



**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL (EVOO)  
TERHADAP KADAR GLUTATION (GSH) DAN  
KADAR ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE  
(eNOS) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
MODEL PREEKLAMPSIA**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:**

**AFNIARI MAHARANI  
176070400111026**

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

# TESIS

## PENGARUH *EXTRA VIRGIN OLIVE OIL* (EVOO) TERHADAP KADAR GLUTATION (GSH) DAN KADAR *ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE* (eNOS) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL PREEKLAMPSIA

Oleh:

**AFNIARI MAHARANI**

**176070400111026**

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

**KOMISI PEMBIMBING**

**Dr. dr. Retty Rathawati, M.Sc**

**NIP 195502011985032001**

**Ketua**

**Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K)**

**NIP 195706301984121001**

**Anggota**

Malang, 25 JUL 2019

**Universitas Brawijaya**

**Fakultas Kedokteran**

**Dekan,**



**Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K)**

**NIP 197307262005011008**

## TESIS

# **PENGARUH *EXTRA VIRGIN OLIVE OIL* (EVOO) TERHADAP KADAR GLUTATION (GSH) DAN KADAR *ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE* (eNOS) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL PREEKLAMPSIA**

Oleh :

**AFNIARI MAHARANI**  
176070400111026

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

**KOMISI PENGUJI**

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc  
NIP 195502011985032001  
Ketua

Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K)  
NIP 195706301984121001  
Anggota Penguji

Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K)  
NIP 196902041999031008  
Anggota Penguji

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes  
NIP 195505121987012001  
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 : Afniari Maharani  
NIM : 176070400111026  
PS : Magister Kebidanan  
Fak : Kedokteran UB



## LEMBAR PERUNTUKAN

**Karya Ilmiah ini kutujukan kepada**  
**Ayahanda dan Ibunda Tercinta,**  
**Suamiku dan anak tersayang**  
**Aditya Satriya Nugraha dan**  
**Aldian Aufar Nugraha**



## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Kadar Glutation (GSH) dan Kadar *Endothelial Nitric-Oxide Synthase* (eNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Preeklamsia”**. Tesis ini disusun sebagai syarat kelulusan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Dengan terselesaikannya tesis ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.si.Med, Sp.A(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya yang telah memberikan izin, fasilitas dan berbagai kebijakan selama menempuh pembelajaran di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K), selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sekaligus penguji 1.
4. Dr. dr. Retty Ratnawati, MSc. selaku dosen pembimbing pertama yang selama ini telah memberikan pengarahan serta senantiasa memberikan bimbingan sehingga terselesaikannya penulisan tesis ini.



5. Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K) selaku dosen pembimbing kedua yang dengan sabar dan selalu memberikan semangat membimbing penyusunan hingga terselesaikannya tesis ini.

6. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes. selaku penguji 2 yang telah banyak memberi masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.

7. Suami (dr. Aditya Satriya Nugraha, M.Biomed), ibunda (Hj. Sri Hidayati, S.Pd.I) dan ayahanda (H. Untung Miseran) dan anak tercinta Aldian AUFAR Nugraha, serta kakak Praretno Wibowo, S.Kom dan Rifqi Sasmita Hadi, S.E., MM. atas segala bantuan, pengertian, dukungan dan kasih sayangnya.

8. Teman – teman satu kelompok penelitian, Yulia Silvani, Alfima Rahasti, Agnestia Naning, Dwi Norma dan Wenny Rahmawati atas semangat, bantuan, saran, masukan dan kerjasamanya selama penelitian ini.

9. Para laboran dari laboratorium Biosains UB, laboratorium Ilmu Faal dan laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB.

10. Teman teman angkatan 2017 khususnya sahabat-sahabat yang saling menyemangati satu sama lain.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri atas segala saran dan kritik yang membangun, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2019

Penulis

## RINGKASAN

### Afniari Maharani

Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Kadar Glutation (GSH) dan Kadar *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Preeklamsia, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, Anggota: Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K)

Preeklamsia adalah penyakit hipertensi persisten disertai dengan tanda tekanan darah tinggi dan proteinuria yang muncul pada trimester kedua kehamilan. Preeklamsia terjadi karena penurunan perfusi organ sehingga terjadi hipoksia dan iskemia plasenta. Iskemia plasenta akan meningkatkan radikal bebas. Di dalam tubuh terdapat pertahanan antioksidan untuk menangkal radikal bebas. Ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan akan menyebabkan stres oksidatif.

Salah satu antioksidan dalam tubuh yang menetralkan radikal bebas adalah glutathione. Glutathione akan bereaksi dengan hidrogen peroksida dan mengubahnya ke dalam bentuk non radikal. Pada preeklamsia kadar GSH menurun dikarenakan tingginya radikal bebas. Selain itu, keadaan stres oksidatif akan menyebabkan disfungsi endotel yang akan meningkatkan pengeluaran sFlt-1. sFlt-1 merupakan inhibitor endogen dari VEGF dan PlGF sehingga ikatan antara VEGFR1 dan VEGF atau PlGF menurun. Pada keadaan normal ikatan VEGFR1 dan VEGF atau PlGF akan meningkatkan fosforilasi VEGFR2. VEGFR2 terlibat dalam pembentukan *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) melalui aktivasi PLC- $\gamma$  dan PI3K. Pada preeklamsia proses ini terhambat sehingga berdampak pada penurunan eNOS. Penurunan eNOS akan menurunkan sintesis Nitric Oxide (NO) yang berperan sebagai vasodilator sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan darah.

*Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) adalah minyak zaitun dengan kualitas terbaik yang mempunyai kandungan antioksidan tinggi berupa polifenol. Mekanisme kerja polifenol sebagai antioksidan dengan menghambat NADPH Oksidase dalam membentuk radikal bebas ( $O_2^{\cdot -}$  dan  $H_2O_2$ ). EVOO juga berperan dalam sintesis GSH melalui aktivasi *nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2* (Nrf2) dan sintesis eNOS melalui aktivasi VEGFR2.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap kadar GSH dan Kadar eNOS pada tikus model preeklamsia. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group design* menggunakan 20 ekor tikus bunting yang dibagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok kontrol negatif (Tidak diberikan EVOO dan L-NAME), Kelompok kontrol positif (Injeksi L-NAME), Kelompok D1 (Diberikan EVOO 0.5 mL/hari dan injeksi L-NAME), Kelompok D2 (Diberikan EVOO 1 mL/hari dan injeksi L-NAME), kelompok D3 (Diberikan EVOO 2 mL/hari dan injeksi L-NAME)

EVOO berpengaruh signifikan terhadap peningkatan kadar GSH pada pemberian 2 mL/hari ( $p$ -value = 0.000). EVOO sebagai antioksidan eksogen yang dapat menangkal radikal bebas dengan cara menghambat NADPH oksidase. Komponen polifenol EVOO dapat menggantikan peran GSH sebagai *scavenger* hidrogen peroksida. Selain itu *hydroxytyrosol* dapat meningkatkan sintesis GSH melalui aktivasi Nrf2. Nrf2 menginduksi ekspresi gen penyusun GSH yaitu *gamma-glutamylcysteine ligase* (GCL) sehingga kadar GSH meningkat.

EVOO berpengaruh signifikan meningkatkan kadar eNOS pada dosis 0.5 mL/hari ( $p$ -value = 0.014), 1 mL/hari ( $p$ -value = 0.001) dan 2 mL/hari ( $p$ -value = 0.024). Komponen fenol dan *hydroxyl-oleid acid* EVOO dapat memperbaiki kerusakan endotel vaskular. Perbaikan endotel vaskular akan menurunkan sFlt-1 sehingga ikatan antara VEGFR1/Flt-1 dan VEGF atau PlGF akan meningkatkan fosforilasi VEGFR2 yang akan meningkatkan pembentukan eNOS melalui jalur PKC dan PI3K. Selain itu efek *antiinflammatory* pada



EVOO akan menurunkan beberapa mediator inflamasi seperti TNF alfa dan CRP sehingga ROS menurun dan pembentukan eNOS tidak terhambat.

EVOO dapat meningkatkan kadar GSH dan Kadar eNOS pada tikus model preeklamsia.



## SUMMARY

**Afniari Maharani**

Effect of Extra Virgin Olive Oil (EVOO) on Glutathione (GSH) Level and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Level on Preeclampsia Rat (*Rattus norvegicus*) Model, Master Program in Midwifery, Universitas Brawijaya. Chair of Supervisory Commission: Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, Member: Dr. dr. I Wayan Arsanana Wiyasa, SpOG(K)

Preeclampsia is persistent hypertension accompanied by signs of high blood pressure and proteinuria that appear in the second trimester of pregnancy. Preeclampsia occurs because of decreased organ perfusion resulting in hypoxia and placental ischemia. Placental ischemia will increase free radicals. There is an antioxidant defense to counteract free radicals. An imbalance between the amount of free radicals and antioxidants will cause oxidative stress.

One of the antioxidants that neutralize free radicals is glutathione. Glutathione will react with hydrogen peroxide and convert it into a non-radical form. In preeclampsia GSH levels decrease due to high free radicals. The condition of oxidative stress will cause endothelial dysfunction which will increase sFlt-1. sFlt-1 is an endogenous inhibitor of VEGF and PlGF so that the bond between VEGFR1 and VEGF or PlGF decreases. Under normal conditions VEGFR1 and VEGF or PlGF will increase VEGFR2 phosphorylation. VEGFR2 is involved in the formation of *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) through activation of PLC- $\gamma$  and PI3K. In preeclampsia this process is hampered, resulting in a decrease in eNOS. Decreasing eNOS will reduce the synthesis of Nitric Oxide (NO) which acts as a vasodilator which causes an increase in blood pressure.

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) is olive oil with best quality that has high antioxidant content that is polyphenols. The mechanism of polyphenols as antioxidants is by inhibiting NADPH Oxidase in forming free radicals ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ). EVOO also plays a role in GSH synthesis through activation of *nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2* (Nrf2) and eNOS synthesis through activation of VEGFR2.

This study aims to determine the effect of Extra Virgin Olive Oil (EVOO) on GSH levels and eNOS levels in preeclampsia rat model. This study was an experimental study with a post test only control group design using 20 pregnant rats divided into 5 groups. Negative control group (Not given EVOO and L-NAME), Positive control group (Injection L-NAME), Group D1 (Given EVOO 0.5 mL / day and injection of L-NAME), Group D2 (Given EVOO 1 mL / day and injection L-NAME), D3 group (Given EVOO 2 mL / day and injection L-NAME).

EVOO has a significant effect on increasing GSH levels at 2 mL / day ( $p$ -value = 0.000). EVOO as an exogenous antioxidant which can counteract free radicals by inhibiting NADPH oxidase. Polyphenol component of EVOO can replace the role of GSH as a hydrogen peroxide scavenger. In addition, hydroxytyrosol can increase GSH synthesis through activation of nuclear factor (erythroid-derived-2) -like 2 (Nrf2). Nrf2 induces the expression of GSH constituent gene, gamma-glutamylcysteine ligase (GCL) so that GSH levels increase.

EVOO has a significant effect on increasing the level of eNOS. The content at administration is 0.5 mL / day, 1 mL / day and 2 mL / day ( $p$ -value = 0.014,  $p$ -value = 0.001,  $p$ -value = 0.024). Phenol and hydroxyl-oleid acid components of EVOO can repair vascular endothelial damage. Vascular endothelial repair will reduce sFlt1 so that the bonds between VEGFR1/Flt-1 and VEGF or PLGF will increase the phosphorylation of VEGFR2 which will increase the formation of eNOS through the PKC and PI3K pathways.



In addition, the antiinflammatory effect on EVOO will reduce some inflammatory mediators such as TNF alpha and CRP so that ROS decreases and the formation of eNOS is not inhibited.

EVOO can increase GSH levels and eNOS levels in preeclampsia rat 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                                        |       |
| 1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....                            | 5     |
| 1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....                          | 5     |
| 1.3 Tujuan                                                 |       |
| 1.3.1 Tujuan Umum.....                                     | 6     |
| 1.3.2 Tujuan Khusus.....                                   | 6     |
| 1.4 Manfaat .....                                          | 6     |
| 1.4.1 Manfaat Akademik.....                                | 6     |
| 1.4.2 Manfaat Praktis.....                                 | 7     |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA                                     |       |
| 2.1 Preeklamsia                                            |       |
| 2.1.1 Definisi Preeklamsia .....                           | 8     |
| 2.1.2 Diagnosis Preeklamsia .....                          | 9     |
| 2.1.3 Klasifikasi Hipertensi Dalam Kehamilan.....          | 10    |
| 2.1.4 Patofisiologi Preeklamsia.....                       | 11    |
| 2.2 Radikal Bebas                                          |       |
| 2.2.1 Pengertian Radikal Bebas.....                        | 21    |
| 2.2.2 Reaksi Umum.....                                     | 22    |
| 2.2.3 Sumber Radikal Bebas.....                            | 24    |
| 2.3 Stres Oksidatif .....                                  | 26    |
| 2.4 Antioksidan.....                                       | 27    |
| 2.4.1 Antioksidan Enzimatik .....                          | 28    |
| 2.4.2 Antioksidan Non Enzimatik.....                       | 28    |
| 2.5 <i>Extra Virgin Olive Oil (EVOO)</i>                   |       |
| 2.5.1 Klasifikasi <i>Olive Oil</i> .....                   | 30    |
| 2.5.2 Kandungan <i>Extra Virgin Olive Oil (EVOO)</i> ..... | 31    |
| 2.5.3 Mekanisme EVOO Sebagai Antioksidan .....             | 32    |
| 2.5.4 Dosis <i>Olive Oil</i> .....                         | 34    |



|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6 Glutation (GSH) .....                                              | 35 |
| 2.7 <i>Endothelial nitric-oxide synthase</i> (eNOS) .....              | 38 |
| 2.8 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Galur Wistar .....              |    |
| 2.8.1 Klasifikasi Tikus Wistar.....                                    | 40 |
| 2.8.2 Siklus Estrus Tikus Wistar.....                                  | 41 |
| 2.8.3 Proses Sinkronisasi pada Fase Estrus .....                       | 42 |
| 2.9 L-NAME.....                                                        | 43 |
| <b>BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN</b>                      |    |
| 3.1. Kerangka Teori.....                                               | 45 |
| 3.2. Keterangan Kerangka Teori.....                                    | 46 |
| 3.3. Kerangka Konsep.....                                              | 49 |
| 3.4. Keterangan kerangka konsep.....                                   | 50 |
| 3.5. Hipotesis Penelitian .....                                        |    |
| 3.5.1 Hipotesis Umum .....                                             | 51 |
| 3.5.2 Hipotesis Khusus.....                                            | 51 |
| <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>                                         |    |
| 4.1 Jenis dan Desain Penelitian .....                                  | 52 |
| 4.2 Populasi Penelitian, Teknik Pengambilan dan Replikasi Sampel ..... |    |
| 4.2.1 Populasi Penelitian.....                                         | 52 |
| 4.2.2 Besar Replikasi.....                                             | 52 |
| 4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi .....                              | 53 |
| 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....                                  | 54 |
| 4.4 Bahan dan Alat Penelitian .....                                    |    |
| 4.4.1 Bahan Penelitian .....                                           |    |
| 4.4.1.1 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba .....                         | 54 |
| 4.4.1.2 Bahan untuk Pemeriksaan Kadar GSH.....                         | 55 |
| 4.4.1.3 Bahan untuk Pemeriksaan eNOS .....                             | 55 |
| 4.4.2 Alat Penelitian .....                                            |    |
| 4.4.2.1 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba .....                       | 56 |
| 4.4.2.2 Alat untuk Perlakuan Hewan Coba .....                          | 56 |
| 4.4.2.3 Alat untuk Pembedahan hewan coba.....                          | 56 |
| 4.4.2.4 Alat untuk Pemeriksaan Kadar GSH .....                         | 56 |
| 4.4.2.5 Alat untuk Pemeriksaan eNOS .....                              | 57 |
| 4.5 Variabel Penelitian .....                                          |    |
| 4.5.1 Variabel Bebas .....                                             | 57 |
| 4.5.2 Variabel Tergantung .....                                        | 57 |
| 4.6 Definisi Operasional .....                                         | 57 |
| 4.7 Prosedur Penelitian .....                                          |    |
| 4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba.....                            | 58 |
| 4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba.....                            | 58 |
| 4.7.3 Prosedur Pembuatan Tikus Bunting Model Preeklamsia .....         | 59 |
| dengan L-NAME .....                                                    | 59 |
| 4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Tekanan Darah .....                         | 60 |
| 4.7.5 Prosedur Pengukuran Protein Urin .....                           | 61 |
| 4.7.6 Prosedur Perhitungan Dosis EVOO .....                            | 61 |
| 4.7.7 Prosedur pemberian EVOO pada Tikus.....                          | 62 |
| 4.7.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Bahan .....                  |    |
| Pemeriksaan .....                                                      | 62 |
| 4.7.9 Prosedur Perlakuan setelah Penelitian Terhadap .....             |    |
| Hewan Coba .....                                                       | 63 |
| 4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar GSH.....                              | 63 |



|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.11 Prosedur Pengukuran Kadar eNOS .....                                                                                                                         | 64  |
| 4.8 Alur Penelitian .....                                                                                                                                           | 65  |
| 4.9 Teknik Analisis Data .....                                                                                                                                      | 66  |
| <b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA</b>                                                                                                                      |     |
| 5.1 Gambaran Umum Penelitian .....                                                                                                                                  | 67  |
| 5.1.1 Gambaran Umum Hewan Coba .....                                                                                                                                | 67  |
| 5.2 Hasil Pengukuran Tanda Klinis Preeklamsia .....                                                                                                                 | 68  |
| 5.3 Hasil Pengukuran Kadar GSH dan Kadar eNOS Plasenta .....                                                                                                        | 70  |
| 5.4 Hasil Analisis Kadar GSH dan Kadar eNOS Plasenta                                                                                                                |     |
| 5.4.1 Hasil Uji Normalitas Data .....                                                                                                                               | 71  |
| 5.4.2 Hasil Uji Homogenitas Data .....                                                                                                                              | 71  |
| 5.4.3 Hasil Uji One Way Anova Dan Multiple Comparison                                                                                                               |     |
| 5.4.3.1 Hasil Uji Kadar GSH .....                                                                                                                                   | 72  |
| 5.4.3.2 Hasil Uji Kadar eNOS .....                                                                                                                                  | 73  |
| 5.4.4 Hasil Uji Korelasi .....                                                                                                                                      | 75  |
| <b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>                                                                                                                                             |     |
| 6.1 Peningkatan Tekanan Darah pada Tikus Model Preeklamsia .....                                                                                                    | 76  |
| 6.2 Kadar GSH Plasenta pada Tikus Model Preeklamsia .....                                                                                                           | 76  |
| 6.3 Kadar eNOS Plasenta pada Tikus Model Preeklamsia .....                                                                                                          | 78  |
| 6.4 Pengaruh pemberian <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO) terhadap kadar Glutation (GSH) pada tikus yang model preeklamsia .....                                  | 80  |
| 6.5 Pengaruh pemberian <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO) terhadap Kadar <i>endothelial Nitric Oxide Shynthase</i> (eNOS) pada tikus yang model preeklamsia ..... | 82  |
| 6.6 Keterbatasan Penelitian .....                                                                                                                                   | 84  |
| 6.7 Implikasi Pada Asuhan Kebidanan .....                                                                                                                           | 84  |
| <b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>                                                                                                                                   |     |
| 7.1 Kesimpulan .....                                                                                                                                                | 85  |
| 7.2 Saran .....                                                                                                                                                     | 85  |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....                                                                                                                                         | 86  |
| <b>LAMPIRAN</b> .....                                                                                                                                               | 94  |
| <b>RIWAYAT HIDUP</b> .....                                                                                                                                          | 113 |



## DAFTAR TABEL

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Tekanan Darah Dan Protein Urin Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil .....     | 68 |
| Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi GSH dan Konsentrasi eNOS Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil ... | 70 |
| Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas <i>Sapiro Wilk</i> .....                                                                                   | 71 |
| Tabel 5.4 Hasil Uji Homogenitas <i>Varian Lavene Statistic</i> .....                                                                      | 71 |
| Tabel 5.5 Pengaruh EVOO terhadap penurunan Kadar GSH Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil .....          | 72 |
| Tabel 5.6 Hasil Uji <i>Multiple Comparison</i> Pos Hoc LSD Kadar GSH .....                                                                | 73 |
| Tabel 5.7 Pengaruh EVOO Terhadap Penurunan Kadar Enos Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil .....         | 74 |
| Tabel 5.8 Hasil Uji <i>Multiple Comparison</i> Pos Hoc LSD Pada Kadar eNOS .....                                                          | 74 |
| Tabel 5.9 Hasil Uji Korelasi .....                                                                                                        | 75 |



## DAFTAR GAMBAR

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 2.1 Tahap perkembangan preeklamsia.....                                     | 12 |
| Gambar 2.2 Perubahan mekanisme signalling NO pada Preeklamsia .....                | 16 |
| Gambar 2.3 Skema proses di sel endotel dan sel otot polos pada Preeklamsia .....   | 20 |
| Gambar 2.4 Struktur dari Komponen Fenol pada olive oil .....                       | 31 |
| Gambar 2.5 Kandungan Komponen Fenolik pada EVOO .....                              | 31 |
| Gambar 2.6 Mekanisme antioksidan OP pada EVOO.....                                 | 32 |
| Gambar 2.7 Peran OP (Olive Phenols) Dalam Tubuh Manusia.....                       | 33 |
| Gambar 2.8 Pembentukan GSH melalui aktivasi Nrf2 oleh TPF dan hydroxytyrosol ..... | 34 |
| Gambar 2.9 Ikatan VEGFR1 dan VEGFR2 pada Vaskulogenesis atau angiogenesis .....    | 39 |
| Gambar 3.1 Kerangka teori.....                                                     | 45 |
| Gambar 3.2 Kerangka konsep .....                                                   | 49 |
| Gambar 4.1 Alat Pengukur Tekanan Darah Tikus.....                                  | 60 |
| Gambar 4.2 Kandang Metabolik .....                                                 | 61 |
| Gambar 4.3 Alur Penelitian.....                                                    | 65 |



## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik.....    | 94  |
| Lampiran 2 Surat Keterangan sertifikat Tikus..... | 95  |
| Lampiran 3 Surat Hasil Uji Antioksidan IC50.....  | 96  |
| Lampiran 4 Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....   | 97  |
| Lampiran 5 Bukti Accepted Jurnal.....             | 98  |
| Lampiran 6 Publikasi Jurnal.....                  | 99  |
| Lampiran 7 Hasil Pengukuran.....                  | 100 |
| Lampiran 8 Data Hasil Analisis.....               | 102 |
| Lampiran 9 Proses Pembuntingan Tikus.....         | 112 |



## DAFTAR SINGKATAN

|                               |                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| ADMA                          | : Asymmetric Dimethylarginin                  |
| Ang II                        | : Angiotensin II                              |
| AP-1                          | : Activator Protein 1                         |
| AT1-AA                        | : Angiotensin II Type 1-Receptor Autoantibody |
| BH4                           | : (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin         |
| cGMP                          | : Cyclic Guanosine Monophosphate              |
| COMT                          | : Catechol O-Methyltransferase                |
| CSE                           | : Cystathionine- $\gamma$ -lyase              |
| Cu                            | : Cuprum                                      |
| DAMP                          | : Damage Associated Molecular Patterns        |
| DNA                           | : Deoxyribonucleic Acid                       |
| eNOS                          | : Endothelial Nitric Oxide Synthase           |
| EDH                           | : Hyperpolarization Endotelium                |
| EDFRs                         | : Endothelium Derived Relaxing Factors        |
| EDCFs                         | : Endothelium Derived Contracting Factors     |
| ET-1                          | : Endothelin-1                                |
| EVOO                          | : Extra Virgin Olive Oil                      |
| EVTAS                         | : Extra Villous Cythrophoblast                |
| Flt-1                         | : Fms-Like Tyrosine Kinase-1                  |
| GPx                           | : Glutation Peroksidase                       |
| GCL                           | : Glutamate Cysteine Ligase                   |
| GSH                           | : Glutation                                   |
| GSSG                          | : Glutation Disulfida                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrogen Peroksida                          |
| H <sub>2</sub> S              | : Hidrogen Sulfat                             |



HDK : Hipertensi Dalam Kehamilan

HELLP : Hemolysis Elevated Liver Enzyme Levels And Low Platelet Levels

HIF1 : Hipoxia Inducible Factor 1

HIF1 $\alpha$  : Hipoxia Inducible Factor 1 $\alpha$

iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase

IUGR : Intra Uterine Growth Retardation

L-NAME : L-Nitro-Arginine Methyl Ester

LH : Luteinizing Hormon

MCP-1 : Monocyte Chemo Attractant Protein-1

MPs : Micro Particles

mRNA : Messenger RNA

MUFA : Monounsaturated Fatty Acids

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NF $\kappa$ B : Nuclear Factor Kappa B

nNOS : Neuronal Nitric Oxide Synthase

NO : Nitric Oxide

NOS : Nitric Oxide Synthase

NOX2 : NADPH Oxidase 2

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Superoksida

OP : Oil Phenols

OH<sup>•</sup> : Radikal Hidroksil

ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite

Ox-LDL : LDL Teroksidasi

PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase

PKC : Protein Kinase C

PLC-gamma : Phospholipase C Gamma

PIGF : Placental Growth Factor



RNA : Ribonucleic Acid

RNS : Reactive Nitrogen Species

ROS : Reactive Oxygen Species

ROO<sup>•</sup> : Radikal Peroksil

Se : Selenium

SENG : Soluble Endoglin

sFlt-1 : Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1

SOD : Superoxide Dismutase

STBMs : Syncytiotrophoblast Microparticles

TGF $\beta$  : Tumor Growth Factor  $\beta$

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

XO : Xantine Oxidase

Zn : Seng



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Preeklamsia adalah sindrom khusus kehamilan yang terjadi pada sistem organ karena terjadi penurunan perfusi organ akibat aktivasi endotel dan vasospasme. Preeklamsia adalah penyakit hipertensi persisten disertai dengan tanda tekanan darah tinggi dan proteinuria yang muncul pada trimester kedua kehamilan (Cunningham, 2013; Aouache *et al.*, 2018).

Angka kejadian hipertensi pada kehamilan adalah sekitar 10%. Yang termasuk dalam hipertensi pada kehamilan antara lain preeklamsia, eklamsia, hipertensi gestasional dan hipertensi kronis. Preeklamsia adalah kelainan spesifik pada kehamilan yang mempunyai prevalensi sekitar 5-8% di dunia dan preeklamsia merupakan penyebab utama mortalitas dan morbiditas ibu dan bayi yaitu terjadi 50.000-60.000 kematian setiap tahunnya di seluruh dunia. Preeklamsia merupakan komplikasi multisistem yang biasa terjadi pada kehamilan dan insidennya mencapai 5 – 10%. Preeklamsia menjadi penyebab utama mortalitas maternal karena menyebabkan terjadinya komplikasi organ, eklamsia, dan gangguan vaskuler *cerebral* pada ibu serta menyebabkan gangguan pada bayi yang dilahirkan, seperti IUGR, prematuritas, dan lahir mati/*stillbirth* (WHO, 2011; Gathiram dan Moodley, 2016; USPSTF, 2017; Black dan Horowitz, 2018).

Berdasarkan Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia (SDKI) pada tahun 2012, angka kematian ibu adalah sebesar 359 per 100.000 kelahiran hidup dan pada tahun 2015 menurun menjadi 305 per 100.000 kelahiran hidup. Penyebab kematian ibu masih didominasi oleh perdarahan, hipertensi dalam kehamilan



(HDK) dan infeksi. Berdasarkan profil kesehatan provinsi Jawa Timur tahun 2015, angka kematian Ibu di Jawa Timur adalah sebesar 89,6 per 100.000 kelahiran hidup. Angka ini masih tinggi, walaupun memang mengalami penurunan dibandingkan dengan tahun 2014 yang mencapai 93,52 per 100.000 kelahiran hidup. Dari data didapatkan penyebab tertinggi kematian ibu pada tahun 2015 adalah eklamsia dan preeklamsia sebesar 31% (Kemenkes RI, 2014; Dinkes Jawa Timur, 2015; Kemenkes RI, 2017).

Mekanisme terjadinya preeklamsia secara pasti hingga saat ini masih belum diketahui. Ada beberapa faktor yang diduga kuat menjadi penyebab terjadinya preeklamsia, antara lain: variasi genetik abnormal, kelainan pada trofoblas, mekanisme pertahanan dari sistem imun dan gangguan pada sel endotel. Beberapa faktor yang mungkin berkaitan dengan perkembangan preeklamsia adalah stres oksidatif, inflamasi, dan variasi genetik. Sedangkan menurut patofisiologi preeklamsia dipengaruhi oleh gangguan perfusi uteroplasental, stres oksidatif, gangguan pada nitric oxide *pathway*, perubahan keseimbangan antara faktor angiogenik dan antiangiogenik, peroksidasi lipid, faktor inflamasi karena plasentasi yang buruk, Fragmen dan mikropartikel plasenta karena banyaknya kematian sel, autoantibodi, faktor genetik dan faktor imunologis (Sanjay dan Girija 2014; Gathiram dan Moodley, 2016; Peng *et al.*, 2016).

Stres oksidatif mempunyai peranan penting pada patofisiologi preeklamsia. Stres oksidatif terjadi karena adanya gangguan keseimbangan antara ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan antioksidan di dalam tubuh. ROS merupakan jenis radikal bebas yang mempunyai elektron tidak berpasangan, contohnya adalah superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ). Sedangkan contoh dari antioksidan adalah glutathion peroksidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), Catalase, Vitamin C dan E, dan  $\beta$ -carotene yang berperan penting dalam menangkal radikal bebas. Pada kehamilan, jumlah



radikal bebas dan antioksidan dalam keadaan seimbang. Sedangkan ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dan antioksidan dapat menyebabkan preeklamsia (Peng *et al.*, 2016).

Pada penderita preeklamsia terjadi beberapa perubahan di dalam pembuluh darah, salah satunya adalah perubahan pada aktivitas *Nitric Oxide* (NO). NO adalah salah satu molekul yang memiliki sifat protektif pada pembuluh darah. Substansi utama yang berperan dalam proses pembentukan NO di pembuluh darah adalah *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS). Fungsi dari eNOS adalah mengoksidasi L-arginine menjadi NO. Fungsi normal dari eNOS, membutuhkan proses dimerisasi antara L-arginine, dan kofaktor esensial (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4). Pada preeklamsia terjadi disfungsi endotel yang dapat dilihat dari proses *signaling* NO. NO mempunyai peranan penting pada *remodelling* dari *uterine vascular*. Defisiensi NO berkorelasi dengan gangguan metabolic pada preeklamsia seperti hipertensi, proteinuria dan disfungsi platelet. Gangguan ini menyebabkan perubahan pada uteroplasenta seperti penurunan diameter arteri uterina, panjang arteri spiralis dan aliran darah uteroplasenta. Hal ini menandakan bahwa sistem NOS memainkan peranan penting pada *remodelling* arteri spiralis pada kehamilan (Förstermann dan Münzel, 2006; Phipps, 2016; Osol *et al.*, 2017).

Pada preeklamsia, terjadi penurunan jumlah NO disebabkan karena peningkatan jumlah dari *asymmetric dimethylarginin* (ADMA). ADMA berfungsi sebagai inhibitor endogen NO yang meningkatkan resistensi vaskuler sistemik pada manusia sehingga menyebabkan peningkatan tekanan darah pada pasien preeklamsia. Penyebab lain dari menurunnya jumlah NO adalah penurunan dari ekspresi eNOS. Pada kehamilan normal terjadi peningkatan aktifitas dan ekspresi dari eNOS sedangkan pada preeklamsia terjadi penurunan ekspresi eNOS pada pembuluh darah (Osol *et al.*, 2017).



Secara fisiologis, di dalam tubuh manusia terdapat sistem pertahanan tubuh pada pereklamsia, salah satunya pertahanan untuk menangkal dan melawan radikal bebas yaitu antioksidan. Antioksidan dapat dibedakan menjadi antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Sebagian besar antioksidan enzimatis bekerja pada mitokondria dan sitoplasma secara intraseluler. Antioksidan enzimatis contohnya antara lain *superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GPx). Sedangkan yang termasuk antioksidan non enzimatis dapat dibagi menjadi dua, yaitu antioksidan non enzimatis endogen, dan non enzimatis eksogen. Contoh antioksidan non enzimatis endogen adalah glutathion (GSH), meskipun bukan merupakan enzim, namun keberadaannya merupakan kosubstrat bagi enzim glutathion peroksidase. GSH berperan penting untuk pertahanan seluler terhadap ROS. GSH bereaksi secara langsung dengan radikal-radikal dalam reaksi-reaksi enzimatis dan donor elektron dalam reduksi peroksida yang dikatalisis oleh GPx (Sunarno, 2009).

Contoh antioksidan enzimatis eksogen adalah vitamin C, E, A, beta karoten, isoflavon, dan flavonoid. Selain itu, ada juga antioksidan enzimatis eksogen yang disebut polifenol, salah satu contohnya adalah berasal dari *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) (Winarsi, 2011; Nocella *et al.*, 2018).

EVOO berperan sebagai antioksidan dengan cara menghambat *NADPH Oksidase* (NOX2). NOX2 memproduksi atau menghasilkan radikal bebas paling banyak dalam tubuh sedangkan  $H_2O_2$  adalah oksidan yang berperan besar dalam stres oksidatif melalui jalur aktivasi NOX2. EVOO akan berperan sebagai scavenger dari radikal bebas tersebut. Akan tetapi menurut Weinbrenner, Covas dan Bogani dalam Calabriso *et al.*, (2015), pada penelitiannya ditemukan hasil yang kontradiktif yaitu konsumsi dari EVOO dengan kadar fenol tinggi meningkatkan disfungsi endotel. Dari penelitian Tenório *et al.* (2018) didapatkan hasil bahwa pemberian antioksidan, salah satunya dari resveratrol (polifenol yang



ada pada tumbuhan) tidak berpengaruh terhadap pencegahan preeklamsia, namun tetap memberikan efek dengan mencegah terjadinya IUGR. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Keita et al, diemukan bahwa konsumsi EVOO jangka panjang pada tikus (20 minggu) akan mempertahankan dan menjaga fungsi endotel, akan tetapi dapat meningkatkan obesitas dan resistensi insulin (Keita et al., 2013; Calabriso et al., 2015; Carnevale et al., 2018).

Berdasarkan fakta – fakta diatas, maka perlu diadakan penelitian tentang pengaruh pemberian EVOO terhadap kadar GSH dan eNOS pada tikus model preeklamsia.

## 1.2 Rumusan Masalah

### 1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar glutation (GSH) dan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia?

### 1.2.2 Rumusan masalah Khusus

1. Apakah ada perbedaan kadar glutation (GSH) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal?
2. Apakah ada perbedaan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal?
3. Apakah *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar glutation (GSH) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia?
4. Apakah *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia?



### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar glutathion (GSH) dan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ada perbedaan kadar glutathion (GSH) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
2. Membuktikan ada perbedaan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
3. Membuktikan *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar glutathion (GSH) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.
4. Membuktikan *extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.

### 1.4 Manfaat

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Menambah wawasan mengenai *extra virgin olive oil* (EVOO) sebagai antioksidan yang berpengaruh terhadap kadar glutathion (GSH) dan *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.
2. Meningkatkan perkembangan ilmu kebidanan tentang manfaat pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) pada masa kehamilan dengan preeklamsia khususnya di program studi S2 kebidanan Universitas Brawijaya.



### 1.4.2 Manfaat Praktis

Menambah nilai guna dari *extra virgin olive oil* (EVOO) sebagai antioksidan untuk radikal bebas pada masa kehamilan dengan preeklamsia.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Preeklamsia

##### 2.1.1 Definisi Preeklamsia

Preeklamsia adalah sindroma klinis yang ditandai dengan adanya hipertensi dan proteinuria saat usia kehamilan diatas 20 minggu. Preeklamsia adalah sindrom pada kehamilan yang dapat mengenai sistem organ akibat terjadi penurunan perfusi organ akibat aktivasi endotel dan vasospasme. Preeklamsia terjadi pada 3-5% kehamilan dan menjadi penyebab tertinggi kematian maternal terutama di negara berkembang. Preeklamsia adalah kelainan spesifik pada kehamilan yang mempunyai prevalensi sekitar 5-8% di dunia. Preeklamsia merupakan penyebab utama mortalitas dan morbiditas ibu dan bayi yaitu terjadi 50.000 - 60.000 kematian setiap tahunnya di seluruh dunia (Berg *et al.*, 2009 Cuningham *et al.*, 2013; Gathiram dan Moodley, 2016).

Menurut Black dan Horowitz (2018), preeklamsia merupakan komplikasi multisistem yang biasa terjadi pada kehamilan dan insidennya mencapai 5 – 10% di dunia. Menurut Aouache (2018), preeklamsia adalah penyakit hipertensi persisten disertai dengan tanda tekanan darah tinggi dan proteinuria yang muncul pada trimester kedua kehamilan. Preeklamsia adalah penyakit yang ditandai dengan perlekatan plasenta yang tidak adekuat karena gangguan invasi trofoblas pada arteri spiralis yang menyebabkan terjadinya hipoksia plasenta, peningkatan sekresi sitokin proinflamasi dan pelepasan faktor angiogenik dan antiangiogenik seperti sFlt-1, sENG, VEGF dan PlGF (Laresgoiti-Servitje *et al.*, 2012).



### 2.1.2 Diagnosis Preeklamsia

Diagnosis preeklamsia ditentukan secara klinis menurut *American college of obstetrics and gynecology* (ACOG) yaitu tekanan darah diatas 140/90 mmHg dalam dua kali pengukuran, ditambah dengan proteinuria diatas 300 mg per hari.

Edema sebagai tanda klasik penyakit ini sudah tidak lagi digunakan untuk menegaskan diagnosis karena rendahnya nilai sensitifitas dan spesifisitasnya.

Preeklamsia bisa menjadi eklamsia tanpa didahului dengan ditemukannya hipertensi dan proteinuria pada 20% kasus. Tes laboratorium seperti tes fungsi hati, pengukuran kuantitas protein urine, dan serum kreatinin bisa membantu mendeteksi derajat kerusakan organ, namun tidak spesifik untuk preeklamsia (Camille *et al.*, 2011).

Karakteristik preeklamsia adalah hipertensi yang baru timbul saat kehamilan dengan disertai tanda berikut (ACOG, 2013) :

1. Tekanan darah sistolik  $\geq 140$  mmHg atau tekanan darah diastolik  $\geq 90$  mmHg, diukur dalam 2 waktu dengan selisih 4 jam, terjadi pada usia kehamilan diatas 20 minggu pada wanita dengan tekanan darah normal sebelumnya.
2. Proteinuria  $> 0,3$  gram per 24 jam, rasio protein/kreatinin lebih besar sama dengan 0.3 atau  $\geq +1$  proteinuria, dideteksi dengan dipstik urin pada kehamilan diatas usia 20 minggu.

Apabila tidak ditemukan proteinuria, preeklamsia dapat terdiagnosis dengan adanya hipertensi disertai dengan :

1. Trombositopenia (jumlah platelet  $< 100.000/\mu\text{l}$ ).
2. Insufisiensi renal (konsentrasi serum kreatinin  $> 1.1$  mg/dl atau peningkatan 2 kali konsentrasi serum kreatinin tanpa disertai adanya *renal disease*).
3. Gangguan fungsi liver (peningkatan konsentrasi enzim transaminasse menjadi 2 kali konsentrasi normal).



#### 4. Odema paru

#### 5. Masalah penglihatan atau masalah pada otak.

### 2.1.3 Klasifikasi Hipertensi Dalam Kehamilan

Klasifikasi hipertensi dalam kehamilan menurut *The National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* pada tahun 2000 dalam Amanda dan Leslie (2012) yaitu :

#### 1. Hipertensi Kronis

Hipertensi kronis ditandai dengan tekanan darah  $\geq 140/90$  mmHg mulai sebelum hamil, sebelum usia kehamilan 20 minggu atau terjadi setelah postpartum hari ke 42. Frekuensi terjadinya sekitar 1% - 5% dari kehamilan.

#### 2. Hipertensi gestasional

Hipertensi yang terjadi di atas 20 minggu. Dapat disertai atau tanpa disertai protein urin, tetapi tidak disertai tanda preeklamsia yang lain, biasanya akan hilang setelah hari ke 42 postpartum. Frekuensi terjadinya sekitar 6%-7% dari kehamilan.

#### 3. Preeklamsia/Eklamsia

Hipertensi yang terjadi diatas usia kehamilan 20 minggu disertai protein urin  $> 300$  mg pada urin tampung selama 24 jam atau  $> 30$  mg/mmol pada sampel urin sesaat. Eklamsia adalah terjadinya kejang pada ibu hamil dengan preeklamsia. Frekuensi terjadinya sekitar 5%-7% dari kehamilan.

#### 4. *Superimposed* preeklamsia

*Superimposed* preeklamsia merupakan gejala preeklamsia pada ibu hamil yang mempunyai riwayat hipertensi kronis dan terjadi pada usia kehamilan diatas 20 minggu.

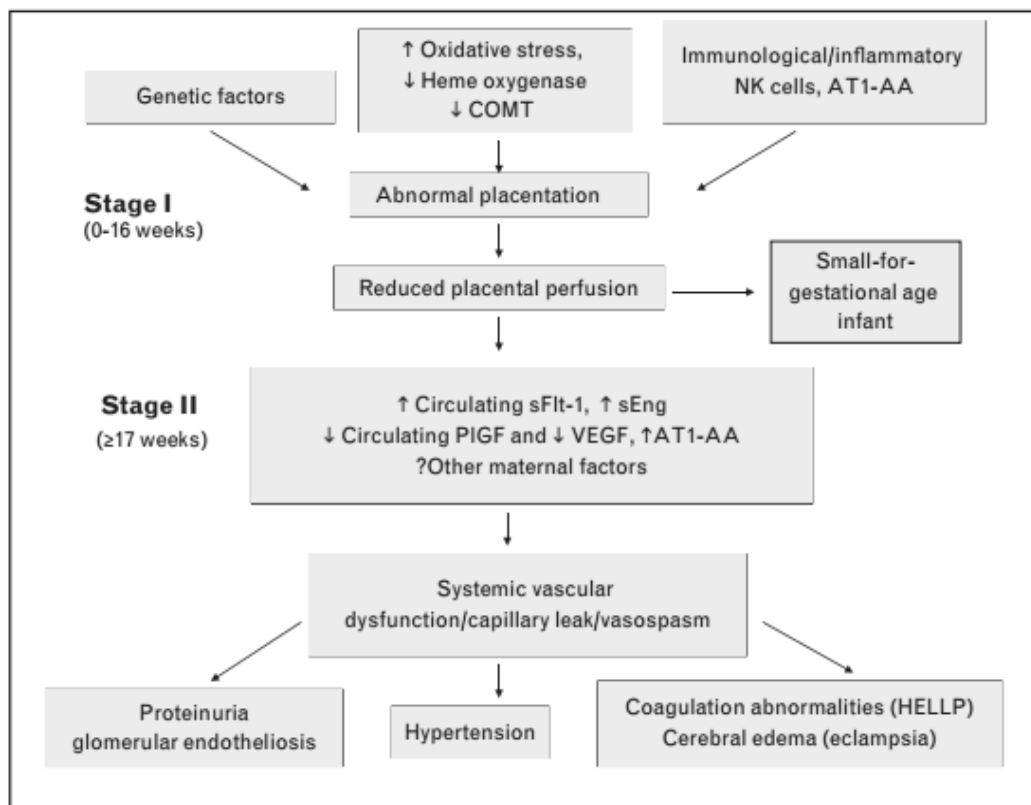


#### 2.1.4 Patofisiologi Preeklamsia

Penyebab preeklamsia dan eklamsia sampai sekarang belum diketahui secara pasti, namun telah banyak teori yang menjelaskan penyebab dari penyakit tersebut. Ada beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab terjadinya preeklamsia, diantaranya: variasi genetik abnormal, kelainan pada trofoblas, mekanisme pertahanan dari makrofag, gangguan pada sel NK dan sel endotel. Pada akhir – akhir ini ditemukan bahwa aktivitas proteolitik sel EVTAs (*Extra Villous Cytotrophoblast*) terlibat pada proses invasi desidua dan arteri spiralis (Gathiram dan Moodley, 2016).

Pada Gambar 2.1 menunjukkan bahwa preeklamsia terdiri dari dua tahap, tahap pertama yaitu pengeluaran faktor yang menyebabkan “*placental disease*”.

Tahap ini terjadi pada usia kehamilan 0 – 16 minggu dan diawali dengan etiologi berupa faktor genetik, peningkatan stres oksidatif, penurunan heme oksigenase, penurunan COMT (*Catechol O-methyltransferase*), serta adanya faktor imunologi atau inflamasi seperti NK sel dan AT1-AA. Beberapa hal tersebut menyebabkan terjadinya plasentasi abnormal sehingga terjadi penurunan perfusi plasenta. Tahap dua terjadi pada usia kehamilan lebih dari 17 minggu, dimulai dari meningkatnya sFlt-1, peningkatan sENG, penurunan PIGF dan VEGF, peningkatan AT1-AA dan beberapa faktor maternal lain. Beberapa hal ini menyebabkan terjadinya disfungsi sistemik vaskuler/vasospasme, proteinuria, *glomerular endotheliosis*, hipertensi dan koagulasi abnormal (HELLP) (Sircar M. *et al.*; 2015).



**Gambar 2.1 Tahap perkembangan preeklamsia**

Keterangan: Tahap 1 terjadi pada usia kehamilan 0-16 minggu dimulai dari munculnya faktor resiko seperti faktor genetik, peningkatan stres oksidatif dan adanya faktor imunologis yang menyebabkan terjadinya plasentasi abnormal sampai penurunan perfusi plasenta. Tahap 2 terjadi pada usia kehamilan  $\geq 17$  minggu dimulai dengan perubahan pada faktor angiogenesis dan antiangiogenesis dengan manifestasi proteinuria, hipertensi, eklamsia dan sindrom HELLP (Sircar M. *et al.*, 2015).

Dari beberapa penelitian dapat diketahui bahwa patofisiologi dari preeklamsia diantaranya :

#### 1. Patologi Uteroplasental

Pada awal kehamilan trofoblas mulai invasi menuju arteri spiralis maternal pada desidua, selanjutnya terjadi *remodelling* dari pembuluh darah menjadi lebih lebar, melunak untuk aliran darah menuju plasenta. Pada preeklamsia terjadi kegagalan *remodelling* arteri spiralis. Pada kehamilan normal invasi trofoblas pada miometrium dan desidua mengubah arteri muskuler dari bertekanan tinggi aliran rendah menjadi bertekanan rendah aliran tinggi yang



berfungsi untuk mengalirkan nutrisi ke plasenta dan janin. Hilangnya sel endotel dan lapisan otot dalam pembuluh darah menyebabkan stimulus vasomotor tidak sensitif. Pada preeklamsia, invasi trofoblas pada pembuluh darah uterus tidak lengkap dan menyebabkan aliran darah dan nutrisi terhambat sehingga menyebabkan hipoksia fetoplasental. Penyimpangan pada perfusi dan hemodinamik menyebabkan *acute atherosclerosis* dan plak *atherosclerosis* pada arteri spiralis yang gagal bermodifikasi. Faktor – faktor ini menyebabkan timbulnya sindrom maternal. Faktor plasenta ini diidentifikasi sebagai agen angiogenik, sitokin, peroksidasi lipid, auto antibodi, dan debris plasenta (Sanjay dan Girija, 2104; Siscar *et al.*, 2015).

Menurut Aoache (2018), ada beberapa kemajuan substansial yang telah ditemukan tentang patofisiologi preeklamsia. Preeklamsia berasal dari adanya defek implantasi plasenta pada dinding uterus ibu. Gangguan *remodelling* dari arteri spiralis pada uterus oleh *ekstravilus trofoblas* (EVT) memegang peranan untuk menurunkan perfusi plasenta. Konsekuensi dari gangguan aliran darah ini menyebabkan iskemia, yang pada akhirnya menjadikan lingkungan berkembang menjadi stres oksidatif. Kerusakan oksidatif pada plasenta menyebabkan inflamasi dan apoptosis, pengeluaran beberapa faktor antiangiogenik, seperti soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) dan soluble endoglin (sEng), sitokin dan antioksidan. Pemeriksaan histopatologis dari wanita dengan preeklamsia menunjukkan adanya kelainan berupa infark, atherosclerosis, trombosis, dan inflamasi kronis. Beberapa abnormalitas yang terlihat ini disebabkan karena hipertensi dan kerusakan endotel yang disebabkan oleh penyakit ini. Jadli (2015) mengatakan bahwa selama tahap/stase perkembangan plasenta pada kehamilan dengan preeklamsia, trofoblas menginvasi secara superfisial, sehingga menyebabkan hipoperfusi plasenta dan hipoksia. Pada saat ini diketahui



bahwa disfungsi endotel merupakan salah satu manifestasi dini dari penyakit kardiovaskuler, misalnya preeklamsia, hipertensi kronis, atherosclerosis, diabetes atau penyakit arteri coronaria (Salafia et al., 1995; Phipp, 2016).

## 2. Stres Oksidatif

Stres oksidatif terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Stres oksidatif melibatkan radikal bebas seperti superoksida ( $O_2^-$ ), Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ). Stres oksidatif dianggap mempunyai peranan yang penting pada patofisiologi preeklamsia. Plasenta berperan dalam pertumbuhan fetus dengan cara mensuplai semua kebutuhan dan mempertahankan lingkungan terbaik untuk fetus. Pada plasenta terjadi metabolisme seperti sintesis protein, transport aktif, dan pertumbuhan serta terjadi difusi pasif antara oksigen dan karbon dioksida. Metabolisme dan difusi ini menyebabkan adanya reaksi reduksi dan oksidasi yang dapat menghasilkan senyawa radikal bebas. Pada Preeklamsia diaktifkan neutrofil yang akan menghasilkan *reactive oxygen spesies* (ROS) atau radikal bebas melalui beberapa enzim yaitu NADPH oksidase, *xanthine oxidase* (XO) dan *uncoupled eNOS*. NADPH oksidase mengkatalis NADPH dan oksigen menjadi radikal bebas pada neutrofil dan sel endotel. Tingginya radikal bebas terutama radikal hidroksil akan merusak membran sel sehingga akan terjadi peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan merusak membran sel, nukleus dan sel endotel sehingga terjadi disfungsi endotel (Lyll & Beelfort, 2007; Matsubara et al., 2015; Yuslianti, 2018)

## 3. Nitric Oxide Pathway

Nitric oxide merupakan vasodilator poten yang berperan untuk menginduksi relaksasi otot polos pada pembuluh darah. Proses pembentukan NO yaitu melalui katalisis L-Arginin oleh *endotelial nitric oxide synthase* (eNOS). Defisiensi NO yang terjadi pada preeklamsia menyebabkan adanya



gangguan metabolik seperti hipertensi, proteinuria dan disfungsi platelet (Sangkaralingam, 2010; Phipp, 2016).

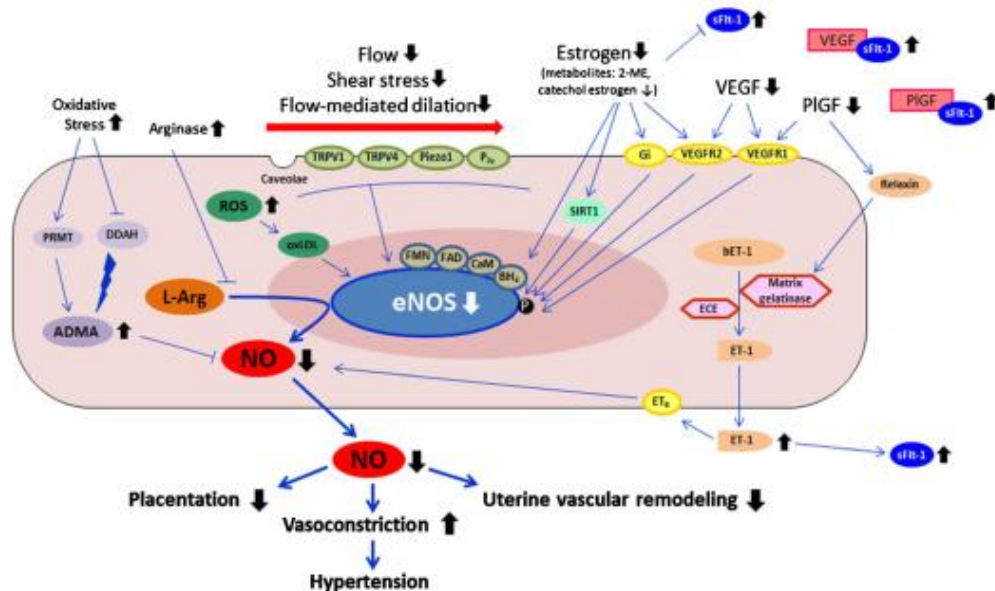
Perubahan NO pada preeklamsia dapat dilihat dari aktivitas eNOS dan fungsi vaskuler dari NO. Menurut Osol (2017) ada beberapa faktor yang berpengaruh atau berkontribusi terhadap *signaling* NO pada Preeklamsia, diantaranya :

1. Berkurangnya ketersediaan substrat dari eNOS yaitu L-Arginin atau adanya inhibisi *asymmetric dimethylarginin* (ADMA). ADMA berfungsi sebagai inhibitor endogen NO dan meningkatkan resistensi vaskuler sistemik.
2. Menurunnya hiperpolarisasi dari endotel dan *signaling* kalsium
3. Adanya eNOS *uncoupling* disebabkan karena penurunan kofaktor BH4 dan stres oksidatif.
4. Perubahan fosforilasi eNOS
5. Penurunan bioavailabilitas NO karena peningkatan stres oksidatif
6. Peningkatan gangguan pada pengeluaran NO disebabkan karena ROS
7. Peningkatan vasokonstriktor yang mengurangi atau menurunkan vasodilatasi.
8. Perubahan pada sensitivitas kalsium

Bioavailabilitas *nitric oxide* dipengaruhi oleh stres oksidatif dengan beberapa mekanisme, yaitu (Nocella et al., 2018) :

- a Peningkatan  $O_2^-$  yang mana jika bereaksi dengan NO akan menghasilkan *potent oxidant peroxynitrite* (ONOO<sup>-</sup>) sehingga menyebabkan hilangnya bioaktivitas dari NO.
- b ROS menyebabkan penurunan eNOS dan merubahnya menjadi eNOS *encoupling* yaitu enzim yang menyebabkan peningkatan produksi  $O_2^-$  dan penurunan produksi dari NO.

Dari penelitian sebelumnya pada hewan coba diketahui bahwa defisiensi NO akan menurunkan diameter arteri uterina, panjang arteri spiralis dan aliran darah uteroplasental. Temuan ini menggambarkan bahwa NO pathway berperan dalam patogenesis dari Preeklamsia ( Phipp, 2016).



**Gambar 2.2 Perubahan mekanisme signalling Nitric Oxide (NO) pada preeklamsia**

Keterangan: Mekanisme penurunan Nitric Oxide yang disebabkan karena adanya peningkatan stres oksidatif, peningkatan arginase, peningkatan sFlt-1, penurunan VEGF dan PIGF (Osol et al., 2017).

Penurunan NO pada preeklamsia dapat dikaitkan dengan peningkatan endothelin (ET-1). Ekspresi dari gen preproET-1 (ppET-1) meningkat dengan adanya rangsangan fisik seperti hipoksia dan shear stress. ekspresi gen ppET-1 akan membentuk big-ET-1 (bET-1). bET-1 akan membelah menjadi ET-1 dengan adanya matrix metalloproteinase (MMPs), khususnya MMP-2 gelatinase (Bourque et al., 2011). Pada Gambar 2.2 menunjukkan ET-1 merupakan faktor yang menentukan terjadinya hipertensi dan protein urin pada preeklamsia. ET-1 diproduksi oleh sel endotel dan merupakan vasokonstriktor endogen paling poten. ET-1 diketahui menginduksi stres



oksidatif dan stres retikulum endoplasma pada preeklamsia (Osol *et al.*, 2017).

#### 4. Faktor Angiogenik

Iskemik plasenta dipercaya berkontribusi pada disfungsi sel endotel karena adanya perubahan keseimbangan antara faktor angiogenik dan anti angiogenik. Faktor angiogenik diantaranya adalah sFlt-1, VEGF, PlGF dan endoglin. sFlt-1 mengikat dan menghambat aktivitas VEGF dan PlGF. Endoglin adalah salah satu faktor antiangiogenesis yang juga berpengaruh pada preeklamsia. Keduanya, baik sFlt-1 dan endoglin ditemukan meningkat pada sirkulasi maternal sebelum onset preeklamsia terjadi. VEGF berperan dalam pengaturan proses neurovaskuler dan berperan dalam pembentukan atau produksi NO dengan jalur sinyal VEGF/Flk 1 dan jalur PI3 Kinase/Akt. VEGF meningkatkan NO dengan cara meningkatkan ekspresi mRNA eNOS yang berpengaruh pada produksi NO (Gentile *et al.*, 2013; Sanjay dan Girija, 2104).

#### 5. Peroksidasi lipid

Peroksida lipid dari sinsitiotrofoblast bertanggung jawab untuk pengeluaran Malondialdehyde (MDA). Peroksidasi lipid terjadi salah satunya dengan jalur reaksi NO dan ROS. Reaksi antara NO dengan  $O_2^-$  akan memproduksi prooksidan poten yaitu peroksinitrit anion (ONOO<sup>-</sup>). ONOO<sup>-</sup> bersifat sangat toksik dan menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa ikatan LDL teroksidasi (ox-LDL) dan reseptornya (LOX-1) mempunyai peran penting dalam disfungsi endotel. Ikatan antara ox-LDL dan LOX-1 mengaktifasi NADPH oksidase yang mana akan meningkatkan ROS intraseluler ( $O_2^-$  dan  $H_2O_2$ ) yang mana akan menurunkan NO (Sanjay dan Girija, 2104; Zuniga *et al.*, 2014).



## 6. Inflamasi dan Sitokin

Gangguan plasentasi menyebabkan hipoksia yang dapat mengeluarkan stimulus inflamasi pada sirkulasi maternal. Leukosit pada plasenta dan vena uterina diaktifkan untuk merilis sitokin dan radikal bebas. Aktivasi neutrofil ditemukan meningkat pada desidua dan plasenta (Sanjay dan Girija, 2014).

## 7. Fragmen Plasenta dan Mikro Partikel (Micro Particles/MPs)

Pada preeklamsia terdapat banyak debris dari permukaan plasenta dan sinsitiotrofoblas di sirkulasi maternal sebagai akibat dari banyaknya kematian sel karena hipoksia. Hal ini menyebabkan respon inflamasi maternal berlebihan. Material dari plasenta seperti *cytokeratin* dan *soluble fetal DNA* secara langsung merusak sel endotel vaskuler dan berinteraksi dengan fagosit dan berkontribusi terhadap respon imun. Peningkatan mikro partikel pada sirkulasi terjadi pada inflamasi dan trombosis *disease*. Mikro partikel meningkatkan stres oksidatif pada endotel vaskuler melalui proses yang melibatkan NADPH Oksidase, PGHS, *xanthine oxidase* dan eNOS *uncoupling*. *Placenta-derived ssyncytiotrophoblast MPs* (STBMs) ditemukan di sirkulasi pada trimester 3 kehamilan dan pada kehamilan dengan preeklamsia (Gouloupoulou dan Davidge, 2014; Sanjay dan Girija, 2014).

## 8. Autoantibodi

Beberapa penelitian saat ini menunjukkan bahwa preeklamsia dikaitkan dengan autoantibodi yang disebut *agonistic autoantibodi* (AT1-AAs). Antibodi ini mengaktifkan angiotensin II reseptor. Pada preeklamsia ditemukan AT1-AAs yang menyebabkan terjadinya vasokonstriksi. Beberapa fungsi dari AT1-AAs adalah meningkatkan sFlt-1 dan mengaktifkan NADPH Oksidase untuk memproduksi ROS. AT1-AAs bekerja pada jaringan yang mempunyai reseptor AT1 (AT1R). AT1R mengatur ekspresi protein yang berkaitan



dengan invasi trofoblas dan angiogenesis (Irani dan Xia, 2011 ; Seki, 2013; Sanjay dan Girija, 2014).

Sistem renin angiotensin adalah salah satu yang mengontrol tekanan darah. Ekspresi dari mRNA renin dapat dideteksi pada desidua, makrofag, membran korioamnionitik dan otot polos vaskuler. Angiotensin II reseptor tipe I (AT1R) telah ditemukan di vilus dan ekstrasvilus trofoblas dan respon AT1R menjadi angiotensin II. Angiotensin II pada sirkulasi maternal meningkat selama kehamilan. Pada preeklamsia angiotensin II sedikit menurun, akan tetapi telah ditemukan fakta bahwa sensitifitas vaskuler pada angiotensin meningkat pada wanita hamil dengan hipertensi. Ekspresi gen AT1 reseptor lebih tinggi pada plasenta jika dibandingkan dengan desidua baik pada preeklamsia atau normal. Ekspresi AT1 reseptor pada desidua lebih tinggi dibandingkan pada desidua wanita hamil normal. AT1-AAs ditemukan pada wanita preeklamsia. AT1-AAs berperan menghambat migrasi trofoblas, terbukti menginduksi ROS secara in vitro dan menginduksi gejala preeklamsia pada hewan coba (Vitoratos, *et al.*, 2012).

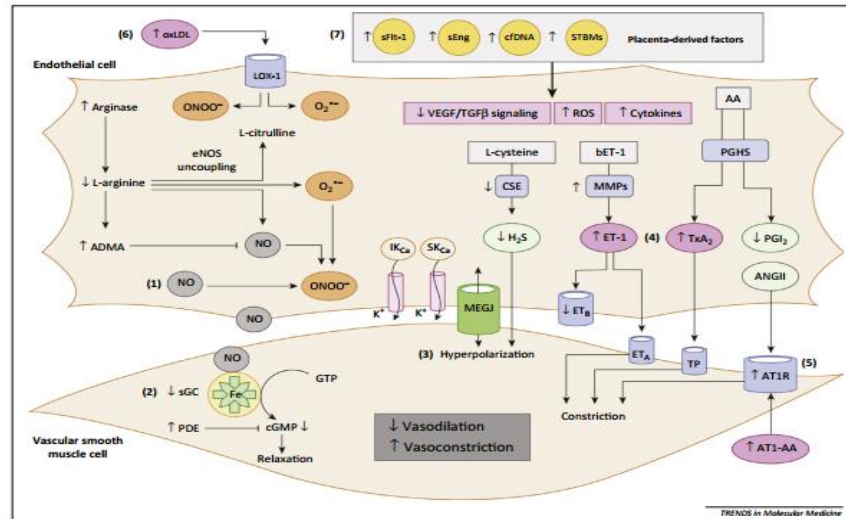
#### 9. Genetik

Preeklamsia adalah kelainan genetik yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Ditemukan bahwa frekuensi Preeklamsia meningkat pada ibu, anak perempuan, saudara perempuan, dan cucu perempuan. Kecenderungan preeklamsia dan eklamsia diturunkan pada anggota keluarga. Hal ini dikaitkan dengan hubungan antara histokompatibilitas antigen HLA DR4 dan hipertensi proteinuria (Sanjay dan Girija, 2014).

#### 10. Faktor Imunologis

Maladaptasi yang terjadi pada sistem imun saat hamil menjadi salah satu faktor patofisiologi Preeklamsia. Dimulai pada awal trimester kedua, pada preeklamsia ditemukan jumlah sel T *helper* yang lebih rendah secara

signifikan dibandingkan orang dengan tekanan darah normal. Antibodi yang menyerang pada sel endotel ditemukan 50% pada wanita preeklamsia dibandingkan wanita dengan tekanan darah normal yaitu sebesar 15% (Sanjay dan Girija, 2104).



**Gambar 2.3 Skema proses di sel endotel dan sel otot polos pada preeklamsia**

Keterangan: Terjadi peningkatan sFlt-1, SENG, cfDNA dan STBMs yang akan menyebabkan penurunan VEGF, peningkatan ROS dan sitokin pada sel endotel. Terjadi peningkatan Ox-LDL menghasilkan peroksida nitrit dan superoksida. Penurunan L-Arginin yang mengakibatkan penurunan NO dan menyebabkan vasokonstriksi. Peningkatan ET, AT1-AA dan tromboksan serta penurunan prostasiklin menyebabkan vassokonstriksi pada otot polos. Gangguan fisik MEGJs, mengurangi produksi hidrogen sulfat ( $H_2S$ ) karena aktivitas cystathionine-g-lyase (CSE) menurun, dan downregulation saluran konduktif kalsium kecil (SKCa) dan intermediate- (IKCa) yang diaktifkan kalsium mengurangi hyperpolarization endotelium (EDH), berkontribusi untuk mengurangi vasodilatasi (Gouloupoulou dan Davidge, 2014).

Gouloupoulou dan Davidge (2014) menjelaskan beberapa teori patogenesis preeklamsia. Pada Gambar 2.3 menunjukkan bahwa Disfungsi endotel merupakan pusat patofisiologi dari preeklamsia karena menjadi penyebab mekanisme resistensi vaskuler dan hipertensi. Sel endotel berfungsi mengeluarkan molekul vasoaktif dikenal sebagai EDRFs (endothelium-derived relaxing factors) dan EDCFs (endothelium-derived contracting factors).



EDRFs adalah molekul yang menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah. Pada preeklamsia terjadi penurunan EDRFs yang berkontribusi terhadap penurunan bioavailabilitas NO dan prostasiklin. EDCFs adalah molekul yang menyebabkan kontraksi otot polos vaskuler. EDCFs terdiri dari endotelin (ET) 1 dan Prostanoid (Tromboxan A<sub>2</sub> dan Angiotensin II (Ang II)). Pada preeklamsia terjadi peningkatan dari EDCFs yang berkontribusi terhadap vasokonstriksi pembuluh darah dan menyebabkan hipertensi (Gouloupoulou dan Davidge, 2014).

Pada preeklamsia, produksi VEGF oleh sel podosit di glomerulus menurun. Pada keadaan normal, VEGF akan berikatan dengan reseptornya dan mengatur fenestrasi endotel di pembuluh darah. Kegagalan fenestrasi endotel mengakibatkan kegagalan fungsi filtrasi menyebabkan proteinuria. Selain itu, ET1 menyebabkan penurunan nephrin pada podosit sehingga mengganggu fungsi filtration barrier pada glomerulus. Penurunan VEGF dan peningkatan ET1 berperan pada terjadinya proteinuria (Lankhorst *et al.*, 2012).

Disfungsi endotel pada preeklamsia dimediasi oleh sFlt-1 atau reseptor 1 VEGF menjadi patogenesis dari preeklamsia. Pada penelitian ini diketahui bahwa sENG (koreseptor TGF $\beta$ ) meningkat pada serum penderita preeklamsia. sENG akan menginduksi permeabilitas kapiler dan menyebabkan hipertensi. sENG menghambat ikatan TGF $\beta$  dan reseptornya sehingga menurunkan aktivasi eNOS dan vasodilatasi pembuluh darah (Venkatesha *et al.*, 2006).

## 2.2 Radikal Bebas

### 2.2.1 Pengertian Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa yang mempunyai satu elektron tidak berpasangan atau biasa disebut sebagai senyawa oksigen reaktif. Proses lepasnya elektron dari senyawa tertentu disebut oksidasi, sebaliknya proses menangkap elektron disebut sebagai proses reduksi. Adanya molekul tidak



berpasangan menyebabkan molekul sangat reaktif. Radikal bebas ini akan menyerang molekul stabil yang berada disekitarnya. Zat di sekitarnya ini menjadi radikal bebas baru dan menyebabkan reaksi berantai yang mengakibatkan keusakan sel (Winarsi, 2011; Yuslianti, 2018). Sedangkan menurut Agarwal (2012) radikal bebas atau *reactive oxygen species (ROS)* ditimbulkan saat molekul dengan elektron tidak berpasangan mengambil satu elektron dari senyawa lainnya. Molekul ini akan menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil dan menyebabkan reaksi radikal bebas lainnya.

### 2.2.2 Reaksi Umum

Radikal bebas dapat terbentuk pada saat suatu radikal bebas menyumbangkan satu elektronnya, mengambil satu elektron dari molekul lain, atau bergabung dengan molekul non radikal lainnya. Akibat dari proses tersebut maka akan timbul reaksi berantai yang akan menghasilkan radikal bebas baru. Yang dimaksud dengan reaksi berantai adalah reaksi ini akan terus berlanjut hingga sifat radikal ini dihilangkan dengan reaksi radikal bebas lainnya atau saat bereaksi dengan sistem antioksidan tubuh. Dua buah radikal bebas yang bereaksi akan menggabungkan elektron yang tidak berpasangan dan bergabung membentuk ikatan kovalen. Radikal bebas dapat bereaksi dengan komponen – komponen sel, komponen struktural (molekul penyusun membran) dan komponen fungsional (enzim dan DNA) (Yuslianti, 2018).

Radikal bebas mempunyai reaktivitas yang tinggi, sifatnya tidak stabil dan berumur singkat. Senyawa radikal bebas akan segera menyerang komponen seluler yang ada di dekatnya karena reaktivitasnya tersebut. Radikal bebas biasa menyerang senyawa lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, RNA dan DNA dan mengakibatkan kerusakan fungsi dan struktur sel (Winarsi, 2011).



Adanya ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Rasio yang dapat dilihat diantaranya adalah peningkatan jumlah *reactive oxygen species* (ROS) dan atau peningkatan *reactive nitrogen species* (RNS) atau penurunan pertahanan tubuh oleh antioksidan (Agarwal et al., 2012).

#### 1. ROS

ROS dalam jumlah tertentu dibutuhkan untuk menjalankan fungsi normal sel yaitu memfasilitasi proses oksidasi agar kembali ke reaksi reduksi. ROS terbentuk dari proses di dalam tubuh yang membutuhkan banyak oksigen. Proses biologis yang membutuhkan banyak oksigen dan nitrogen sangat penting karena digunakan dalam proses metabolik seperti saat terjadi proses patologis di dalam tubuh atau ketika terdapat proses interaksi dengan lingkungan eksternal. Proses fisiologis yang menggunakan  $O_2$  sebagai substrat seperti reaksi oksigenasi dan transfer elektron, membuat ROS yang paling banyak di dalam tubuh adalah superoksida anion. Sumber lain superoksida anion adalah dari rantai pendek di retikulum endoplasma, sitokrom p450 dan enzim *nicotiamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) *oxidase* yang mana dihasilkan dalam jumlah besar pada awal kehamilan. Superoksida anion dinetralkan oleh enzim superoksida dismutase (SOD) yang kemudian dirubah menjadi  $H_2O_2$ . Selanjutnya GPx dan Katalase akan merubah  $H_2O_2$  menjadi air. Meskipun  $H_2O_2$  bukan merupakan radikal bebas, akan tetapi dapat menghasilkan radikal hidroksil yang lebih radikal. Radikal hidroksil akan memecah purin dan pirimidin serta menyebabkan untai DNA pecah dan menyebabkan kerusakan DNA.

#### 2. RNS

RNS berasal dari perubahan Nitric oxide (NO) dan Nitrogen dioxide ( $NO_2$ ) menjadi bentuk spesies non reaktif yaitu peroksida nitrit ( $ONOO^-$ ) dan



nitrosamin. RNS (ONOO<sup>-</sup>) berasal dari reaksi nitric oxide (terbentuk dari O<sub>2</sub> dan L-arginine) dan anion superoksida. Peroksida nitrit akan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid.

### 2.2.3 Sumber Radikal Bebas

Beberapa contoh dari radikal bebas adalah superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radikal hidroksil OH<sup>-</sup>, dan bentuk oksigen yang tereduksi secara parsial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Radikal hidroksil dapat menjadi inisiator atau pencetus reaksi berantai.

Menurut Droge (2002), sumber radikal bebas terdiri dari tiga hal yaitu :

#### 1. Radikal bebas yang berasal dari lingkungan.

Radikal bebas ini bersumber dari obat-obatan, asap rokok, pestisida, asap kendaraan, dan racun dari sisa pembuangan.

##### a. Obat – obatan

Beberapa macam obat dapat meningkatkan produksi radikal bebas antara lain obat yang berikatan dengan logam untuk aktivitasnya (nitrofurantoin), obat kanker seperti bleomycin, *anthracyclines* (adriamycin), fenilbutazon, *methotrexate*, asam mefenamat, dan komponen aminosalisilat dari sulfasalasin yang dapat menginaktivasi protease. Penggunaan asam askorbat dalam jumlah banyak mempercepat peroksidasi lipid (Arief, 2007).

##### b. Radiasi

Radioterapi memungkinkan terjadinya peningkatan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Radiasi dapat berupa radiasi elektromagnetik dan radiasi partikel. Radiasi elektromagnetik misalnya sinar X dan sinar gamma, sedangkan radiasi partikel misalnya partikel elektron, neutron, proton, alfa dan beta (Arief, 2007).



### c. Asap Rokok

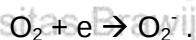
Asap rokok pada kehamilan dapat menyebabkan berat badan bayi lahir rendah (BBLR) dan bayi lahir prematur, Sindroma Kematian Bayi Mendadak (*Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)*), dan efek pada bayi berupa pertumbuhan janin dalam rahim terhambat dan keguguran spontan. Sebagian besar BBLR dilahirkan oleh ibu yang terpapar asap rokok saat hamil. Hal ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok saat hamil menyumbangkan angka yang cukup besar terhadap kejadian BBLR.

### d. Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh,

Radikal bebas ini berasal dari proses metabolisme energi. Beberapa radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh antara lain :

#### 1. Superoksida ( $O_2^-$ )

Superoksida yaitu spesies hasil penambahan satu elektron pada  $O_2$ ,



Radikal superoksid diproduksi dalam tubuh melalui proses enzimatik maupun non enzimatik seperti elektron transport di mitokondria, reaksi hidroksilasi pada retikulum endoplasmik, reaksi xantin oksidase pada pembentukan urat, auto oksidasi katekolamin. Semua reaksi tersebut merupakan proses biokimia yang penting untuk kelangsungan proses fisiologis tubuh. Superoksid dapat mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) oleh enzim superoksid dismutase (SOD).

#### 2. Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ )

Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) sebenarnya bukan merupakan radikal bebas, tetapi merupakan inisiator dalam pembentukan radikal bebas yaitu bila bereaksi dengan logam transisi seperti  $Fe^{2+}$  akan membentuk hidroksil radikal ( $OH\cdot$ ). Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) diproduksi di dalam mitokondria dan mikrosom. Peningkatan dari produksi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) akan



meningkatkan konsentrasi oksigen ( $O_2$ ). Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) merupakan oksidator yang lemah dan dapat diinaktifkan oleh beberapa enzim secara langsung seperti pada oksidasi dari esensial thiol group ( $-SH$ ). Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dapat menembus membran sel kemudian sel bereaksi dengan Fe dan Cu membentuk radikal hidroksil ( $OH$ ) dimana radikal superoksida ( $O_2^-$ ) sendiri tidak mampu menembus membran sel tersebut.

### 3. Radikal Hidroksil ( $OH$ )

Radikal hidroksil adalah salah satu radikal bebas yang sangat reaktif.  $OH$  dapat merusak hampir semua molekul dalam tubuh seperti karbohidrat, asam amino, dan asam organik. Radikal ini dibentuk melalui radiasi sel yang akan menyebabkan pecahnya ikatan kovalen antara hidrogen dan oksigen.

e. Radikal bebas dari radikal bebas itu sendiri

Radikal bebas ini terbentuk saat radikal bebas memperoleh elektron dari molekul lain sehingga terbentuklah radikal bebas baru akibat kehilangan elektronnya. Bila reaksi berlanjut terus maka terjadilah suatu reaksi berantai (*chain reaction*) sampai radikal bebas itu hilang oleh reaksi dengan radikal bebas lain atau hilang oleh sistem antioksidan tubuh.

### 2.3 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbangnya *Reactive oxygen species* (ROS) dan antioksidan. Stres oksidatif adalah salah satu dari patogenesis preeklamsia. Pada preeklamsia terjadi gangguan invasi sel trofoblas ke arteri spiralis yang mengakibatkan gangguan remodelling arteri spiralis sehingga aliran darah ke plasenta berkurang. Aliran darah yang berkurang mengakibatkan



kondisi hipoksia plasenta dan iskemia plasenta (Young *et al.*, 2010; Sánchez-Aranguren *et al.*, 2014; Matsubara *et al.*, 2015).

Hipoksia plasenta akan menyebabkan pelepasan *syncytiotrophoblast microparticle* (STBM) dan produksi *damage-associated molecular pattern* (DAMP). DAMP mengaktifkan *immunocytes* diantaranya neutrofil dan sel dendritik. Pengaktifan neutrofil akan menghasilkan ROS melalui beberapa enzim yaitu *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oksidase, *xanthin oxidase* (XO), dan *uncoupled eNOS*. Peningkatan ROS akan mengaktifasi faktor transkripsi diantaranya *Nuclear Factor kappa   * (NF    ), *Activator Protein-1* (AP-1), dan *Hypoxia inducible factor* (HIF-1) (Matsubara *et al.*, 2015).

HIF-1 adalah protein transkripsi heterodimer yang terdiri dari 2 subunit    dan   . HIF-1   sangat sensitif terhadap oksigen sehingga akan teraktivasi dengan cepat saat terjadi hipoksia. Peningkatan HIF-1   pada plasenta akan mengakibatkan pengeluaran *soluble FMS like Tyrosine kinase 1* (sFlt-1) dan SENG. Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa faktor transkripsi dari HIF-1   dapat diinduksi dengan adanya aktivasi dari NF     oleh TNF   (Sanchez *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Nevo *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2014).

## 2.4 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mencegah proses peroksidasi lipid dengan cara memberikan atau menyumbangkan elektron (elektron donor) atau senyawa yang meredam radikal bebas. Antioksidan merupakan zat yang mencegah reaksi oksidasi oleh radikal bebas di dalam oksidasi lipid (yuslianti, 2018).

Antioksidan diklasifikasikan menjadi 2 berdasarkan sumbernya, yaitu :

### 1. Antioksidan enzimatik

Antioksidan enzimatik merupakan antioksidan yang berasal dari dalam tubuh.



## 2. Antioksidan non enzimatis

Antioksidan non enzimatis terdiri dari antioksidan yang berasal dari alam (antioksidan alami) dan antioksidan yang diperoleh dari hasil reaksi kimia atau disebut sebagai antioksidan sintetis.

### 2.4.1 Antioksidan Enzimatis

Antioksidan enzimatis memiliki inti logam yang mana akan memberikan kemampuan untuk mengambil valensi yang berbeda kemudian akan memberikan elektronnya untuk menyeimbangkan molekul pada proses. Antioksidan enzimatis berupa enzim primer dan enzim sekunder. Enzim Primer terdiri dari Superoksida Dismutase (SOD, Catalase, dan Glutathione peroksidase). Sedangkan Enzim sekunder terdiri dari glutathione reduktase, glucose 6 phosphate dehydrogenase (Winarsi, 2011). Antioksidan enzimatis (SOD, Catalase, GPX dan glutathione oksidase) akan menetralkan ROS dan mencegah kerusakan struktur sel (Agarwal *et al.*, 2012).

SOD akan mengkatalis anion superoksida menjadi  $H_2O_2$  yang mana merupakan reaksi dasar atau fundamental dari antioksidan. Keluarga glutathione terdiri dari GPx, GST dan GSH reduktase. GPx akan mereduksi GSH sebagai donor  $H^+$  untuk degradasi peroksida ( $H_2O_2$ ). Menurunnya jumlah GSH dari dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan sel dan meningkatkan konsentrasi  $H_2O_2$ , oleh karena itu GSH adalah antioksidan yang penting. GSH memainkan peranan penting dalam pemeliharaan sel dan berkonjugasi dengan zat endogen berbahaya dan komponen xenobiotik pada sel (Agarwal *et al.*, 2012).

### 2.4.2 Antioksidan Non Enzimatis

Beberapa macam antioksidan non enzimatis berasal dari suplemen yang ada di dalam makanan dan antioksidan sintetis, seperti vitamin C, GSH,



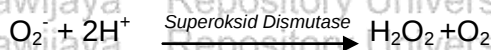
taurine, Hypotaurin, vitamin E, Zn, selenium (se), beta caroten dan caroten (Agarwal, 2012).

Antioksidan non enzimatis terdiri dari :

1. Mineral, terdiri dari zinc dan selenium
2. Vitamin, terdiri dari vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan vitamin K.
3. Carotenoids, terdiri dari  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin
4. Komponen Organosulfur, terdiri dari allium, allyl sulfide dan indoles
5. Antioksidan dengan berat molekul rendah, terdiri dari glutathione dan asam urat
6. Kofaktor antioksidan, terdiri dari koenzim Q<sub>10</sub>
7. Polifenol, terdiri dari flavonoid dan fenol

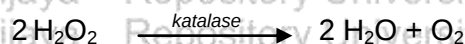
Mekanisme kerja antioksidan enzimatis antara lain :

1. Superoksida dismutase (SOD) mengandung ion logam, yaitu Cu<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> (CuZnSOD) serta Mn (Mn-SOD). Ion logam tersebut dapat mempercepat perubahan superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) menjadi hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dengan reaksi sebagai berikut:

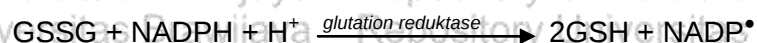
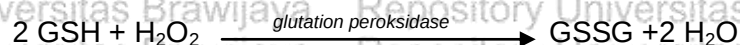


2. Katalase dan glutathione peroksidase menghilangkan atau mereaksikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sehingga dapat mencegah pembentukan radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>) yang sangat reaktif dari reaksi fenton

- a. Katalase bekerja dengan cara mempercepat dekomposisi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secara langsung dengan reaksi :



- b. Glutathione peroksidase menghilangkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan reaksi sebagai berikut :

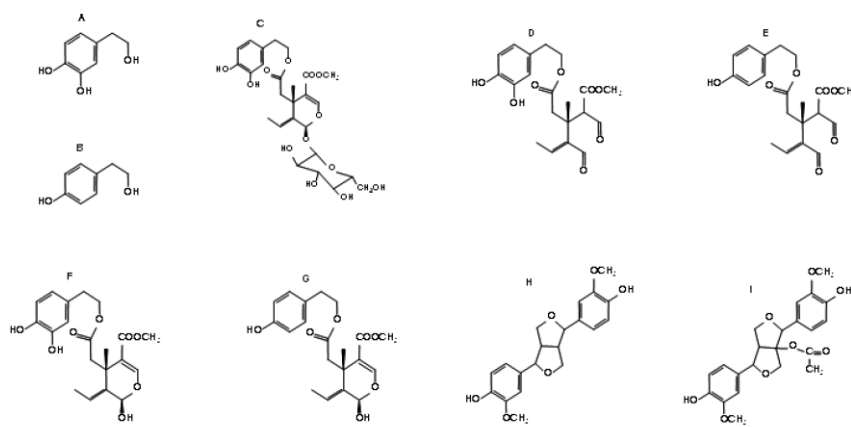




## 2.5 Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

### 2.5.1 Klasifikasi Olive Oil

*Olive Oil* dibedakan berdasarkan kualitasnya menjadi tiga jenis yaitu *extra virgin olive oil* (EVOO), *virgin olive oil* (VOO) dan *ordinary olive oil* (OO). EVOO adalah VOO yang paling sedikit kandungan asam oleidnya yaitu 0,8 g asam per 100 g minyak. VOO mempunyai 2 g asam per 100 g minyak. Sedangkan olive oil mempunyai asam sebesar 3,3%. Kandungan bioaktif yang ditemukan pada EVOO diantaranya adalah *monounsaturated fatty acids* dan *polyunsaturated fatty acids*, tokoferol dan polifenol (bio-fenol). Keuntungan dari konsumsi EVOO adalah karena tingginya MUFA dan kaya akan mikro komponen bioaktif seperti polifenol (Nocella *et al.*, 2018). Sedangkan menurut Guasch-Ferré (2014) olive oil atau minyak zaitun, adalah komponen utama dari diet mediteranian sebagai sumber utama lemak sayur, utamanya *monounsaturated fatty acids* (MUFA). Virgin olive oil diproduksi dari buah zaitun yang ditekan secara mekanik sehingga mengeluarkan minyak, dan minyak ini yang disebut olive oil. Olive oil biasa memiliki komponen bioaktif dan antioksidan seperti polyphenols, phytosterols and vitamin E dan memiliki tingkat keasaman <1.5%. Extra virgin olive oil (EVOO) juga diproduksi dengan mekanisme yang sama, namun diambil kualitas yang terbaik dengan keasaman < 1%.



**Gambar 2.4 Struktur dari komponen fenol pada olive oil**

Keterangan: A = hydroxytyrosol; B = tyrosol; C = oleuropein glucoside; D = dialdehydic dari oleuropein (SID-1); E = ligstroside (SID-2); F = aglycone form of oleuropein glucoside (SID-3); G = ligstroside SID-4; H = lignanes (+)-pinoresinol; I = (+)-1-acetoxypinoresinol (Covas et al., 2015)

### 2.5.2 Kandungan Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

EVOO terdiri dari beberapa senyawa heterogen dengan berbagai struktur kimia. Beberapa senyawa fenolik yang terdapat di dalam EVOO diantaranya fenolik alkohol, asam fenolik, flavonoid, secoiridoids, dan ligans.

| Phenolic acids and derivatives                                                                   | Phenolic alcohols                                    |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|
| Vanillic acid                                                                                    | (3,4-Dihydroxyphenyl) ethanol (3,4 DHPEA)            |                 |
| Syringic acid                                                                                    | ( <i>p</i> -Hydroxyphenil) ethanol ( <i>p</i> -HPEA) |                 |
| <i>p</i> -Coumaric acid                                                                          | (3,4-Diidrossifenil)etanolo-glucoside                |                 |
| <i>o</i> -Coumaric acid                                                                          |                                                      |                 |
| Gallic acid                                                                                      |                                                      |                 |
| Caffeic acid                                                                                     | <b>Lignans</b>                                       | <b>Flavones</b> |
| Protocatechuic acid                                                                              | (+)-1-Acetoxypinoresinol                             | Apigenin        |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid                                                                    | (+)-Pinoresinol                                      | Luteolin        |
| Ferulic acid                                                                                     |                                                      |                 |
| Cinnamic acid                                                                                    | <b>Hydroxy-isocromans</b>                            |                 |
| 4-(acetoxethyl)-1,2-Dihydroxybenzene                                                             |                                                      |                 |
| Benzoic acid                                                                                     |                                                      |                 |
| Secoiridoids                                                                                     |                                                      |                 |
| Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA)            |                                                      |                 |
| Dialdehydic form of decarboxymethyl etenolic acid linked to <i>p</i> -HPEA ( <i>p</i> -HPEA-EDA) |                                                      |                 |
| Oleuropein aglycon (3,4 DHPEA-EA)                                                                |                                                      |                 |
| Ligstroside aglycon                                                                              |                                                      |                 |
| Oleuropein                                                                                       |                                                      |                 |
| <i>p</i> -HPEA-derivative                                                                        |                                                      |                 |
| Dialdehydic form of oleuropein aglycon                                                           |                                                      |                 |
| Dialdehydic form of ligstroside aglycon                                                          |                                                      |                 |

**Gambar 2.5 Kandungan Komponen Fenolik pada EVOO**

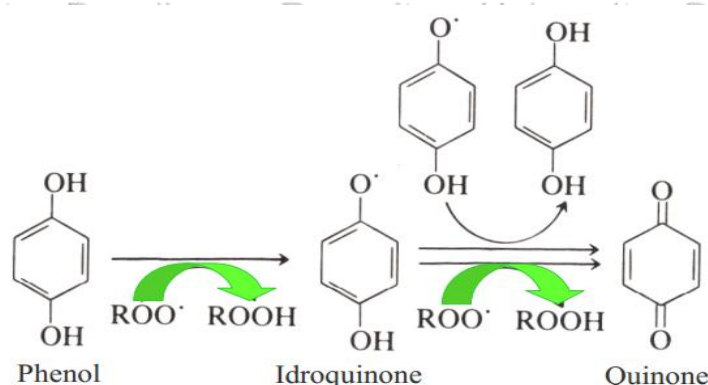
Keterangan: Beberapa kandungan dari polifenol EVOO yang terdiri dari asam fenolik dan derivatnya, fenolik alkohol, ligans dan hydroxy-isocromans (Servili et al., 2014).



Dari pemeriksaan yang dilakukan di laboratorium pengujian mutu dan keamanan pangan pada EVOO merk Borges (Nomor : 0263/THP/LAB/2018) diketahui bahwa kandungan antioksidan IC<sub>50</sub> adalah sebesar 48,56 mg/ml. Senyawa dikatakan mempunyai kandungan antioksidan sangat kuat apabila nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150) dan lemah (151-200).

### 2.5.3 Mekanisme EVOO Sebagai Antioksidan

Mekanisme kerja EVOO sebagai antioksidan yaitu dengan peningkatan aktivitas antioksidan glutathion dan glutathion peroksidase dalam plasma. Selain itu, dapat dilihat dari terjadinya penurunan proses oksidasi sel darah merah, gastrointestinal dan renal, LDL teroksidasi, ROS, GSSG dan Fa-Isoprostanes. Komponen primer yang berperan sebagai antioksidan adalah OP (Olive Phenols) (Servili *et al.*, 2014).



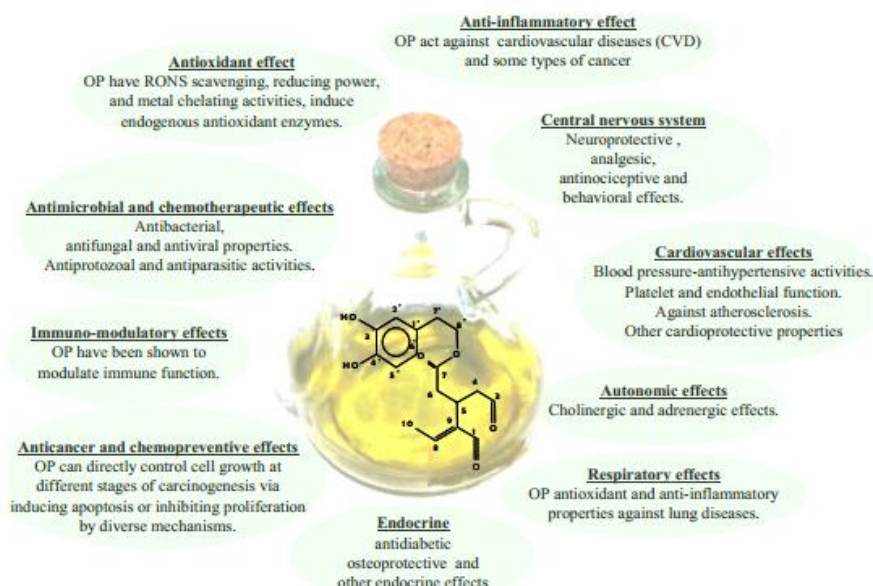
**Gambar 2.6 Mekanisme antioksidan OP pada EVOO**

Keterangan: Perubahan komponen fenol pada EVOO melalui perubahan menjadi Hidroquinone dan berubah menjadi Quinon (Servili *et al.*, 2014).

Pada Gambar 2.7 menunjukkan kerja OP dengan merusak ikatan dengan cara mendonorkan hidrogen ke radikal alkilperoksil (ROO<sup>•</sup>). Hidroquinon merupakan bentuk tereduksi dari fenol. Hidroquinon akan mendonorkan hidrogen kembali dan menjadi bentuk paling sederhana yaitu quinon (Servili *et al.*, 2014).



Mekanisme kerja EVOO sebagai antioksidan telah dijelaskan yaitu dengan mengurangi terjadinya proses oksidasi. Berikut adalah gambar peran OP dalam EVOO untuk kesehatan tubuh manusia (Servili *et al.*, 2014).

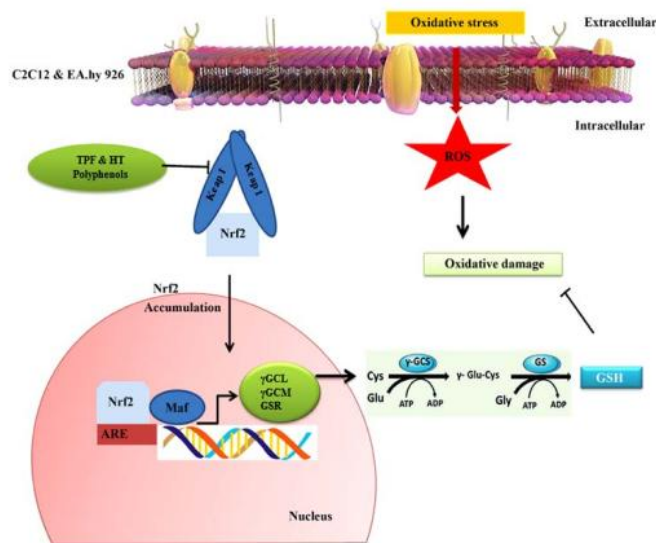


### Gambar 2.7 Peran OP (Olive Phenols) Dalam Tubuh Manusia

Keterangan: *Olive phenols* berfungsi sebagai sebagai Antioksidan, antimikroba dan kemoterapi, Immunomodulator, anti-cancer dan kemopreventif, endokrin, respiratori, autonomic, cardiovascular, CNS dan antiinflamasi (Servili *et al.*, 2014).

Mekanisme kerja EVOO sebagai antioksidan pada stres oksidatif melalui komponen polifenolnya adalah dengan menghambat NADPH oksidase sehingga superoksida dan hidrogen peroksida tidak terbentuk. EVOO juga berperan sebagai scavenger hidrogen peroksida (Gambar 2.8). Pada Gambar 2.9 menunjukkan bahwa komponen hydroxytyrosol EVOO melepaskan ikatan antara *nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2* (Nrf2) dengan Keap1 sehingga faktor transkripsi (Nrf2) menjadi aktif. Nrf2 akan masuk dan terakumulasi di nukleus dan berikatan dengan gen protektif *antioxidant responsive element* (ARE) dan protein kecil Maf mengaktifkan transkripsi gen target. Salah satunya adalah ekspresi

gamma-glutamylcysteine ligase (GCL), Gamma GCM dan GSR yang akan membentuk GSH (Kouka, 2017).



**Gambar 2.8 Pembentukan GSH melalui aktivasi Nrf2 oleh TPF dan hydroxytyrosol**

Keterangan: *Total Polyphenol Fraction* dan *Hydroxy tyrosol* pada EVOO menyebabkan Nrf2 terlepas dari Keap1 sehingga Nrf2 berpindah dari sitoplasma menuju nukleus. Nrf2 akan berikatan dengan ARE dan Maf mengaktifkan transkripsi gen yang akan membentuk GSH (Kouka, 2017).

#### 2.5.4 Dosis Olive Oil

Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa konsumsi EVOO 10 g/hari secara signifikan dapat menurunkan sebesar 10% resiko penyakit kardiovaskuler dan mortalitas kardiovaskuler, sedangkan konsumsi OO tidak signifikan.

Beberapa penelitian yang lain menunjukkan bahwa konsumsi EVOO bisa mencegah berbagai macam penyakit kardiovaskuler seperti penyakit arteri koroner, dan menurunkan mortalitas yang disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler lainnya. Selain penyakit kardiovaskuler, konsumsi EVOO juga bisa mencegah terjadinya penyakit stroke (Buckland *et al.*, 2012; Guasch-Ferré *et al.*, 2014; Nocella *et al.*, 2018). Menurut Torre (2008) konsumsi harian EVOO adalah sekitar 50 gram dengan konsentrasi sebesar 180 mg/kg fenol mengandung sekitar 9 mg fenol. Sedangkan menurut penelitian Nugraheny



(2012) rata – rata konsumsi EVOO oleh masyarakat mediterania adalah 30-50 gram/hari.

konsumsi EVOO dapat menurunkan OX-LDL secara signifikan. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak yang memicu aktivasi *naive*-LDL dan ox-LDL. Pada penelitian kohort selama 1 tahun, ditemukan bahwa dengan konsumsi virgin olive oil terjadi penurunan jumlah ox-LDL dibandingkan dengan grup kontrol. Pada penelitian ini juga terlihat jika setelah pemberian VOO terjadi keseimbangan antara GSH dan GSSG (Nocella C *et al.*, 2018).

## 2.6 Glutation (GSH)

GSH adalah antioksidan yang terdapat di dalam tubuh. GSH dihasilkan baik di dalam atau di luar sel dan di seluruh organ tubuh. GSH tersusun atas tiga asam amino yaitu sistin, glisin, dan glutamat (Yuslianti, 2018).

Glutation (GSH) adalah tripeptida dan tersusun atas asam amino glutamat (Glu), glisin (Gly) dan sistein (Cys). GSH merupakan kosubstrat bagi enzim glutation peroksidase. Oleh sebab itu, glutation juga memainkan peran sebagai antioksidan. Sebagai antioksidan, tripeptida tersebut difasilitasi oleh gugus sulfhidril dari sistein (Rennenberg, 1982). Ketika terjadi reaksi oksidasi, sulfur membentuk radikal tiil yang kemudian bereaksi dengan glutation teroksidasi kedua membentuk ikatan disulfida (G-S-S-G). Glutation memiliki potensi redoks sebesar -349 mV, yang memungkinkannya mereduksi dehidroaskorbat menjadi askorbat atau mereduksi ikatan disulfida protein (Winarsi, 2011).

Glutation adalah salah satu antioksidan seluler yang dominan, jumlahnya banyak dalam sitoplasma, mitokondria dan nukleus. Glutation dapat berfungsi sebagai antioksidan melalui berbagai mekanisme. Senyawa tersebut secara kimia dapat bereaksi dengan oksigen singlet, radikal superoksida, dan radikal hidroksil, dan secara langsung dapat berperan sebagai *scavenger* radikal bebas.



Glutation juga menstabilkan struktur membran dengan cara menghilangkan atau meminimalkan pembentukan asil peroksida dalam reaksi peroksida lipid (Price *et al.*, 1990; Sunarno, 2009).

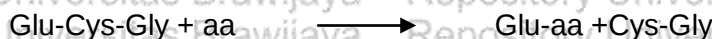
Sintesis dan degradasi glutation di dalam tubuh terjadi secara kontinu melalui siklus glutamil. Tahap awal sintesis glutation adalah kombinasi glutamat dan sistein membentuk glutamilsistein, dengan bantuan enzim glutamilsistein sintetase. Tahap selanjutnya adalah penambahan glisin yang dikatalis oleh enzim glutation sintetase.



Langkah kedua meliputi penambahan alanin dengan bantuan enzim homoglutation sintetase.



Sedangkan degradasi glutation diawali oleh pemecahan ikatan di antara glutamat dan sistein oleh enzim glutamil transpeptidase. Kemudian gugus glutamat ditranspor menjadi akseptor atau penerima asam amino. Selanjutnya, dipeptida sistein-glisin akan didegradasi oleh enzim dipeptidase, sedangkan asam amino glutamat didegradasi oleh enzim glutamilsiklotransferase.



Glu-Cys biasanya merupakan *intermediate* dalam proses sintesis dan degradasi glutation. Tahap akhir degradasi adalah konversi 5-oksoprolin oleh enzim 5-oksoprolinase menjadi glutamat.



Enzim – enzim yang berperan dalam mengkatalisis sintesis dan degradasi glutation dapat ditemukan dalam kloroplas dan sitosol. Sejumlah inhibitor enzim

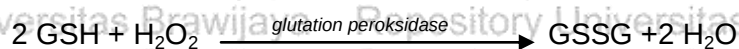


ini terjadi pada hewan percobaan, yang mana dapat digunakan untuk melihat fungsi glutathion dalam metabolisme seluler (Winarsi, 2011).

Asam amino sistein (penyusun glutathion) merupakan asam amino yang memiliki gugus  $-SH$  (sulfidril). Senyawa ini rentan sekali terhadap reaksi oksidasi, bahkan terhadap udara. Sistein yang teroksidasi akan membentuk ikatan disulfida ( $-S-S-$ ). Ikatan ini merupakan hasil kondensasi 2 molekul sistein melalui gugus  $-SH$ . Ikatan disulfida juga merupakan hasil kondensasi dari glutathion bentuk tereduksi (GSH) dan glutathion bentuk teroksidasi (GSSG).

Dalam reaksi ini, glutathion berperan sebagai kosubstrat dari enzim glutathion reduktase. Enzim ini akan bekerja untuk merestorasi glutathion teroksidasi menjadi bentuk tereduksi kembali. Berubahnya bentuk glutathion tersebut diperkirakan sebagai akibat pindahnya GSSG dari sel ke plasma. Kondisi demikian merupakan indikator stres oksidatif. Perubahan GSH yang teroksidasi menjadi GSSG dalam sel dapat dijadikan bukti bahwa dalam tubuh sedang terjadi peningkatan radikal bebas (Winarsi, 2011).

Sistem GSH sangat penting untuk pertahanan seluler terhadap radikal bebas. GSH bereaksi secara langsung dengan radikal-radikal dalam reaksi enzimatik dan berperan sebagai donor elektron dalam reduksi peroksida yang dikatalisis oleh enzim GSH-Px (Sunarno, 2009).



Glutathion mempunyai peranan penting dalam pertahanan antioksidan, metabolisme nutrisi, dan beberapa regulasi peristiwa seluler (termasuk gen, ekspresi DNA dan sintesis protein, proliferasi sel dan apoptosis, proses transduksi sinyal, produksi sitokin dan respon kekebalan tubuh). Kekurangan glutathion akan berkontribusi terhadap terjadinya stres oksidatif, yang menyebabkan penuaan dan berperan dalam patogenesis dari beberapa penyakit. Dari penelitian sebelumnya diketahui kadar GSH pada kehamilan

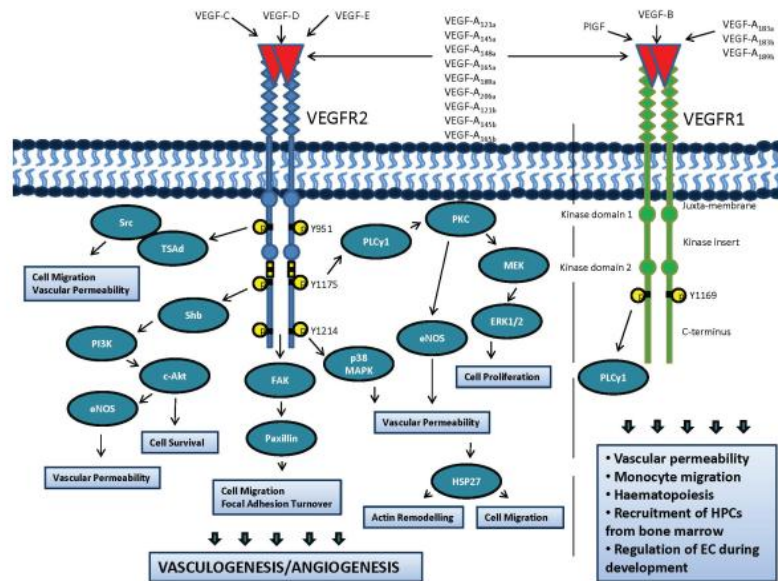


berkurang karena hipoksia dengan konversi menjadi glutathion teroksidasi (GSSG) (Patot, 2004; Wu, 2004).

### 2.7 Endothelial nitric-oxide synthase (eNOS)

Nitric oxide synthase (NOS) terdiri dari tiga isoform yaitu endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), dan inducible NOS (iNOS) (x). Fungsi dari eNOS adalah mengoksidasi L-arginine menjadi L-citruline dan NO. Fungsi normal dari eNOS membutuhkan proses dimerisasi dari enzim, adanya L-arginine, dan adanya cofactor esensial (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4) (). eNOS adalah substansi gas yang berfungsi melakukan regulasi terhadap homeostasis pembuluh darah/endotel. eNOS berperan secara berkelanjutan dalam mengatur diameter pembuluh darah dan menjaga lingkungan pembuluh darah tetap seimbang di dalam lingkungan *anti-apoptotic* dan *anti-proliferative* di dinding pembuluh darah dengan meningkatkan jumlah Nitric Oxide (NO) di pembuluh darah ( Sessa, 2004; Förstermann dan Munzel 2006; Förstermann dan Munzel 2006).

Pada Gambar 2.8 menunjukkan bahwa eNOS dapat dihasilkan melalui jalur PI3K dan PKC. VEGFR1 berikatan dengan VEGFA, VEGFB dan PIGF yang berperan pada homeostasis endotel. Ikatan tersebut akan meningkatkan fosforilasi VEGFR2. VEGFR2 dapat berikatan dengan VEGFA, VEGFC, VEGFD dan VEGFE. Ikatan VEGFR2 dapat mengaktifkan beberapa jalur diantaranya PLC-gamma dan PI3K. Kedua molekul ini akan membentuk endothelial nitric oxide synthase (eNOS) yang akan meningkatkan produksi NO (Fearnley, 2013).



**Gambar 2.9 Ikatan VEGFR1 dan VEGFR2 pada vaskulogenesis atau angiogenesis**

Keterangan : Ikatan antara VEGFR1 dengan VEGF atau PlGF akan meningkatkan fosforilasi dari VEGFR2. VEGFR2 berfungsi dalam sintesis eNOS melalui jalur PLC-gamma dan PI3K (Fearnley, 2013).

Menurut Agarwal, *Nitric oxide synthase* (NOS), merupakan enzim yang mengkatalis pembentukan NO dari O<sub>2</sub> dan L-arginin dibantu dengan NADPH sebagai donor elektron. Terdapat 3 bentuk dari NOS yaitu eNOS, NOS dan nNOS. Pada umumnya produksi NO untuk proses fisiologis tubuh dikatalis oleh eNOS dan nNOS sedangkan iNOS berperan dalam proses patologis di dalam tubuh. nNOS berfungsi sebagai neurotransmitter sedangkan iNOS banyak diekspresikan di makrofag setelah diinduksi oleh sitokin (Agarwal, 2012).

NO adalah salah satu molekul yang memiliki sifat protektif pada pembuluh darah, dan endothelial NO-synthase (eNOS) adalah substansi yang berperan utama dalam proses pembentukan NO di pembuluh darah. NO berfungsi untuk melebarkan pembuluh darah dengan menstimulasi *soluble guanylyl cyclase* dan meningkatkan *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP) pada otot polos endotel.

NO yang berada di lumen pembuluh darah berfungsi sebagai inhibitor agregasi dan perlekatan platelet yang poten. NO juga dapat menghambat perlekatan



leukosit di dinding pembuluh darah dengan mengganggu molekul adhesi leukosit CD11/CD18. NO juga berfungsi untuk menghambat sintesis DNA, mitogenesis, dan proliferasi sel otot polos pembuluh darah serta mencegah proses atherogenesis, dan pembentukan plak di pembuluh darah (Agarwal, 2012).

Percobaan yang dilakukan pada tikus hamil yang dihambat substansi NO synthase nya menunjukkan adanya gejala mirip preeklampsia yang ditandai dengan hipertensi, proteinuria, IUGR, serta gangguan pembuluh darah kapiler. NO memiliki kemampuan sebagai vasodilator endotel, dan mengurangi resistensi pembuluh darah selama kehamilan. Gangguan pada produksi NO, diamati pada pasien preeklampsia, dan rendahnya kadar NO berkorelasi dengan peningkatan sFlt-1 dan sENG (Sandrim *et al.*, 2008).

Pada preeklampsia sistem Nitric Oxide (NO)/ Nitric Oxide synthase (NOS) terganggu pada. NO merupakan vasodilator poten yang memainkan peranan dalam menginduksi relaksasi pada pembuluh darah otot polos via *cyclic guanosine monophosphate pathway*. Penurunan level NO dan peningkatan level arginase merupakan prekursor pada pathway NOS pada preeklampsia. Defisiensi NO menunjukkan adanya hubungan antara kekacauan metabolik pada preeklampsia seperti hipertensi, proteinuria dan disfungsi platelet. Kekacauan ini menyebabkan perubahan pada uteroplasenta seperti penurunan diameter arteri uterina, panjang arteri spiralis dan aliran darah uteroplasenta. Hal ini menandakan bahwa sistem NOS memainkan peranan penting pada remodelling arteri spiralis pada kehamilan (Phipps, 2016).

## 2.8 Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

### 2.8.1 Klasifikasi Tikus Wistar

Kingdom : Animalia

Fillum : Chordata



Sub Fillum : Vertebrata

Class : Mammalia

Ordo : Rodentia

Sub Ordo : Myomorpha

Family : Muridae

Sub Family : Murinae

Genus : Rattus

Spesies : *Rattus norvegicus*

Kelebihan tikus wistar sebagai hewan coba diantara perkembangannya relatif cepat, pemeliharaan mudan dan ukuran yang lebih besar, lebih tenang, kemampuan menyusui tinggi dan tahan pada arsenik (Akbar, 2010).

### 2.8.2 Siklus Estrus Tikus Wistar

Masa ovulasi tikus terjadi pada pertengahan fase estrus. Masa ovulasi tikus dipengaruhi oleh hormon LH (*Luteinizing hormon*). Tikus wistar mengalami fase estrus lebih dari dua kali dalam 1 tahun, siklus reproduksinya juga pendek, panjang siklus sekitar 4-5 hari. Panjang siklus dipengaruhi oleh uisa, cahaya, suara, suhu, nutrisi, hubungan sosial dan stres. Tikus yang ditempatkan dalam tempat yang berbeda memiliki siklus estrus lebih teratur. Siklus estrus akan lebih teratur jika ada pejantan dalam satu kandang (efek whitten). Siklus yang teratur juga didapatkan jika pencahayaan yang diterapkan adalah 12 jam siang dan 12 jam malam. Berikut ini adalah karakteristik beberapa fase reproduksi pada tikus wistar (Cora *et al.*, 2015) :

#### 1. Fase Proestrus

Fase Proestrus adalah fase yang terjadi sekitar 14 jam pada tikus (fase pendek). Tanda yang dapat dilihat yaitu sel epitel bulat, berukuran seragam, berinti sama, dan kecil. Tanda yang lain adalah sering bergerombol



(seperti anggur), bercampur basofil, disertai sedikit neutrofilnya pada fase proestrus awal. Sel keratin lebih banyak saat mendekati fase estrus.

## 2. Fase Estrus

Fase ini terjadi sekitar 24-48 jam. Tanda yang dapat dilihat adalah adanya oksidasi dari sel keratin. Bakteri akan menempel di sel. Pada fase ini sebagian besar sel adalah sel tidak berinti. Sel berinti terkadang ada di seluruh fase ini, walaupun hanya sedikit. Neutrofil hanya terlihat di akhir fase estrus.

## 3. Fase Metestrus

Fase yang terjadi sekitar 6-8 jam. Fase ini ditandai dengan adanya kombinasi antara neutrofil dan sel epitel anukleat. Sel yang dominan atau banyak adalah leukosit sedangkan neutrofil jarang atau kadang ditemukan.

## 4. Fase Diestrus

Fase ini merupakan fase paling panjang yaitu sekitar 48-72 jam. Sel yang dominan adalah sel leukosit dan sel berinti.

### 2.8.3 Proses Sinkronisasi pada Fase Estrus

Sinkronisasi pada fase estrus bertujuan untuk menyamakan terjadinya gejala estrus dan ovulasi pada sekelompok hewan pada waktu yang bersamaan. Efek Lee-Boot akan muncul apabila mengumpulkan tikus dengan jenis kelamin betina dalam satu kandang. Efek Lee-Boot adalah perpanjangan siklus estrus tikus (gangguan hormonal pada siklus estrus). Efek Lee-Boot ini dapat hilang dengan memberikan bau tikus jantan atau menempatkan tikus jantan pada kandang yang sama dengan tikus betina (Efek Whitten) (Tirindelli et al., 2009; Cora et al., 2015).

Sinkronisasi pada fase estrus tikus dapat dilakukan dengan efek feromon. Feromon adalah sinyal kimia yang dimiliki suatu organisme sehingga akan menarik bagi organisme lainnya. Feromon pada tikus salah satunya terdapat



pada urin karena mengandung konstituen volatil untuk komunikasi kimia. Kadar volatil pada tikus jantan dewasa akan menarik bagi tikus betina. Cara yang dilakukan untuk sinkronisasi fase estrus tikus yaitu dengan mengganti sekam tikus betina dengan sekam bekas tikus jantan selama 3 hari (72 jam) (Dodge *et al.*, 2002; Tirindelli *et al.*, 2009; Cora *et al.*, 2015).

## 2.9 L-NAME

Hewan coba merupakan alat yang efektif digunakan untuk mempelajari berbagai patogenesis, disgnostik dan metode pengobatan pada berbagai penyakit, termasuk preeklamsia. Telah diketahui bahwa pada preeklamsia, terjadi penurunan NO di selendotel pembuluh darah yang mana sangat penting untuk mengatur ketegangan pembuluh darah. *N-Nitro-L-arginin metil ester* (L-NAME) adalah inhibitor dari *nitric oxide xynthase* (NOS). Penurunan NOS akan meningkatkan hipertensi pada hewan coba tikus. Preeklamsia berhubungan dengan gangguan endotel vaskuler dan inflamasi, oleh karena itu penting untuk membuat hewan coba model preeklamsia yang meniru patologi vaskuler preeklamsia sehingga akan lebih mudah dalam memahami onset dan perkembangan preeklamsia (Shu *et al.*, 2018).

L-NAME dikenal sebagai bahan untuk membuat model penelitian hipertensi, penyakit jantung dan penyakit ginjal. Mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat NOS yang akan menyebabkan penurunan NO. Penurunan produksi NO dihubungkan dengan adanya peningkatan signifikan tekanan darah maternal, hilangnya refraktori vaskular terhadap stimulus, dan penurunan berat plasenta. Pemaparan L-NAME pada tikus akan menggambarkan penurunan perfusi plasenta sama dengan manusia sehingga penggunaan L-NAME ini akan berguna untuk membuat model preeklamsia pada penelitian (Oludare *et al.*, 2018).



Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan pada hewan coba tikus dengan pemberian L-NAME berbagai dosis (40 mg/kgBB/hari, 75mg/kgBB/hari dan 125 mg/kgBB/hari) yang diberikan mulai hari ke 9 sampai dengan hari pembedahan.

Hasil yang didapatkan pada pemberian dosis L-NAME 40 mg/kgBB/hari adalah perbedaan tekanan darah sistolik dan diastolik signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Terjadi peningkatan rasio sFlt-1/PIGF secara signifikan pada tikus yang diinjeksi L-NAME pada dosis 40 mg/kgBB/hari.

Pengukuran MDA dilakukan setelah tikus diinjeksi L-NAME dosis 75 mg/kgBB/hari didapatkan hasil lebih tinggi signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Pemberian L-NAME juga berpengaruh pada sitokin inflamasi yaitu MCP-

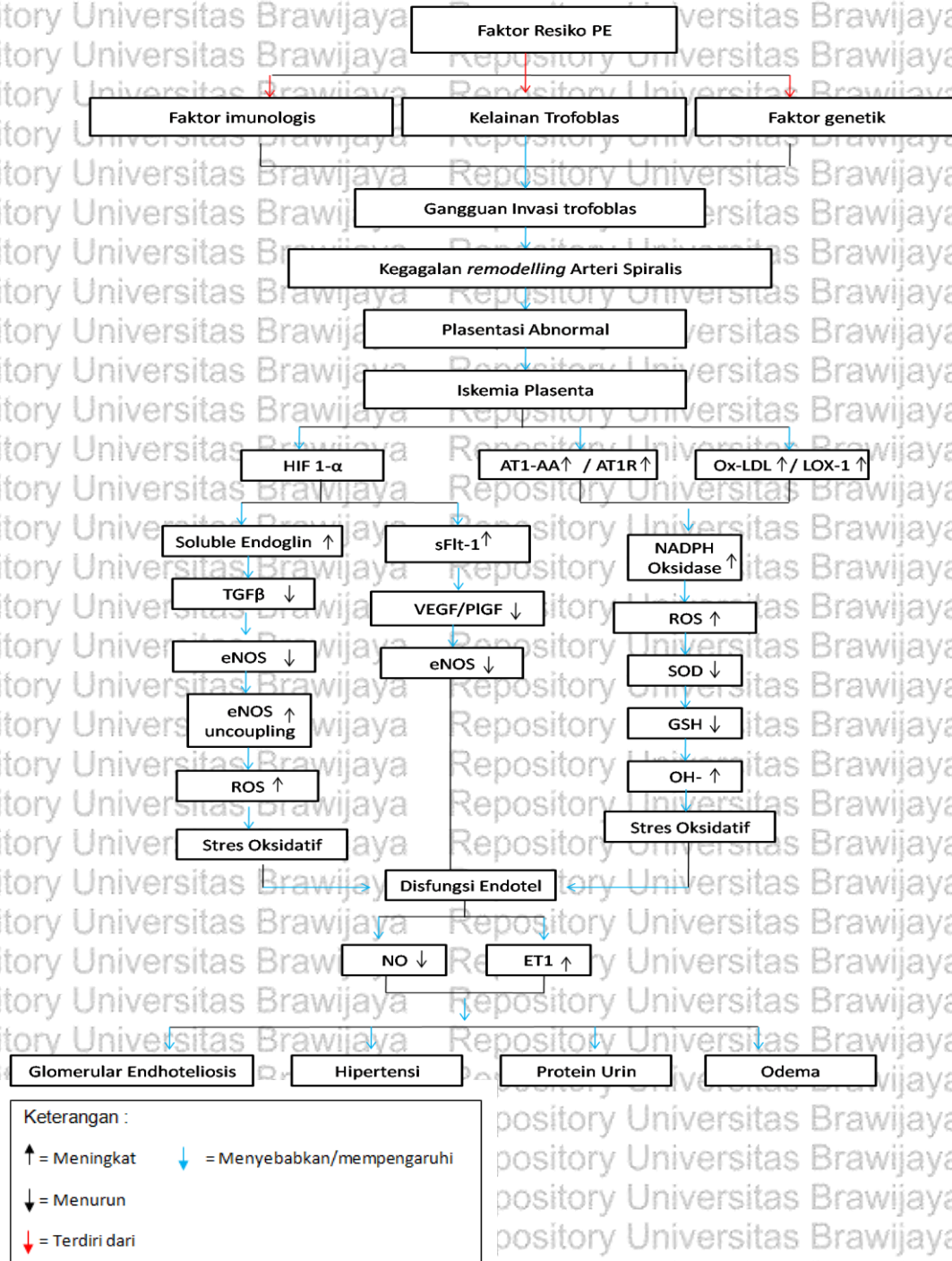
1. Pada tikus juga didapatkan NO menurun secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Shu *et al.*, 2018).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Zhu (2018), pemberian L-NAME dilakukan pada usia kebuntingan tikus hari ke 13 dengan dosis 125 mg/kgBB, dan dilakukan pengukuran tekanan darah dan protein urin dengan hasil peningkatan yang signifikan (Zhu, 2016)

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori



### 3.2 Keterangan Kerangka Teori

Beberapa faktor resiko terjadinya preeklamsia pada ibu hamil diantaranya faktor imunologi, terjadinya kelainan trofoblas dan faktor genetik. Menurut Gathiram Dan Moodley (2016) ada beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab terjadinya preeklamsia, diantaranya: variasi genetik abnormal, kelainan pada trofoblas, mekanisme pertahanan dari makrofag, gangguan pada sel NK dan sel endotel. Gangguan yang terjadi pada preeklamsia tersebut menyebabkan gangguan invasi trofoblas seperti yang dijelaskan oleh Sanjaya (2014) bahwa pada preeklamsia, invasi trofoblas pada pembuluh darah uterus tidak lengkap. Gangguan invasi trofoblas menyebabkan kegagalan *remodelling* arteri spiralis. Gangguan *remodelling* dari arteri spiralis pada uterus oleh *ekstravilus trofoblas* (EVT) memegang peranan untuk menurunkan perfusi plasenta. Konsekuensi dari gangguan aliran darah ini menyebabkan iskemia plasenta.

Pada saat keadaan iskemia plasenta terjadi peningkatan HIF-1 $\alpha$  pada plasenta akan mengakibatkan perubahan faktor angiogenik yaitu adanya pengeluaran *soluble FMS like Tyrosine kinase 1* (sFlt-1) dan sENG. HIF-1 $\alpha$  sangat sensitif terhadap oksigen sehingga akan teraktivasi dengan cepat saat terjadi hipoksia (Herrera *et al.*, 2014). Disfungsi endotel pada preeklamsia dimediasi oleh sFlt-1 atau reseptor 1 VEGF menjadi patogenesis dari preeklamsia. sFlt-1 mengikat dan menghambat aktivitas VEGF dan PIGF (Sanchez *et al.*, 2002; Nevo *et al.*, 2006; Osol, 2017).

VEGF berperan dalam pengaturan proses neurovaskuler dan berperan dalam pembentukan atau produksi NO dengan cara meningkatkan ekspresi eNOS. sENG (koreseptor TGF $\beta$ ) meningkat pada serum penderita preeklamsia. sENG akan menginduksi permeabilitas kapiler dan menyebabkan hipertensi. sENG menghambat ikatan TGF $\beta$  dan reseptornya sehingga menurunkan aktivasi eNOS



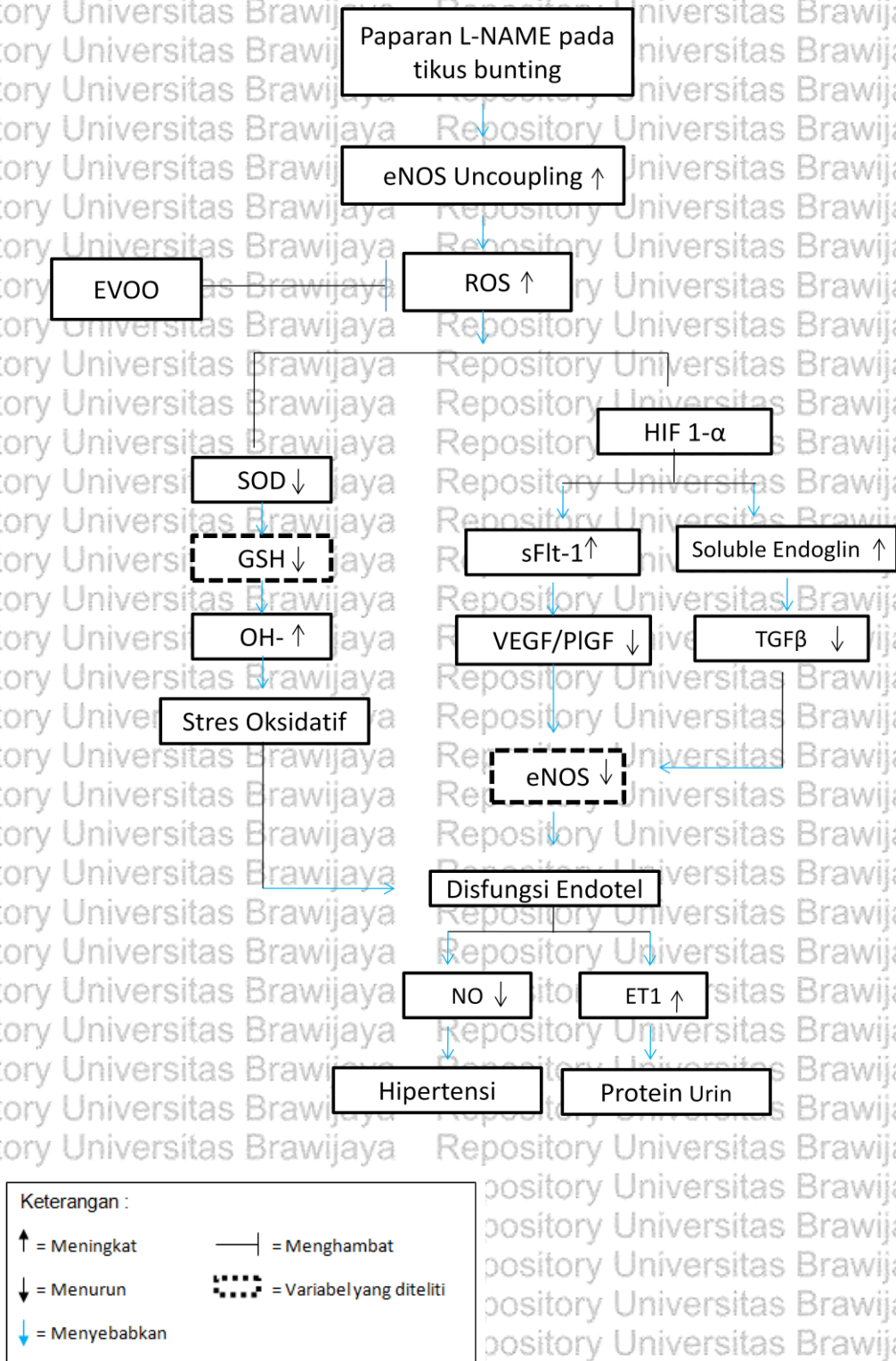
dan vasodilatasi. Rendahnya aktivitas eNOS menyebabkan L-Arginin tidak dapat disintesis menjadi NO disertai dengan tingginya aktivitas eNOS uncoupling yang akan menghasilkan radikal bebas ( $O_2^-$ ). Reaksi antara NO dengan  $O_2^-$  akan memproduksi prooksidan poten yaitu peroksinitrit anion ( $ONOO^-$ ).  $ONOO^-$  bersifat sangat toksik dan menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid (Zuniga, 2014). Penurunan NO akan menyebabkan peningkatan ekspresi gen preproET-1 dan pada akhirnya akan menyebabkan peningkatan ET-1 (Venkatesha, 2006; Bourque *et al*, 2011)

Pada iskemia plasenta akan terjadi peningkatan AT1-AA. AT1-AA mengaktifkan angiotensin II reseptor (Sanjay, 2104). Beberapa fungsi dari AT1-AA adalah meningkatkan sFlt-1 dan mengaktifkan NADPH Oksidase untuk memproduksi ROS. AT1-AA berperan menghambat migrasi trofoblas, terbukti menginduksi ROS secara *in vitro* dan menginduksi gejala preeklamsia pada hewan coba. Pada preeklamsia terjadi peningkatan LDL teroksidasi dan reseptornya. Ikatan antara ox-LDL dan LOX-1 mengaktifkan NADPH oksidase yang mana akan meningkatkan ROS intraseluler ( $O_2^-$  dan  $H_2O_2$ ) yang mana akan menurunkan NO. Pada saat ROS meningkat, tubuh mengkompensasi dengan pengeluaran antioksidan endogen yaitu SOD dan GSH. Pada saat jumlah ROS tinggi, antioksidan endogen seperti SOD dan GSH tidak mampu untuk mengimbangi jumlah ROS. GSH-PX tidak mampu untuk mereaksikan GSH dan  $H_2O_2$  menjadi air dan GSSG. Apabila  $H_2O_2$  bereaksi dengan logam transisi akan terbentuk radikal hidroksil, bentuk paling radikal dari radikal bebas. Peningkatan radikal hidroksil dan penurunan antioksidan disebut sebagai stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan merusak membran sel, nukleus dan sel endotel sehingga terjadi disfungsi endotel. Disfungsi endotel akan menyebabkan penurunan NO dan peningkatan ET1 (Lyll & Beelfort, 2007; Lankhorst *et al*, 2012; Seki, 2013; Zuniga, 2014).



Beberapa faktor tersebut yaitu dari peningkatan HIF1- $\alpha$  diikuti dengan jalur perubahan faktor antiangiogenik dan peningkatan AT1-AA dan ox-LDL akan menyebabkan disfungsi endotel diikuti dengan peningkatan ET1 dan penurunan NO sehingga memunculkan sindroma klinis seperti odema, protein urin, hipertensi dan Glomerular endotheliosis.

### 3.3 Kerangka Konsep



**Gambar 3.2 Kerangka Konsep**



### 3.4 Keterangan Kerangka Konsep

Pada penelitian ini model tikus bunting preeklamsia dilakukan dengan cara paparan L-NAME pada tikus. Setelah diberikan paparan diharapkan terjadi peningkatan radikal bebas plasenta. Hipoksia plasenta akan menginduksi terjadinya iskemia plasenta.

Tingginya ROS ( $O_2$ ) di dalam tubuh akan menyebabkan menurunnya antioksidan endogen yaitu SOD. Penurunan SOD diikuti oleh penurunan antioksidan endogen lainnya yaitu GSH. Ketika GSH turun maka Hidrogen peroksida tidak dapat dikatalis oleh GSH-PX menjadi GSSG dan air. Hidrogen peroksida yang bereaksi dengan logam transisi akan membentuk radikal bebas yaitu OH $\cdot$ . Jika jumlah ROS berlebih dan antioksidan terbatas maka akan terjadi stres oksidatif, stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid dan menyebabkan disfungsi endotel.

Selain itu, hipoksia dan iskemia plasenta akan menyebabkan tingginya HIF 1- $\alpha$  yang mana akan meningkatkan faktor angiogenik yaitu sFlt-1 dan sENG. Peningkatan sFlt-1 akan menyebabkan penurunan VEGF dan PlGF. Penurunan VEGF akan menurunkan produksi NO akan menurun. HIF 1- $\alpha$  juga akan menyebabkan peningkatan sENG yang mana akan diikuti dengan penurunan TGF $\beta$  dan berpengaruh pada penurunan NO. Dengan adanya penurunan NO diharapkan menyebabkan terjadinya manifestasi klinis berupa hipertensi pada tikus model preeklamsia.

Pada penelitian ini, digunakan upaya preventif oleh antioksidan dari EVOO. Antioksidan ini bekerja menghambat ROS sehingga proses peningkatan ROS hingga hipertensi sebagai tanda dan gejala dari preeklamsia dapat dicegah.



## Hipotesis Penelitian

### 3.5.1 Hipotesis Umum

Extra virgin olive oil meningkatkan kadar glutation (GSH) dan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus model preeklamsia.

### 3.5.2 Hipotesis Khusus

1. Ada penurunan kadar GSH pada tikus model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
2. Ada penurunan kadar eNOS pada tikus model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
3. *Extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar GSH pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.
4. *Extra virgin olive oil* (EVOO) meningkatkan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratories. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Grup design* yang dilakukan secara *in vivo*. Penelitian ini menggunakan tikus bunting diinjeksi L-NAME. Subjek dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok kontrol (-) adalah tikus bunting yang dipapar atau diinjeksi PBS. Kelompok kontrol (+) adalah tikus bunting yang dipapar atau diinjeksi L-NAME. Kelompok perlakuan 1 - 3 adalah tikus bunting yang dipapar atau diinjeksi plasma L-NAME dan diberikan extra virgin olive oil dengan tiga dosis yang berbeda. Selanjutnya akan diukur kadar GSH dan eNOS dari masing – masing sampel.

#### 4.2 Populasi Penelitian, Teknik Pengambilan dan Replikasi

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus galur wistar yang dibuntingkan kemudian dibagi menjadi 5 kelompok.

##### 4.2.2 Besar Replikasi

Besar replikasi adalah banyaknya pengulangan/replikasi pengukuran atau pengamatan yang dilakukan dalam setiap kelompok penelitian.

Jumlah replikasi (n) pada setiap perlakuan (p) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan  $p=5$  :

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

$$pn-p \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$



$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = perlakuan

Dari perhitungan didapatkan  $n \geq 4$ , jadi dilakukan minimal 4 kali replikasi untuk masing – masing kelompok. Dalam penelitian ini akan menggunakan 4 replikasi untuk masing – masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 20 ekor tikus bunting.

Pembagian sampel penelitian :

1. Kelompok (-) : Tikus bunting yang tidak dipapar L-NAME dan EVOO (Tikus bunting normal) dan diinjeksi PBS.
2. Kelompok (+) : Tikus bunting yang dipapar atau diinjeksi L-NAME hari 9-18 kebuntingan (tikus model preeklamsia)
3. Kelompok 1 : Tikus bunting model preeklamsia yang ditambahkan EVOO sebanyak 0,5 mL/hari hari ke 1 -18 kebuntingan
4. Kelompok 2 : Tikus bunting model preeklamsia yang ditambahkan EVOO sebanyak 1 mL/hari hari ke 1 -18 kebuntingan
5. Kelompok 3 : Tikus bunting model preeklamsia yang ditambahkan EVOO sebanyak 2 mL/hari hari ke 1 -18 kebuntingan

#### 4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi :

- Jenis kelamin tikus : betina
- Berat badan tikus : 150-200 gram
- Umur tikus : minimal 8 minggu
- Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata yang jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih.

- Tikus belum pernah bunting sebelumnya

- Tikus Bunting

- Tikus Model Preeklamsia TD  $\geq 140/90$  mmHg dan protein urin  $\geq +1$

Kriteria Eksklusi:

- Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

- Terlalu cepat melahirkan (keguguran dan prematur).

- Tikus cacat.

- Tikus yang sudah pernah mendapatkan perlakuan sebelumnya pada penelitian lain

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, laboratorium Fisiologi dan laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dilakukan selama 4 bulan yaitu Februari 2018 – Mei 2019.

#### 4.4 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.4.1 Bahan Penelitian

##### 4.4.1.1 Bahan Untuk Perlakuan Hewan coba

###### 1) Paparan L-NAME

Bahan induksi preeklamsia menggunakan NOS inhibitor L-NAME ( $C_7H_{15}N_5O_4 \cdot HCl$ ) dari Sigm-Aldrich (Merk KgaA, Damstadt, Germany, aquades, PBS, dan alkohol swab.

###### 2) Pemberian EVOO

Diberikan EVOO merk Borges.



#### 4.4.1.2 Bahan Untuk Pemeriksaan Kadar GSH

Kit yang akan digunakan adalah *Reduced Glutathione Assay Kit* Merk *Elabscience* Catalog No : E-BC-K051, Bahan yang ada di dalam kit antara lain :

- 1) Reagen 1 : Buffer Solution 45 mL x 2 vials
- 2) Reagen 2 : Phosphate, powder x 1 vial
- 3) Reagen 3 : DTNB Solution 30mL x 1 vial
- 4) Reagen 4 : Salt Reagen, powder x 4 vials
- 5) Reagen 5 : GSH Standard Powder, 3.07 mg x 3 vials
- 6) GSH Standard Stock Solution, 6 mL x 1 vial

#### 4.4.1.3 Bahan untuk Pemeriksaan eNOS

Kit yang digunakan adalah Rat NOS3/eNOS (Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial) ELISA Kit catalog number E-EL-R0367 dari elabscience.

1. Micro ELISA Plate (Dismountable) 8 wells x 12 strips
2. Reference Standard 2 vials
3. Concentrated Biotinylated Detection Ab (100×) 1 vial, 120 µL
4. Concentrated HRP Conjugate (100×) 1 vial, 120 µL
5. Reference Standard & Sample Diluent 1 vial, 20 mL
6. Biotinylated Detection Ab Diluent 1 vial, 14 mL
7. HRP Conjugate Diluent 1 vial, 14 mL
8. Concentrated Wash Buffer (25×) 1 vial, 30 mL
9. Substrate Reagent 1 vial, 10 mL
10. Stop Solution 1 vial, 10 mL
11. Plate Sealer 5 pieces
12. Deionized or distilled water
13. Absorbent paper
14. Loading slot for Wash Buffer



#### 4.4.2 Alat Penelitian

##### 4.4.2.1 Alat Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- 1) Kandang tikus yang berupa box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm sebanyak 5 buah diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa. Masing – masing kandang ditempati 4 tikus bunting.
- 2) Tempat minum

##### 4.4.2.2 Alat Untuk Perlakuan Hewan Coba

- 1) L-NAME  
Sprit 1 cc, mortar, gelas ukur, timbangan micro digital.
- 2) EVOO  
Sprit ukuran 1 cc, sonde

##### 4.4.2.3 Alat Untuk Pembedahan Hewan Coba

- 1) Stik besi
- 2) Alas lilin
- 3) Gunting bedah
- 4) Pinset
- 5) Jarum pentul
- 6) Plastik tempat jaringan
- 7) Timbangan micro digital

##### 4.4.2.4 Alat untuk Pemeriksaan kadar GSH

- 1) Test tube
- 2) Micropipettor
- 3) Vortex mixer
- 4) Centrifuge
- 5) Spectrophotometer (420 nm)



#### 4.4.2.5 Alat untuk Pemeriksaan eNOS

- 1) Microplate reader with 450 nm wavelength filter
- 2) High-precision transfer pipette, EP tubes and disposable pipette tips
- 3) Incubator capable of maintaining 37°C

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Pemberian extra virgin olive oil dengan 3 dosis 0.5 mL/hari, 1 mL/hari dan 2 mL/hari.

##### 4.5.2 Variabel Tergantung

Kadar eNOS dan Kadar GSH

#### 4.6 Definisi Operasional

##### 1. Tikus bunting

Tikus (*Rattus Norvegicus*) betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan selama satu malam dan ditemukan vaginal plug.

##### 2. Tikus Bunting Model Preeklamsia

Tikus bunting yang diinjeksi dengan L-NAME dosis 125 mg/kgBB/day usia kebuntingan 13-18 dan didiagnosa dengan tekanan darah sistole  $\geq 140$  mmHg, tekanan darah diastole  $\geq 90$  mmHg dan protein urin  $> 10 \mu\text{g}$  atau protein urin  $\geq +1$  (Zhu, 2018).

##### 3. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) adalah antioksidan endogen di dalam tubuh atau biasa disebut antioksidan enzimatis. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan dari sampel plasenta menggunakan *Reduced Glutathione Assay Kit* Merk



Elabscience Catalog No : E-BC-K051. Satuan kadar glutathion adalah mgGSH/gprotein.

#### 4. Endothelial nitric-oxide synthase (eNOS)

Endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) adalah salah satu isomer nitric oxide synthase yang berperan dalam pembentukan atau produksi nitric oxide (NO) dan spesifik pada sel endothel. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan dari sampel plasenta. Rat NOS3/eNOS (Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial) ELISA Kit catalog number E-EL-R0367 dari elabscience. Satuan Kadar eNOS adalah pg/mL.

#### 5. EVOO

Extra Virgin Olive Oil yang diberikan merk borges dengan dosis 0.5 mL/hari, 1 mL/hari, 2 mL/hari dan diberikan melalui sonde diberikan mulai hari 1-18 kebuntingan (Nugraheny, 2012; Irianti, 2017).

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi (penyesuaian/adaptasi lingkungan) bagi hewan coba dilakukan selama 7 hari pada temperatur ruangan konstan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Pada saat aklimatisasi, tikus hanya diberi pakan berupa pallet dengan konsistensi lembek dan air mineral *ad libitum*.

#### 4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Tempat pemeliharaan menggunakan box plastik berukuran 12 x 35 x 45 cm, masing-masing untuk 4 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam yang diganti 3 hari sekali. Cahaya ruangan dikontrol 12 jam terang (jam 06.00 s.d. 18.00 WIB) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 s.d 06.00 WIB). Temperatur dan kelembapan udara ruangan dibiarkan pada kisaran suhu ruang (26-27°C).

Tikus diberi makan yang berbentuk pallet (bulat) dengan komposisi protein kasar,



lemak kasar, kalsium dan fosfor, pada saat diberikan sebelumnya dicampur merata dengan air sehingga konsistensinya tidak keras. Porsi makanan tikus adalah 50 g/hari/ekor. Pemberian minum diberikan secara *ed libitum*.

#### 4.7.3 Prosedur Pembuatan Tikus Bunting Model Preeklamsia dengan L-NAME

Sebelum dikawinkan, tikus betina ditimbang menggunakan neraca ohaus pada usia reproduksi. Tikus betina diberikan bau tikus jantan untuk memulai siklus estrus (efek feromon) dengan memindahkan tikus betina ke bekas kandang tikus jantan selama 72 jam (efek whitten) (Tirindelli, 2009; Cora *et al.*, 2015). Kemudian tikus dikawinkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:1 dalam 1 malam (Liu dan Yang, 2015). Pengawinan tikus dilakukan pada siklus gelap selamasatu malam. Tikus bunting kemudian diberi tanda /label (permanent board maker) dan selanjutnya dimasukkan ke dalam kelompok yang telah ditentukan. Berdasarkan hasil eksplorasi pada penelitian ini, tingkat keberhasilan kebuntingan tikus sebesar 50% maka dilakukan pembuntingan dengan jumlah tikus betina lebih banyak untuk memperoleh tikus bunting sesuai dengan jumlah sampel yang dibutuhkan (Lampiran 9).

Tikus bunting diinjeksi larutan L-NAME intraperitoneal dari usia kebuntingan 13 – 18 dengan dosis 125 mg/kgBB/hari (Zhu, 2016).

Perhitungan dosis pemberiannya adalah sebagai berikut :

1. Dosis L-NAME yang digunakan adalah 125 mg/kgBB. Dosis L-Name masing – masing tikus dilarutkan dalam 0.2 cc PBS. Pelarutan PBS dilakukan dengan perbandingan 1 tablet : 100 cc aquades.
2. Pada kontrol negatif, diberikan injeksi PBS 0.2 cc secara intraperitoneal dilakukan 1 kali per hari.



#### 4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Tekanan Darah

Pengukuran tekanan darah dilakukan setelah tikus bunting diberikan injeksi L-NAME pada hari ke 12, setelah pemberian L-NAME pada hari ke 15 dan pada hari ke 19. Prosedur pemeriksaan dilakukan di laboratorium fisiologi sesuai dengan prosedur pengukuran di laboratorium yaitu :

- 1) Memposisikan hewan coba pada pegangan yang berbentuk seperti tabung dengan memastikan ekor hewan berada di luar tabung.
- 2) Manset VPR digeser sampai ekor dengan ujung diameter yang lebih besar pertama sampai mencapai manset oklusi. Cukup gunakan manset satu ukuran yang lebih besar. Jika ekor bengkak dapat dirasakan pada setiap bagian dari ekor selama ada porsi yang cukup pada manset VPR.
- 3) Mengamankan manset tabung oklusi yang terletak di belakang pengikat hitam di atas dudukan. Hal ini akan membantu dalam menjaga manset di posisi.

Untuk mempertahankan posisi manset, mengamankan manset tabung di dalam alur yang terletak di belakang pengikat hitam di atas dudukan.



Gambar 4.1 Alat Pengukur Tekanan Darah Tikus



#### 4.7.5 Prosedur Pengukuran Protein Urin

Pengukuran protein urin dilakukan pada hari ke 12, 15 dan 19 kebuntingan.

Urin tikus diambil dengan cara tikus ditempatkan pada kandang metabolik. Urin ditampung selama satu malam dan selanjutnya dilakukan pengukuran protein urin. Pengukuran protein urin dilakukan dengan menggunakan Uriscan 3 GPH strip.



**Gambar 4.2 Kandang Metabolik**

#### 4.7.6 Prosedur Perhitungan Dosis EVOO

Pemberian dosis EVOO yang diberikan sesuai dengan hasil konversi dosis manusia ke hewan coba. Pemberian EVOO berpedoman pada rata – rata konsumsi masyarakat mediterania (30-50 gram/hari) untuk berat badan 70 kg dikonversikan ke berat badan tikus 200 gram dengan perhitungan  $30 \times 0.018 = 0.5$  gram. Pemberian EVOO sebesar 0,5 gr/hari digunakan sebagai dosis pertama selanjutnya untuk dosis 2 dan 3 merupakan kelipatan dari dosis pertama (nugraheny, 2012; Irianti, 2017). Sediaan EVOO berupa cairan sehingga ketiga dosis tersebut diubah ke satuan ml dengan rumus massa jenis :

$$\rho = m/v$$



Keterangan :

$\rho$  = massa jenis ( $\frac{\text{gram}}{\text{cm}^3}$ )

$m$  = massa (gram)

$v$  = volume ( $\text{cm}^3$ )

Diketahui massa jenis EVOO adalah  $0.92 \text{ gram/cm}^3$ , sehingga diketahui dosis

EVO dalam ml :

$$0.5 \text{ gr/hari}, v = 0.5/0.92$$

$$= 0.54$$

$$= 0.5 \text{ ml/hari}$$

$$1 \text{ gr/hari}, v = 1/0.92$$

$$= 1.09$$

$$= 1 \text{ ml/hari}$$

$$2 \text{ gr/hari}, v = 2/0.92$$

$$= 2.17$$

$$= 2 \text{ ml/hari}$$

#### 4.7.7 Prosedur Pemberian EVOO pada Tikus

Tikus diberikan EVOO mulai hari ke 1 sampai hari ke 18 kehamilan. EVOO diberikan setiap hari dengan peroral menggunakan sonde.

#### 4.7.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Bahan Pemeriksaan

##### 1) Plasenta/Organ

Pembedahan dilakukan dengan *servical dislocation*. Tikus dibedah dan diambil organ plasentanya untuk dilakukan pemeriksaan. Prosedur pengambilan organ plasenta adalah sebagai berikut :

##### (1) Peralatan dan bahan yang digunakan untuk bedah minor disiapkan



(2) Tikus yang sudah tidak bergerak lagi diletakkan diatas alas kayu dengan perut menghadap ke atas dan jarum suntik (needle) ditancapkan pada ke empat telapak kaki.

(3) Dinding perut dibuka dengan gunting dan pinset secara hati – hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah selanjutnya diafragma dibuka.

(4) Secara hati – hati membuka selaput janin kemudian memisahkan janin dengan plasenta

(5) Plasenta diambil, kemudian ditimbang dan digunakan sebagai sampel pemeriksaan.

#### 4.7.9 Prosedur Perlakuan setelah Penelitian Terhadap Hewan Coba

Penguburan induk dan anak tikus yang sudah tidak digunakan dilakukan oleh petugas laboratorium sesuai prosedur standar laboratorium.

#### 4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar GSH

1) Persiapan Sampel : Timbang jaringan dalam keadaan dingin, tambahkan PBS (0.01 M, PH 7.4) dengan perbandingan berat(g) : volume (mL) = 1:19. Gerus jaringan pasenta pada keadaan dingin, sentrifugasi di 10000g selama 15 menit. Ambil 0.7 mL supernatan, tambahkan 0.7 mL reagen 1 dan campur, kemudian sentrifuse di 4500g selama 10 menit.

2) *Blank tube* : tambahkan 1 mL reagen 1 pada 5 mL EP tube

*Standard tube* : tambahkan 1 mL dari 20  $\mu\text{mol/L}$  GSH standard solution pada 5 mL EP tube

*Sample tube* : Tambahkan 1 mL supernatan pada 5 mL EP tube

3) Tambahkan reagen 2 sebanyak 1.25 mL, reagen 3 0.25 mL, reagen 4 0.05 mL pada masing – masing tube

4) Campurkan dan tunggu 15 menit pada suhu ruang. Siapkan spektrofotometer pada 0 dengan distilled water dan ukur nilai OD masing –

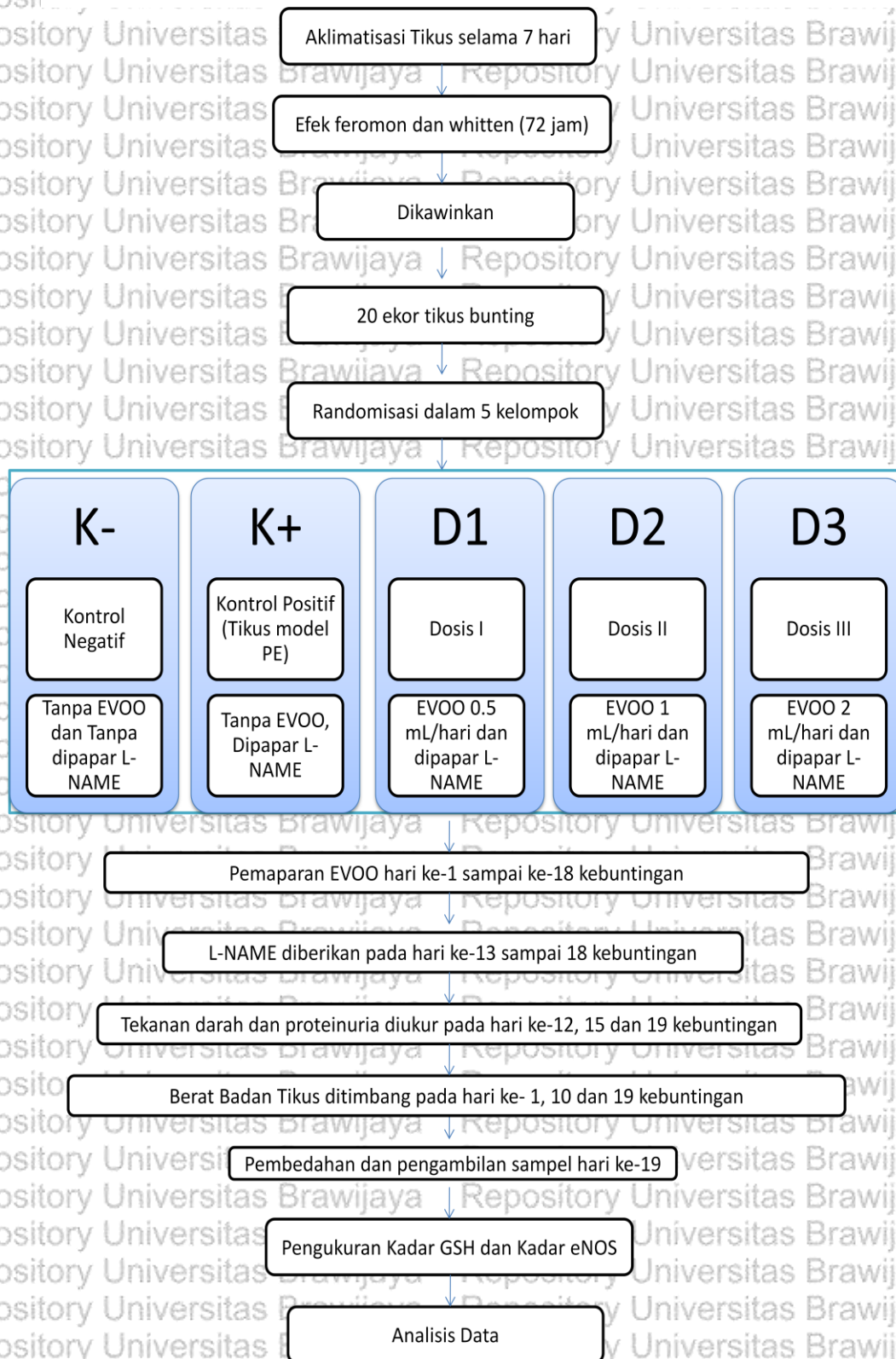


masing tube dengan panjang gelombang 420 nm dengan cuvet beriameter 1 cm.

#### 4.7.11 Prosedur pengukuran kadar eNOS

- 1) Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  standar eNOS atau sampel pada masing2 well. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 90 menit.
- 2) Buang cairan
- 3) Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  Biotinylated Detection Ab. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 1 jam. Ambil/aspirasi dan cuci 3 kali
- 4) Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  HRP conjugat. Inkubasikan selama 30 menit pada 37 °C. Aspirasi dan cuci 5 kali.
- 5) Tambahkan 90  $\mu\text{L}$  substrate reagent.Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 15 menit
- 6) Tambahkan 50  $\mu\text{L}$  stop solution
- 7) baca pada 450 nm segera.
- 8) Hitung hasil.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian



#### 4.9 Teknik Analisis Data

Hasil penghitungan kadar GSH dan eNOS masing – masing kelompok dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p < 0,05$ ). Langkah-langkah uji data adalah sebagai berikut :

- a. Uji normalitas data : bertujuan untuk mengetahui apakah data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis bergantung pada normal tidaknya distribusi data. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Uji normalitas menggunakan metode statistik uji *kolmogorof-smirnov* dengan  $\alpha=0.05$ . Jika didapatkan  $p\text{ value} > 0.05$  dan dapat dilanjutkan dengan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA*.
- b. Uji homogenitas varian : Apabila varian dalam kelompok homogen, maka asumsi untuk menggunakan Anova telah terpenuhi.
- c. Uji *One Way Anova* (analisa varian satu arah) : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- d. *Multiple Comparison* : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji Anova. Multiple comparison yang dipakai dalam *software spss* disebut Uji *Post hoc* yaitu uji *LSD* dengan tingkat signifikansi 95% ( $p < 0,05$ ).
- e. Uji korelasi *Pearson* : untuk mengetahui ada atau tidaknya tingkat keeratan antara variabel terukur (minimal berskala interval).

**BAB 5****HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA****5.1. Gambaran Umum Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, laboratorium Ilmu Faal, dan laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya menggunakan 20 hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing –masing kelompok 4 tikus bunting.

Sampel yang digunakan adalah plasenta tikus yang diambil dengan pembedahan pada usia kebuntingan hari ke 19. Sampel plasenta kemudian di gerus (*Tissue homogenate*), di sentrifugasi dan disimpan pada suhu -40°C dan diukur aktivitas GSH dan kadar eNOS setelah semua sampel terkumpul.

Penelitian dilakukan bulan Februari – Mei 2019. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh Extra Virgin Olive Oil terhadap kadar GSH dan kadar eNOS pada plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia.

**5.1.1. Gambaran Umum Hewan Coba**

Penelitian ini menggunakan 20 hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing –masing kelompok terdiri dari 4 tikus bunting.

Tingkat keberhasilan dari kebuntingan tikus pada penelitian ini sebesar 50%.

Oleh karena itu pembuntingan tikus dilakukan dengan cara mengawinkan 50 tikus betina menjadi 3 periode sehingga didapatkan jumlah tikus bunting sesuai besar sampel. Pembuntingan 1 dilakukan dengan mengawinkan (*mating*) 20 ekor tikus betina dan tikus jantan dengan pebandingan 1:1 didapatkan 10 ekor tikus bunting. Pada *mating* 2, 15 tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan didapatkan 9 ekor tikus bunting. Pada *mating* 3 dengan mengawinkan 15 tikus betina dengan tikus jantan didapatkan 7 ekor tikus bunting. Kebuntingan tikus



dievaluasi dengan peningkatan berat badan induk tikus mulai hari kebuntingan 1, 10 dan 19. Tikus bunting di berikan EVOO per oral mulai hari kebuntingan 1-18.

Pemeriksaan kandungan antioksidan yang dilakukan di laboratorium pengujian mutu dan keamanan pangan pada EVOO merk Borges (Nomor : 0263/THP/LAB/2018) diketahui bahwa kandungan antioksidan IC50 adalah sebesar 48,56 mg/ml (antioksidan sangat kuat).

Pembuatan tikus model preeklamsia dilakukan dengan injeksi L-Name 125 mg/kgBB mulai usia kebuntingan hari ke 13-18. Diagnosis tikus model preeklamsia yaitu tikus bunting dengan tekanan darah  $\geq 140$  mmHg dan protein urin  $\geq +1$  (Shu, 2018). Evaluasi tikus model preeklamsia dilakukan dengan pengukuran tekanan darah dan protein urin pada hari ke 12 (sebelum injeksi L-NAME), 15 (setelah pemberian L-NAME) dan 19 (sebelum dibedah).

## 5.2 Hasil Pengukuran Tanda Klinis Preeklamsia Karakteristik Klinis Tikus Preeklamsia

Dilakukan pengukuran tekanan darah pada hari ke-12, hari ke-15 dan hari ke-19 kebuntingan dengan hasil sebagai berikut :

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Tekanan Darah Dan Protein Urin Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil**

| KELO<br>MPOK | Tekanan Darah (mmHG) |          |         |          |         |          | Protein Urin |            |            |
|--------------|----------------------|----------|---------|----------|---------|----------|--------------|------------|------------|
|              | Hari 12              |          | Hari 15 |          | Hari 19 |          | Hari<br>12   | Hari<br>15 | Hari<br>19 |
|              | Sistole              | Diastole | Sistole | Diastole | Sistole | Diastole |              |            |            |
| K-           | 116.25               | 89.25    | 117     | 89.75    | 119.5   | 89.75    | -            | -          | -          |
| K+           | 115.5                | 89       | 150.75  | 109      | 162.75  | 117.25   | -            | +          | ++         |
| D1           | 103.5                | 67.5     | 147     | 110.25   | 137.5   | 106      | -            | +          | +-         |
| D2           | 120.25               | 78       | 149.75  | 114.75   | 123.25  | 85.25    | -            | ++         | +-         |
| D3           | 120.75               | 86.5     | 156.5   | 131      | 113.25  | 81.25    | -            | +          | +-         |

Keterangan: Rerata tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik dan protein urin pada tikus bunting model preeklamsia yang diberi EVOO diukur pada hari ke-12, hari ke-15 dan hari ke-19 kebuntingan pada kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), EVOO Dosis 0,5 mL/hari (D1), EVOO 1 mL/hari (D2) dan EVOO 2 mL/hari (D3)



Dari pengukuran tekanan darah sistole pada hari ke 12 nampak normal ( $<140$  mmHg) pada masing-masing kelompok. Pada hari ke 15 yaitu pada hari ke 3 injeksi L-NAME didapatkan peningkatan tekanan darah sistole ( $>140$  mmHg) pada kelompok kontrol positif dan perlakuan. Hal ini menandakan bahwa pembuatan hewan coba berupa tikus model preeklamsia dinyatakan berhasil. Sedangkan pada hari ke 19, Tekanan darah pada kelompok kontrol positif tetap tinggi ( $>140$  mmHg), dan pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya penurunan.

Dari pengukuran tekanan darah diastole pada hari ke 12 nampak normal ( $<90$  mmHg) pada masing-masing kelompok. Pada hari ke 15 yaitu pada hari ke 3 injeksi L-Name didapatkan peningkatan tekanan darah diastole ( $>90$  mmHg) pada kelompok kontrol positif dan perlakuan. Hal ini menandakan bahwa pembuatan hewan coba berupa tikus model preeklamsia dinyatakan berhasil. Sedangkan pada hari ke 19, Tekanan darah pada kelompok kontrol positif tetap tinggi ( $>90$  mmHg), dan pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya penurunan.

Dari pengukuran protein urin pada hari ke-12 nampak negatif pada semua kelompok perlakuan. Pada hari ke-15 kebuntingan semua nilai protein urin  $\geq +1$  pada semua kelompok perlakuan dan pada hari ke-19 kebuntingan menunjukkan adanya penurunan yaitu menjadi  $\pm$  pada kelompok dosis.

Dari pengukuran tekanan darah dan protein urin dapat ditegakkan diagnosis tikus model preeklamsia karena terjadi peningkatan tekanan darah sistole  $> 140$  mmHg, tekanan darah diastole  $> 90$  mmHg dan hasil pengukuran protein urin  $\geq +1$ .



### 5.3 Hasil Pengukuran Kadar GSH dan Kadar eNOS Plasenta

Sampel plasenta yang telah digerus dan disentrifuse dari masing masing hewan coba dimasukkan dalam tube, kemudian diberi tanda pada tutupnya dan disimpan pada suhu  $-40^{\circ}\text{C}$ . Pengukuran kadar GSH dengan metode kolorimetri menggunakan Kit Reduced Glutathione Assay Kit Merk Elabscience Catalog No : E-BC-K051. Pengukuran Kadar eNOS dengan metode ELISA menggunakan Kit Rat NOS3/eNOS (Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial) Catalog No : E-EL-RO367. Hasil pengukuran nampak pada tabel berikut:

**Tabel 5.2. Hasil Pengukuran Konsentrasi GSH dan Konsentrasi eNOS Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil**

| Nama Kelompok | Konsentrasi GSH (mg/gprotein) | Konsentrasi eNOS (pg/mL) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|
| K-            | 0.307669                      | 106.8333                 |
| K-            | 0.396897                      | 119.2222                 |
| K-            | 0.318920                      | 100.3333                 |
| K-            | 0.341162                      | 122.5                    |
| K+            | 0.257983                      | 72.6111                  |
| K+            | 0.243028                      | 118.8889                 |
| K+            | 0.243100                      | 31.7222                  |
| K+            | 0.166973                      | 74.4074                  |
| D1            | 0.243216                      | 169.3889                 |
| D1            | 0.167211                      | 176.3889                 |
| D1            | 0.245937                      | 201.1667                 |
| D1            | 0.176356                      | 342.8889                 |
| D2            | 0.294931                      | 327.9444                 |
| D2            | 0.279548                      | 202.2778                 |
| D2            | 0.235550                      | 203.1111                 |
| D2            | 0.309075                      | 320.5                    |
| D3            | 0.497179                      | 145.3889                 |
| D3            | 0.367797                      | 170                      |
| D3            | 0.416989                      | 151.1667                 |
| D3            | 0.427322                      | 193.6111                 |

Keterangan : Konsentrasi kadar GSH (mg/gprotein) dan kadar eNOS (pg/mL) pada kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), EVOO Dosis 0,5 mL/hari (D1), EVOO 1 mL/hari (D2) dan EVOO 2 mL/hari (D3).



## 5.4 Hasil Analisis Kadar GSH dan Kadar eNOS Plasenta

### 5.4.1. Hasil Uji Normalitas Data

Uji normalitas data GSH menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Data dikatakan terdistribusi normal jika nilai signifikansi atau  $p\text{-value} > 0.05$ , sebaliknya data dikatakan terdistribusi tidak normal jika nilai signifikansi atau  $p\text{-value} < 0.05$ . Hasil uji normalitas dengan *shapiro wilk* terlihat pada gambar di tabel ini.

**Tabel 5.3. Hasil Uji Normalitas *Saphiro Wilk***

| Variabel yang diukur | $p\text{-value}$ | Distribusi |
|----------------------|------------------|------------|
| Kadar GSH            | 0.433            | Normal     |
| Kadar eNOS           | 0.558            | Normal     |

Keterangan : Hasil uji normalitas data pada kadar GSH dan kadar eNOS menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

Dari hasil analisis didapatkan distribusi data normal pada kadar GSH ( $p\text{-value}=0.433$ ) dan pada kadar eNOS ( $p\text{-value}=0.433$ ).

### 5.4.2. Hasil Uji Homogenitas Data

Uji homogenitas data menggunakan test of hoogeneity of variances lavene statistic. Dama seperti uji normalitas data, data dapat dikatakan homogen jika  $p\text{-value} > 0.05$  dan dikatakan tidak homogen jika  $p\text{-value} < 0.05$ . Berikut adalah hasil uji homogenitas pada kadar GSH dan Kadar eNOS.

**Tabel 5.4. Hasil Uji Homogenitas *variance Levene Statistic***

| Variabel yang diukur | $p\text{-value}$ | Sifat data |
|----------------------|------------------|------------|
| Kadar GSH            | 0.905            | Homogen    |
| Kadar eNOS           | 0.082            | Homogen    |

Keterangan : Hasil uji normalitas data pada kadar GSH dan kadar eNOS menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

Dari hasil analisis didapatkan data kadar GSH ( $p\text{-value}=0.905$ ) dan kadar eNOS ( $p\text{-value}=0.082$ ) homogen. Dari hasil analisis didapatkan hasil bahwa data



terdistribusi normal dan semua data homogen sehingga memenuhi syarat uji parametrik yaitu dengan uji parametrik *One Way ANOVA*.

#### 5.4.3. Hasil Uji *One Way Anova* Dan *Multiple Comparison*

##### 5.4.3.1. Hasil uji Kadar GSH

Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA* pada kadar GSH diperoleh ada perbedaan yang signifikan atau bermakna pada kelima kelompok penelitian ( $p\text{-value} = 0.000$ ). Selanjutnya dilakukan uji *multiple comparison* dengan dengan uji *Least Significant Different (LSD)*.

**Tabel 5.5 Pengaruh EVOO terhadap Kadar GSH Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil**

| Kelompok Pengamatan                      | (N) | Kadar GSH (mg/gprotein)   | p-value |
|------------------------------------------|-----|---------------------------|---------|
|                                          |     | Rerata $\pm$ sd           |         |
| Kontrol Negatif (Tikus Bunting Normal)   | 4   | $0.3412 \pm 0.03968^c$    | 0.000   |
| Kontrol Positif (Tikus Preeklamsia (PE)) | 4   | $0.2278 \pm 0.04114^{ab}$ |         |
| Dosis 1 (Tikus PE+EVOO 0.45 gr/hari)     | 4   | $0.2082 \pm 0.04221^a$    |         |
| Dosis 2 (Tikus PE+EVOO 0.9 gr/hari)      | 4   | $0.2798 \pm 0.03185^{bc}$ |         |
| Dosis 3 (Tikus PE+EVOO 1.8 gr/hari)      | 4   | $0.4273 \pm 0.09014^d$    |         |

Keterangan: Rerata dan standar deviasi kadar GSH pada Tikus Bunting Model Preeklamsia. Pada uji one way anova menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ( $p\text{-value} = 0.000$ ). Pada rerata  $\pm$  sd memuat huruf yang berbeda maka ada perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p\text{-value} < 0.05$ ) dan jika memuat huruf yang sama maka dianggap tidak ada perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

Tabel rerata kadar GSH tersebut menunjukkan adanya penurunan pada kontrol positif ( $0.2278 \pm 0.04114$  mg/gprotein) dibandingkan dengan kontrol negatif ( $0.3412 \pm 0.03968$  mg/gprotein). Kadar GSH pada D1 ( $0.2082 \pm 0.04221$  mg/gprotein) menunjukkan penurunan tidak bermakna. Kadar GSH meningkat pada D2 ( $0.2798 \pm 0.03185$  mg/gprotein) dan D3 ( $0.4273 \pm 0.09014$  mg/gprotein).



**Tabel 5.6. Hasil Uji *Multiple Comparison* Pos Hoc LSD Kadar GSH**

| Kelompok | K (-)  | K (+)  | D1     | D2     | D3     |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| K (-)    |        | 0.002* | 0.000* | 0.058  | 0.011* |
| K (+)    | 0.013* |        | 0.521  | 0.102  | 0.000* |
| D1       | 0.000* | 0.521  |        | 0.030* | 0.000* |
| D2       | 0.058  | 0.102  | 0.030* |        | 0.000* |
| D3       | 0.011* | 0.000* | 0.000* | 0.000* |        |

Keterangan : Kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), EVOO Dosis 0,5 mL/hari (D1), EVOO 1 mL/hari (D2) dan EVOO 2 mL/hari (D3). Tanda (\*) = terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok)

Dari hasil uji *multiple comparison* post hoc dengan LSD terdapat perbedaan yang signifikan atau bermakna antara kontrol negatif dan kontrol positif dengan  $p\text{-value} = 0.002$ . Kelompok kontrol positif tidak berbeda bermakna dengan kelompok dosis 1 ( $p\text{-value} = 0.521$ ) dan dosis 2 ( $p\text{-value} = 0.102$ ) tetapi berbeda bermakna dengan kelompok dosis 3 ( $p\text{-value} = 0.000$ ).

#### 5.4.3.2. Hasil Uji Kadar eNOS

Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA* pada kadar eNOS terdapat perbedaan yang signifikan atau bermakna pada kelima kelompok penelitian ( $p\text{-value} = 0.000$ ). Selanjutnya dilakukan uji *multiple comparison* dengan uji *Least Significant Different* (LSD) diperoleh hasil pada tabel di bawah ini.



**Tabel 5.7 Pengaruh EVOO Terhadap Kadar eNOS Tikus Bunting Model Preeklamsia yang diberikan Extra Virgin Olive Oil**

| Kelompok Pengamatan                      | (N) | Kadar eNOS (pg/mL)          | p-value |
|------------------------------------------|-----|-----------------------------|---------|
|                                          |     | Rerata ± sd                 |         |
| Kontrol Negatif (Tikus Bunting Normal)   | 4   | 158.54 ± 84.98 <sup>b</sup> | 0.011   |
| Kontrol Positif (Tikus Preeklamsia (PE)) | 4   | 74.41 ± 35.61 <sup>a</sup>  |         |
| Dosis 1 (Tikus PE+EVOO 0.45 gr/hari)     | 4   | 175.39 ± 19.44 <sup>b</sup> |         |
| Dosis 2 (Tikus PE+EVOO 0.9 gr/hari)      | 4   | 229.72 ± 60.69 <sup>b</sup> |         |
| Dosis 3 (Tikus PE+EVOO 1.8 gr/hari)      | 4   | 165.04 ± 21.75 <sup>b</sup> |         |

Keterangan: Rerata dan standar deviasi kadar eNOS pada Tikus Bunting Model Preeklamsia. Pada uji one way anova menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ( $p$ -value = 0.011). Pada rerata ± sd memuat huruf yang berbeda maka ada perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p$ -value < 0.05) dan jika memuat huruf yang sama maka dianggap tidak ada perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p$ -value > 0.05)

Diagram rerata kadar eNOS tersebut menunjukkan adanya penurunan pada kontrol positif (74.41 ± 35.61 pg/mL) dibandingkan dengan kontrol negatif.

Rerata kadar eNOS menunjukkan peningkatan pada kelompok dosis 1 (175.39 ± 19.44 pg/mL), dosis 2 (229.72 ± 60.69 pg/mL) dan dosis 3 (165.04 ± 21.75 pg/mL).

**Tabel 5.8 Hasil Uji Multiple Comparison Pos Hoc LSD Pada Kadar Enos**

| Kelompok | K (-)  | K (+)  | D1     | D2     | D3     |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| K (-)    |        | 0.034* | 0.647  | 0.067  | 0.859  |
| K (+)    | 0.034* |        | 0.014* | 0.001* | 0.024* |
| D1       | 0.647* | 0.014  |        | 0.153  | 0.778  |
| D2       | 0.067  | 0.001* | 0.153  |        | 0.093  |
| D3       | 0.859  | 0.024* | 0.778  | 0.093  |        |

Keterangan : Kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), EVOO Dosis 0,5 mL/hari (D1), EVOO 1 mL/hari (D2) dan EVOO 2 mL/hari (D3). Tanda (\*) = terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok.



Dari hasil uji *multiple comparison post hoc* dengan LSD terdapat perbedaan yang signifikan atau bermakna antara kontrol negatif dan kontrol positif dengan  $p\text{-value} = 0.034$ . Kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok dosis 1 ( $p\text{-value} = 0.014$ ), dosis 2 ( $p\text{-value} = 0.001$ ) dan dosis 3 ( $p\text{-value} = 0.024$ ).

#### 5.4.4. Hasil Uji Korelasi

Dilakukan uji korelasi untuk melihat hubungan antara kadar GSH dengan kadar eNOS, hubungan antara dosis EVOO dengan kadar GSH, dan hubungan antara dosis EVOO dengan kadar eNOS.

**Tabel 5.9 Hasil Uji Korelasi**

| Variabel                     | Koefisien Korelasi | $p\text{-value}$ |
|------------------------------|--------------------|------------------|
| Kadar GSH dengan kadar eNOS  | 0.079              | 0.741            |
| Dosis EVOO dengan kadar GSH  | 0.907              | 0.000            |
| Dosis EVOO dengan kadar eNOS | -0.344             | 0.273            |

Keterangan : Jika  $p\text{-value} < 0.05$  menunjukkan hubungan yang signifikan, jika  $p\text{-value} \geq 0.05$  menunjukkan hubungan yang tidak signifikan; koefisien korelasi menunjukkan kekuatan korelasi (nilai 0.00-0.20 = sangat lemah; 0.21-0.40 = lemah, 0.41-0.70 = sedang, 0.71-0.90 = kuat,  $>0.90$  = sangat tinggi) dan koefisien korelasi + menunjukkan korelasi positif, koefisien korelasi - menunjukkan korelasi negatif.

Dari hasil korelasi menggunakan pearson menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara kadar GSH dan kadar eNOS ( $p\text{-value} = 0.079$ ), sedangkan arah korelasinya positif. Sedangkan hasil korelasi kelompok dosis dengan masing – masing variabel menunjukkan bahwa korelasi antara besar dosis dengan kadar GSH berkorelasi secara signifikan ( $p\text{-value} = 0.079$ ), kekuatan korelasi sangat kuat ( $R=0.907$ ) dan arah korelasinya positif. Besar dosis dan kadar eNOS tidak berkorelasi secara signifikan ( $p\text{-value}= 0.344$ ). arah korelasi negatif.



## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Peningkatan Tekanan Darah pada Tikus Model Preeklamsia

Pengukuran tekanan darah tikus bunting dilakukan pada hari ke 12, 15 dan 19 kebuntingan. Pada hari ke 12 kebuntingan didapatkan hasil semua tekanan darah tikus normal (sistole  $< 140$  mmHg dan diastole  $< 90$  mmHg). Hal ini menunjukkan bahwa semua tikus yang digunakan dalam penelitian adalah tikus normal (tidak hipertensi). Pada pengukuran tekanan darah hari ke 15 yaitu 2 hari setelah injeksi L-NAME didapatkan hasil terjadi peningkatan tekanan darah (sistole  $> 140$  mmHg dan diastole  $> 90$  mmHg) pada semua kelompok tikus preeklamsia dan perlakuan (K+, D1, D2 dan D3) jika dibandingkan dengan tekanan darah hari ke 12 (sebelum injeksi L-NAME). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pemberian L-NAME dapat meningkatkan tekanan darah tikus. Mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat eNOS yang akan menyebabkan penurunan NO. Penurunan produksi NO dihubungkan dengan adanya peningkatan signifikan tekanan darah maternal (Shu *et al.*, 2018). Kendala dalam penelitian adalah tidak adanya peningkatan tekanan darah pada pemberian L-NAME dosis 40 dan 75 mg/kgBB. Kemudian diberikan L-NAME dengan dosis 125 mg/kgBB dan dilakukan pemeriksaan tekanan darah pada hari 15 kebuntingan didapatkan peningkatan tekanan darah  $\geq 140/90$  mmHg dan protein urin  $\geq +1$ .

### 6.2 Kadar GSH Plasenta pada Tikus Model Preeklamsia

Pada penelitian ini diketahui bahwa kadar GSH pada kelompok kontrol positif dan kontrol negatif berbeda secara bermakna bermakna ( $p\text{-value} = 0.002$ ). Nilai



rerata kadar GSH pada kontrol negatif sebesar  $0.3412 \pm 0.03968$  mg/gprotein sedangkan pada kontrol positif sebesar  $0.2278 \pm 0.04114$  mg/gprotein. Nilai signifikansi (*p-value*) dari uji post hoc LSD antara kontrol positif dengan negatif adalah 0.03. Dapat disimpulkan bahwa kadar GSH plasenta pada tikus preeklamsia mengalami penurunan secara bermakna atau signifikan jika dibandingkan dengan tikus bunting normal.

Hasil penelitian oleh Jin (2017) didapatkan hasil terjadi penurunan kadar GSH pada plasenta pasien preeklamsia secara bermakna atau signifikan pada wanita preeklamsia dibandingkan dengan wanita hamil normal. Penurunan sintesis GSH dan penggunaan GSH yang besar dapat merusak fungsi endotelial.

Pada saat terjadi penurunan sintesis GSH akan mengaktifkan *signaling pathway* yang berkaitan dengan stress oksidatif. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa penurunan GSH akan berkontribusi pada terjadinya preeklamsia salah satunya melalui jalur abnormal dari GSSG dan GSH.

Dari penelitian oleh Rani (2010), didapatkan hasil adanya penurunan kadar GSH secara bermakna pada jaringan plasenta wanita preeklamsia. Glutation dapat bertindak sebagai substrat dalam reaksi redoks sitosolik atau secara tidak langsung akan menurunkan ROS. Glutation dapat menyumbangkan satu elektron ( $H^+$ ) ke molekul lain yang tidak stabil seperti ROS. Tingginya stres oksidatif pada preeklamsia dapat meningkatkan oksidasi glutation dari sel dan jaringan sehingga terjadi peningkatan glutation teroksidasi (GSSG) dan penurunan kadar GSH.

Hasil penelitian meta analisis oleh Ali Taravati (2018) menunjukkan bahwa dari 11 penelitian tentang kadar GSH dengan sampel 532 wanita preeklamsia dan 581 wanita hamil normal terjadi penurunan kadar GSH pada 9 penelitian.

Hanya terdapat 1 penelitian yang mengatakan terjadi peningkatan GSH pada preeklamsia. Pada penelitian ini disebutkan juga bahwa terjadi peningkatan



aktivitas glutathion peroksidase (GSH-Px) pada wanita preeklamsia dari 13 penelitian dengan sampel 127 wanita preeklamsia dan 121 wanita hamil normal.

Peningkatan aktivitas GSH-Px akan meningkatkan penggunaan GSH dalam reaksinya sehingga kadar GSH akan menurun. Pada penelitian ini, dari 5 penelitian dengan sampel 399 wanita preeklamsia dan 529 wanita hamil normal, didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan yang signifikan pada kadar hidrogen peroksida pada wanita preeklamsia. Hal ini sejalan dengan peningkatan aktivitas GSH-Px, sehingga menyebabkan penurunan GSH dan pada akhirnya kadar hidrogen peroksida akan meningkat.

Pada penelitian oleh Subandrate (2017) yang dilakukan dengan sampel plasma wanita preeklamsia didapatkan hasil bahwa kadar GSH menurun secara bermakna dibandingkan dengan wanita hamil normal. Hal ini mengindikasikan bahwa pada preeklamsia terjadi stres oksidatif yang lebih ekstensif.

Beberapa penelitian menunjukkan hasil yang berbeda dengan penelitian ini. Penelitian yang dilakukan oleh Prijanti (2018) menyebutkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar GSH pada kelompok wanita hamil normal, wanita dengan preeklamsia. Dari penelitian tersebut dikatakan bahwa tidak terdapat penurunan kadar GSH secara bermakna. Kemungkinan karena peran antioksidan terhadap ROS oleh antioksidan lainnya, keterbatasan dalam penelitian ini tidak dilakukan pengukuran antioksidan lainnya seperti SOD, GPx atau katalase.

### **6.3 Kadar eNOS Plasenta pada Tikus Model Preeklamsia**

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kadar eNOS pada kelompok kontrol positif dan kontrol negatif berbeda secara bermakna bermakna ( $p\text{-value} = 0.0034$ ). Nilai rerata kadar GSH pada kontrol negatif sebesar  $158.54 \pm 84.98$  pg/mL sedangkan pada kontrol positif sebesar  $74.71 \pm 35.61$  pg/mL. Dapat



disimpulkan bahwa kadar eNOS plasenta pada tikus preeklamsia mengalami penurunan secara bermakna atau signifikan jika dibandingkan dengan tikus bunting normal.

Pada penelitian sebelumnya oleh Zawiejska (2014) tentang konsentrasi eNOS pada wanita preeklamsia didapatkan hasil adanya penurunan konsentrasi atau kadar eNOS secara signifikan pada wanita preeklamsia dibandingkan dengan wanita hamil normal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Laskowska (2014) disebutkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada kadar eNOS wanita preeklamsia dibandingkan dengan wanita hamil normal. Penurunan eNOS berkaitan dengan penurunan kadar NO yang mana berperan sebagai vasodilator sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan darah pada preeklamsia (Caramia, 2014).

Pada preeklamsia terjadi kegagalan remodelling arteri spiralis sehingga terjadi penurunan perfusi plasenta yang akan mengganggu proses plasentasi dan invasi trofoblas selama masa perkembangan plasenta. Gangguan invasi akan menyebabkan gangguan aliran darah sehingga terjadi iskemia dan menjadikan keadaan hipoksia, stres oksidatif, inflamasi dan disfungsi endotel (Myatt dan Webster, 2009). Proses disfungsi endotel meningkatkan pengeluaran sFlt1-1 (sVEGFR-1) yang merupakan inhibitor endogen dari VEGF dan PlGF sehingga ikatan VEGFR-1 dan PlGF rendah (Widmer, *et al.*, 2007)

Pada keadaan normal, ikatan VEGFR-1 dengan PlGF dan VEGF akan meningkatkan fosforilasi VEGFR-2. fungsi dari VEGFR-2 adalah mengaktivasi PLC-gamma dan PI3K. PLC-gamma akan mengaktivasi PKC melalui pembentukan diacylglycerol dan peningkatan konsentrasi kalsium intrasel. PKC akan menghasilkan eNOS. Adaptor molekul Shb berikatan dengan Tyr1175 mengaktifkan PI3K kemudian AKT menghasilkan eNOS dan menimbulkan vascular permeability, cell migration dan cell survival (Fearnley, 2013). Pada



keadaan preeklamsia proses diatas terhambat dikarenakan tingginya sFlt-1 sehingga proses pembentukan eNOS terganggu.

Penelitian oleh Laskowska (2013) menunjukkan hasil yang berbeda yaitu tidak ada perbedaan kadar eNOS secara signifikan pada wanita hamil normal dengan wanita preeklamsia. Terdapat penurunan kadar eNOS pada wanita preeklamsia walaupun secara statistik tidak signifikan. Pembentukan NO dapat melalui jalur selain jalur eNOS-NO dalam reaksinya, yaitu melalui sitokrom P450 reduktase. Sitokrom P450 reduktase akan menginduksi pembentukan NO dari nitrat. Hal ini merupakan mekanisme kompensasi untuk memenuhi ketersediaan NO saat terjadi disfungsi endotel (Klinger, 2013; Tonelli, 2013).

#### **6.4 Pengaruh pemberian Extra Virgin Olive Oil (EVOO) terhadap kadar Glutation (GSH) pada tikus yang model preeklamsia**

Berdasarkan hasil uji One Way Anova kadar GSH plasenta terdapat perbedaan yang bermakna pada kelima kelompok penelitian ( $p\text{-value} = 0.000$  ).

Sementara hasil uji multiple comparison LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dan positif ( $p\text{-value} = 0.002$ ). Nilai rerata kontrol negatif adalah  $0.3412 \pm 0.03968$  mg/gprotein, sedangkan kelompok kontrol positif sebesar  $0.2278 \pm 0.04114$  mg/gprotein. Dilihat dari hasil rerata, maka dapat disimpulkan terjadi penurunan kadar GSH pada preeklamsia jika dibandingkan dengan hamil normal.

Pada kelompok dosis, didapatkan hasil rerata masing – masing kelompok dosis 1, 2 dan 3 adalah  $0.2082 \pm 0.04221$  mg/gprotein;  $0.2798 \pm 0.03185$  mg/gprotein;  $0.4273 \pm 0.09014$  mg/gprotein. Pada uji *multiple comparison post hoc* LSD, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan kadar GSH antara kelompok kontrol positif dan kelompok dosis 1 dan dosis 2. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dengan kelompok dosis 3, terdapat perbedaan yang



bermakna ( $p\text{-value} = 0.000$ ). Kadar GSH pada kelompok dosis 3 meningkat secara bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian EVOO pada kadar GSH plasenta tikus model preeklamsia. Adapun pengaruh EVOO tersebut adalah meningkatkan kadar GSH pada tikus model preeklamsia, sehingga hipotesis penelitian ini terbukti, yaitu pemberian EVOO dapat meningkatkan kadar GSH pada tikus model preeklamsia. Dari hasil tersebut juga diketahui bahwa dosis EVOO yang berpengaruh pada kadar GSH tikus model preeklamsia adalah kelompok dosis 3 yaitu 1.8 mL/hari.

Preeklamsia berasal dari adanya defek implantasi plasenta pada dinding uterus ibu. Gangguan *remodelling* dari arteri spiralis pada uterus oleh *ekstravilus trofoblas* (EVT) memegang peranan untuk menurunkan perfusi plasenta. Konsekuensi dari gangguan aliran darah ini menyebabkan iskemia, yang pada akhirnya meningkatkan ROS dan berkembang menjadi stres oksidatif (Aoché et al, 2018).

Meningkatnya ROS di dalam tubuh akan diimbangi dengan meningkatnya aktivitas antioksidan di dalam tubuh. Sistem perlindungan antioksidan internal ini terdiri dari perlindungan enzimatik (SOD, GSH-Px dan catalase) dan non enzimatik (Glutation). Glutation dapat menjadi substrat pada reaksi inaktivasi ROS. Glutation terdiri dari 2 bentuk, yaitu glutation tereduksi (GSH) dan glutation teroksidasi (GSSG). Pada sel normal, 90% glutation yang disimpan adalah glutation tereduksi (GSH). Pada saat terjadi stres oksidatif, GSH menyumbangkan satu elektronnya ( $H^+$ ) pada molekul yang tidak stabil seperti ROS. Glutation beraksi dengan GSH-PX, menetralkan hidrogen peroksida menjadi GSSG dan air. Pada saat stres oksidatif terjadi peningkatan GSSG pada sel dan jaringan sehingga terjadi penurunan kadar GSH. Hal ini dikarenakan peningkatan aktivitas GSH-PX akan meningkatkan penggunaan GSH.



Penurunan GSH akan menyebabkan hidrogen peroksida bebas. Hidrogen peroksida bebas merupakan salah satu radikal bebas paling poten sehingga dibutuhkan antioksidan sebagai netralisator. Penurunan kadar GSH merupakan indikasi terjadinya stres oksidatif salah satunya karena proses tersebut (Rani, 2010; D'Souza, 2016; Taravati, A., 2018).

Dari penelitian yang dilakukan oleh Carnevale, *et al* (2018) diketahui bahwa polifenol EVOO berperan menghambat NADPH oksidase dalam menghasilkan superoksida dan hidrogen peroksida. Selain itu EVOO berperan sebagai scavenger hidrogen peroksida sehingga dapat menggantikan peran GSH. Selain itu, hydroxytyrosol yang merupakan komponen dari fraksi polifenol EVOO dapat meningkatkan sintesis GSH dengan mengaktifkan *nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2* (Nrf2). Nrf2 merupakan faktor transkripsi dan regulator dalam sistem pertahanan antioksidan. Nrf2 menginduksi ekspresi dari gamma-glutamylcysteine ligase (GCL) yang mana mempunyai kemampuan untuk sintesis GSH (Kouka, 2017). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa pemberian EVOO dosis 1.8 g/hari dapat meningkatkan kadar GSH diasumsikan karena fungsi tersebut.

### **6.5 Pengaruh pemberian Extra Virgin Olive Oil (EVOO) terhadap Kadar endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) pada tikus yang model preeklamsia**

Berdasarkan uji One Way Anova pada kadar eNOS plasenta diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelima kelompok penelitian ( $p\text{-value} = 0.011$ ). Dari hasil uji *multiple comparison* LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dan positif ( $p\text{-value} = 0.034$ ).

Nilai rerata kontrol negatif adalah  $158.54 \pm 84.98$  pg/mL, sedangkan kelompok kontrol positif sebesar  $74.41 \pm 35.61$  pg/mL. Dilihat dari hasil tersebut, maka



dapat disimpulkan terjadi penurunan kadar eNOS pada preeklamsia jika dibandingkan dengan hamil normal.

Hasil rerata masing – masing kelompok dosis 1, 2 dan 3 adalah  $175.39 \pm 19.44$  pg/mL;  $229.72 \pm 60.69$  pg/mL;  $165.04 \pm 21.75$  pg/mL. Pada *uji multiple comparison post hoc LSD*, diketahui bahwa terdapat perbedaan kadar eNOS antara kelompok kontrol positif dan kelompok dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 ( $p\text{-value} = 0.014$ ;  $p\text{-value} = 0.001$  dan  $p\text{-value} = 0.024$ ). Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian EVOO pada kadar eNOS plasenta tikus model preeklamsia. Adapun pengaruh EVOO tersebut adalah meningkatkan kadar eNOS pada tikus model preeklamsia, sehingga hipotesis penelitian ini terbukti, yaitu pemberian EVOO dapat meningkatkan kadar GSH pada tikus model preeklamsia. Dari hasil tersebut juga diketahui bahwa dosis EVOO yang berpengaruh pada kadar eNOS tikus model preeklamsia adalah kelompok dosis 1,2 dan 3. Rerata kadar eNOS tertinggi terdapat pada dosis 2 akan tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna diantara ketiga dosis EVOO yang diberikan, masing masing dosis meningkatkan kadar eNOS secara bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini sejalan dengan diagnosis penelitian pada EVOO berpengaruh pada kadar eNOS plasenta tikus model preeklamsia. Pengaruh yang dimaksud adalah peningkatan kadar eNOS.

Peningkatan ROS pada preeklamsia berhubungan dengan penurunan eNOS. eNOS merupakan enzim yang berperan dalam produksi NO. Pada preeklamsia terjadi penurunan eNOS yang akan menurunkan produksi NO (vasodilator) sehingga tidak terjadi vasodilatasi. EVOO melalui komponen fenolnya meningkatkan produksi NO oleh eNOS. Selain itu komponen fenol dan *hydroxyl-oleid acid* dari EVOO dapat menurunkan tekanan darah diastolic dan sistolic dengan cara mencegah kerusakan endotel vaskular pada preeklamsia.

Perbaikan endotel vaskular akan menurunkan kadar Sflt1 sehingga terjadi ikatan



antara Flt1/VEGFR1 dengan VEGF dan PlGF. Ikatan ini akan meningkatkan fosforilasi VEGFR2. Fungsi VEGFR2 sebagai pengatur *vascular permeability* dan *cell survival* dapat berjalan dengan baik karena dihasilkannya eNOS melalui jalur PLC-gamma dan PI3K (Caramia, 2012; Fearnley, 2013; D'Souza, 2016). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa pemberian EVOO dapat meningkatkan kadar eNOS sehingga meningkatkan produksi NO dan menurunkan tekanan darah.

Pada hasil penelitian oleh Acin (2006) diketahui bahwa terjadi penurunan kadar eNOS pada D3 jika dibandingkan dengan D2. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pada pemberian EVOO dosis tinggi dapat menyebabkan peningkatan faktor *proinflammatory* seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-alfa) dan *C-reactive protein* (CRP). TNF-alfa akan menyebabkan disfungsi mitokondria dan meningkatkan ROS sehingga menurunkan biogenesis eNOS di mitokondria. Sedangkan CRP secara tidak langsung akan menurunkan produksi eNOS kofaktor (BH<sub>4</sub>), menurunkan stabilitas mRNA eNOS, meningkatkan eNOS uncoupling dan pembentukan peroksinitrit (Acin, 2006; Valerio, 2006; Singh *et al.*, 2007; Jialal *et al.*, 2009; Devaraj, 2011).

#### 6.6 Keterbatasan Penelitian

1. Tidak dilakukan pengukuran marker preeklamsia yang lain seperti HIF1- $\alpha$ , soluble endoglin, TGF  $\beta$ , dan NF- $\kappa$ B.
2. Pada penelitian ini hanya menggunakan 3 dosis, diperlukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis EVOO yang berbeda.

#### 6.7 Implikasi Pada Asuhan Kebidanan

Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar teori untuk penelitian selanjutnya tentang pemberian EVOO pada kehamilan dengan preeklamsia.



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Ada penurunan kadar glutathion (GSH) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
2. Ada penurunan kadar *endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model preeklamsia dibanding tikus bunting normal.
3. Extra Virgin Olive Oil (EVOO) meningkatkan kadar glutathion (GSH) plasenta pada tikus model preeklamsia.
4. Extra Virgin Olive Oil (EVOO) meningkatkan kadar endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) plasenta pada tikus model preeklamsia.

#### 7.2 Saran

1. Disarankan untuk dilakukan pengukuran marker preeklamsia yang lain seperti HIF1- $\alpha$ , soluble endoglin, TGF  $\beta$ , dan NF-kB.
2. Disarankan bagi peneliti selanjutnya untuk penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis EVOO yang berbeda



## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Aponte-ellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A., Gupta, S. 2012. The Effect of oxidative stress on female reproduction : a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*.10:49
- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). 2013. Hypertension in Pregnancy. *Hypertension, pregnancy-Induced-Practice Guidline*. WQ 244
- Akbar, B. 2010. Pengaruh Mangostin Terhadap Fertilitas Tikus Wistar Betina. Tesis Magister Program Pasca Sarjana. Bandung; ITB.
- Amanda, R.V dan Leslie S.C. 2012. Hypertention in Pregnancy. *Cardiology Clinic*. 30: 407-423
- Aouache, R., Biquard, L., Vaiman, D., Miralles, F. 2018. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International journal of Molecular sciences*. 19(5): 1-29
- Arief, Sjamsul. 2007. *Radikal Bebas*. Surabaya: FK UNAIR.
- Azambuja P, Souza L De, Marcadenti A, and Vera L. 2017. Effects Of Olive Oil Phenolic Compounds On Inflammation In The Prevention And Treatment. *Nutrients*.9: 1-22
- Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM. 2009. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the united states: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstetry Gynecoly*. 113: 1075–1081
- Black K.D. dan Horowitz J.A. 2018. Inflammatory Marker and Preeclampsia. *Nursing Research*. 67(3): 242-251
- Bourque A.L., Davidge A.T., Adams M.A. 2011. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 300:1288-1295
- Buckland, G., Travier N., Barricarte, A., Ardanaz E., Moreno-Iribas, C., Sanchez, MJ. *et al.* 2012. Olive oil intake and CHD in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Spanish cohort. *British Journal of Nutrition*. 108(11): 2075–2082.
- Byer, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L., Taft, R.A. 2012. Mouse Estrus Cycle Identification Tool and Images. *PloS ONE*. 7 (4): 1-5
- Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, D'Amore S, Gnoni A, Pellegrino M *et al.* 2015. Extra virgin olive oil rich in polyphenols modulated VEGF-induced angiogenic responses by preventing NADPH oxidase activity and expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 28: 19-29



Carnevale R Ph.D, Nocella, C. Ph.D, Cammisotto V B.Sc, Bartimoccia S B.Sc, Monticolo R B.Sc, D'Amico A B.Sc, et al. 2018. Antioxidant activity from extra virgin olive oil via inhibition of hydrogen peroxide-mediated NADPH-oxidase 2 activation. *Nutrition*. 55(56): 36-40

Camille E. Powe, Richard J. Levine, and S. Ananth. Karumanchi. 2011. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 21. 123 (24)

Caramia, G., Gori, A., Valli, E., Carretani, L. 2012. Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114: 375-388

Conrad K.P. 2011. Emerging Role of Relaxin in the Maternal Adaptations to Normal Pregnancy: Implications for Preeclampsia. *Seminars in Nephrology*. 31(1): 15-32

Cora MC, Kooistra L, Travlos G. 2015. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Journal of Toxicologic Pathology*. 43(6): 776-793

Covas, M.I., De La Torre, R., Fito, M. 2015. Virgin Olive Oil: a Key Food For Cardiovascular Risk Protection. *Journal of Nutrition*. 113: 19-28

Cunningham, F. G., Leveno, K. J., Bloom, S. L., Hauth, J. C., Gilstrap, L., & Wenstrom, K. D. 2013. *Pregnancy Hypertension*. Williams Obstetrics (24th Edition ed.). New York: The McGraw-Hill Companies.

Devaraj S, Siegel D, and Jialal I. Statin Therapy In Metabolic Syndrome And Hypertension Post-JUPITER: What Is The Value Of CRP?. 2011. *Current Atherosclerosis Report*. 2011: 31-42.

Dodge, J., Kristal, M., Badura, L. 2002. Male Induced Estrus Synchronization in the Female Siberian Hamster (Phodopus Sungorus Sungorus). *Physiology and Behavior*. 77 (2-3): 227-231

Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. 2015. *Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur Tahun 2015*. DINKES Jawa Timur: Surabaya

Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82:47-95

Fauziyah, R.F. 2016. Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Gaur Wistar dan Sprague-Dawley. Skripsi. Institut Pertanian Bogor

Fearnley GW, Smith GA, Harrison MA, Wheatcroft SB, Tomlison DC, Ponnabalam S. 2013. Vascular endothelial growth factor-A regulation of blood vessels sprouting in health and disease. *OA Biochemistry*. 1(1): 5-14



Förstermann,U dan Münzel, T. 2006. Endothelial Nitric Oxide Syntase in Vascular Disease.From Marvel to Menace. *Journal Of The American Heart Association*. 113(13):1708-1714.

Förstermann,U., and Sessa, W.C. 2012. Nitric Oxide Synthases : Regulation and Function. *European Heart Journal*. 33(7): 1983-1992

Gentile C., Muise-Helmericks R.C., Drake C.J. 2013. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblasts and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol*. 373(1): 163-175

Gathiram P. dan Moodley J. 2016. Preeclampsia: its pathogenesis and pathophysiolgy. *Cardiovascular Journal of Africa*. 27(2): 71-78

Gouloupoulou, S dan Davidge, S.T. 2014. Molecular Mechanism of maternal vascular dysfunction in Preeclampsia. *Trend in Molecular Medicine*. XX: 1-10

Guasch-Ferré, M. Hu., F., B. Martínez-González M.,A., Mònica Bulló, Montserrat Fitó, Ramon Estruch *et al.*, 2014. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*. 12(1): 1–11.

Herrera, E., Krause, B., Ebensperger, G., Reyes, R.V., Casanello, P., and Parra, C.M. *et al.* 2014. The Placental Pursuit for an Adequate oxidant balance between the mother and the fetus. *Frontier in Pharmacology*. 1-10

Heyne, G.W., Plisch, E.H., Melberg, C.G., Sandgren, E.P., Peter, J.S., Lipinski, R.J. 2015. A Simple Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *Journal of The American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 54(4): 368-371

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, and Rahu N. 2016. Oxidative Stress And Inflammation : What Polyphenols Can Do For Us. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.2016:1-9

Irani, R.A. dan Xia, Y. 2011. Renin Angiotensin Signaling In Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Seminars in Nephrology*. 31(1): 47-58

Irianti, E, Ilyas, S, Rosidah and Hutahaean. 2017. Hsp70 Expression profile in Preeclamsia Model of Pregnant Rat (*Rattus Norvegicus*) after Giving the EVOO. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Universitas Pendidikan Indonesia

Jadli, A., Sharma, N., Damania, K., Satoskar, P., bansal, V., Ghosh, K. 2015. Promising Prognostic Marker of preeclampsia : New Avenues in waiting. *Thrombosis Research*. 136(2): 189-195

Jialal, I., Verma, S., and Devaraj, S. 2009. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase by C-reactive protein: clinical relevance. *Clinical Chemical*. 55, 206–208



Jin,X., Xu, Z., Cao, J., Shao, P., Zhou, M., Qin, Z. 2017. Proteomics analysis of human placenta reveals glutathione metabolism dysfunction as the underlying pathogenesis for preeclampsia. *BBA - Proteins and Proteomics*. 1865: 1207-1214

Jung, Y., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z.G, and Necker, L. 2003. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor kappa B activation. *The Biochemical journal*. 370(3): 2387-2398

Keita, H, Juan, ER, Panigua-Castro, N, Garduno-Siciliano, L, Quevedo, L. 2013. The long-term ingestion of a diet high in extra virgin olive oil produces obesity and insulin resistance but protect endothelial function in rats: a preliminary study. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 5(1): 45-53

Kemenkes RI. 2014. *Pusat Data dan Informasi Situasi Kesehatan Ibu*. Jakarta : Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Kemenkes RI. 2017. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016*. Jakarta : Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Klinger JR, Abman SH, Gladwin MT. 2013. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.188: 639-646.

Kouka, P., Priftis,A., Stagos, D., Angelis A., Stathopoulos, P., Xinos,N., et al. 2017. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek Olea europea variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal Of Molecular Medicine*. 40: 703-712

Laresgoiti-Servitje dan Lopez N.G. 2012. The Pathophysiology of preeclampsia involved altered levels of angiogenic factor promoted by hipoxya and autoantibody-mediated mechanism. *J. Biology of Reproduction*. 87(2): 1-7

Laskowska, M., Laskowska,K., Terbosh, M., Oleszczuk, J. 2013. A comparison of maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase, asymmetric dimethylarginine, and homocysteine in normal and preeclamptic pregnancies. *Medical Science Monitor*. 19: 430-437

Laskowska, M., Laskowska, K., Oleszczuk,J. 2014. The relation of maternal serum eNOS, NOSTRIN and ADMA levels with aetiopathogenesis of preeclampsia and/or intrauterine fetal growth restriction. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 28(1): 26-32.

Lankhorst, S., Kappers, M.H.W., Esch, J.H.M., Danser, A.H.J., Van De Meiracker, A.H. 2012. Mechanism of hypertension and proteinuria during angiogenesis inhibition : evolving role of endothelin-1. *Journal of Hypertention*. 30(00): 1-11

Liu,Q., Yang,J., 2015. Expression and significance of miR155 and vascular endothelial growth factor in placenta of rats with preeclampsia. *International journal of clinical and experimental medicine*. 8(9): 15731-15737



Lyll & Beelfort, 2007. Pre-eclampsia etiology and clinical practice. English : Cambridge Cambridge University Press

Matsubara Ka, Higaki, T, Matsubara Y, Nawa, A. 2015. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia. *The International Journal of Molecular Sciences*.16(3): 4600-4614

Marks, Dawn B. 2000. Biokimia Kedokteran Dasar : sebuah pendekatan klinis pengarang, Dawn B, Mark, Allan D. Mark, Collen M. Smith : Alih bahasa. Bram U. Pendit : editor edisi bahasa Indonesia Joko Suyono, Vivi Sadikin, Lydia I. Mandera. Jakarta : EGC

Myatt, L. 2010. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31(Suppl.): 66–69

Nevo, O., Soleymanlou, N., Wu, Y., Xu, J. Kingdom, J., and Many, A., et al. 2006. Increased expression of sFlt-1 in vivo and in vitromodels of human placental hypoxia is mediated by HIF1. *American journal of physiology-Regulatory, integrative, and comparative physiology*. 291(4): 1085-1093

Nocella C, Cammisoto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, CastellaniV et al., 2018. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular : Benefits for Human Health.*ndocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drugs Targets*. 18: 4-18

Nugraheni K., 2012. Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Oludare, G.O, Jinadu, H.D, Aro, O.O. 2018. L-arginin attenuated blood pressure and reverses the uppression of angiogenic risk factors in a rat model of preeclampsia. *Pathophysiology* 960

Osol, G., Lin Ko, N., Mandala, M. 2017. Altered Endothelial Nitric Oxide Signaling as a Paradigm for Maternal Vascular Maladaptation in Preeclampsia. The journal *Current Hypertension*. 19(10): 82

Patot, M. C. Tissot van et al. 2004. Greater vascularity, lowered HIF-1/DNA binding and elevated GSH as markers of adaptation in vivo chronic hypoxia. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 287: 525-532

Peng, X., Lin, Y., Li, J., Liu, M., Wang, J., Li, X. et al., 2016. Evaluation of Glutathione Peroxidase 4 role in Preeclampsia. *Scientific reports*. 2016(6)

Phipps, E. 2016. Preeclampsia : Updates in Phatogenesis, Definitions, dan Guidlines. *The American Society of Nephrology*. 11: 1102-1113

Prince, A. P., Lucas , dan P.J. Lea. 1990. Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Oone Fumigated Barley: a leaf section approah. *Journal of Experimental Botany*. 41(10): 1309–1317



Rani, N., Dhingra, R., Arya, D.S., Kalaivani, M., Bhatla, N., Kumar, R. 2010. Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclamptic patients. *Obstetric and Gynaecology Research*. 36(6): 1189-1194

Sánchez-Aranguren, Prada, C.E, Riano-Medina, C.E, and Lopez, M. 2014. Endothelial dysfunction and preeclampsia: Role of oxidative stress. *Frontier in Physiology*. 5(372): 1-11

Sánchez-Elsner, Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C., Bernabeu, C. 2002. Endoglin Expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathway. *Journal of biological chemistry*. 227(46): 43799-43808

Sadrim, V.C., Palei, A.C.T., Metzger, I.F., Gomes, V.A., Cavalli, R.C., Tanus-Santos, J.E. 2008. Nitric Oxide Formation Is Inversely Related to Serum Levels of Antiangiogenic Factors Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endoglin in Preeclampsia. *Hypertension*. 52: 402-407

Salafia, C.M., Pezzullo, J.C., Lopez-Zeno. 1995. Placental Pathologic Features of Preterm Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 175(4): 1097-1105

Sanjay, G dan Girija, W. 2014. Preeclampsia-Eclampsia. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 64(1): 4-13

Sessa, W. C. 2004. eNOS at a glance. *Journal of Cell Science*. 117(12): 2427-2429.

Seki, H. 2014. The Role of The Renin Angiotensin System in The Pathogenesis of Preeclampsia – New Insight into The Renin Angiotensin System in Preeclampsia. *Medical Hypotheses*. 82: 362-367

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Venezinni, G., Di Maio, I., et al., 2014. Biological Activities of Phenolic Compound of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidant*. 3(1): 1-23

Shu, W., Li, H., Gong, H., Zhang, M., Niu, X., Ma Y., et al., 2018. Evaluation of blood vessel injury, oxidative stress and circulating inflammatory factor in an L-NAME- induced preeclampsia-like rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 16: 585-594

Singh, U., Devaraj, S., Vasquez-Vivar, J., and Jialal, I. 2007. C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 43: 780-791

Sircar, M, Thadhani, R, Karumanchi, SA. 2015. Pathogenesis of preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 24: 131-138

Solimun. 2001. *Struktural Equatuion Modelling* dan LISREL. Malang: FMIPA Universtas Brawijaya



Sunarno. 2009. Peran Glutathion sebagai Antioksidan dalam Menghambat Neurodegenerasi dan Penuaan Otak dalam *Sains Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 1(2): 185-210

Taravati, A., Tohidi, F., 2018. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetric & Gynecology*.57(6):779-790

Tenório, M.B., Ferreira, R.C., Moura, F.A., Bueno, N.B., Goulart, M.O.F., Oliveira, A.C.M. 2018. Oral antioxidant therapy for prevention and treatment of preeclampsia: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*. XX: 1-12

Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., Menini, A. 2009. From Pheromones to Behavior. *Physiological Reviews*. 89: 951-956

Tonelli AR, Haserodt S, Aytekin M, Dweik RA. 2013. Nitric oxide deficiency in pulmonary hypertension: pathobiology and implications for therapy. *Pulmonary Circulation*. 3(1): 20-30

Torre, D.L. 2008. Bioavailability of olive oil phenolic compound in human. *Inflammopharmacology* 16: 245-247

Ulya, Z, Indra, M.R., Supranowo. Ekstrak Rosela Menurunkan Perlemakan Dan Ekspresi ADMA Hepar Akibat Diet Aterogenik Pada Tikus Rosella ' S Extract Decrease Fatty Liver And ADMA Expression On Liver Due To Atherogenic Diet In Mice. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(1): 6–10.

Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A. et al. 2006. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *Journal of Clinical Investigation*. 116: 2791–2798.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M. Bdolah, Y. et al. 2006. Soluble Endoglin Contributes to the pathogenesis of Preeclampsia. *Nature Medicine*. 12(6): 642-649

Vitoratos, N., Hassiakos, D., Iavazzo, C. 2012. Molecular Mechanism of Preeclampsia. *Journal of Pregnancy*. 2012: 1-5

WHO. 2011. WHO recommendation for Prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia.

Widmer, M., Villar, J., Benigni, A., Conde-Agudelo, A., Karumanchi, S. A., and Lindheimer, M. (2007). Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review. *Obstet. Gynecol*. 109: 168–180

Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Jakarta: Kanisius

Wu G., Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. *Glutathione metabolism and its complications for health*. USA: Faculty of Nutrition, Texas A&M university, College Station.



Young, B.C., Levine, R.J. and Karumanchi, S.A., 2010. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Pathol.* 2010(5): 173-192.

Yuslianti, Euis Reni. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Daerah Istimewa Yogyakarta: Deepublish

Zawiejska, A., Wender-Ozegowska, E., Iciek, R., Brazent, J. 2014. Concentrations of endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor and placental growth factor in maternal blood and maternal metabolic status in pregnancy complicated by hypertensive disorders. *Journal of Human Hypertension.* 28: 670-676

Zuniga, F.A., Ormazabal, V., Gutierrez, N., Aguilera, V., Radojkovic, C., Veas, C. et al. 2014. Role of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein-1 in Fetoplacental Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Biomed Research International.* 2014:1-11

## 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](mailto: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.**

Malang,  
Ketua



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 sertifikat Tikus

  
**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



### Lampiran 3 Surat Hasil Uji Antioksidan IC50



**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<br>(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

#### Lampiran 4 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](mailto:sekr.fk@ub.ac.id)

#### SURAT KETERANGAN

Nomor : 374 /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 Kadar Glutation (GSH)  
Dan Kadar Endothelial Nitric-Oxide Synthase (eNOS) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Preeklamsia

Penulis : Afniari Maharani

NIM : 176070400111026

Jumlah Halaman : 88

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)

Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

27 JUN 2019

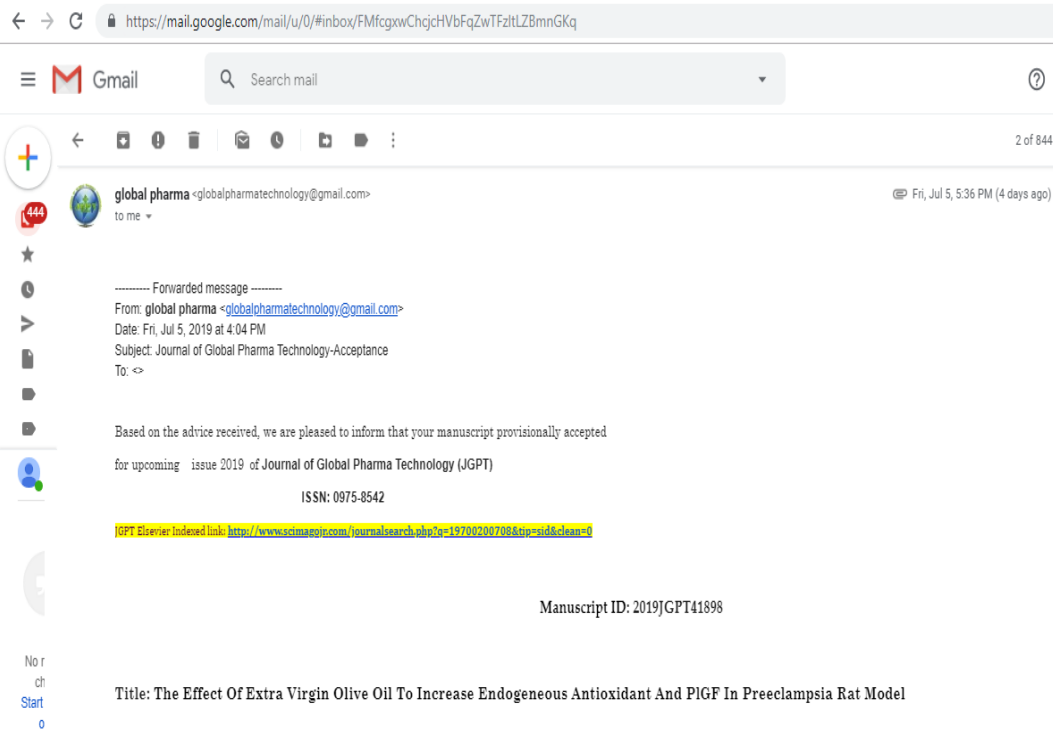
Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



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



## Lampiran 5 Bukti Accepted Jurnal





## Lampiran 6 Publikasi Jurnal



Journal of Global Pharma Technology

ISSN: 0975-8542

Available Online at: [www.jgpt.co.in](http://www.jgpt.co.in)

RESEARCH ARTICLE

**The Effect of Extra Virgin Olive Oil To Increase Endogeneous Antioxidant and PlGF In Preeclampsia Rat Model****Silvani Yulia<sup>1</sup>, Maharani Afniari<sup>1</sup>, Dian Lovita Agnestia Naning<sup>1</sup>, Wiyasa, IWA<sup>2</sup>, Sujuti Hidayat<sup>3</sup>, Ratnawati Retty<sup>4</sup>, Raras Tri Yudani M<sup>3</sup>.**<sup>1</sup> Magister of Midwifery Program, University of Brawijaya, Malang, Indonesia.<sup>2</sup> Departemen of Obstettry And Gynecology, Dr. Saiful Anwar Hospital, Malang, Indonesia.<sup>3</sup> Department of Biochemistry-Molecular Biology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.<sup>4</sup> Departemen of Physiology, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia.

\*Corresponding Author: Silvani Yulia

**Abstract**

**Background:** Preeclampsia is a special disease in pregnancy with oxidative stress as one of its pathogenesis pathways, suspected that it can interfere the process of angiogenesis and negatively impacts the fetus and maternal wellbeing. **Objective:** This study aimed to determine effect of EVOO as a strong exogenous antioxidant to increase SOD activity and GSH level in accordance with improvement on PlGF level as an angiogenesis factor in preeclampsia rat model. **Method:** This research consisted of five groups: negative control, positive control (preeclampsia rat model), doses 1, 2, and 3 that were preeclampsia rats given EVOO in 3 different doses (0.5 mL/day, 1 mL/day and 2 mL/day respectively). Blood pressure measurements were carried out at the 12th, 15th, and 19th day of pregnancy. After sacrificed, placentas were collected to determine SOD activity and GSH level either maternal plasma to determine PlGF level. **Results:** Result of this study showed that there was a reduction of GSH ( $p=0.02$ ) and PlGF ( $p=0.233$ ) level between negative and positive control group meanwhile SOD activity seem increased ( $p=0.049$ ). There were significant differences among positive control and dose 1 in SOD activity ( $p=0.008$ ), dose 3 in GSH level ( $p=0.000$ ), both dose 1 ( $p=0.017$ ) and 2 ( $p=0.000$ ) in PlGF level. **Conclusion:** Administration of EVOO increased SOD and GSH in all three doses groups, while there was a decrease in PlGF at dose 3. EVOO had been shown to be a potential antioxidant in preeclampsia through increased SOD activity and GSH level, at once modulate angiogenesis through increased PlGF level.

**Keywords:** Preeclampsia, EVOO, SOD, GSH, PlGF, Antioxidant, Oxidative stress, Angiogenesis.**Introduction**

Preeclampsia defined as new onset of hypertension with or without proteinuria after 20 weeks gestation. Preeclampsia as one of the main causes of maternal death in the world is a pathological condition in pregnancy which described as a disease of theories. Various pathophysiologies involved in the process of preeclampsia, such as angiogenesis, oxidative stress, genetic and immunological-inflammation are mentioned as trigger for preeclampsia.

The combination of various precipitating factors above is responsible for the appearance of clinical symptoms that are

typical in preeclampsia such as hypertension and proteinuria [1].

In preeclampsia, defect of trophoblast invasion as the main process of placental formation disturb spiral artery remodeling. This causes intermittent arterial blood flow resulting period of recurrent ischemia-reperfusion which causes decrease placental blood flow and lead to hypoxia.

Hypoxia trigger oxidative stress characterized by changes in various markers and oxidative damage [2]. Imbalance between ROS and endogenous antioxidants in preeclampsia resulting oxidative stress



## Lampiran 7 Hasil Pengukuran

## DATA KASAR PENGUKURAN TEKANAN DARAH DAN PROTEIN URIN

| Kelompok | Hari-12 | Hari-15 | Hari-19 |
|----------|---------|---------|---------|
| K-       | 105/78  | 131/109 | 164/139 |
| K-       | 115/84  | 94/71   | 109/75  |
| K-       | 126/96  | 120/86  | 95/62   |
| K-       | 119/99  | 123/93  | 110/83  |
| K+       | 121/84  | 152/101 | 164/112 |
| K+       | 106/85  | 148/108 | 134/78  |
| K+       | 101/82  | 163/111 | 195/154 |
| K+       | 134/105 | 140/116 | 158/125 |
| D1       | 80/55   | 148/109 | 144/97  |
| D1       | 99/53   | 150/114 | 130/106 |
| D1       | 119/89  | 139/103 | 129/108 |
| D1       | 125/73  | 151/115 | 147/113 |
| D2       | 102/84  | 153/124 | 120/85  |
| D2       | 131/74  | 150/108 | 121/81  |
| D2       | 132/85  | 155/116 | 134/87  |
| D2       | 116/69  | 141/111 | 118/88  |
| D3       | 116/83  | 165/130 | 134/86  |
| D3       | 101/77  | 159/128 | 119/89  |
| D3       | 140/97  | 152/137 | 103/71  |
| D3       | 126/89  | 150/129 | 97/79   |

## DATA KASAR PENGUKURAN BB TIKUS

| Kelompok | Berat Badan Tikus (gram) |            |            |      |
|----------|--------------------------|------------|------------|------|
|          | Hari Ke-1                | Hari Ke-10 | Hari Ke-19 | Δ BB |
| K-4      | 164.5                    | 189        | 201        | 36.5 |
| K-5      | 195                      | 215        | 234        | 39   |
| K-9      | 197.5                    | 243        | 258        | 60.5 |
| K-4a     | 163                      | 177        | 197        | 34   |
| K+2      | 173                      | 189        | 205        | 32   |
| K+6      | 165                      | 176        | 187        | 22   |
| K+39     | 189                      | 248        | 237        | 48   |
| K+41     | 181                      | 235        | 221        | 40   |
| D1-8     | 159.5                    | 173        | 206        | 46.5 |
| D1-11    | 191                      | 238        | 243        | 52   |
| D1-2     | 163                      | 177        | 195        | 32   |
| D1-12    | 180                      | 195        | 213        | 33   |
| D2-1     | 175.5                    | 198        | 209        | 33.5 |

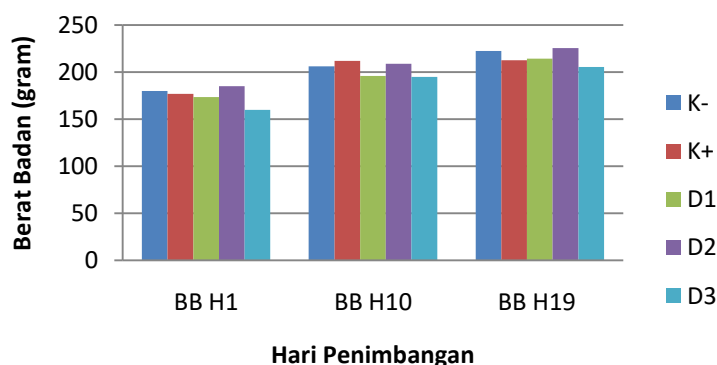


|       |       |     |     |      |
|-------|-------|-----|-----|------|
| D2-40 | 187   | 223 | 238 | 51   |
| D2-35 | 193   | 216 | 244 | 51   |
| D2-14 | 185   | 199 | 211 | 26   |
| D3-3  | 151.5 | 199 | 218 | 66.5 |
| D3-37 | 152   | 179 | 195 | 43   |
| D3-38 | 151.5 | 203 | 182 | 30.5 |
| D3-34 | 184   | 198 | 227 | 43   |

### DATA KASAR PENGUKURAN BB JANIN

| Kelompok | Berat Badan Janin Tikus (gram) |         |         |         |           |
|----------|--------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
|          | Tikus 1                        | Tikus 2 | Tikus 3 | Tikus 4 | Rata-rata |
| K-       | 2.83                           | 1.44    | 2.42    | 3.85    | 2.635     |
| K+       | 0.82                           | 0.94    | 1.42    | 0.81    | 0.9975    |
| D1       | 1.36                           | 1.24    | 1.32    | 1.36    | 1.32      |
| D2       | 2.24                           | 2.33    | 1.44    | 1.82    | 1.9575    |
| D3       | 3.2                            | 2.33    | 2.37    | 2.88    | 2.695     |

### RERATA HASIL PENGUKURAN BERAT BADAN TIKUS





## Lampiran 8 Data Hasil Analisis

### 1. Analisis Kadar GSH

#### Descriptives

| gsh (mg/gprotein) | N  | Mean  | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Min | Max |
|-------------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|-----|-----|
|                   |    |       |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |     |     |
| K -               | 4  | .3412 | .03968         | .01984     | .2780                            | .4043       | .31 | .40 |
| K +               | 4  | .2278 | .04114         | .02057     | .1623                            | .2932       | .17 | .26 |
| D1 (0.5mL/hari)   | 4  | .2082 | .04221         | .02110     | .1410                            | .2753       | .17 | .25 |
| D2 (1 mL/hari)    | 4  | .2798 | .03185         | .01593     | .2291                            | .3305       | .24 | .31 |
| D3 (2 mL/hari)    | 4  | .4273 | .05332         | .02666     | .3425                            | .5122       | .37 | .50 |
| Total             | 20 | .2968 | .09014         | .02016     | .2547                            | .3390       | .17 | .50 |

#### Tests of Normality

|                   | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
|-------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|                   | Statistic                       | df | Sig.  | Statistic    | df | Sig. |
| gsh (mg/gprotein) | .117                            | 20 | .200* | .954         | 20 | .433 |

a. Lilliefors Significance Correction

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

#### Test of Homogeneity of Variances

gsh (mg/gprotein)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .251             | 4   | 15  | .905 |

#### ANOVA

| gsh (mg/gprotein) | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|-------------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups    | .128           | 4  | .032        | 17.916 | .000 |
| Within Groups     | .027           | 15 | .002        |        |      |
| Total             | .154           | 19 |             |        |      |



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: gsh (mg/gprotein)

|                       |                     |     | Mean       |        |      | 95% Confidence Interval |             |
|-----------------------|---------------------|-----|------------|--------|------|-------------------------|-------------|
| (I)                   |                     |     | Difference | Std.   |      |                         |             |
| KELOMPOK (J) KELOMPOK |                     |     | (I-J)      | Error  | Sig. | Lower Bound             | Upper Bound |
| LSD                   | K -                 | K + | .11339*    | .02984 | .002 | .0498                   | .1770       |
|                       |                     | D1  | .13298*    | .02984 | .000 | .0694                   | .1966       |
|                       |                     | D2  | .06139     | .02984 | .058 | -.0022                  | .1250       |
|                       |                     | D3  | -.08616*   | .02984 | .011 | -.1498                  | -.0226      |
|                       | K +                 | K - | -.11339*   | .02984 | .002 | -.1770                  | -.0498      |
|                       |                     | D1  | .01959     | .02984 | .521 | -.0440                  | .0832       |
|                       |                     | D2  | -.05200    | .02984 | .102 | -.1156                  | .0116       |
|                       |                     | D3  | -.19955*   | .02984 | .000 | -.2632                  | -.1359      |
|                       | EVOO<br>0.45mL/hari | K - | -.13298*   | .02984 | .000 | -.1966                  | -.0694      |
|                       |                     | K + | -.01959    | .02984 | .521 | -.0832                  | .0440       |
|                       |                     | D2  | -.07160*   | .02984 | .030 | -.1352                  | -.0080      |
|                       |                     | D3  | -.21914*   | .02984 | .000 | -.2828                  | -.1555      |
|                       | EVOO<br>0.9mL/hari  | K - | -.06139    | .02984 | .058 | -.1250                  | .0022       |
|                       |                     | K + | .05200     | .02984 | .102 | -.0116                  | .1156       |
|                       |                     | D1  | .07160*    | .02984 | .030 | .0080                   | .1352       |
|                       |                     | D3  | -.14755*   | .02984 | .000 | -.2112                  | -.0839      |
|                       | EVOO<br>1.8mL/hari  | K - | .08616*    | .02984 | .011 | .0226                   | .1498       |
|                       |                     | K + | .19955*    | .02984 | .000 | .1359                   | .2632       |
|                       |                     | D1  | .21914*    | .02984 | .000 | .1555                   | .2828       |
|                       |                     | D2  | .14755*    | .02984 | .000 | .0839                   | .2112       |



## Homogeneous Subsets

gsh (mg/gprotein)

Duncan

| KELOMPOK | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |
|----------|---|-------------------------|-------|-------|-------|
|          |   | 1                       | 2     | 3     | 4     |
| D1       | 4 | .2082                   |       |       |       |
| K +      | 4 | .2278                   | .2278 |       |       |
| D2       | 4 |                         | .2798 | .2798 |       |
| K -      | 4 |                         |       | .3412 |       |
| D3       | 4 |                         |       |       | .4273 |
| Sig.     |   | .521                    | .102  | .058  | 1.000 |

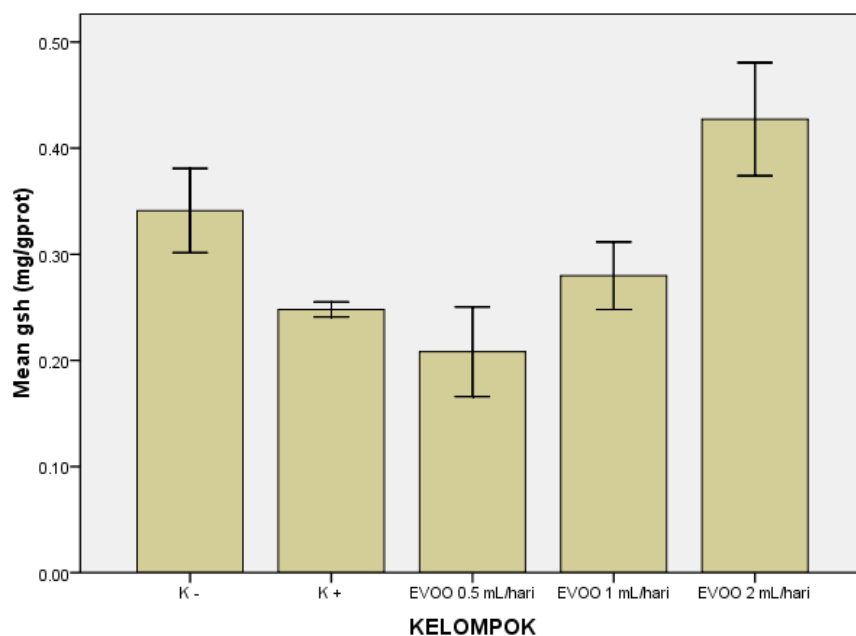
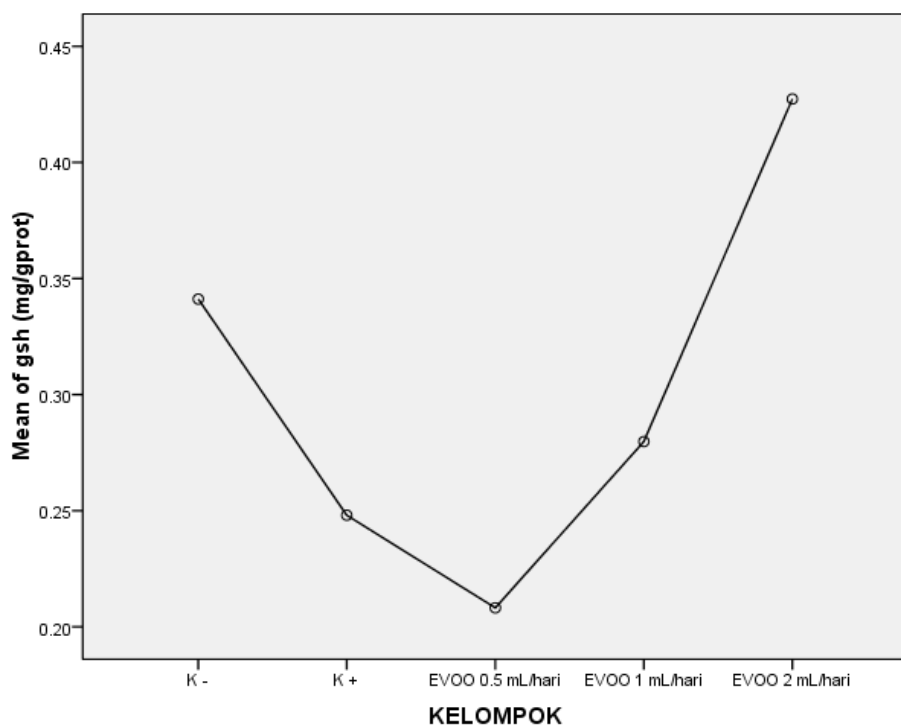
## KELOMPOK

### Case Processing Summary

| KELOMPOK              | Cases |         |         |         |       |         |
|-----------------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
|                       | Valid |         | Missing |         | Total |         |
|                       | N     | Percent | N       | Percent | N     | Percent |
| gsh (mg/gprotein) K - | 4     | 100.0%  | 0       | .0%     | 4     | 100.0%  |
| K +                   | 4     | 100.0%  | 0       | .0%     | 4     | 100.0%  |
| D1                    | 4     | 100.0%  | 0       | .0%     | 4     | 100.0%  |
| D2                    | 4     | 100.0%  | 0       | .0%     | 4     | 100.0%  |
| D3                    | 4     | 100.0%  | 0       | .0%     | 4     | 100.0%  |



## Means Plots



Error Bars: +/- 1 SD



## 2. Analisis Kadar eNOS

### Descriptives

eNOS(pg/mL)

|       | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|       |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| K-    | 4  | 1.5854E2 | 84.98125       | 42.49063   | 23.3174                          | 293.7656    | 106.83  | 285.61  |
| K+    | 4  | 74.4074  | 35.60830       | 17.80415   | 17.7466                          | 131.0682    | 31.72   | 118.89  |
| D1    | 4  | 1.7539E2 | 19.43563       | 9.71781    | 144.4626                         | 206.3154    | 154.61  | 201.17  |
| D2    | 4  | 2.2972E2 | 60.69176       | 30.34588   | 133.1481                         | 326.2964    | 193.00  | 320.50  |
| D3    | 4  | 1.6504E2 | 21.75259       | 10.87630   | 130.4285                         | 199.6550    | 145.39  | 193.61  |
| Total | 20 | 1.6062E2 | 68.39184       | 15.29288   | 128.6120                         | 192.6287    | 31.72   | 320.50  |

### Tests of Normality

|             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|             | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| eNOS(pg/mL) | .167                            | 20 | .145 | .961         | 20 | .558 |

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variances

eNOS(pg/mL)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.550            | 4   | 15  | .082 |



# ANOVA

| eNOS(pg/mL)    | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 49798.910      | 4  | 12449.727   | 4.779 | .011 |
| Within Groups  | 39072.519      | 15 | 2604.835    |       |      |
| Total          | 88871.429      | 19 |             |       |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: eNOS(pg/mL)

|     | (I) | (J) | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|-----|-----|-----|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|     |     |     |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| LSD | K-  | K+  | 84.13409*             | 36.08902   | .034 | 7.2122                  | 161.0560    |
|     |     | D1  | -16.84750             | 36.08902   | .647 | -93.7694                | 60.0744     |
|     |     | D2  | -71.18075             | 36.08902   | .067 | -148.1027               | 5.7412      |
|     |     | D3  | -6.50025              | 36.08902   | .859 | -83.4222                | 70.4217     |
|     | K+  | K-  | -84.13409*            | 36.08902   | .034 | -161.0560               | -7.2122     |
|     |     | D1  | 100.98159*            | 36.08902   | .014 | -177.9035               | -24.0597    |
|     |     | D2  | 155.31484*            | 36.08902   | .001 | -232.2368               | -78.3929    |
|     |     | D3  | 90.63434*             | 36.08902   | .024 | -167.5563               | -13.7124    |
|     | D1  | K-  | 16.84750              | 36.08902   | .647 | -60.0744                | 93.7694     |
|     |     | K+  | 100.98159*            | 36.08902   | .014 | 24.0597                 | 177.9035    |
|     |     | D2  | -54.33325             | 36.08902   | .153 | -131.2552               | 22.5887     |
|     |     | D3  | 10.34725              | 36.08902   | .778 | -66.5747                | 87.2692     |



|    |    |           |          |      |           |          |
|----|----|-----------|----------|------|-----------|----------|
| D2 | K- | 71.18075  | 36.08902 | .067 | -5.7412   | 148.1027 |
|    | K+ | 155.3148  | 36.08902 | .001 | 78.3929   | 232.2368 |
|    |    | 4*        |          |      |           |          |
|    | D1 | 54.33325  | 36.08902 | .153 | -22.5887  | 131.2552 |
|    | D3 | 64.68050  | 36.08902 | .093 | -12.2414  | 141.6024 |
| D3 | K- | 6.50025   | 36.08902 | .859 | -70.4217  | 83.4222  |
|    | K+ | 90.63434* | 36.08902 | .024 | 13.7124   | 167.5563 |
|    | D1 | -10.34725 | 36.08902 | .778 | -87.2692  | 66.5747  |
|    | D2 | -64.68050 | 36.08902 | .093 | -141.6024 | 12.2414  |

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

### Homogeneous Subsets

eNOS pg/mL

Duncan

| KELOMPOK         | N | Subset for alpha = 0.05 |          |
|------------------|---|-------------------------|----------|
|                  |   | 1                       | 2        |
| K +              | 4 | 74.4072                 |          |
| K -              | 4 |                         | 158.5415 |
| EVOO 1.8mL/hari  | 4 |                         | 165.0418 |
| EVOO 0.45mL/hari | 4 |                         | 175.3890 |
| EVOO 0.9mL/hari  | 4 |                         | 229.7222 |
| Sig.             |   | 1.000                   | .088     |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### Case Processing Summary

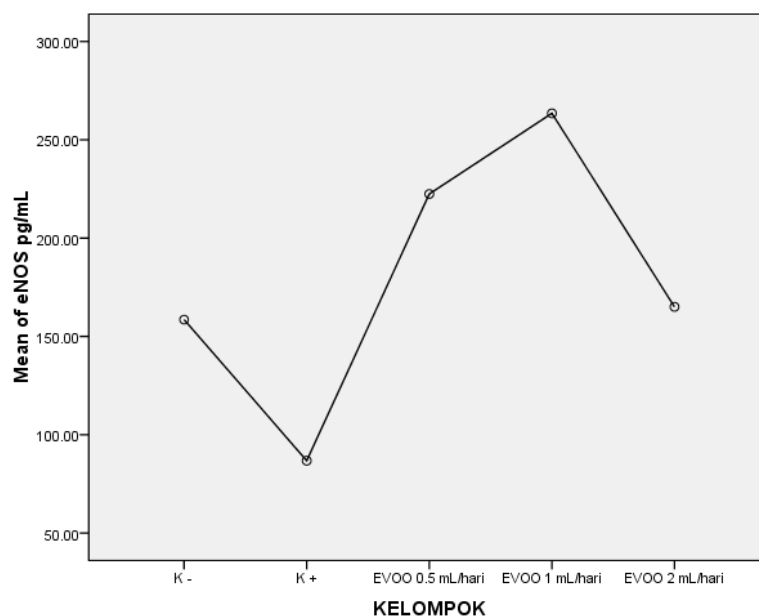
|             | Cases |         |         |         |       |         |
|-------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
|             | Valid |         | Missing |         | Total |         |
|             | N     | Percent | N       | Percent | N     | Percent |
| eNOS(pg/mL) | 20    | 95.2%   | 1       | 4.8%    | 21    | 100.0%  |

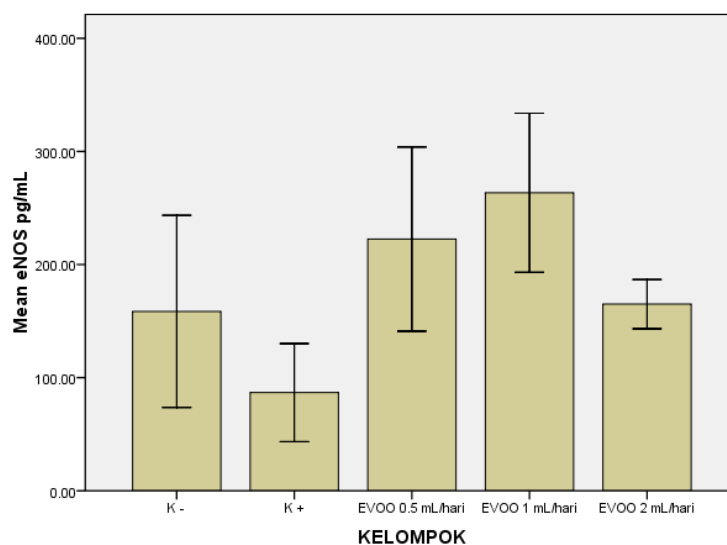


### Descriptives

|             |                                  |             | Statistic | Std. Error |
|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|------------|
| eNOS(pg/mL) | Mean                             |             | 1.6062E2  | 15.29288   |
|             | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 1.2861E2  |            |
|             |                                  | Upper Bound | 1.9263E2  |            |
|             | 5% Trimmed Mean                  |             | 1.5890E2  |            |
|             | Median                           |             | 1.6200E2  |            |
|             | Variance                         |             | 4.677E3   |            |
|             | Std. Deviation                   |             | 6.83918E1 |            |
|             | Minimum                          |             | 31.72     |            |
|             | Maximum                          |             | 320.50    |            |
|             | Range                            |             | 288.78    |            |
|             | Interquartile Range              |             | 80.31     |            |
|             | Skewness                         |             | .458      | .512       |
|             | Kurtosis                         |             | .808      | .992       |

### Means Plots





Error Bars: +/- 1 SD

### 3. Uji Korelasi

#### Descriptive Statistics

|                   | Mean     | Std. Deviation | N  |
|-------------------|----------|----------------|----|
| eNOS pg/mL        | 1.6062E2 | 68.39189       | 20 |
| gsh (mL/gprotein) | .2968    | .09014         | 20 |

#### Correlations

|                     |                   | eNOS pg/mL | gsh (mL/gprotein) |
|---------------------|-------------------|------------|-------------------|
| Pearson Correlation | eNOS pg/mL        | 1.000      | .079              |
|                     | gsh (mL/gprotein) | .079       | 1.000             |
| Sig. (1-tailed)     | eNOS pg/mL        | .          | .370              |
|                     | gsh (mL/gprotein) | .370       | .                 |
| N                   | eNOS pg/mL        | 20         | 20                |
|                     | gsh (mL/gprotein) | 20         | 20                |



## Descriptive Statistics

|                        | Mean   | Std. Deviation | N  |
|------------------------|--------|----------------|----|
| DOSIS                  | 2.0000 | .85280         | 12 |
| KadarGSH (mg/gprotein) | .3051  | .10305         | 12 |

## Correlations

|                        |                     | DOSIS  | KadarGSH<br>(mg/gprotein) |
|------------------------|---------------------|--------|---------------------------|
| DOSIS                  | Pearson Correlation | 1      | .907**                    |
|                        | Sig. (2-tailed)     |        | .000                      |
|                        | N                   | 12     | 12                        |
| KadarGSH (mg/gprotein) | Pearson Correlation | .907** | 1                         |
|                        | Sig. (2-tailed)     | .000   |                           |
|                        | N                   | 12     | 12                        |

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

## Descriptive Statistics

|                    | Mean     | Std. Deviation | N  |
|--------------------|----------|----------------|----|
| DOSIS              | 2.0000   | .85280         | 12 |
| Kadar eNOS (pg/mL) | 2.1699E2 | 71.13596       | 12 |

## Correlations

|                    |                     | DOSIS | Kadar eNOS<br>(pg/mL) |
|--------------------|---------------------|-------|-----------------------|
| DOSIS              | Pearson Correlation | 1     | -.344                 |
|                    | Sig. (2-tailed)     |       | .273                  |
|                    | N                   | 12    | 12                    |
| Kadar eNOS (pg/mL) | Pearson Correlation | -.344 | 1                     |
|                    | Sig. (2-tailed)     | .273  |                       |
|                    | N                   | 12    | 12                    |



### Lampiran 9 Proses Pembuntingan Tikus

Penelitian ini menggunakan 20 hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai sampel. Tikus bunting kemudian di randomisasi ke dalam 5 kelompok (K-, K+, D1, D2, D3), masing –masing kelompok terdiri dari 4 tikus bunting.

Tingkat keberhasilan dari kebuntingan tikus pada penelitian ini sebesar 50%.

Oleh karena itu pembuntingan tikus dilakukan dengan cara mengawinkan 50 tikus betina pada 3 periode sehingga didapatkan jumlah tikus bunting sesuai besar sampel.

Pembuntingan 1 dilakukan dengan mengawinkan (*mating*) 20 ekor tikus betina dan tikus jantan dengan perbandingan 1:1 selama satu malam pada siklus gelap dan diperiksa vaginal plug pada pagi harinya. Sebanyak 20 tikus yang telah dikawinkan di randomisasi ke dalam 5 kelompok. Pada hari ke 13 sebelum pemberian L-NAME dilakukan observasi kebuntingan tikus dengan melihat pembesaran pada abdomen dan didapatkan 10 ekor tikus bunting.

Pada *mating* 2, 15 tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan didapatkan 9 ekor tikus bunting. Pada *mating* 3 dengan mengawinkan 15 tikus betina dengan tikus jantan didapatkan 7 ekor tikus bunting. Proses yang dilakukan pada *mating* 2 dan 3 sama dengan proses dan perlakuan pada *mating* 1.



## RIWAYAT HIDUP

Afniari Maharani, lahir di Banyuwangi, 28 Juli 1991

anak ketiga dari 3 bersaudara, putri dari bapak

H.Untung Miseran dan Ibu Hj. Sri Hidayati, SPdI, Lulus

SD Muhammadiyah 06 Genteng tahun 2003, Lulus

SMP N 1 Genteng tahun 2006, lulus SMA N 1 Genteng

tahun 2009. Tahun 2009 melanjutkan pendidikan S1

Kebidanan di Universitas Brawijaya Malang lulus tahun

2013. Melanjutkan program profesi bidan di Universitas Brawijaya, lulus tahun

2015. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan Magister Kebidanan di Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bulan Januari Tahun 2016 penulis

bekerja di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Brawijaya. Bulan Juni Tahun

2016 sampai sekarang bekerja sebagai staf di S1 Kebidanan Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

