini uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk uji normalitas. Kriteria data terdistribusi normal bila *p-value* > 0.05 sedangkan data tidak terdistribusi normal bila *p-value* < 0.05. Tabel dibawah ini merupakan hasil dari uji *Shapiro-Wilk*.

Tabel 5.2 Hasil uji normalitas data

Kelompok Pengamatan	<i>p-value</i>		Distribusi
	kadar TNF- α	Konsentrasi NO	
K (-)	0.921	0.088	Normal
K(+)	0.130	0.870	Normal
P1	0.087	0.992	Normal
P2	0.217	0.883	Normal
P3	0.515	0.170	Normal

Keterangan: Jika *p-value* > 0.05 maka data terdistribusi normal, sedangkan data tidak terdistribusi normal jika *p-value* < 0.05. K (-) merupakan tikus bunting normal. K (+) merupakan tikus bunting model preeklamsia. P 1 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 0.5 mL/hr. P 2 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 1 mL/hr. P 3 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 2 mL/hr.

Pada Tabel 5.2 memperlihatkan bahwa data terdistribusi normal karena semua data kadar TNF- α beserta kadar NO pada kelompok pengamatan memiliki nilai *p-value* > 0.05.

Semua prasyarat uji parametrik sudah terpenuhi karena semua data terdistribusi normal. Selanjutnya untuk membuktikan hipotesis penelitian data dianalisis dengan uji statistika parametrik *One Way ANOVA*.

5.2.2 Hasil Uji One Way ANOVA dan Multiple Comparasion

5.2.2.1 Hasil Uji Kadar TNF- α

Perbandingan rerata kadar TNF- α pada kelima kelompok sampel pengamatan dengan masing-masing kelompok $n = 4$ ekor menggunakan uji *Anova one way* diperoleh ada perbedaan yang bermakna $p=0.011<\alpha$. Selanjutnya pada uji *Multiple Comparisons* LSD (*Least Significant Difference*) untuk menentukan kelompok mana yang berbeda bermakna.

Tabel 5.3 Perbandingan kadar TNF- (pg/mL)

Kelompok pengamatan	Rerata $\pm$ SD	<i>p-value</i>
K (-)	99.9 $\pm$ 10.9 ^b	0.011 ($p<\alpha$)
K (+)	312.6 $\pm$ 171.6 ^a	
P1	143.5 $\pm$ 29.3 ^b	
P2	167.0 $\pm$ 52.3 ^b	
P3	92.1 $\pm$ 2.9 ^b	

Keterangan: Pada rerata $\pm$ sd menunjukkan hasil uji LSD jika tidak ada perbedaan yang bermakna bila $p\text{-value}>0.05$ dan ada perbedaan yang bermakna jika $p\text{-value}<0.05$. K (-) merupakan tikus bunting normal. K (+) merupakan tikus bunting model preeklamsia. P 1 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 0.5 mL/hr. P 2 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 1 mL/hr. P 3 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 2 mL/hr.

Berdasarkan hasil uji LSD rerata kadar TNF- α antara kelompok kontrol negatif (tikus wistar yang bunting normal) (99.9 $\pm$ 10.9 pg/mL) dengan kelompok kontrol positif (tikus wistar yang bunting yang dibuat model preeklamsia) (312.6 $\pm$ 171.6 pg/mL) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.002<\alpha$). Tampak nilai rerata kadar TNF- α pada kelompok kontrol positif jauh besar bila dibandingkan dengan rerata kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif.

Selain itu hasil uji LSD kadar TNF- α antara kelompok kontrol positif (tikus bunting yang preeklamsia) (312.6 $\pm$ 171.6^apg/mL) dengan kelompok P1 atau kelompok tikus bunting preeklamsia + EVOO dosis 0,5 mL/hr (143.5 $\pm$ 29.3^bpg/mL) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata. Tampak nilai rerata

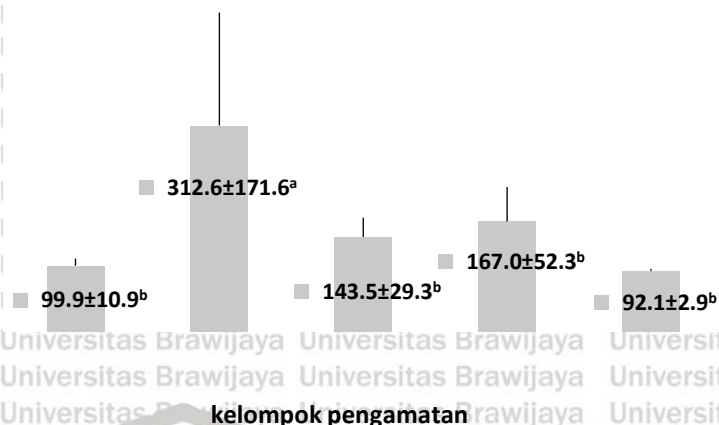
kadar TNF- α kelompok kontrol positif lebih besar bila dibandingkan dengan rerata kadar TNF- α pada kelompok P1.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata kadar TNF- α antara kelompok kontrol positif (tikus bunting yang preeklamsia) (312.6 ± 171.6^a pg/mL) dengan kelompok P2 atau kelompok perlakuan preeklamsia + EVOO dosis 1 mL/hr (167.0 ± 52.3^b pg/mL). Pada nilai rerata kadar TNF- α kelompok P2 menunjukkan nilai yang lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata kadar TNF- α kontrol positif.

Hasil di Tabel 5.3 menunjukkan pula bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar TNF- α antara kelompok kontrol positif (tikus bunting yang preeklamsia) (312.6 ± 171.6^a pg/mL) dengan kelompok P3 atau kelompok perlakuan preeklamsia + EVOO dosis 2 mL/hr (92.1 ± 2.9 pg/mL). Nilai rerata kadar TNF- α kelompok kontrol positif jauh lebih besar bila dibandingkan dengan rerata kadar TNF- α pada kelompok P3.

Pada penjelasan hasil dari Tabel 5.4 di atas maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian EVOO dosis 0,5 mL/hr, dosis 1 mL/hr, dan dosis 2 mL/hr pada tikus wistar bunting model preeklamsia berpengaruh bermakna terhadap penurunan kadar TNF- α . Pada histogram di bawah ini menunjukkan rerata kadar TNF- α pada kelima kelompok sampel.

Kadar TNF- α (pg/mL)



Gambar 5.3 Rerata kadar TNF- α pada tikus wistar bunting model preeklamsia.

Keterangan: Kontrol (-) yang merupakan tikus bunting normal, kontrol (+) merupakan tikus wistar model preeklamsia, P1 merupakan kelompok perlakuan yang diberikan EVOO 0.5 mL/hari, P2 yaitu kelompok perlakuan yang diberikan EVOO 1 mL/hari dan P3 kelompok perlakuan dengan pemberian EVOO 2 mL/hari.

Pada Gambar 5.3 menunjukkan rerata kadar TNF- α pada tikus Wistar bunting normal (kontrol negatif), tikus wistar bunting preeklamsia (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus wistar bunting preeklamsia dengan pemberian EVOO berturut-turut dosis 0,5 mL/hr, dosis 1 mL/hr, dan dosis 2 mL/hr. Tampak pada gambar tersebut batang rerata kadar TNF- α tertinggi pada kelompok kontrol positif dan yang terendah pada batang rerata kadar TNF- α pada kelompok P3. Sedangkan rerata kadar TNF- α tampak menurun pada kelompok P1, P2, dan P3 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Penurunan kadar TNF- α seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan, meskipun ketiga macam dosis EVOO tidak berbeda bermakna kadar TNF- α nya secara statistik.

5.2.2.2 Hasil Uji Kadar NO

Berdasarkan hasil uji Anova one way pada kelima kelompok sampel pengamatan dengan masing-masing kelompok n = 4 ekor di dapatkan data konsentrasi NO ada perbedaan yang bermakna rerata konsentrasi NO dengan

nilai $p\text{-value} = 0.015 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan *Multiple Comparisons/LSD* (Least Significant Difference) ditampilkan pada table berikut ini.

Tabel 5.4 Perbandingan Kadar NO

Kelompok pengamatan	Rerata $\pm$ SD	$p\text{-value}$
K (-)	0.36 $\pm$ 0.08 ^b	0.015 $<$ α
K (+)	0.17 $\pm$ 0.07 ^a	
P1	0.23 $\pm$ 0.08 ^a	
P2	0.27 $\pm$ 0.08 ^{ab}	
P3	0.36 $\pm$ 0.08 ^b	

Keterangan: Pada rerata $\pm$ sd menunjukkan hasil uji LSD jika tidak ada perbedaan yang bermakna bila $p\text{-value} > 0.05$ dan ada perbedaan yang bermakna jika $p\text{-value} < 0.05$. K (-) merupakan tikus bunting normal, K (+) merupakan tikus bunting model preeklamsia. P 1 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 0.5 mL/hr. P 2 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 1 mL/hr. P 3 merupakan tikus bunting model preeklamsia dengan pemberian dosis EVOO 2 mL/hr.

Berdasarkan hasil uji LSD rerata kadar NO kelompok kontrol positif (tikus wistar bunting yang preeklamsia) (0.17 $\pm$ 0.07 $\mu\text{mol/L}$) dengan kelompok kontrol negatif (tikus wistar yang bunting normal) (0.36 $\pm$ 0.08 $\mu\text{mol/L}$) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.004 < \alpha$). Berdasarkan nilai reratanya kadar NO tampak pada kelompok kontrol positif lebih kecil nilainya bila dibandingkan dengan nilai rerata kadar NO pada kelompok kontrol negatif.

Hasil uji LSD juga memperlihatkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna rerata kadar NO antara kelompok P1 atau kelompok perlakuan preeklamsia + EVOO dosis 0,5 mL/hr (0.23 $\pm$ 0.08 $\mu\text{mol/L}$) dengan kelompok kontrol positif (tikus wistar yang dipapar preeklamsia) (0.17 $\pm$ 0.07 $\mu\text{mol/L}$). Meskipun tampak ada peningkatan rerata kadar NO pada kelompok P1 bila dibandingkan dengan rerata kadar NO pada kelompok kontrol positif, tetapi peningkatan ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini berarti bahwa tikus wistar bunting preeklamsia+ EVOO 0,5 mL/hr hanya akan mampu meningkatkan sedikit

kadar NO bila dibandingkan dengan tikus wistar bunting preeklamsia, meskipun peningkatan ini tidak bermakna.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa antara kelompok P2 atau kelompok perlakuan preeklamsia + EVOO dosis 1 mL/hr ($0.27 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$) dengan kelompok kontrol positif ($0.17 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$) tidak ada perbedaan yang bermakna.

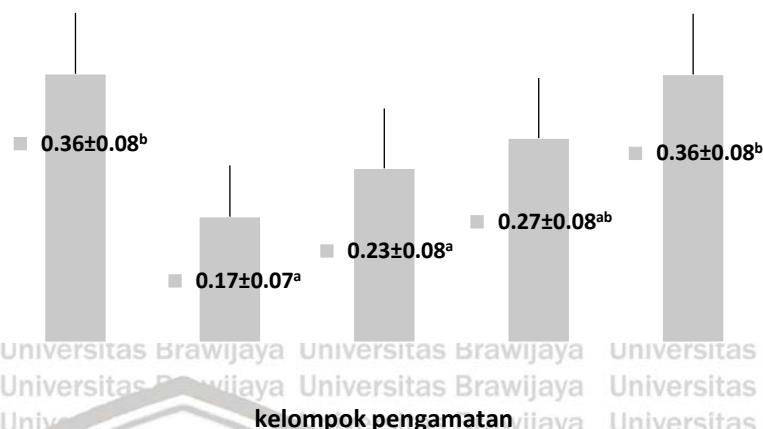
Meskipun tampak ada peningkatan rerata kadar NO pada kelompok P2 bila dibandingkan dengan rerata kadar NO pada kelompok kontrol positif, tetapi secara statistik peningkatan ini tidak bermakna.

Pada Tabel 5.4 kelompok P3 atau kelompok perlakuan preeklamsia + EVOO dosis 2 mL/hr ($0.36 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$) dengan kelompok kontrol positif (tikus Wistar yang dipapar preeklamsia) ($0.17 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$) memperlihatkan ada perbedaan yang bermakna rerata kadar NO. Tampak nilai rerata kadar NO kelompok P3 lebih besar bila dibandingkan kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus wistar bunting preeklamsia + EVOO 2 mL/hr akan meningkatkan kadar NO bila dibandingkan dengan tikus wistar bunting preeklamsia yang tidak diberikan EVOO. Dengan kata lain pemberian EVOO 2 mL/hr dapat meningkatkan kadar NO pada tikus wistar bunting preeklamsia.

Selanjutnya rerata kadar NO pada kelima kelompok sampel tersebut ditampilkan pada gambar di bawah ini.

6.

Konsentrasi NO (µmol/L)



Gambar 5.4 Rerata kadar NO pada tikus wistar bunting model preeklamsia.

Keterangan: Kontrol (-) yang merupakan tikus bunting normal, kontrol (+) merupakan tikus wistar model preeklamsia, P1 merupakan kelompok perlakuan yang diberikan EVOO 0.5 mL/hari, P2 yaitu kelompok perlakuan yang diberikan EVOO 1 mL/hari dan P3 kelompok perlakuan dengan pemberian EVOO 2 mL/hari.

Histogram tersebut adalah rerata kadar NO pada tikus wistar bunting normal (kontrol negatif), tikus wistar bunting preeklamsia (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus wistar bunting preeklamsia dengan pemberian EVOO berturut-turut dosis 0,5 mL/hr, dosis 1 mL/hr, dan dosis 2 mL/hr. Tampak pada gambar tersebut batang rerata kadar NO tertinggi pada kelompok kontrol negatif dan kelompok P3 dan yang terendah pada batang rerata kadar NO pada kelompok kontrol positif. Sedangkan rerata kadar NO tampak meningkat pada kelompok P1, P2, dan P3 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Peningkatan kadar NO seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan, meskipun peningkatan ini tidak bermakna secara statistik. Jadi pemberian EVOO ketiga dosis (P3) tersebut mampu meningkatkan kadar NO pada tikus bunting yang preeklamsia.

5.2.3 Hasil Uji Korelasi

Berdasarkan hasil analisis data dari uji korelasi Spearman antara dosis *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan kadar tumor necrosis factor alpha

(TNF- α) pada tikus wistar model preeklamsia menunjukkan hubungan tidak bermakna secara statistik. Sedangkan uji korelasi *Spearman* antara dosis *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan kadar *nitric okside* (NO) pada kelompok tikus wistar model preeklamsia menunjukkan hubungan bermakna secara statistik. Untuk uji hasil korelasi *Pearson* antara kadar TNF- α dan kadar NO terdapat hubungan bermakna secara statistik. Hal pemeriksaan ditunjukkan pada table berikut.

Tabel 5.5 Hasil uji korelasi

Variabel yang dihubungkan	Koefisien korelasi	Arti	<i>p-value</i>
Dosis terhadap kadar TNF- α	-0.56	Tidak ada korelasi	0.057
Dosis terhadap kadar NO	0.59*	Kuat	0.043
Kadar TNF- α terhadap kadar NO	-0.73**	Kuat	0.007

Keterangan: Tanda (*)korelasi bernilai signifikan sebesar 0.05. Tanda (**) artinya korelasi bernilai signifikan sebesar 0.01.

Pada tabel 5.5 menunjukkan bahwa tidak ada korelasi bermakna antara dosis *extra virgin olive oil* (EVOO) terhadap kadar TNF- α dengan *p-value*=0.057 ($p>0.05$). Sedangkan pada pemberian dosis *extra virgin olive oil* (EVOO) terhadap kadar NO menunjukkan ada hubungan/korelasi bermakna dengan *p-value*=0.043 ($p<0.05$) dan menunjukkan korelasi yang kuat dan searah (0.53). Hasil uji korelasi antara kadar TNF- α dan kadar NO menunjukkan adanya korelasi bermakna dengan *p-value*=0.007 ($p<0.05$) dan ditunjukkan keeratan hubungan -0.73. Nilai tersebut menunjukkan hubungan kuat yang berlawanan, yaitu makin rendahnya TNF- α , maka NO semakin meningkat.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembuatan Tikus Model Preeklamsia

Pembuatan tikus model preeklamsia pada studi ini menggunakan tikus bunting yang diinjeksi L-NAME sebanyak 125 mg/kgBB. L-NAME berperan sebagai NO sintase inhibitor untuk mengubah L-arginine menjadi NO. Tidak terbentuknya NO sebagai vasodilator menyebabkan pembuluh darah mengalami vasokonstriksi. Vasokonstriksi vaskuler memicu peningkatan tekanan darah sistolik dan diastolik yang mirip dengan kondisi preeklamsia (Podjarny *et al.*, 2004; McCarthy *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Model ini telah terbukti menunjukkan peningkatan tekanan darah dan proteinuria. Hal tersebut berhubungan dengan aktivitas *nitric oxide synthase* (NOS) terhambat (Well *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Hasil pembuatan tikus model preeklamsia menunjukkan gejala umum preeklamsia yaitu bertambahnya tekanan darah dan protein urin, tetapi pada tikus bunting yang diinjeksi PBS tidak mengalami peningkatan tekanan darah dan proteinurin.

Kondisi preeklamsia akibat pemberian L-NAME mengakibatkan tidak terbentuknya NO akibat dari penghambatan NO sintase yang mengakibatkan pembuluh darah mengalami vasokonstriksi karena NO sebagai vasodilator tidak terbentuk. Akibatnya tekanan darah menjadi meningkat, yang kondisinya mirip dengan keadaan preeklamsia (Suzuki *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Pada penelitian ini terjadi peningkatan tekanan darah (>140/90 mmHg) pada kebuntingan hari ke 15 atau 3 hari setelah pemberian L-NAME dan pada kontrol positif (tikus bunting model preeklamsia) tekanan darah tetap dalam kondisi hipertensi. Kondisi tersebut menunjukkan keberhasilan pembuatan tikus bunting model preeklamsia.

Penurunan tekanan darah terjadi setelah pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) pada tikus model preeklamsia yang dibuat di studi ini pada kebuntingan hari ke 19. Kondisi preeklamsia sangat berhubungan dengan keadaan stres oksidatif dan peningkatan respon inflamasi yang menyebabkan perubahan lokal dan sistemik yang mempengaruhi regulasi tekanan darah dan aliran darah sehingga berakibat terjadinya disfungsi pada endotel vaskuler ibu yang berakibat terjadinya vasokonstriktor (Saucedo *et al.*, 2014). EVOO mengandung polifenol dengan konsentrasi tinggi yaitu hydroxytyrosol dan oleuropein yang mampu menurunkan kondisi inflamasi dan stres oksidatif penyebab disfungsi endotel (Parkinson dan Cicerale, 2016; Peyrol *et al.*, 2017; George *et al.*, 2018). Mekanisme kerjanya yaitu dengan mencegah terjadinya reaksi berantai (ROS) dan menangkap senyawa radikal (Chichton *et al.*, 2013).

Pada studi ini tekanan darah pada kelompok perlakuan dengan pemberian EVOO tidak mengalami peningkatan atau memiliki rerata tekanan darah yang tidak jauh berbeda dengan kontrol negatif. Hal ini membuktikan bahwa antioksidan dalam EVOO kemungkinan dapat menstabilkan aktivasi sel endothelium sehingga tidak terjadi peningkatan tekanan darah. Selain itu EVOO yang kaya akan polifenol, hidroksitirosole dan tirosole dapat mencegah pembentukan oksidasi *peroxynitrite* dan meningkatkan NO serta menekan respon endotel akibat produksi ROS terhambat sehingga terjadi vasodilatasi (Keita *et al.*, 2013). Oleh karena itu dapat memperbaiki tekanan darah pada tikus. Pada penelitian ini juga mengalami peningkatan SOD sebagai bentuk respon tubuh untuk melawan stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan MDA (Agnes, 2019).

Kandungan MUFA (lemak tak jenuh) didalam EVOO mampu mengurangi ACE (*Angiotensin-Converting Enzim*) yaitu enzim yang mengatur regulasi tekanan darah. ACE disebut juga sebagai inhibitor atau menurunkan kadar NO

serta 8-isoprostanes (sejenis radikal bebas dan senyawa prostaglandin) yang rendah (Villarejo *et al.*, 2015). ACE adalah enzim yang berperan pada sistem rennin angiotensin tubuh yang mengatur vasokonstriksi arteri dan volume ekstraseluler (misal plasma, darah, cairan jaringan tubuh dan limfa). Proses kerja ACE yaitu dengan mengubah angiotensin (AT) I menjadi AT II dan degradasi bradikinin (penghancuran peptide di dalam tubuh yang membantu untuk membuka dan memperbesar pembuluh darah sehingga memungkinkan lancarnya aliran darah keseluruh tubuh dan menurunkan tekanan darah) (Sherwood L, 2004).

Perubahan tekanan darah kondisi preeklamsia juga dapat dilihat pada kondisi protein urin. Pada penelitian ini di dapat perubahan protein urin terutama pada tikus bunting model preeklamsia (kontrol positif). Kondisi proteinuria pada preeklamsia diakibatkan karena disfungsi endotel yang berakibat permeabilitas meningkat pada vaskular sehingga terjadi proteinuria dan edema (Dharma *et al.*, 2005).

Pada kondisi PE diketahui bahwa organ ginjal mengalami perubahan penurunan pada aliran darah akibat dari hipovolemik. Akibat dari kerusakan sel glomerulus menjadikan permeabilitas membrane basalis meningkat sehingga terjadi kebocoran dan berakibat proteinuria. Pada umumnya kondisi preeklamsia ditandai adanya peningkatan proteinuria, edema dan juga peningkatan tekanan darah. Kondisi tersebut didasarkan pada kerusakan sel endotel kapiler dan juga hipoalbuminemia (Brown, 2003).

6.2 Pengaruh Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada Tikus Model Preeklamsia

Produksi TNF- α yang berlebihan dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel, sehingga berakibat berkurangnya aliran darah dan juga meningkatnya permeabilitas endothelium sehingga membuat banyaknya perubahan secara lokal

dan sistemik sebagai penanda preeklamsia karena mempengaruhi regulasi tekanan darah dan aliran darah pada endotel vaskuler yang berpengaruh pada terjadinya vasokonstriktor (Saucedo *et al.*, 2014). L-NAME yang diinjeksikan merupakan *inhibitor* NO synthase (NOS), yaitu dengan aktivitas dari *nitro-L-arginine metal ester* (L-NAME). Pembuatan preeklamsia dengan menggunakan L-NAME akan meningkatkan ROS. Kondisi stres oksidatif dan mengakibatkan kerusakan pada sel endotel, sel-sel plasenta, dan menstimulasi produksi sitokin pro inflamasi (TNF- α , IL-6) akibat aktivasi dari NF-kB yang berlebihan (Xuan *et al.*, 2016).

Pada studi ini dapat dibuktikan bahwa kadar TNF- α pada kelompok tikus bunting normal lebih rendah dari pada kadar tikus setelah diinjeksi L-NAME ($p=0.02$). Hasil tersebut dapat dikatakan bahwa pada kondisi tikus preeklamsia memiliki kadar TNF- α lebih tinggi dibandingkan dengan tikus bunting normal. Jadi dapat disimpulkan bahwa preeklamsia dapat berakibat terhadap peningkatan TNF- α pada tikus Wistar yang bunting.

Kondisi tersebut sama dengan studi yang dilakukan oleh Wicaksono (2015) yang menyebutkan bahwa kadar TNF- α dan IL 6 pada ibu hamil dengan preeklamsia lebih tinggi dari pada hamil normal. Tingginya kadar pro inflamasi (TNF- α , IL-6) akan menginduksi perubahan sel T menjadi Th17, sehingga menyebabkan penurunan fungsi dari Treg. Kondisi lebih lanjut akan menyebabkan sel B teraktivasi menjadi sel B CD19+ CD5+. Sifat autoreaktif dari sel B mengakibatkan pada pasien preeklamsia mensekresi tingginya AT1AA. AT1AA yang terbentuk akan berikatan dengan AT1 Reseptor (AT1R) yang akan menginduksi TNF- α dan sFLT-1 kembali (Zhou *et al.*, 2010).

Terdapat perbedaan bermakna dari kelima kelompok perlakuan dengan $p=0.011$ antara TNF- α kontrol positif (tikus model preeklamsia) dengan kelompok perlakuan yang diberikan EVOO baik dosis 0,5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari.

Secara umum dapat dikatakan bahwa terjadi penurunan kadar TNF- α serum dengan pemberian EVOO diberbagai dosis. Jadi pemberian EVOO ketiga dosis tersebut mampu menurunkan kadar TNF- α pada tikus bunting yang preeklamsia.

Sedangkan dosis EVOO yang dianggap paling cepat mampu menurunkan kadar TNF- α adalah dosis 1 dengan pemberian 0.5 mL/hr, karena dengan pemberian lebih kecil EVOO sudah mampu menurunkan kadar TNF- α kelompok dosis 1 dengan nilai rerata yang dekat dengan kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif. Namun demikian karena tidak terdapat perbedaan yang bermakna rerata

kadar TNF- α antara ketiga dosis perlakuan. Keadaan ini diartikan bahwa ketiga dosis EVOO yang diberikan memiliki kemampuan yang sama dalam hal menurunkan kadar TNF- α . Kondisi tersebut dapat terjadi kemungkinan karena EVOO dengan porsi minimum (25-50 mL/hari) sudah memiliki kandungan yang bersifat antimikroba, antioksidan dan anti inflamasi (Fung et al., 2009). Pada penelitian ini D1 dengan dosis 0.5 mL/hari (pada tikus) setara dengan 30 mL/hari (pada manusia), sehingga dapat diartikan bahwa pada ketiga dosis yang diberikan pada penelitian ini mampu memberikan dampak yang signifikan.

Hasil uji korelasi antara dosis pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan kadar TNF- α menunjukkan korelasi tidak bermakna atau tidak signifikan dengan $p\ value=0.057$ ($p>0.05$) yang artinya hubungan dari pemberian ke tiga dosis tersebut tidak menimbulkan perbedaan bermakna kadar TNF- α pada tikus wistar model preeklamsia antara perlakuan 1, 2 dan 3. Kondisi tersebut kemungkinan bisa disebabkan karena pada studi ini jarak antar dosis berdekatan sehingga belum bisa menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kadar TNF- α dari ketiga dosis tersebut.

Tumor necrosis factor α (TNF- α) adalah sitokin multipoten yang kuat karena memberikan respon pada berbagai sel termasuk didalamnya autokrin dan

parakrin pada pusat reproduksi, yang termasuk didalamnya pembentukan plasenta, perkembangan embrio dan juga luteal (Agius & press, 2012; Azizieh & Raghupatty, 2014).

Pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) pada tikus wistar model preeklamsia dapat menurunkan sitokin proinflamasi pada kasus preeklamsia karena EVOO memiliki kandungan polifenol yang bersifat antiinflamasi dan menunjukkan kemampuan dalam menghambat sitokin-sitokin inflamasi seperti TNF- α , interleukin-6, dan faktor-faktor transkripsi NF-kB (Cicerale et al., 2012).

Impellizzeri (2011) mengemukakan bahwa kandungan fenolik EVOO, oleuropein agliko dapat melemahkan respon inflamasi pada model tikus peradangan. Pada penelitian lain menyebutkan bahwa asupan EVOO yang diperkaya fenolik (70 mg/hari – 398 mg/hari) mampu menurunkan ekspresi beberapa gen inflamasi diantaranya NF-kB dan COX-2 (Camargo et al., 2009).

6.3 Pengaruh Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Kadar Nitric Oxide (NO) pada Serum Tikus Model Preeklamsia

Disfungsi endotel merupakan salah satu karakteristik dalam terjadinya preeklamsia, yang dipicu oleh peningkatan sFL-1 pada plasenta akibat dari aktivasi dari faktor transkripsi HIF-1 α (Tal et al., 2010). *Solubel fms-like tyrosine kinase 1* (sFLT-1) berikatan dengan VEGF melalui peredaran darah maternal, hal tersebut berakibat VEGF bebas yang berikatan dengan reseptor berkurang serta memicu terjadinya kerusakan sel endotel (Karumanchi and Epstein, 2007). Kondisi berkurangnya VEGF bebas juga mengakibatkan terjadinya aktivasi pada eNOS berkurang yang mengakibatkan sel endotel mengalami penurunan sintesis NO (Forstemann and Sessa, 2012).

Pada penelitian pembuatan tikus model preeklamsia dengan menginjeksi L-NAME dengan dosis 125 mg/kgBB (Zhu et al., 2016). Model ini terbukti membuat tekanan darah, protein urin, IUFD (*intrauterin fetal death*) dan retardasi

pertumbuhan janin (Zhu *et al.*, 2016). L-NAME yang diinjeksikan pada tikus bunting akan menghambat *inhibitor synthase* NO, sehingga menyebabkan vasokonstriksi karena terhambatnya NO. Akibat yang bisa timbul bila terjadi vasokonstriksi adalah terjadinya perubahan tekanan darah (Shu *et al.*, 2018). Pemberian L-name berakibat terjadinya gangguan pensinyalan NO disemua arteri (Paulus, 2008).

Pemeriksaan pada kadar NO tikus wistar bunting model preeklamsia menunjukkan penurunan yang signifikan ($p=0.004$) dari pada tikus bunting normal. Kondisi tersebut dapat diartikan terjadi perbedaan bermakna antara kadar NO pada kontrol positif dengan kadar NO pada kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus wistar bunting model preeklamsia akan menunjukkan konsentrasi NO yang rendah bila dibandingkan dengan tikus wistar yang bunting normal. Preeklamsia dapat berakibat terhadap penurunan konsentrasi NO pada tikus wistar yang bunting. Hasil penelitian ini sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Santosa (2007) yaitu pada penelitian yang melibatkan wanita hamil normal dan wanita hamil dengan preeklamsia untuk membuktikan NO pada wanita hamil normal lebih tinggi dari pada wanita dengan preeklamsia. Salah satu teori menyebutkan bahwa semakin tinggi tekanan darah sistolik dan diastolik maka kadar NO dalam darah semakin rendah, kondisi tersebut dikarenakan NO merupakan senyawa yang bersifat vasodilator. Semakin besar kerusakan endotel akibat stres oksidatif maka akan mengurangi produksi NO dan akan menyebabkan tekanan darah semakin bertambah tinggi (Norris *et al.*, 1999; Choi JW *et al.*, 2002).

Studi yang dilakukan oleh Sandrim (2010) pada pasien preeklamsia memperlihatkan adanya peningkatan *Soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFLT-1) dan *soluble endoglin* (sEng) disertai penurunan NO, Faktor angiogenik disini sFLT-1 dan sEng mempengaruhi produksi NO *synthesis*. Penelitian yang dilakukan

untuk pembuatan tikus wistar model preeklamsia sesuai dengan keadaan manusia, yaitu NO mengalami penurunan pada model preeklamsia dari pada hamil normal.

Terdapat perbedaan bermakna dari kelima kelompok kontrol perlakuan dengan $p=0.015$ antara NO kontrol positif (tikus model preeklamsia) dengan kelompok perlakuan yang diberikan EVOO baik dosis 0,5 mL/hari, 1 mL/hari, dan 2 mL/hari. Secara umum dapat dikatakan bahwa terjadi peningkatan kadar NO serum dengan pemberian EVOO diberbagai dosis. Jadi pemberian EVOO ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan kadar NO pada tikus bunting model preeklamsia. Sedangkan dosis EVOO yang dianggap paling cepat mampu meningkatkan kadar NO adalah dosis 3 yaitu 2 mL/hr, hal ini dikarenakan rerata kadar NO pada dosis 3 yang paling dekat dengan kelompok kontrol negatif. Selain itu secara statistik terbukti dari ke tiga kelompok perlakuan hanya dosis 3 yaitu pemberian 2 mL/hari yang mampu memberikan dampak yang bermakna.

Kondisi NO pada perlakuan 1 dengan pemberian EVOO 0,5 mL/hari dan perlakuan 2 dengan pemberian EVOO 1 mL/hari dinyatakan belum mampu meningkatkan NO secara signifikan bisa disebabkan karena pada kondisi tikus bunting model preeklamsia terjadi peningkatan apoptosis karena stres oksidatif yang berlebihan sehingga terjadi penurunan ekspresi Hsp70 dan protein Bcl-2 yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel yang berakibat meningkatnya vasokonstriksi (Teguh *et al.*, 2010). Pemberian EVOO secara signifikan mampu menghambat MGO (methylglyoxal) yang telah diketahui mejadi salah satu penyebab induksi apoptosis dan meenyebabkan kerusakan dalam sel endotel.

Penghambatan MOG ini mampu meningkatkan ekspresi Bcl-2 dengan merubh produksi ROS dalam intraseluler, sehingga mampu mengurangi terjadinya apoptosis secara luas (Moon ho Do *et al.*, 2015). Menurut Camargo (2009) mengemukakan dosis yang sesuai untuk menurunkan kondisi stres oksidatif

dengan kandungan fenolik yang tinggi adalah pada dosis 70 mg/hari - 389 mg/hari. Pada penelitian ini dosis 3 (2 mL/hari) setara dengan 90 mg/hari pada manusia. Pada uji korelasi juga menunjukkan adanya hubungan antara pemberian dosis EVOO dengan kadar NO ($p\text{-value} = 0.043 < \alpha$) dengan koefisien korelasi 0.59* yang artinya hubungan kuat antara dosis dengan kadar NO. Nilai positif dapat diartikan bahwa dengan pemberian dosis EVOO semakin besar maka akan meningkatkan kadar NO.

NO merupakan mediator yang mempengaruhi regulasi otot vaskuler dan homeostasis. Selain itu NO juga merupakan vasodilator dan dapat menstimulasi otot polos. NO juga mempengaruhi tonus miogenik dan pada kehamilan normal mempengaruhi resistensi vaskuler arteri yaitu sebagai faktor relaksasi dari miometrium, sedangkan pada preeklamsia mempengaruhi sirkulasi uteroplasenta (Santosa *et al.*, 2007).

Pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) pada tikus model preeklamsia dapat menurunkan kondisi stres oksidatif karena EVOO memiliki bahan aktif polifenol dan hidroksitirosol yang dapat meningkatkan NO pada sintase endotel dan menurunkan sintesis ET-1 (Carnevale *et al.*, 2014). Pada studi lain juga menyebutkan bahwa konsumsi EVOO dapat meningkatkan ekspresi basal eNOS dan menurunkan mRNA ET-1 yang disebabkan oleh induksi ekspresi ROS. Karena polifenol minyak zaitun seperti hydroxytyrosol kemungkinan memiliki kemampuan dapat merangsang eNOS, terutama melalui aktivasi non genomic dalam sel endotel. Kondisi tersebut dapat mengurangi stres oksidatif dengan mensintesis NO yang dirangsang oleh Ach (Carolina *et al.*, 2014).

Penurunan kadar NO setelah pemberian EVOO, diduga kandungan fenol yang terkandung didalamnya sebagai senyawa polar yang mampu untuk menekan radikal bebas. EVOO juga mengandung komponen sederhana lainnya

seperti hidroxytyrosol yang merupakan antioksidan yang tinggi dari pada vitamin C dan E (Lopez *et al.*, 2008). Kondisi ini sama dengan penelitian yang lain yang menyebutkan kandungan fenol yang banyak dalam EVOO sebesar 579,2 mg/kg dan α tokoferol didalam mencapai 90% sebagai antioksidan (Nakbi *et al.*, 2010).

Mekanisme kerja EVOO untuk meningkatkan NO adalah sebagai antioksidan pemulus rantai radikal bebas, dalam hal ini diperankan oleh kandungan α tokoferol yang berperan dengan cara memindahkan hydrogen fenolat pada radikal bebas dari asam lemak tak jenuh (PUFA) yang telah mengalami peroksidasi sehingga terbentuklah senyawa yang stabil (Murryay *et al.*, 2000).

Selain sebagai antioksidan alami yang dapat membuang radikal bebas, kandungan polifenol dan α tokoferol dapat menekan oksidasi asam lemak tak jenuh sehingga dapat mempertahankan fungsi dari membrane dan mencegah terjadinya kerusakan pada sel endotel sehingga kondisi tetap seimbang (Murray *et al.*, 2000). Irianti (2017) menyatakan kandungan tokoferol di dalam EVOO dapat menyeimbangkan antara produksi radikal bebas dengan antioksidan.

Kandungan MUFA yang terdapat pada EVOO mampu melindungi kerusakan pada hepar dan sel lain karena proses oksidasi yaitu dengan cara aktifitas peroksida lipid terhambat. Mekanisme kerjanya dengan mempertahankan marker-marker enzim antioksidan dan juga enzim pada serum hepar pada kondisi mendekati normal (Nakbi *et al.*, 2010). Kelebihan lain dari EVOO adalah tidak rusaknya kandungan hidroksitirosol sebagai antioksidan meskipun telah dicerna.

6.4 Hubungan Antara Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan Kadar Nitric Oxide (NO) Pada Tikus Wistar Model Preeklamsia

Pada kehamilan dengan preeklamsia akan terjadi peningkatan dari sitokin pro inflamasi diantaranya IL-6, IL-8 dan TNF- α pada NK sel terjadi kebocoran pada pembuluh darah endotel dan apoptosis karena makrofak dan monosit

memproduksi TNF- α yang berlebihan, sehingga berakibat aktivasi endotel sistemik. Kondisi tersebut membuat perubahan fungsi dan struktur dalam sel termasuk didalamnya terjadi stres oksidatif, sekresi vasokonstriktor dan mikrotrombosis. Kondisi stres oksidatif akan memicu radikal bebas yang menyebabkan terjadi kerusakan pada sel endotel. Reaktif Oxygen Species (ROS). Seperti anion peroksida dan radikal hidroksil menyebabkan asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid mengalami konversi menjadi peroksida lipid. Kondisi terbentuknya peroksida lipid karena kerusakan endotel menyebabkan produksi NO terganggu (Munzel *et al.*, 2005; Abbas, 2005).

Hasil uji korelasi antara kadar TNF- α dan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia menunjukkan adanya korelasi bermakna ($p\text{-value}=0.007<\alpha$) dan ditunjukkan keeratan hubungan -0.73. Nilai tersebut menunjukkan hubungan kuat yang berlawanan. Bila ada peningkatan kadar TNF- α akan terjadi penurunan kadar NO dan jika ada penurunan TNF- α akan terjadi peningkatan NO pada tikus wistar model preeklamsia. Dari hasil korelasi tersebut membuktikan kerangka konsep pada penelitian ini yaitu terdapat hubungan yang berlawanan antara sitokin proinflamasi dengan produksi vasodilator pada kondisi preeklamsia. Hal ini juga menguatkan konsep teori yang telah ditemukan pada bab 2 sebelumnya, dimana pemberia *extra virgin olive oil* (EVOO) yang mengandung antioksidan dan antinflamasi (polifenol) diduga mampu menurunkan faktor inflamasi secara optimal.

Kondisi tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Dharma dan Susianto yaitu pada keadaan preeklamsia terjadi kondisi hipoksia plasenta yang berakibat terjadinya peningkatan TNF- α yang akan mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel yang memicu penurunan NO. Kondisi hipoksia plasenta menjadi penyebab terjadinya stres oksidatif dan berdampak pada

disfungsi endotel (Dharma *et al.*, 2005; Susianto *et al.*, 2009). EVOO dengan kandungan polifenol yang tinggi berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi sehingga di asumsikan dapat mengurangi terjadinya disfungsi endotel dengan menghambat aktivasi NF- κ B sehingga menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan NO

Kondisi preeklamsia juga disebabkan karena disfungsi endotel. Salah satu penyebab disfungsi endotel karena peningkatan sitokin proinflamasi diantaranya adalah TNF- α dan interleukin (IL). Sitokin tersebut berperan pada kondisi stres oksidatif yang terkait preeklamsia. Hal ini ditandai dengan terdapatnya oksigen reaktif dan radikal bebas yang menyebabkan pembentukan peroksida lemak (*lipid peroksida*) proses tersebut yang menghasilkan radikal yang sangat toksik yang dapat merusak sel endotelial dan mempengaruhi produksi nitrat oksida (*nitric oxide*) dan mengganggu keseimbangan prostaglandin (Goya L, 2007).

Studi ini memiliki keterbatasan yaitu peneliti tidak bisa mengendalikan stresor sebelum dilakukan tensi terkait dengan mobilisasi hewan tikus dan perlakuan sebelum ditensi, sehingga dikhawatirkan mempengaruhi hasil tensi. Oleh karena itu perlakuan yang dapat memicu kondisi stres jangan dilakukan sebelum tikus di ukur tekanan darahnya. Pada studi ini pemberin EVOO pada tikus wistar bermanfaat dalam menurunkan TNF- α dan meningkatkan NO, tetapi perlu dilakukan uji toksisitas sebelum diberikan kepada manusia agar tidak membahayakan kondisi ibu hamil.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Injeksi L-NAME dapat meningkatkan TNF- α dan menurunkan kadar NO pada tikus Wistar model preeklamsia.
2. *Extra Virgine Olive Oil* (EVOO) dapat meningkatkan kadar Nitric Okside pada tikus Wistar model preeklamsia.
3. *Extra Virgine Olive Oil* (EVOO) dapat menurunkan kadar Tumour Necrosis Factor Alpha pada tikus Wistar model preeklamsia.
4. Pemberian *Extra Virgine Olive Oil* (EVOO) dengan dosis 0.5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari dapat menurunkan kadar TNF- α pada tikus wistar model preeklamsia. Sedangkan pada kadar NO hanya dosis 2 mL/hari yang dapat meningkatkan kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia
5. Meningkatnya kadar TNF- α mengakibatkan menurunnya kadar NO dan sebaliknya semakin turunnya kadar TNF- α menyebabkan meningkatnya kadar NO pada tikus wistar model preeklamsia.

7.2 Saran

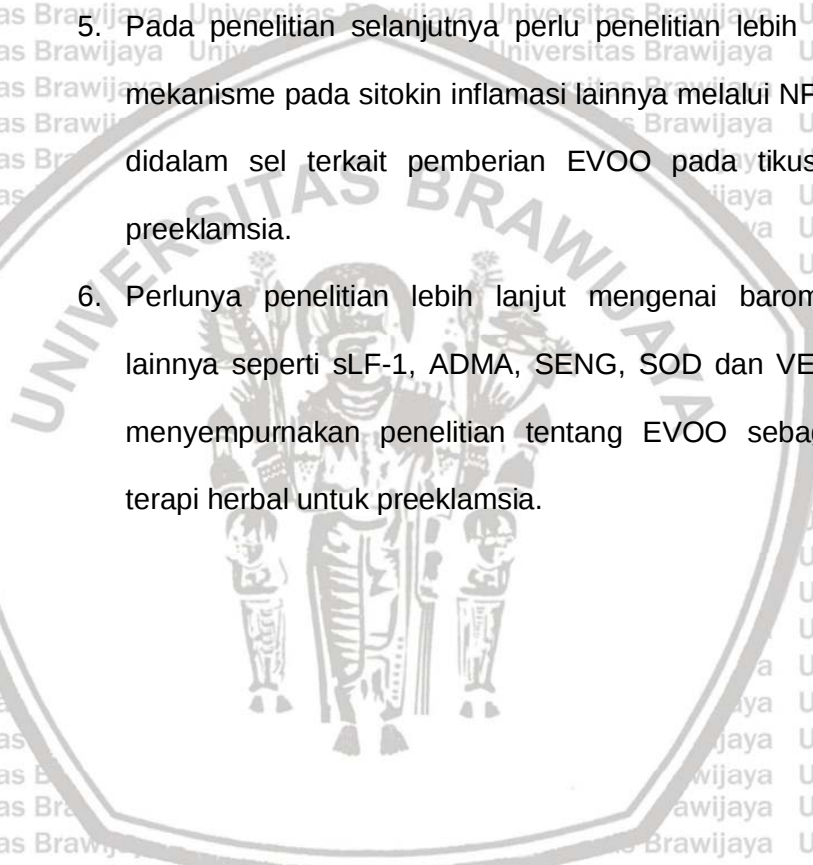
1. Perlu adanya pemeriksaan lanjutan tentang manfaat EVOO pada dosis 0,5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari pada parameter-parameter yang menjadi pemicu terjadinya preeklamsia pada manusia.
2. Perlu adanya uji toksisitas pada EVOO dosis 0.5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari sebelum diberikan kepada manusia.

3. Untuk penelitian selanjutnya perlu jarak lebih besar antara dosis EVOO agar dapat melihat perubahan kadar dari parameter setelah diberikan perlakuan.

4. Adanya perbedaan dosis pemberian EVOO pada tikus model preeklamsia dengan manusia sehingga diperlukan konversi dosis yang sesuai dan aman digunakan manusia terutama pasien preeklamsia.

5. Pada penelitian selanjutnya perlu penelitian lebih lanjut terhadap mekanisme pada sitokin inflamasi lainnya melalui NF- κ B yang terjadi didalam sel terkait pemberian EVOO pada tikus wistar model preeklamsia.

6. Perlunya penelitian lebih lanjut mengenai barometer-barometer lainnya seperti SLF-1, ADMA, SENG, SOD dan VEGF untuk lebih menyempurnakan penelitian tentang EVOO sebagai salah satu terapi herbal untuk preeklamsia.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, AK, & Lichtman., 2008. Basic Immunology. Update 3rd. Philaselpia: WB Saunders Company.
- Abdulsid A, Hanretty K, and Lyall F. 2013. Heat Shock Protein 70 Expression Is Spatially Distributed In Human Plasenta and Selectively Upregulated During Labor And Preeclampsia. PLoS ONE, 8: 1 – 7
- Abimulyani, Y, Nurdiana, N & Baktiyani, SCW., 2014, Syzgium cumini reduces oxidate stress and matrix metelloproteinase-2 level in endotelial cellsw induced by plasma from preeclamsia patients, J Exp integr Med, 4(2): 89-92.
- ACOG. James N. Martins Jr, MD. 2013. Hypertension in Pregnancy. Washington DC: The American College of Obstetrician and Gynecologist.p:13-19.
- Agius C.J., Jauniaux, E., Muttukrishna, S. 2012.Inflammatory Cytokines in Maternal Circulation and placenta of Chromosomally AbnormalFirst Trimester Miscarriages, Clinical and Developmental Immunology.1-7.doi:10.1155/2012/175041.
- Aisah, S., Djati, S., Khotimah, H. 2010. Pengaruh Polifenol The Hijau Terhadap Produksi Tnf- α pada Kultur Sel Trofoblas Manusia Yang Dipapar Glukosa Tinggi 33 Mm. Farmasains. Vol 1. No:1
- Aisyah,Y., Rudiansyah dan Muhaimin. 2015. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas antioksidan pada beberapajenis sayuran.Jurnal teknologi dan industry pertanian Indonesia.6(2): 28-32.
- Akbar, B. 2010. PengaruhMangostinTerhadapFertilitasTikusWistarBetina. Tesis Magister Program PascaSarjana. ITB. Bandung
- Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. Am J Hypertens 2002;15:170–175. [PubMed: 11863253]
- Ana C., Palel, Frank T. Spradly, June P. Warrington, Eric M. George, and Joey P. Granger. 2013. Pathophysysiology of Hypertension in Preeclamsia: Lesson in integrative physiology. National Institute of Health. 208: 224-233.
- Anom, IGN & Kusuma, AANJ., 2012, 'High Level Of Tumor Necrosis Factor (TNF- α) is Risk Factor Preeclamsia', indonesia J Obstetri Gynecology, vol.36, no 3.
- Azizieh, F.Y., Raghupathy, R. G. 2014.Tumour Necrosis Factor-a and Pragnancy Complications: A Prospective Study.Medical Principles and Practice, 24(2), 165-170.doi:10.1159/000369363.
- Baktiyani, SCW., 2007, 'Pengaruh Pemberian Kombinasi NAC Dengan Vitamin C Dan E Terhadap Stres Oksidatif Pada Huvecs Di

Papar Plasma Preeklamsia', Jurnal Kedokteran Brawijaya, vol XXIII, no 3

Baratawidjaja, KG & Rengganis, I., 2010, Immunologi Dasar, Balai Penerbit FKUI: Jakarta

Beltran, S. H., Harhay, M. O., Harhay, M. M., 2014. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from Cv. Picua.

Besnard, G., Khadari, B., Navascues, M., Fernandez-Mazuecos, M., El Bakkali A., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini, V., Santoni, S., Vargas, P., dan Savolainen V. 2013. The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *The Royal Society B*.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2833>

Bonney, EA, 2007, Preeclamsia: A View Through the Danger Model, J Reprod Immunol, 76 (1-2) 68-74

Camargo A, Ruano J, Fernandez J, Parnell L, Jimenez A, SantosGonzalez M, Marin C, Perez-Martinez P, Uceda M, LopezMiranda J et al.: Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. BMC Genomics 2009, 11:253.

Carnevale, R., Pignatelli, P., Nocella, C., Loffredo, L., Pastori, D., Vicario, T., Violi, F. (2014). *Extra virgin olive oil blunt post-prandial oxidative stress via NOX2 down-regulation. Atherosclerosis*, 235(2), 649–658. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.95

Carolina E., Joan R. C., Xavier Pintó. 2014. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endotheli. *Redox Biology*. 2, pp 971–977.

Catarino, C. C, Silva, A.S, Belo, L, Pereira, P. R, Rocha, S, and Patrício, B., 2012., Inflammatory Disturbances in Preeclamsia: Relationship between Maternal and Umbilical Cord Blood., Journal of Pregnancy Article ID 684384, 10 pages

Choi JW, Im MW, Pai SH. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. Annals of Clinical & Laboratory Science 2002; 32: 257-63

Chrichton GE, Bryan J, and Murphy KJ. 2013. Dietary Antioxidants, Cognitive Function and Dementia-A Systematic Review. Plant Food for Human Nutrition, 68: 279 - 292.

Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2012). *Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129–135. doi:10.1016/j.copbio.2011.09.006

Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N: Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento

(Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem* 2010, 121:105-111.

Cockovic, M, Buhimschi, CS, Zhao, G, F. Funai, E, Norwitz, ER, Kuzynski, e, Lockwood, CJ & Buhimschi. IA., 2008, 'Fractional Excretion of Tumor Necrosis Factor- α in whoman with severe preeclamsia', *Obstet Ginecol*, vol 112 (1). Pp. 93-100

Corona G, Spencer J, Dessi M: Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health* 2009, 25:285-293. 57.

Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Baumler H et al.: The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006, 145:333-341.

Covas, M.I. Olive oil and the cardiovascular system-Review. *Pharm. Res.* 2007, 55 175–186.

Covas, M.I., Nyysson, K., Poulsen, H.E. 2008. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factor. *Ann. Int. med.* 2

Cunha, S.; Ferreira Isabel, M.P.L.V.O.; Fernandes, J.O.; Faria, M.A.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P. Determination of lactic, acetic, succinic and citric acids in table olive by HPLC/UV. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2001, 24, 1029–1038

Cunningham FG, Levenno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. *Hipertensi dalam kehamilan*. In: Penerbit BU, Setia R, editor. *Obstetri William*. 23th ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2013: 740-794

Cunningham, FG, Leveno, KJ, Bloom, SL, Hauth, JC, Rouse, DJ & Spong, CY, 2013, *Williams Obstetri*, 23 rd Ed. Setia, R. (Editor), 2009. *The Williams*. Edisi 23, EGC, Jakarta.

D. Haig. 1996. "Gestational drive and the green-bearded placenta," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 13, pp. 6547–6551.

De la Torre-Carbot K, Chavez-Servin JL, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, Fito M, Covas MI, Munoz-Aguayo D, Lopez-Sabater MC: Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2007, 583:402-410. 34.

De la Torre-Carbot K, Chavez-Servin JL, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, Nurmi T, Poulsen HE, Gaddi AV, Kaikkonen J, Zunft HF et al. 2010. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr*, 140:501-508.

DeChemey AH, and Nathan L. Hiperensive states of pregnancy. Curent Obstetric and Gynecologic Diagnosis and Treatment. 9th ed. New York: McGRAW-HILL Inc.

Dell'Agli M, Fagnani R, Galli GV, Maschi O, Gilardi F, Bellosta S, Crestani M, Bosisio E, De Fabiani E, Caruso D. 2010. Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor-kB signaling. J Agric Food Chem 2010, 58:2246-2252.

Depkes, 1995. Farmakope Indonesia edisi IV. Jakarta: departemen Kesehatan RI.

Dharma, R., Wibowo,N., Raranta, H. 2005. Disfungsi Endotel pada Preeklamsia. Makara, Kesehatan, Vol.9. no.2.hal 63-69

Diez Concepcion M., Isabel Trujillo, Nieves Martinez-Urdiroz, Diego Barranco, Luis Rallo, Pedro Marfil and Brandon S. Gaut. 2015. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. New Phytologist. 206: 436-447. doi: 10.1111/nph.13181

Endermann, D. & Schiffrin, E. L., 2004. Endotelial Dysfunction. Journal Of The American Society of Nephrology, Volume 15, p. 1983-1992

Faas M.M, Van Pampus M. G, Aningga Z. A, Salomons J, Westra I. M, Donker R. B, Aarnoude J.G and de Vos. 2010. Plasma from preeclampsic woman activates endothelial cells via monocyte activation invitro, J. Reproductive Immunology. 87: 28-38.

Fatsecret Indonesia. 2018. Borges Extra Virgin Olive Oil. <https://www.fatsecret.co.id/kalori-gizi/borges/extra-virgin-olive-oil/1-porsi>. Diakses tanggal 24 Juli 2019

Fito, M., Cladellas M, de la Torre R, Marti J, Munoz D, Schroder H, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Lopez-Sabater MC, Bruguera J, Covas MI. 2008. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. Eur J Clin Nutr 62(4): 570-574.

Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB 2009. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. Circulation, 119:1093-1100.

Gathiram, P., & Moodley, J. 2016. Pre-eclamsia: its pathogenesis and pathophysiolgy. Cardiovascular journal of Afrika, 27(2), 71-78. Doi: 10.5830/cvja-2016-009

George, E. S., Marshal, S., Mayr, H. L., Trakman, G. L., Tatu-Babet, O. A., Lassemillante, A.-C. M., Marx, W. 2018. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 01-138. Dio:10.1080/10408398.2018.1470491

George, EM & Grangger, JP., 2010, Recent Insights into the Phatophysiology of Preeclamsia', Exspert Reviu Obstetri Gynecology, vol 5(5)

- Ghanbari Rahele, Anwar Farooq, Alkharfy, M. Khalid, Gilani Anwarul Hasan, and Saari Nazamid. 2012. Valuable Nutrients and Function Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *international Journal of Molecular Sciences*. Doi: 10.3390/ijms13033291
- Ghobadi, S., Hassanzadeh-Rostami Z, Mohammadian F, Nikfetrat A, Ghasemifard N, Raeisi Dehkordi H, Faghih S. 2018. Comparison of blood lipid-lowering effects of olive oil and other plant oils: a systematic review and meta-analysis of 27 randomized placebo-controlled clinical trials. *Crit Rev Food Sci Nutr*: 0.
- Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. 2002. TNF- α enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol*;283:R130–R143.
- Gilbert JS, Gilbert SA, Arany M, Granger JP. 2009. Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension* 2009;53(2):399-403.
- Gilbert, JS, Verzwylvelt J, Colson D, Arany M, Karumanchi SA, Granger JP. 2010. Pregnancy/Preeclampsia Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor 121 Infusion Lowers Blood Pressure and Improves Renal Ischemia-Induced Hypertension., pp.3380-385
- Goya L, Mateos R, Bravo L. 2007. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr*, 46:70-78.
- Greenwood JP, Scott EM, Stoker JB, Walker JJ, Mary DA. 2001. Sympathetic neural mechanisms in normal and hypertensive pregnancy in humans. *Circulation*;104:2200–2204. [PubMed: 11684631]
- H. S. Ros, P. Lichtenstein, L. Lipworth, and S. Cnattingius. 2010. "Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 91, no. 4, pp. 256–260.
- Haider, S., Knofler, M. 2009. Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and endometrium. *Placenta*, 30(2), 111-123. Doi:10.1016/j.placenta.2008.10.012
- Hassan, M. F., Rund, N. M. A & Salama, A. H., 2013. An elevated maternal plasma soluble fms-like tyrosine kinase-1 to placental growth factor ratio at midtrimester is a useful predictor for preeclampsia. *Obstetrics and gynecology international*, 2013, p.202346
- Heffler LA, Tempfer CB, Moreno RM, et al. Endothelial-derived nitric oxide and angiotensinogen: Blood pressure and metabolism during mouse pregnancy. *Am J Physiol* 2001;280:R174–R182
- Hem, A. 2005. *The Biology of Laboratory Animals*. 1:95-102
- Holvoet P, Collen D. Thrombosis and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 320- 328. 12.

- Hubel, C.A. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222: 222-235
- Hung S. H., Wang C. C., Ivanov S. V., Alexieva V., Yu C. W. 2007. Repetition of hydrogen peroxide treatment induces a chilling tolerance comparable to cold acclimation in mung bean. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132 770-776.
- Hung T.H., Skepper J.N., Charnock-Jones, D.S., Burton, G.J. 2002. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res*. 90(12): 1274-1281.
- Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S: The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin Nutr* 2011, 30:533-540 doi: 10.1016/j.clnu.2011.02.004. 69.
- Irianti. 2017. HSP 70 expression profile in Preeclampsia model of pregnant rat (*Rattus norvegicus*) after giving the EVOO. IOP Conference series: materials science and engineering.
- Jadhav, A. 2010. Is Olive Oil Good For Hair? <http://www.buzzle.com/articles/is-olive-oil-good-for-hair.html>
- Jenner, P.; Olanow, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996, 47, 161S-170S 75.
- Jonssons Yvonne. 2005. Cytokines And Immune Balance In Preeclampsia. Linköping University Medical Dissertations No. 924.
- Keceli T and Gordon MH. 2001. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the science of food and agriculture*. 81 (14):1391-1396
- Kemenkes. 2017. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur tahun 2016. Surabaya
- Kenny, L., English, F., & McCarthy, F. 2015. Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integrated Blood Pressure Control*, 7. Doi: 10.2147/ibpc.s50641.
- Khymenets O, Fito M, Covas MI, Farre M, Pujadas MA, Munoz D, Konstantinidou V, de la Torre R: Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study. *OMICS* 2009, 13:7-19.
- Kliman, H. J. 2000. Uteroplacental Blood Flow. *The American Journal of Pathology*, 157(6), 1759-1768. doi:10.1016/s0002-9440(10)64813-4
- Kochhar, S.P. The composition of frying oils. In *Frying Improving Quality*; Rossel, J.B., Ed.; Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, UK, 2001; pp. 87-114.

Kohyama, N.; Nagata, T.; Fujimoto, S. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 347–350.

Konstantinidou V, Covas M-I, Munoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Tormos MdC, Toledo E, Marti A, RuizGutierrez V. 2010. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J*, 24:2546-2557. 58.

Kopincova, Jana., Puzserova, Angelika., & Bernatova, Iveta. 2012. L-Name in the Cardiovascular System Nitric Oxide Synthase Activator. *Pharmacological Reports*. 64. 511-520

Laptah Dit Kesga. 2016. Laporan Tahunan Direktoat Kesehatan Keluarga. Jakarta.

Laresgoiti-Servitje E and Gomes-Lopez N. 2012. The Pathophysiology of preeclampsia involves altered levels of angiogenic factors promoted by hypoxia and autoantibody-mediated mechanisms. *J.Biology of Reproduction* 87(2):36,1-7

Leeners B., Rath W, Kuse S, Irawan C, Imthurn B, Neumaier-Wagner P. 2006. New Aspects Of a Classical Risk Factor for Hypertensive Disorder in Pregnancy. *Clinical Science*.81-86.doi: 10.1042/cs20060015.

Lohmiller, J.J., S.P. Swing. 2006. Reproduction and breeding. Dalam: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth 7 C.L. Franklin (eds). 2006. *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington:vi 912 hlm

Lopez Maria Jesus O, Berna G, Everado MC, Hermina LG, Franz M and M Carmen L. 2008. An Extra–Virgin Olive Oil Rich in Polyphenolic Compounds Has Antioxidant Effects in Of1 Mice. *The Journal of Nutrition*, 138: 1074 – 1078.

Lu, J.; Huang, G.; Wang, Z.; Zhuang, S.; Xu, L.; Song, B.; Xiong, Y.; Guan, S. 2013. Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia. *Food Chem. Toxicol.* 62, 172- 178.

Lyall, F & Greer, I. A., 1996. *The Vascular Endothelium in Normal Pregnancy and Pre-eclampsia.*, pp.107-116.

Maloe, Sri Utami Pramono, C. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan* doi Laboratorium. Jawa barat: Institut pertanian Bogor. Hal: 104-112.

Mangkoewidjojo, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan hewan Percobaan di daerah Tropis*. UI Press, hal: 37-38

Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, de la Torre R, Farre M. 2004. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation — a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* , 43:140-147.

Martin-Pelaez, S., Castaner O, Sola R, Motilva MJ, Castell M, Perez-Cano FJ, Fito M. 2016. Influence of Phenol-Enriched Olive Oils on Human Intestinal Immune Function. *Nutrients* 8(4): 213.

Martin-Pelaez, S., Mosele JI, Pizarro N, Farras M, de la Torre R, Subirana I, Perez-cano FJ, Castaner O, Sola R, Frnandez-Castillejo S, Heredia S, Farre M, Motiva MJ, Fito M. 2017. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *Eur J Nutr* 56(1): 119-131.

Masoura, S. Kalogiannidis I, Makedou K, Theodoridis T, Koïou K, Gerou S, Athanasiadis A, Agorastos T. 2014. Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case control study. *European Journal of obstetrics gynecology, and reproductive biology*, 175, pp.119-23

McCarthy, H.O., Zholobenko, A. V., Wang,Y., Canine, B., Robson,T., Hirst, D. G., and Hatefi, A. 2011. Evaluation of a multi-functional nanocarrier for targeted breast cancer iNOS gene therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 405(1-2), 196-202. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.051

Mensink, R.P.; Janssen, M.C.; Katan, M.B. Effect on blood pressure of two diets differing in total fat but not in saturated and polyunsaturated fatty acids in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988, 47, 976–980.

Moncada, S., Palmer,R.M., Higgs, E. A.2002 Nitric Oxide: physiologi pathophysiology, and pharmacology. *Pham. Rev.*, 43: 109-142.

Moon ho Do, Su nam Kim, Seung-Yong Seo, Eui-Ju Yeo and Sun Yeou Kim. 2015. δ- Tochoferol Prevents Methylglyoxal-Induced Apoptosis by Reducing ROS Generation and Inhibiting Apoptotic Signaling Cascades in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Food Funct*, 6: 1568 - 1577.

Motta-Mejia, C., Kandzija, N., Zhang, W., Mhlomi, V., Cerdeira A S, Burdujan, A., Tannetta, D., Dragovic, R., Sargent, IL., Redman, C.W., Kishore,U., Vatish,M. 2017. Placental Vasciles Carry Active Endothelial Nitric Oxide Synthase and Their Activity is Reduced in Preeclampsia. *Hypertension*.70:372-381.doi:10.1161.117.09321.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, and Rodwell VW. 2000. Biokimia Harper.Edisi 25, Jakarta, EGC.

Mybest. 2018. Rekomendasi Extra Virgin Olive Oil terbaik (terbaru tahun 2019). <https://my-best.id/48838/>. Diakses tanggal 23 juli 2019

Nagai, T., Bridenbaugh, E. A., Gashev, A.A. 2011. Aging-Associated Alteration in Contractility of Rat Mesentric Lymphatic Vessels. *Microcirculation*, 18(6),463-473. Doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00107

Nakbi A, Tayeb W, Abir G, Manel I, Samia D, Issam C. et.al. 2010. Effects of Olive Oil and its Fractions on Oxidative Stress and the Livers

Fatty Acid Composition In 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid-Treated Rats. BioMed Central, 7: 1 - 11.

Nelawati A, Soemardini, Bambang P. 2016. Pengaruh Pemberian Vitamin E pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok Subakut Terhadap Berat Badan Bayi Lahir Aterm. Majalah Kesehatan FKUB, 3: 76 - 85.

Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porriati F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G. 2004. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. Hypertension;43:614-622. [PubMed: 14744923]

Norris LA, Higgins JR, Darling MRN, Washe JJ, Bonnar J. Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. Obstet Gynecol 1999; 93 : 958-63

Nugraheni, Kartika. 2012. Pengaruh pemberian minyak zaitun ekstra virgin terhadap profil lipid serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley* hiperkolesterolemia. Semarang [Artikel Penelitian].

Orey C., 2008. Khasiat Minyak kZaitun; Resep Umur Panjang Ala Mediterania, Hikmah, Jakarta.

Patot MCT, J Bendrick-Peart, Beckey VE, Sarkova N, Zwerdinger L. 2004. Greater Vascularity, Lowered HIF-1/DNA binding an elevated GSH as markers of adaptation to in vivo chronic hypoxia. 80262, pp.525-532

Pepine CJ, Drexler H, Dzau VJ. 1996 Endothelial Cell in Cardiovascular Health and Disease. Florida: University of Florida.

Playfair J.H.L., dan Chain B.M., 2013. Immunology at a Glance, 10th Edition. Blackwell Science Ltd.

Podjarny E, Bursztyn N, Rashed G 2001. Chronic exogenous hyperinsulinaemia-induced hypertension in pregnant rats: Effect of chronic treatment with L-arginine. Clin Sci;100:667-671. [PubMed: 11352784]

Poston L, Chappell L, Seed P, Shennan A. 2010. Biomarker of oksidative stress in pre-eklamsia. Pregnancy Hipertension: An internasional Journal of Women's cardiovascular Health. 1:22-27.

Powe, J. S. & Sessa, W.C., 2007. Evolving Functions of Endothelial cells in Inflammation., pp. 803-815

Puerta, R.D.L; Gutierrez, V.R.; Hoult, J.R. 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* 57, 445-449.

Rahardjo, B, Widjanto, Sujuti, H, & Keman, K, 2014. Defferent Levels of IL-1 α , IL-6, TNF- α , NF-kB and PPP-y in monocyte exposed by plasma Preeclamsia and Normotensive Pregnancy. Pregnancy

Hypertension; an International Journal of Women's Cardiovascular Health, 4:148-193

Rasmussen, O.; Thomsen, C.; Hansen, K.W.; Vesterlund, M.; Winther, E.; Hermansen, K. Effects on blood pressure, glucose, and lipid levels of a high-monounsaturated fat diet compared with a high-carbohydrate diet in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 1993, 16, 1565-1571.

Redman C.W., Sargent, I.L. 2010. Immunology Of Preeclampsia. *AJRI*, Volume 63, pp.534-543

Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review. *Placenta* 2003;24A(suppl):S21-S27. [PubMed: 12842410]

Ribarofa, F., Zanev, R., Shishkov, S., Rinov, N. 2003. A-Tocopherol, fatty acids and their correlations in Bulgarian foodstuffs. *J. Food Compos. Anal.* 16. 659-667.

Richard, N.; Arnold, S.; Hoeller, U.; Kilpert, C.; Wertz, K.; Schwager, J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.*, 2011, 77, 1890-1897.

Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W. & Araya, J., 2007. Relationship between Oxidative Stress and essential Hypertension. *Hypertens Res*, 30 (1), pp. 1159-1167.

Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, Lozano A, Gomez P, Jimenez Y, Perez Jimenez F. 2005. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol*, 46: 1864-1868.

Salas SP, Altermatt F, Campos M, Giacaman A, Rosso P. 1995. Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. *Hypertension*; 26(6 Pt 2):1019-23.

Salem AA. 2015. Effect of Feeding on Olive Oil and Thyme on Pregnancy and Lactation Periods. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4: 19 - 28.

Sandrim V. C., Palei A. C., Luizon M. R., Izidoro-Toledo T. C., Cavalli R. C., Tanus-Santos J. E. 2010. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J.* 10 40-45. 10.1038/tpj.2009.38

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., De Sanctis, P., Geovannini C., D'Archivio, M., & Masella, R. 2017. Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 18 (1). Doi. 10.2174/1871530317666171114114

- Santosa, S., delima, E. R., Prahastuti, S., Tih, F., Suryawan, A., Sastrawinata, U.S., 2007. Peran F2- Isoprostano dan nitric oksida sebagai penanda stress oksidatif dan disfungsi endotel pada penderita preeklamsia, *JKM*: 47-54.
- Sato, K.; Mihara, Y.; Kanai, K.; Yamashita, Y.; Kimura, Y.; Itoh, N. 2016. Tyrosol ameliorates lipopolysaccharide-induced ocular inflammation in rats via inhibition of nuclear factor (NF)-kappa B activation. *J. Vet. Med. Sci.*, 78, 1429-1438.
- Saucedo, R., Valencia, J., Manuel, L., & Hern, M. 2014. Early Disturbed Placental Ischemia and Hypoxia Creates Immune Alteration and Vascular Disorder Causing Preeklamsia, 45.
- Sherwood L. 2004. Human Physiology From Cells to Systems. 4th ed. Belmont CA., Thomson Brooks/Cole.
- Shu W, Li H, Gong H, Zhang M, Niu X, Ma Y, Zhang X, Cai W, Yang G, Wei M, Yang N, and Li Y, 2018. Evaluation of blood vessel injury, oxidative stress and circulating inflammatory factors in an L-NAME induced preeclampsia-like rat model. *J Experimental and therapeutic medicine*. 16:585-594.
- Silalahi, J. 2006. Makanan Fungsional. Kanisius: Yogyakarta
- Smith GCS, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: A retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet* 2001;357:2002–2006. [PubMed: 11438131]
- Soeroso A. 2007. Sitokin. *Oftalmologi Indonesia*.5 ; 171-80
- Soler-Rivas, C., Epsin, J. C., Wichers, H. J. 2000. Oleuropein and related compound. *J. sci. Food Agric*. 80. 1013-1023
- Solimun. 2002. *Multivariate Analysis Structural Equation Modeling*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Streegers EA, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. 2010. Preeclampsia. *Lancet*. 376(9741):631-644.
- Subandrate, Faisal, Mia E., Anggraini, Nurul Windi. 2017. Peranan Stres Oksidatif pada Preeklamsia. Vol. 44 no. 5
- Subowo. 2009. Histologi Umum. Jakarta: *Sagung Seto*
- Subowo. 2013. Immunologi Klinik. Jakarta: *Sagung Seto*
- Susianto IA, Suharsono, S.Hadijono. 2009. Kadar TNF- α , IL-6 dan Trofoblas pada Preeklamsia-Eklamsia. Vol 43. no 4
- Szabo, c., Thiemerman, C., Wu, C., C., Peretti, M., Vane R. J. 2004. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *National academy of science* 91:271-275
- Szarka, A., Rigo, J., Lazar, L., Beko, G., & Molvarec, A. 2010. Circulating Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules in normal

Pregnancy and Preeklamsia determined by Multiplex Suspension Array. *BMC Immunology*, 11, 59.

Taddei, S, Virdis A, Ghiadomi L, Sudano I, Salvetti A 2002. Effets of Antihypertensive Drugs On Endothelial Dysfunction. *Drugs* 62: 265-84

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. 2002. Stress in pregnancy: A new Wistar rat model for human preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*;186:544–550. [PubMed: 11904621]

Teguh M, C Johannes Mose, Jusuf SE, Betty SH. 2010. Perbedaan Indeks Apoptosis Plasenta Antara Preeklampsia dan Kehamilan Normal Serta Hubungannya dengan Berat Badan Lahir dan Tekanan Darah Ibu, *Majalah Kedokteran Bandung*, 42: 1 - 5.

Tista, G.N.B., 2011. Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia L) Menurunkan Tekanan Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar (Rattus Norvegicus) yang Hipertensi. *Program Pascasarjana Universitas Udayana*.

Toelihere, Mozes R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Bandung: Angkasa

Trachtenberg BH, Here JM. 2009. Biomarkers of Oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 5(4) 561-77

Urso, M.L., Clarkson, P.M. 2003. Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation. *Toxicology* 189(1-2)

Valenzuela FJ., Perez-Sapulveda, A., Torres, M. J., Correa, P., Repetto, G. M., & Illanes, S. E. 2012. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *Journal of pregnancy*, 2012,1-8. Doi:10.1155/2012/632732.

Villarejo AB, Ramirez-Sanchez M, Segarra AB, Martinez-CanameroM, and Prieto. 2015. Influence Of Extra Virgin Olive Oil on Blood Pressure and Kidney Angiotensinase Activities in Spontaneously Hypertensive Rats. *Planta Med*, 8: 664 - 669.

Visioli, F.; Galli, C.; Borner, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. 2000. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett*. 486, 159–160

Walsh, A., Rana, S. & Karumanchi, S.A., 2009. Reviews Preeclampsia: The role of Angiogenic Factors in its Pathogenesis. *Physiology*, 1(16), PP. 147-158.

Wani, FA, Albahrawy AZ., Rahiman, S. 2015. Hypolipidemic Activity of Olive Oil (Olea europaea) against High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Disease (NAFLD) in Mice. *Open Journal of Pathology*; 5,pp.73-83.

Wathen K. A. 2011. Pre-eclampsia. Departement of obstetrics and gynaecology & clinical chemistry. *University of Helsinki*: Finland.p:10-73.

Wibowo B., Rachimhadi T. 2006. Preeklampsia dan Eklampsia, dalam : Ilmu Kebidanan. Edisi III. Jakarta. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, pp. 281-99

Wicaksono, B. A., Candra, S., Baktiyani W., & Fitri, L. E. 2015. Intraperitoneal Injection of High Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Serum Increase Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) and Blood Pressure of pregnant Mice. 5 (1)

Widyasanti A, Farddani CL, Rohdiana D. 2016. Pembuatan Sabun Padat Transparan Menggunakan Minyak Kelapa Sawit (Palm oil) dengan Penambahan Bahan Aktif Ekstrak The Putih (camellia Sinensis). *Jurnal Pertanian Lampung*. Vol:5.No:3.125-136

Wolfensohn, S., dan Lloyd, M. 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th ed., Wiley-Blackwell, West Sussex, 234

Xiao J.P., Yin Y.X., Gao Y.F., 2012. The Increased Maternal Serum Levels of IL6 are Associated with The Severity and Onset of Preeclampsia, Cytokine 60; 856- 860. Doi:10.1016/j.cyto.2012.07.039

Xie,Y., Zhou,S., Jiang, Z., Dai,J., E,Elisabeth, Puschek, Lee, I., Parker, G., Huttemann,M., A, Daniel, and Rappolee. 2014. Hypoxic stress induces, but cannot sustain trophoblast stem cell differentiation to mitochondrial insufficiency. *Stem Cell Research* 13pp478-491.

Xuan, R.-R., Niu, T.-T., & Chen, H.-M. 2016. Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2697–2704.doi:10.3892/mmr.2016.5569

Yani L. 2011. Korelasi antara Adiponektin dengan Tumor Ncrosis Factor Alpha (TNF α) pada pria Indonesia obesitas non-diabetes. MKI. 6.1

Zhu Hao, Zhu Weimin, Hu Rong, Wang Huijun, Ma Duan and Li Xiaotian. 2016. The effect of preeclampsia-like-syndrome induced by L-NAME on learning and memory and hippocampal glucocorticoid receptor expression : a rat model. *Jurnal Hypertension in Pregnancy*. Vol 36. Doi: 10.1080/10641955.2016.1228957

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAikan ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 73 / EC / KEPK – S2 / 02 / 2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengaruh Minyak Zaitun Ekstra Virgin pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Preeklamsi dengan Injeksi L-NAME.

PENELITI UTAMA : Yulia Silvani
Agnestia Naning
Afnari Maharani
Alfima Rahasti
Dwi Norma R.
Wenny Rahmawati

UNIT / LEMBAGA : S2 Kebidanan - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(HK)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213 214, 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN
Nomor : 395 /UN10.F08.08/PN/2019

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ)
Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul : Pengaruh Extra Virgin Olive Oil (EVOO) Terhadap Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Dan Kadar Nitric Oxide (NO) Pada Tikus Wistar Model Preeklamsi

Penulis : Dwi Norma Retnaningrum

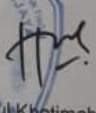
NIM : 176070400111029

Jumlah Halaman : 89

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)

Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

15 JUL 2019
Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP. 19751125 200501 2 001

Lampiran 3 Bukti Accepted Jurnal


UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU

SURAT KETERANGAN
Nomor : 22.62/I/UN1/LPPT-UGM/2019

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : drh. Dwi Liliek Kusindarta, MP. PhD
NIP : 19680526199512 1 001
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : Yulia Silvani
NIK : 2012088707042001
Instansi : Prodi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran UNIBRAW

Pada bulan Januari 2019 membeli Tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur Wistar betina usia 2 bulan sejumlah 50 (*Lima puluh*) ekor dan Jantar. usia 2 bulan sejumlah 15 (*Lima Belas*) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertile dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran 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, 21 Januari 2019
Kabid Unit Pra- Klinik dan Pengembangan
Hewan Percobaan LPPT UGM

drh. Dwi Liliek Kusindarta, MP. PhD
NIP : 19680526199512 1 001

Sekip Utara, Jl. Kaliurang Km. 4 Yogyakarta 55281 - Telp. (0274) 548348, 546868 - Fax (0274) 548348
E-mail : lppt_info@mail.ugm.ac.id - Website : www.lppt.ugm.ac.id

Lampiran 4 Analisis Data

A. Statistik TNF- α

Data Konsentrasi

K(-)	K(+)	D1	D2	D3
90,80	507,00	170,40	215,00	95,60
115,00	406,80	158,40	187,00	92,80
93,20	368,60	142,00	172,80	91,40
100,50	368,00	103,10	93,10	88,60
90,80	507,00	170,40	215,00	95,60

Hasil uji normalitas

Tests of Normality

	kelompok pengamatan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar TNF-alpha (pg/mL)	kontrol (-)	.230	4	.	.894	4	.404
	kontrol (+) (pre)	.299	4	.	.841	4	.200
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	.230	4	.	.930	4	.594
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	.294	4	.	.905	4	.456
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	.155	4	.	.998	4	.995

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

TNFAlfa(pg/mL)			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.845	4	15	.061

Hasil uji komparasi semua kelompok

Oneway

Descriptives

Kadar TNF-alpha (µL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol (-)	4	99.875	10.8945	5.4472	82.539	117.211	90.8	115.0
kontrol (+) (pre)	4	312.600	171.5713	85.7857	39.592	585.608	168.0	507.0
P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	4	143.475	29.3259	14.6630	96.811	190.139	103.1	170.4
P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	4	166.975	52.2776	26.1388	83.790	250.160	93.1	215.0
P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	4	92.100	2.9143	1.4572	87.463	96.737	88.6	95.6
Total	20	163.005	109.2138	24.4210	111.891	214.119	88.6	507.0

ANOVA

Kadar TNF-alpha (pg/mL)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	127155.047	4	31788.762	4.794	.011
Within Groups	99470.582	15	6631.372		
Total	226625.629	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar TNF-alpha (pg/mL)

LSD

(I) kelompok pengamatan	(J) kelompok pengamatan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol (-)	kontrol (+) (pre)	-212.7250*	57.5820	.002	-335.458	-89.992
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	-43.6000	57.5820	.461	-166.333	79.133
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	-67.1000	57.5820	.262	-189.833	55.633
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	7.7750	57.5820	.894	-114.958	130.508
kontrol (+) (pre)	kontrol (-)	212.7250*	57.5820	.002	89.992	335.458
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	169.1250*	57.5820	.010	46.392	291.858
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	145.6250*	57.5820	.023	22.892	268.358
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	220.5000*	57.5820	.002	97.767	343.233
P1 (pre + EVOO 0,5 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	43.6000	57.5820	.461	-79.133	166.333
	kontrol (+) (pre)	-169.1250*	57.5820	.010	-291.858	-46.392
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	-23.5000	57.5820	.689	-146.233	99.233
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	51.3750	57.5820	.386	-71.358	174.108
P2 (pre + EVOO 1 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	67.1000	57.5820	.262	-55.633	189.833
	kontrol (+) (pre)	-145.6250*	57.5820	.023	-268.358	-22.892
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	23.5000	57.5820	.689	-99.233	146.233
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	74.8750	57.5820	.213	-47.858	197.608
P3 (pre + EVOO 2 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	-7.7750	57.5820	.894	-130.508	114.958
	kontrol (+) (pre)	-220.5000*	57.5820	.002	-343.233	-97.767
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	-51.3750	57.5820	.386	-174.108	71.358
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	-74.8750	57.5820	.213	-197.608	47.858

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

B. Statistik NO

Data konsentrasi NO

K(-)	K(+)	D1	D2	D3
0.41854	0,08363	0.16729	0.16737	0,25134
0.33482	0,16729	0.16988	0.25095	0.33488
0.25240	0,16735	0.25509	0.33457	0.41831
0.42471	0,25092	0.33459	0.33467	0.42225
0.41854	0,08363	0.16729	0.16737	0,25134

Hasil Uji Normalitas

Tests of Normality

	kelompok pengamatan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi NO (μmol/L)	kontrol (-)	.273	4	.	.884	4	.358
	kontrol (+) (pre)	.250	4	.	.945	4	.684
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	.281	4	.	.873	4	.310
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	.283	4	.	.864	4	.274
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	.277	4	.	.877	4	.326

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

NO(μmol/L)			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.271	4	15	.892

Hasil uji komparasi semua kelompok Oneway

Descriptives

Konsentrasi NO ($\mu\text{mol/L}$)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol (-)	4	.357618	.0812474	.0406237	.228335	.486900	.2524	.4247
kontrol (+) (pre)	4	.167298	.0682959	.0341479	.058624	.275971	.0836	.2509
P1 (pre + EVOO 0,5 mL/kg BB/hr)	4	.231713	.0797993	.0398997	.104734	.358691	.1673	.3346
P2 (pre + EVOO 1 mL/kg BB/hr)	4	.271890	.0800688	.0400344	.144483	.399297	.1674	.3347
P3 (pre + EVOO 2 mL/kg BB/hr)	4	.356695	.0809721	.0404860	.227850	.485540	.2513	.4223
Total	20	.277042	.1025084	.0229216	.229067	.325018	.0836	.4247

ANOVA

Konsentrasi NO ($\mu\text{mol/L}$)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.108	4	.027	4.405	.015
Within Groups	.092	15	.006		
Total	.200	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi NO ($\mu\text{mol/L}$)

LSD

(I) kelompok pengamatan	(J) kelompok pengamatan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol (-)	kontrol (+) (pre)	.1903200*	.0553181	.004	.072412	.308228
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	.1259050*	.0553181	.038	.007997	.243813
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	.0857275	.0553181	.142	-.032180	.203635
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	.0009225	.0553181	.987	-.116985	.118830
kontrol (+) (pre)	kontrol (-)	-.1903200*	.0553181	.004	-.308228	-.072412
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	-.0644150	.0553181	.262	-.182323	.053493
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	-.1045925	.0553181	.078	-.222500	.013315
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	-.1893975*	.0553181	.004	-.307305	-.071490
P1 (pre + EVOO 0,5 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	-.1259050*	.0553181	.038	-.243813	-.007997
	kontrol (+) (pre)	.0644150	.0553181	.262	.053493	.182323
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	-.0401775	.0553181	.479	-.158085	.077730
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	-.1249825*	.0553181	.039	-.242890	-.007075
P2 (pre + EVOO 1 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	-.0857275	.0553181	.142	-.203635	.032180
	kontrol (+) (pre)	.1045925	.0553181	.078	.013315	.222500
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	.0401775	.0553181	.479	-.077730	.158085
	P3 (pre + EVOO 2 mL/hr)	-.0848050	.0553181	.146	-.202713	.033103
P3 (pre + EVOO 2 mL/kg BB/hr)	kontrol (-)	-.0009225	.0553181	.987	-.118830	.116985
	kontrol (+) (pre)	.1893975*	.0553181	.004	.071490	.307305
	P1 (pre + EVOO 0,5 mL/hr)	.1249825*	.0553181	.039	.007075	.242890
	P2 (pre + EVOO 1 mL/hr)	.0848050	.0553181	.146	-.033103	.202713

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

C. Uji korelasi

1. Hasil uji korelasi dosis terhadap kadar TNF- α

Nonparametric Correlations

Correlations			Dosis	TNF alpha
Spearman's rho	Dosis	Correlation Coefficient	1,000	-,562
		Sig. (2-tailed)	.	,057
		N	12	12
	TNF alpha	Correlation Coefficient	-,562	1,000
		Sig. (2-tailed)	,057	.
		N	12	12

2. Hasil uji korelasi dosis terhadap kadar NO

Nonparametric Correlations

Correlations			Dosis	NO
Spearman's rho	Dosis	Correlation Coefficient	1,000	,591*
		Sig. (2-tailed)	.	,043
		N	12	12
	NO	Correlation Coefficient	,591*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,043	.
		N	12	12

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

3. Hasil uji korelasi kadar TNF- α dengan kadar NO

Correlations

Correlations		NO	TNF alpha
NO	Pearson Correlation	1	-,730**
	Sig. (2-tailed)		,007
	N	12	12
TNF alpha	Pearson Correlation	-,730**	1
	Sig. (2-tailed)	,007	
	N	12	12

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



Lampiran 5 Surat Keterangan Pembelian Tikus



SURAT KETERANGAN Nomor : 22.62/I/UN1/LPPT-UGM/2019

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : drh. Dwi Liliek Kusindarta, MP. PhD
NIP : 19680526199512 1 001
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : Yulia Silvani
NIK : 2012088707042001
Instansi : Prodi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran UNIBRAW

Pada bulan Januari 2019 membeli Tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) galur Wistar betina usia 2 bulan sejumlah 50 (Lima puluh) ekor dan Jantar. usia 2 bulan sejumlah 15 (Lima Belas) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertile dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran 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, 21 Januari 2019
Kabid Unit Pra- Klinik dan Pengembangan
Hewan Percobaan LPPT UGM

drh. Dwi Liliek Kusindarta, MP. PhD
NIP : 19680526199512 1 001

Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian

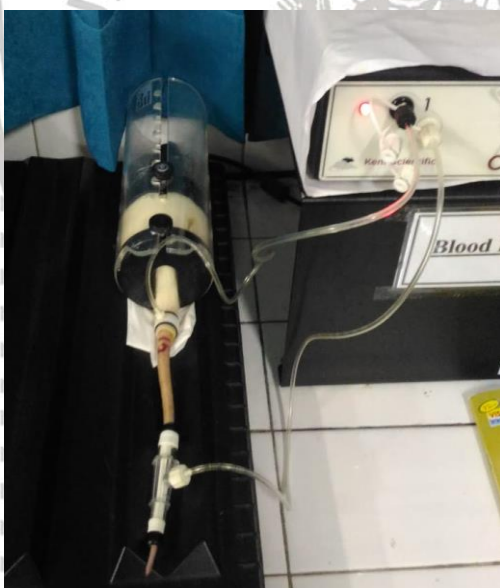
Pembuntingan



Vaginal Plug



Pengukuran Tekanan Darah



Pengukuran Proteinuria



Sonde EVOO



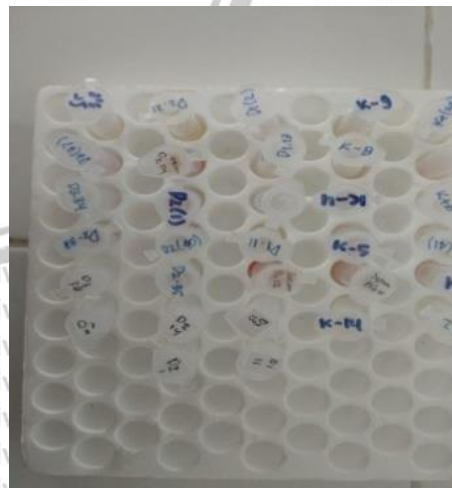
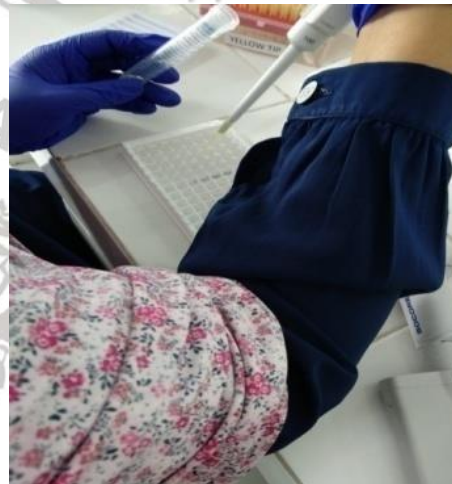
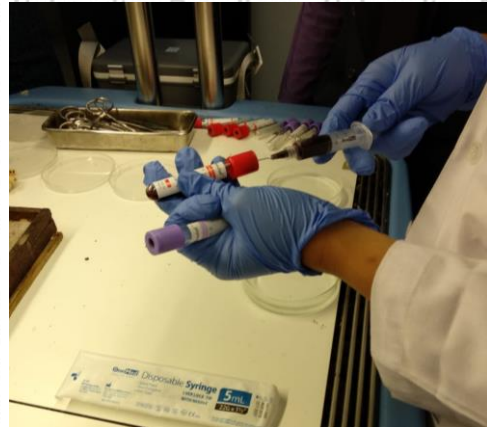
Injeksi L-NAME





Pembedahan dan Pengambilan Sampel







Pengukuran kadar NO



Lampiran 7 Pencatatan berat badan janiin dan induk tikus bunting model preeklamsia

Berat badan janin

KELOMPOK	SAMPEL 1 (GRAM)	SAMPEL 2 (GRAM)	SAMPEL 3 (GRAM)	SAMPEL 4 (GRAM)	RERATA (GRAM $\pm$ SD)
K-	2.83	1.44	2.42	3.85	2.64 $\pm$ 0.99
K+	0.82	0.94	1.42	0.81	0.99 $\pm$ 0.29
D1	1.36	1.24	1.32	1.36	1.32 $\pm$ 0.057
D2	2.24	2.33	1.44	1.82	1.96 $\pm$ 0.19
D3	3.2	2.33	2.37	2.88	2.69 $\pm$ 0.40

Berat badan induk tikus bunting

KELOMPOK		BB G 1 (gram)	BB G 10 (gram)	BB G 19 (gram)
K (-)	Sampel 1	164.5	189	201
	Sampel 2	195	215	234
	Sampel 3	197.5	243	258
	Sampel 4	163	177	197
K (+)	Sampel 1	173	189	205
	Sampel 2	165	176	187
	Sampel 3	189	248	237
	Sampel 4	181	235	221
D 1	Sampel 1	159.5	173	206
	Sampel 2	191	238	243
	Sampel 3	163	177	195
	Sampel 4	180	195	213
D 2	Sampel 1	175.5	198	209
	Sampel 2	187	223	238
	Sampel 3	193	216	244
	Sampel 4	185	199	211
D 3	Sampel 1	151.5	199	218

	Sampel 2	152	179	195
	Sampel 3	151.5	203	182
	Sampel 4	184	198	227



Lampiran 8 Hasil uji antioksidan EVOO



**LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU DAN KEAMANAN PANGAN
(TESTING LABORATORY OF FOOD QUALITY AND FOOD SAFETY)**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

Jl. Veteran, Malang 65145, Telp. (0341) 573358
E-mail : labujipangan_thpub@yahoo.com

KEPADA : Siti Anisah, dkk
FK - UB
MALANG

**LAPORAN HASIL UJI
REPORT OF ANALYSIS**

Nomor / Number : 0263/THP/LAB/2018
Nomor Analisis / Analysis Number : 0263
Tanggal penerbitan / Date of issue : 12 April 2018
Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
The undersigned ratifies that examination
Dari contoh / of the sample (s) of : **MINYAK ZAITUN**

Untuk analisis / For analysis :
Keterangan contoh / Description of sample :
Diambil dari / Taken from : -
Oleh / By : -
Tanggal penerimaan contoh / Received : 26 Februari 2018
Tanggal pelaksanaan analisis / Date of analysis : 26 Februari 2018
Hasil adalah sebagai berikut / Resulted as follows :

PARAMETER	HASIL
ANTIOKSIDAN IC50 (mg/ml)	48,56

HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK
CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL
CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN
TANDING BARANG

Ketua,

Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002

RIWAYAT HIDUP

Dwi Norma Retnaningrum, lahir di Banyuwangi, 31 Juli 1986 anak kedua dari tiga bersaudara putri dari bapak Paidi Winoto dan Ibu Sri Hardaningsih. Lulus SD Negeri 9 Kebondalem tahun 1999, lulus SMP Negeri 1 Cluring tahun 2002 dan lulus SMA Negeri 1 Genteng tahun 2005. Tahun 2005 melanjutkan pendidikan D-III Kebidanan di POLTEKES Kemenkes Malang, lulus tahun 2008. Melanjutkan pendidikan D-IV Bidan Pendidik tahun 2010 di POLTEKES kemenkes Malang, lulus tahun 2011. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2008 sampai 2014 penulis bekerja di RSIA Melati Husada Malang, tahun 2015 sampai sekarang bekerja sebagai dosen di STIKES Widyagama Husada Malang.

