

- CURCUMA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- PREECLAMPSIA

KK

KKA

TKR. 03/11

Din

e

TESIS

CURCUMIN MENURUNKAN EKSPRESI *NUCLEAR FACTOR- κ B* PLASENTA DAN KADAR MALONDEALDEHID SERUM Pada *Mus Musculus* Model Preeklampsia



**DINA PRILIASANTI S
NIM. 090810547 M**

Pembimbing :

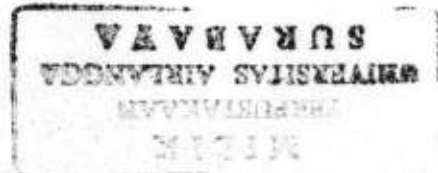
**Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr. Sp. OG (KFM)
Dr. Widati F, dr., M.Kes**

**PROGRAM MAGISTER
ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

TESIS

CURCUMIN MENURUNKAN EKSPRESI *NUCLEAR FACTOR- κ B* PLASENTA DAN KADAR MALONDEALDEHID SERUM Pada *Mus Musculus* Model Preeklampsia

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Kesehatan (M.Kes)
Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga**



**DINA PRILIASANTI S
NIM. 090810547 M**

**PROGRAM MAGISTER
ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

Lembar Pengesahan

PENELITIAN TESIS INI TELAH DISETUJUI
Pada tanggal Agustus 2010

Oleh:

Pembimbing 1

Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)
NIP. 140 092 103

Pembimbing 2

Dr. Widati F, dr., M.Kes.
NIP.19660108 199702 2001

Mengetahui:

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)
NIP. 140 092 103

**Dipertahankan di depan Tim Penguji Tesis
Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

**Dan diterima untuk memenuhi persyaratan guna memperoleh
gelar Magister Kesehatan (M.Kes)**

Pada tanggal 26 Agustus 2010

Tim Penguji :

Ketua : Dr. Rina Judiwati, dr., MS

Anggota : 1. Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp.OG (K)

2. Dr. Widati F., dr., M.Kes

3. Dr. Siti Candra, dr., MS, Sp.OG (K)

4. Dr. Widjiati, M.Si., drh

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur peneliti ucapkan kehadirat Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya serta kemudahan yang diberikan-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Profesor Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp.OG (K) selaku Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang berharga kepada peneliti atas penelitian tesis ini

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Widati, dr., M.Kes, pembimbing yang dengan penuh perhatian & kesabaran telah memberikan banyak waktu pribadi untuk mengajari peneliti dan memberikan banyak masukan, bimbingan serta saran kepada peneliti.

Dengan selesainya tesis ini, perkenalkanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan.
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Sri Hajati, SH., MS yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan program Magister.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P (K)
4. Doktor, Staf bagian embriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Dr. Widjiati, drh., M.Si atas bimbingan, dukungan dan waktu yang telah diberikan selama penelitian.
5. Doktor, staf bagian Obstetri Ginekologi Universitas Brawijaya Malang , Dr. Siti Candra, dr., MS, Sp.OG (K) yang telah berkenan menyediakan waktu berdiskusi, memberikan saran dan masukan yang berharga.
6. Guru besar, kepala divisi Fetomaternal FK UNAIR RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Prof. Dr. H. Agus Abadi, dr., Sp.OG (K) yang telah banyak memberikan nasihat dan dorongan selama ini.
7. Dosen penguji, Dr. Rina Judiwati, dr., MS atas waktu yang telah diberikan.

8. Keluarga besar peneliti, ibu & ayah ; Mama Ismartiana & Bapak Lagi Soebroto, dr. ; Mama Yanny & Papa Farid; Suami tercinta Brian Vicky Faridyan, dr. dan putra kami tersayang Briandy Ahmad Farrosy, sebagai sumber inspirasi, semangat dan telah memberikan dukungan sepenuhnya kepada peneliti untuk terus menuntut ilmu dan berkarya.

Perkenankanlah juga peneliti untuk menyampaikan mohon maaf yang setulusnya atas segala hal yang tidak berkenan selama peneliti mengikuti pendidikan program magister ini. Semoga Tuhan merahmati dan menjadikan ilmu yang ditularkan ini menjadi ilmu yang bermanfaat bagi kita semua dan orang lain. Amin.

Surabaya, Agustus 2010

Peneliti,

Dina Priliasanti Subroto, dr.

**CURCUMIN DECREASE PLACENTAL NF- κ B EXPRESSION AND
MALONEDIALDEHIDE SERUM
In Preeclamptic *Mus musculus* model**

Objective: Curcumin, derived from the plant *Curcuma* that is a commonly used not only as spice but also as medicinal plants. Curcumin has been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, and anti-platelet. These effects are mediated through the regulation of various transcription factors, inflammatory cytokines, protein kinase, and other enzymes. Thus, has a potential against oxidative stress-related and inflammatory illness, Preeclampsia. This study compare NF- κ B expression and malonedialdehyde assesment (as a marker of oxidative stress gradation) between preeclamptic mice model treated with two different dose curcumin and control.

Method: Experimental study, randomized controlled double blind controlled trial. Three mice groups, preeclamptic induced by injection of anti-Qa2 antibody. One group treated with 100 mg/kgBW of curcumin, other group with 240 mg/kgBW of curcumin, and one control group (aquades as plasebo). Those treatment given daily until 14 days. The mice were sacrificed, placentas were taken for NF- κ B expression assesment with immunohistochemistry staining method, the serums were taken for malonedialdehyde assesment.

Result: There are significant differences in NF- κ B assesment between group treated with 100 mg/kgBW of curcumin and control (1,5111 \pm 0,2922), group treated with 240 mg/kgBW of curcumin and control (1,0000 0,2922). But there is no significant difference between group treated by 100 mg/kgBW of curcumin and group treated by 240 mg/kgBW of curcumin (-0,5111 \pm 0,2922). There are significant differences in malonedialdehyde amount between group treated with 100 mg/kgBW of curcumin and control (mean difference 2,7320 \pm 0,3042), group treated with 240 mg/kgBW of curcumin and control (mean difference 3,5334 \pm 0,2612), between group treated with 100 mg/kgBW of curcumin and group treated with 240 mg/kgBW of curcumin (mean difference 0,8014 \pm 0,1624).

Conclusion: Curcumin decrease NF- κ B expression and malonedialdehyde amount in preeclamptic mice model. The decreasing is dose dependent. At dose 240 mg/kgBW, curcumin might have pro-oxidant effect that cause decreasing of curcumin antioxidant activity.

KATA PENGANTAR

Penulis memanjatkan syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa sebagai pembuka, karena atas berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **Curcumin Menurunkan Ekspresi *Nuclear Factor-κB* Plasenta dan Kadar Malondealdehid Serum Pada *Mus musculus* Model Preeklampsia** yang merupakan syarat kelulusan program magister.

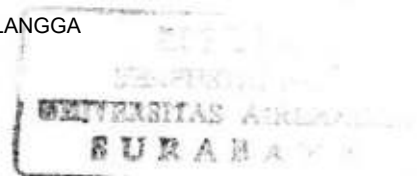
Penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari kesempurnaan, hal ini tidak terlepas dari keterbatasan-keterbatasan yang dihadapi penulis diantaranya keterbatasan literatur yang dimiliki penulis, sehingga penyajian penulisan masih dalam bentuk yang sederhana. Keterbatasan dana juga merupakan faktor signifikan yang tidak dapat dihindari, sehingga penulis membatasi dari banyak parameter penelitian yang dapat diukur, hanya beberapa saja yang dilakukan. Sehubungan dengan hal tersebut maka penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan dari penulisan makalah selanjutnya.

Akhirnya penulis ucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan diharapkan tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, Agustus 2010

Penulis

DAFTAR ISI



	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
KETERANGAN SINGKATAN.....	viii
BAB 1 : PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan	5
1.3.1. Tujuan umum	5
1.3.2. Tujuan khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1. Manfaat akademis	6
1.4.2. Manfaat praktis	6
BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kehamilan dan Preeklampsia	7
2.1.1 Perkembangan trofoblas pada kehamilan	7
2.1.2 Imunologi implantasi	11
2.1.3 Maladaptasi imunologis	12
2.1.4 <i>Nuclear Factor-κB</i>	14
2.1.5 <i>Human Leukocyte Antigen</i>	20
2.1.6 Patofisiologi preeklampsia	22
2.2. Radikal Bebas	26
2.2.1 Efek ROS terhadap membran lipid	29
2.2.2 Efek ROS terhadap DNA	30
2.2.3 Peroksidasi lipid	30
2.2.4 Malondealdehid	32
2.3 Stres Oksidatif pada Preeklampsia	33

2.4 Curcumin	35
2.4.1 Tanaman kunir	35
2.4.2 Kandungan kimia terbesar	36
2.4.3 Farmakokinetik dan efek samping	37
2.4.4 Kegunaan secara tradisional	37
2.4.5 Target molekular curcumin	38
2.5 Kebuntingan dan Preeklampsia pada <i>Rodent</i>	43
2.5.1 <i>Mus musculus</i> (mencit)	46
2.5.2 HLA-G pada mencit	46
2.6 Model Preeklampsia pada Mencit	48
BAB 3 : KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	50
PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	50
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	51
3.3 Hipotesis Penelitian	54
BAB 4 : METODE PENELITIAN	55
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	55
4.2 Sampel dan Besar Sampel	56
4.2.1 Sampel	56
4.2.2 Kriteria sampel	57
4.2.3 Kriteria putus uji	57
4.2.4 Besar sampel	58
4.3 Variabel Penelitian	58
4.3.1 Klasifikasi variabel	58
4.3.2 Definisi operasional	58
4.4 Bahan Penelitian	60
4.4.1 Bahan serbuk curcumin	60
4.4.2 Larutan curcumin	60
4.4.3 Bahan antibodi anti-Qa2	62
4.4.4 Larutan antibodi anti Qa-2	63
4.4.5 Bahan hormon PMSG	63

4.4.6 Larutan hormon PMSG	63
4.4.7 Bahan hormon hCG	64
4.4.8 Larutan hormon hCG	64
4.4.8 Pakan dan minum mencit	65
4.5 Tempat dan Waktu Penelitian	65
4.6 Teknik Penelitian	65
4.7 Pengolahan dan Analisis Data	68
4.7.1 Kadar malondealdehid	68
4.7.2 Ekspresi NF- κ B	68
4.8 Kerangka Operasional	69
BAB 5 : HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	70
5.1 Data Penelitian	70
5.1.1 Sampel <i>Mus musculus</i>	70
5.1.2 Data kadar malondealdehid	71
5.1.3 Data ekspresi NF- κ B	72
5.2 Analisis Data Penelitian Kadar Malondealdehid	74
5.2.1 Uji normalitas distribusi data	75
5.2.2 Uji homogenitas varians data	75
5.2.3 Uji Kruskal Wallis	76
5.2.4 Uji t test 2 sampel tidak berpasangan	76
5.2.4.1 Uji t test 2 sampel tidak berpasangan K0 - K1	76
5.2.4.2 Uji t test 2 sampel tidak berpasangan K0 – K2	77
5.2.4.3 Uji t test 2 sampel tidak berpasangan K1 – K2	77
5.3 Analisis Data Ekspresi NF- κ B	77
5.3.1 Uji normalitas distribusi data	78
5.3.2 Uji homogenitas varians data	78
5.3.3 Uji <i>one way ANOVA</i>	79
5.3.4 Uji beda nyata terkecil	80
BAB 6 : PEMBAHASAN	81
6.1 Pemberian curcumin menurunkan kadar malondealdehid pada model mencit preeklampsia	82

6.2 Pemberian curcumin menurunkan ekspresi NF- κ B pada model mencit preeklampsia	83
BAB 7 : KESIMPULAN DAN SARAN	86
7.1 Kesimpulan	86
7.2 Saran	86
DAFTAR PUSTAKA	88
LAMPIRAN	96
KETERANGAN KELAIKAN ETIK	120

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1.	Diagram tahap-tahap <i>remodeling</i> arteri spiralis	8
Gambar 2.2	Jalur intrinsik mitokondria dalam proses apoptosis	10
Gambar 2.3	Invasi trofoblas	23
Gambar 2.4.	Terbentuknya ROS	27
Gambar 2.5.	Sumber dan akibat dari peningkatan kalsium sitosolik pada kerusakan sel	28
Gambar 2.6	Peranan spesies oksigen reaktif pada proses kerusakan sel.	29
Gambar 2.7.	Rusaknya rantai DNA akibat radikal bebas	30
Gambar 2.8	Malondealdehid	33
Gambar 2.9	Reaksi MDA dengan TBA	33
Gambar 2.10	Pengaruh radikal bebas, B. Stres oksidatif, C. Mekanisme netralisasi radikal bebas	34
Gambar 2.11	Struktur bangun <i>Curcuminoid</i>	36
Gambar 2.12	Kegunaan Curcumin secara tradisional	38
Gambar 2.13	Mekanisme kerja Curcumin pada aktivasi <i>NF-κB</i>	39
Gambar 2.14	Target molekuler dari Curcumin	43
Gambar 2.15	Perbandingan plasenta pada tikus dan manusia	45
Gambar 5.1	Diagram batang rerata kadar malondealdehid	72
Gambar 5.2	Lapangan pandang imunohistokimia kelompok kontrol	72
Gambar 5.3	Lapangan pandang imunohistokimia kelompok perlakuan 1	72
Gambar 5.4	Lapangan pandang imunohistokimia kelompok perlakuan 2	73
Gambar 5.5	Rerata skor imunoreaktif terhadap <i>NF-κB</i>	74

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Perbandingan plasenta pada manusia dan mencit	44
Tabel 2.2. Perbandingan HLA-G dan Qa-2, produk gen <i>Ped</i>	48
Tabel 5.1. Berat badan mencit perlakuan	70
Tabel 5.2. Perlakuan pada kelompok mencit	71
Tabel 5.3. Besar absorban dan kadar malondealdehid pada tiap kelompok sampel	71
Tabel 5.4. Skor sel imunoreaktif terhadap NF- κ B pada kelompok mencit	73
Tabel 5.5. Uji normalitas distribusi data MDA (Uji Shapiro-Wilk)	75
Tabel 5.6. Hasil uji homogenitas varians data MDA (Uji Levene's)	75
Tabel 5.7. Hasil uji signifikansi dengan Kruskal Wallis	76
Tabel 5.8. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K0 dan K1	76
Tabel 5.9. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K0 dan K2	77
Tabel 5.10. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K1 dan K2	77
Tabel 5.11. Hasil uji normalitas distribusi data NF- κ B (Uji Shapiro-Wilk)	78
Tabel 5.12. Hasil uji homogenitas varians data NF- κ B (Uji Levene's)	79
Tabel 5.13. Hasil uji signifikansi dengan <i>one way ANOVA</i>	79
Tabel 5.14. Uji beda nyata terkecil	80

KETERANGAN SINGKATAN

AP-1	:	<i>activating protein-1</i>
AR	:	<i>androgen receptor;</i>
Arh-R	:	<i>aryl hydrocarbon receptor; DR-5, death receptor-5;</i>
Bcl-2	:	<i>B-cell lymphoma protein 2;</i>
cAK	:	<i>autophosphorylation-activated protein kinase;</i>
CBP	:	<i>CREB-binding protein;</i>
CDPK	:	<i>Ca²⁺-dependent protein kinase;</i>
COX2	:	<i>cyclooxygenase-2;</i>
cPK	:	<i>protamine kinase;</i>
CTGF	:	<i>connective tissue growth factor;</i>
DFF40	:	<i>DNA fragmentation factor, 40-kd subunit.</i>
EGF	:	<i>epidermal growth factor;</i>
EGF-R	:	<i>EGF-receptor;</i>
EGFRK	:	<i>EGF receptor-kinase;</i>
Egr-1	:	<i>early growth response gene-1;</i>
ELAM-1	:	<i>endothelial leukocyte adhesion molecule-1;</i>
EPC-R	:	<i>endothelial protein C-receptor;</i>
EpRE	:	<i>electrophile response element;</i>
ERK	:	<i>extracellular receptor kinase;</i>
ER- α	:	<i>estrogen receptor-alpha;</i>
FAK	:	<i>focal adhesion kinase;</i>
Fas-R	:	<i>Fas receptor;</i>
FGF	:	<i>fibroblast growth factor;</i>
FPTase	:	<i>farnesyl protein transferase;</i>
Gcl	:	<i>glutamate-cysteine ligase;</i>
GST	:	<i>gluthathione. S-transferase;</i>
H2-R	:	<i>histamine (2)-receptor;</i>
HGF	:	<i>hepatocyte growth factor;</i>
HO	:	<i>hemeoxygenase;</i>
HSP-70	:	<i>heat-shock protein 70;</i>
IAP	:	<i>inhibitory apoptosis protein;</i>
IARK	:	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase;</i>
ICAM-1	:	<i>intracellular adhesion molecule-1;</i>
IL 8-R	:	<i>interleukin 8-receptor;</i>
IL	:	<i>interleukin;</i>
iNOS	:	<i>inducible nitric oxide oxidase;</i>
InsP3-R	:	<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor;</i>
IR	:	<i>Integrin receptor;</i>
JAK	:	<i>janus kinase;</i>
JNK	:	<i>c-jun N-terminal kinase;</i>
LDL-R	:	<i>low density lipoprotein-receptor;</i>
LOX	:	<i>lipoygenase;</i>
MAPK	:	<i>mitogen-activated protein kinase;</i>
MCP	:	<i>monocyte chemoattractant protein;</i>
MDR	:	<i>multi-drug resistance;</i>
MIF	:	<i>migration inhibition protein;</i>
MIP	:	<i>macrophage inflammatory protein;</i>

MMP	:	<i>matrix metalloproteinase;</i>
NAT	:	<i>Arylamine N-acetyltransferases;</i>
NF- κ B	:	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NGF	:	<i>nerve growth factor;</i>
Nrf-2	:	<i>nuclear factor 2-related factor;</i>
PDGF	:	<i>platelet derived growth factor;</i>
PhK	:	<i>phosphorylase kinase; PKA, protein kinase A;</i>
PKB	:	<i>protein kinase B;</i>
PKC	:	<i>protein kinase C; pp60c-src, pp60c-src tyrosine kinase;</i>
PPAR γ	:	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma;</i>
SHP-2	:	<i>Src homology2 domain-containing tyrosinephosphatase2</i>
STAT	:	<i>signal transducers and activators of transcription;</i>
TGF- β 1	:	<i>transforming growth factor-β1;</i>
TIMP	:	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-3;</i>
TK	:	<i>protein tyrosine kinase;</i>
TNF α	:	<i>tumor necrosis factor alpha;</i>
uPA	:	<i>urokinase-type plasminogen activator,</i>
VCAM-1	:	<i>vascular cell adhesion molecule-1;</i>
VEGF	:	<i>vascular endothelial growth factor;</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

Diperkirakan di dunia setiap menit perempuan meninggal karena komplikasi yang terkait dengan kehamilan dan persalinan, dengan kata lain 1500 perempuan meninggal setiap harinya atau lebih dari 500.000 perempuan meninggal dalam satu tahun karena kehamilan dan persalinan (WHO, 2005).

Salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas ibu dan janin terkait dengan kehamilan dan persalinan disamping karena perdarahan dan infeksi adalah preeklampsia (PE). Lebih dari empat juta wanita mengalami preeklampsia setiap tahunnya (Lyall, 2007). Prevalensi dari preeklampsia berkisar antara 4,4–17,5% dengan rata-rata 4,6% (Gibson, 2006). Di Indonesia angka kejadian preeklampsia 3–10% dan memberikan kontribusi sebesar 39,5% pada angka kematian ibu tahun 2001 dan meningkat tajam menjadi 55,56% pada tahun 2002 (Roeshadi, 2004).

Preeklampsia adalah suatu penyakit pada kehamilan yang ditandai dengan hipertensi dan proteinuria sesudah usia kehamilan 20 minggu. Pada umumnya sindroma ini muncul pada akhir trimester kedua sampai trimester ketiga kehamilan. Gejala berkurang atau menghilang setelah melahirkan sehingga terapi definitifnya adalah mengakhiri kehamilan (Roberts JM, 1998). Preeklampsia dapat berakibat buruk baik pada ibu maupun janin yang dikandung. Komplikasi pada ibu berupa sindroma HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme, low platelet*), edema paru, gangguan ginjal, perdarahan, solusio plasenta bahkan kematian ibu. Komplikasi pada bayi dapat berupa kelahiran prematur, gawat janin, berat badan lahir rendah atau *intra uterine fetal death* (IUFD) (Mutter et al., 2007).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa terjadinya disfungsi endotel maternal, seperti yang terjadi pada kehamilan dengan preeklampsia, akan tetap ada hingga beberapa tahun setelah episode. Dan pada wanita dengan preeklampsia terdapat peningkatan risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler (Chambers et al, 2001). Banerjee dan Cruickshank JK (2006) telah merangkum beberapa hasil studi terkait hal tersebut, menyimpulkan adanya peningkatan angka kejadian hipertensi, diabetes mellitus, peningkatan kolesterol darah, obesitas, dan peningkatan diameter lingkaran pinggul pada wanita dengan riwayat preeklampsia yang diamati selama 7 hingga 31 tahun setelah mengalami preeklampsia.

Preeklampsia terjadi karena kelainan implantasi. Terdapat beberapa teori mengenai etiologi molekuler preeklampsia diantaranya predisposisi genetik, trombofilia, endokrinopati, vaskulopati, iskhemi plasenta, stres oksidatif dan maladaptasi imun (Wochenschr, 2003). Akhir-akhir ini disfungsi endotel dianggap berperan dalam patogenesis preeklampsia (Wibowo N, 2001) dengan segala akibatnya yang saling berkaitan. Hasil akhir dari kelainan implantasi dan molekuler ini adalah hipoksia plasenta karena kerusakan endotel, yang kemudian memicu produksi mitogen, sitokin, eikosanoid dan komponen vasoaktif lainnya, salah satunya tromboksan, yaitu sebuah vasokonstriktor kuat dan stimulan agregasi platelet yang dapat memperberat hipoksia plasenta.

Acetylsalicylic acid, atau dikenal dengan aspirin, menghambat agregasi platelet. Sibai et al pernah meneliti penggunaan aspirin dosis rendah (60 mg per hari) bermanfaat untuk mencegah preeklampsia pada wanita sehat, nulipara, tanpa adanya faktor risiko. Diantara 3135 wanita, insiden preeklampsia lebih rendah secara signifikan pada kelompok yang diberi aspirin daripada kelompok yang diberi plasebo (4,6% dibanding 6,3%). Diantara wanita dengan tekanan darah sistolik awal 120

hingga 134 mm Hg yang diterapi aspirin, terdapat penurunan insiden preeklampsia (5,6% dibanding 11,9%). Studi lain yang dilakukan Duley et al (2007) melaporkan penurunan insiden ini juga didapatkan dengan penggunaan agen anti platelet lain (dipyridamol) selain aspirin. Agen antioksidan selama ini juga digunakan sebagai terapi preeklampsia, mengingat patofisiologi preeklampsia sebagai penyakit stres oksidatif yang disebabkan terbentuknya radikal bebas dalam jumlah besar.

Terapi medis untuk preventif preeklampsia pada wanita hamil dengan risiko preeklampsia selama ini diantaranya menggunakan obat-obatan anti trombotik, seperti aspirin di atas, dan anti oksidan. Namun, penggunaan aspirin jangka panjang tersebut dapat menimbulkan efek samping masalah gastrointestinal. Penggunaan dosis rendah pada terapi aspirin jangka panjang tetap tidak menurunkan risiko terjadinya masalah gastrointestinal (Derry, 2000). Pengobatan yang aman, efektif dan terjangkau di masa dewasa ini semakin dikembangkan.

Dewasa ini pengobatan herbal mulai dipertimbangkan khasiat dan efektifitasnya melalui penelitian yang banyak berkembang. Curcumin, adalah salah satu bagian dari kekayaan herbal tradisional yang mudah ditemui sebagai salah satu tanaman obat selama beberapa abad. Curcumin diturunkan dari akar tanaman *Curcuma longa*, selain digunakan sebagai obat, juga dikenal luas sebagai bumbu masakan yang memberi warna kuning emas. Beberapa spesies dari genus curcuma yang lain juga mengandung Curcumin, diantaranya *C. phaeocaulis* (3%), *C. zedoaria* (0,1%), *C. xanthorrhiza* (1-2%). Namun, telah diteliti bahwa *Curcuma longa* -lah yang mempunyai kandungan Curcumin terbanyak (3-8%).

Curcumin telah diteliti dan diketahui sebagai bahan anti-inflamasi, anti-kanker, anti alergi. Juga telah banyak diteliti penggunaannya sebagai terapi arthritis, terapi supportif untuk diabetes, penyakit kolesterol, kardiovaskular dan

neuroprotektor. Curcumin mempunyai efek anti platelet seperti aspirin. Juga merupakan antioksidan kuat, seperti vitamin antioksidan yang selama ini digunakan untuk terapi preeklampsia. Satu studi melaporkan kejadian ulkus pada lambung tikus tapi tidak ditemukan pada penelitian berikutnya. Melihat potensi Curcumin yang dapat menghambat faktor-faktor patofisiologi preeklampsia, juga karena efek sampingnya yang rendah, peneliti memilih mempelajari pengaruh Curcumin untuk perbaikan kondisi preeklampsia.

Preeklampsia adalah penyakit pada manusia. Penelitian etiopatogenesis molekuler dan seluler preeklampsia pada wanita hamil sangat sulit dan mahal. Untuk mengetahui etiopatogenesis preeklampsia dengan menggunakan jaringan trofoblas pada trimester I dan trimester II pada manusia tidak lazim dikerjakan karena merupakan tindakan yang invasif dan mengakibatkan abortus/partus prematurus yang tentunya tidak diperbolehkan secara etis medis (Sulistiyowati, 2009). Hal ini membuat peneliti melakukan penelitian preeklampsia dengan model hewan coba. Berbagai cara telah dilaporkan untuk membuat model preeklampsia pada hewan, yang saat ini banyak dilakukan adalah pada spesies rodent. Patofisiologi preeklampsia yang berhubungan dengan ekspresi HLA-G, telah diketahui homolog dengan ekspresi Qa-2 pada rodent. Sesuai metode penelitian sebelumnya, peneliti menggunakan pemberian antibodi anti Qa-2 untuk membuat model Qa-2 negatif yang menunjukkan disfungsi endotel pada mencit (*Mus musculus*).

Diharapkan hasil penelitian ini dapat membuka kemungkinan pengembangan penelitian lebih lanjut untuk memanfaatkan *Curcuma longa* yang merupakan obat tradisional Indonesia sebagai alternatif terapi untuk memperbaiki kondisi preeklampsia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dikemukakan rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

Apakah jumlah ekspresi NF- κ B dan kadar malondealdehid lebih sedikit pada mencit model preeklampsia yang diberi perlakuan curcumin dibandingkan mencit model preeklampsia yang tidak diberi curcumin?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Mengamati pengaruh zat aktif *Curcumin* untuk perbaikan kondisi preeklampsia pada mencit.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 100 mg/kg BB terhadap penurunan jumlah ekspresi NF κ B pada mencit model preeklampsia yang diberi perlakuan curcumin dan pada mencit kelompok kontrol.
2. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 240 mg/kg BB terhadap penurunan jumlah ekspresi NF κ B pada mencit model preeklampsia yang diberi perlakuan curcumin dan pada mencit kelompok kontrol.
3. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 100 mg/kg BB terhadap penurunan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia yang diberi perlakuan curcumin dan pada mencit kelompok kontrol.
4. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 240 mg/kg BB terhadap penurunan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia yang diberi perlakuan curcumin dan pada mencit kelompok kontrol.

5. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 100 mg/kg BB dibandingkan dengan pemberian Curcumin dosis 240 mg/kg BB terhadap penurunan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia.
6. Membuktikan perbedaan pengaruh pemberian Curcumin dosis 100 mg/kg BB dibandingkan dengan pemberian Curcumin dosis 240 mg/kg BB terhadap penurunan jumlah ekspresi NFkB pada mencit model preeklampsia.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

1. Meneliti bahwa curcumin dapat digunakan untuk perbaikan kondisi preeklampsia pada mencit.
2. Memberi kesempatan peneliti berikutnya untuk meneliti efek terapi curcumin dengan tujuan tersebut menggunakan simplisia dari *C. Longa*

1.4.2 Manfaat praktis

1. Memanfaatkan curcumin sebagai bahan obat herbal tradisional untuk digunakan sebagai terapi preeklampsia
2. Memanfaatkan curcumin sebagai bahan obat tradisional untuk digunakan sebagai terapi penyakit akibat stres oksidatif dan penyakit inflamasi pada umumnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

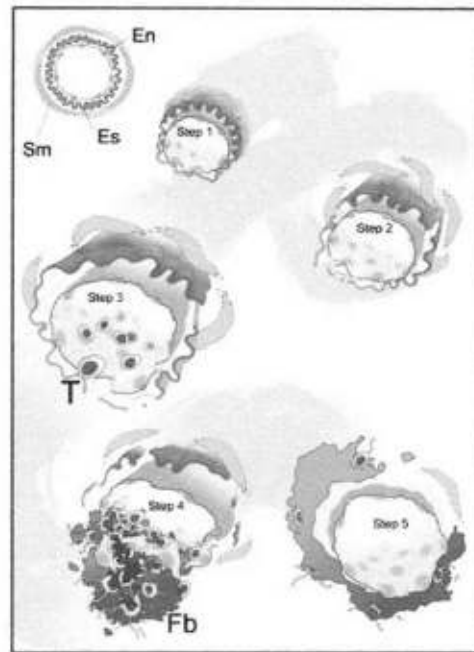
2.1 Kehamilan dan Preeklampsia

2.1.1 Perkembangan Trofoblas Pada Kehamilan

Fertilisasi dalam tuba falopii terjadi dalam 24-48 jam sesudah ovulasi. Perkembangan dari zigot hingga morula terjadi dalam zona pelusida. Morula memasuki kavum uteri setelah 2-3 hari sesudah fertilisasi. Saat terjadi transisi antara morula dan blastokis, terjadi diferensiasi sel. Elemen pertama yang mengalami diferensiasi saat hasil konsepsi berbentuk morula adalah trofoektoderm. Saat morula berubah menjadi blastokis, sel-sel trofoektoderm membentuk lapisan mengelilingi blastokis dengan *inner cell mass* pada salah satu kutubnya. Pada hari keenam hingga ketujuh setelah terjadinya ovulasi, blastokis berinsersi diantara sel epitel mukosa uterus. Saat itu trofoektoderm pada tempat perlekatan mengalami diferensiasi menjadi *syncytial mass*. Perubahan ini diduga terjadi oleh karena rangsangan saat kontak dengan epitel permukaan. Setelah hari kedelapan, trofoblas berdiferensiasi menjadi *outer multinucleated syncytiotrophoblast (primitive syncytium)* dan *inner layer of primitive mononuclear cytotrophoblast*. Selanjutnya *syncytial mass* melakukan penetrasi diantara sel epitel dan secara cepat ekspansi tersebut mencapai stroma dibawahnya. Ini terjadi sebagai akibat dari mitosis sel sitotrofoblas.

Pada sinsitium mulai terbentuk vakuola dan lakuna yang membesar secara cepat dan menyatu setelah hari kesembilan. Saat itu sirkulasi uteroplacenta terjadi ketika kapiler vena dirusak oleh sinsitium sehingga darah dapat melewati sistem lakuna. Selanjutnya lakuna akan menjadi spatium intervillus. Pada plasenta definitif. pada hari kedua belas hingga ketiga belas setelah fertilisasi, posisi blastokis telah sepenuhnya terfiksasi dalam stroma desidua dan epitel permukaan uterus telah tumbuh menutup defek yang terjadi. Proses ini melibatkan nekrosis jaringan dan reaksi inflamasi mukosa yang minimal (Loke,

1995; Norwitz, 2001). Setelah fase nidasi, perkembangan trofoblas selanjutnya terjadi melalui dua jalur yaitu vilus dan ekstravilus. Perbedaan ini berkaitan dengan fungsinya yang berbeda. Trofoblas vilus menutup vili koriales dari plasenta definitif dan berkaitan dengan transport oksigen dan nutrien dari ibu ke janin. Sedangkan trofoblas ekstravilus bermigrasi ke dalam mukosa uterus hingga mencapai myometrium melalui berbagai bentuk sel maternal selama berinfiltrasi ke dalam jaringan uterus (Loke, 1995).



Gambar 2.1 Diagram tahap-tahap remodeling pada arteri spiralis.

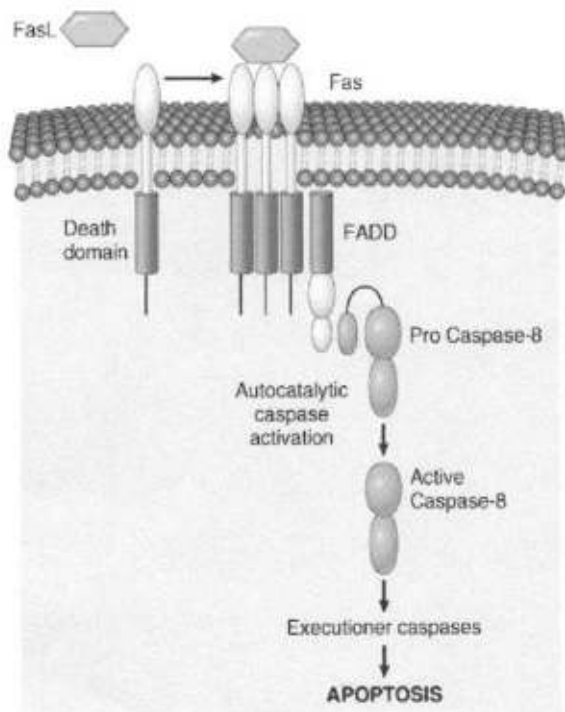
Gambar diatas menunjukkan tahap remodelling pada arteri spiralis. Tahap 1 diawali dengan vakuolisasi endotelial. Pada tahap 2 dimulai disorganisasi awal stratum media dan pelunakan stratum elastika, kondisi tersebut berhubungan dengan dilatasi awal pembuluh darah. Pada tahap 3 endovaskular trofoblas tampak pada lumen arteri. Dua langkah berikutnya merupakan bagian dari perubahan fisiologis. Tahap 4. endovaskular trofoblas menyatu dengan dinding pembuluh darah, proses ini berhubungan dengan deposisi fibrinoid. Otot polos dan stratum elastika digantikan oleh materi fibrinoid, dimana proses

pelekatan trofoblast membentuk bentukan seperti jaring laba-laba. Langkah terakhir yaitu langkah 5, melibatkan perbaikan endotel dan penebalan stratum intima (kiri) (Kumar, 2005).

Pada saat usia kehamilan kurang dari 10 minggu, kondisi uterus adalah dalam keadaan hipoksia. Kadar oksigen yang ada sebesar 2%, ini sesuai dengan tekanan oksigen sebesar 14 mmHg. Kondisi ini akan merangsang peningkatan jumlah siklin B2, suatu regulator pembelahan sel, hingga tiga kali lipat. Peningkatan siklin ini akan mengakibatkan peningkatan proliferasi trofoblas yang mengekspresikan *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Selain itu, kondisi hipoksia ini mengakibatkan dikeluarkannya *hypoxia-inducible factor* (HIF) yang selanjutnya akan merangsang meningkatnya pembentukan VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oleh desidua. Rangsangan VEGF akan mengakibatkan proliferasi trofoblas dan mengurangi aktifitas differensiasi trofoblast yang sejalan dengan proses invasi (Damsky, 1994).

Pada kadar oksigen 20% (98 mm Hg) seperti di sekitar arteriole uterus, akan terjadi peningkatan ekspresi p21 hingga 3-4 kali lipat. Sehingga akan menghentikan sirkulasi sel. Selanjutnya oleh adanya pengaruh VEGF yang rendah kadarnya akan merangsang aktifitas differensiasi trofoblas yang sejalan dengan proses invasi. Di mana trofoblas yang invasif tersebut mengekspresikan protoonkogen *c-erbB* (Damsky, 1994). Pada perkembangan awal trofoblas mengekspresikan integrin $\alpha 5\beta 1$ yang merupakan reseptor fibronectin, selanjutnya pada saat invasi sel ini akan mengekspresikan integrin $\alpha 5\beta 1$ yang merupakan reseptor kolagen/laminin. Sehingga sel trofoblas tersebut dapat mengadakan invasi jauh ke arteri spiralis yang berada pada 1/3 atas lapisan miometrium. Namun bila terjadi kegagalan dalam mengekspresikan integrin $\alpha 5\beta 1$, maka invasi trofoblas akan menjadi sangat dangkal sehingga dapat berakhir dengan terjadinya preeklampsia (Genbacev, 1997).

Pada kondisi kehamilan normal terjadi apoptosis sel sinsitiotrofoblas yang dapat dilihat dengan elektron mikroskop dalam bentuk gambaran khas seperti hilangnya mikroviili dan mengembungnya membran permukaan. Apoptosis ini berperan dalam pergantian sitotrofoblas dan pembaruan permukaan sinsitium dari viili koreales. Proses apoptosis pada plasenta ini dikendalikan oleh XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis protein*), Fas dan FasL (*Fas Ligand*). Proses apoptosis selain terjadi pada sinsitiotrofoblas juga terjadi pada sitotrofoblas. Proses ini makin meningkat dengan makin tuanya kehamilan. Ini terjadi karena adanya peningkatan pembentukan FasL dan penurunan pembentukan XIAP (Gruslin, 2001).



Gambar. 2.2 Jalur intrinsik (mitokondria) dalam proses apoptosis. *Death agonis* menyebabkan perubahan pada membran bagian dalam mitokondria, mengakibatkan *mitochondrial permeability transition* (MPT) dan pelepasan sitokrom *c* dan pro-apoptosis lainnya ke dalam sitosol, yang kemudian mengaktifasi enzim caspase (Kumar, 2005)

2.1.2 Imunologi Implantasi

Sebagaimana yang telah diungkapkan oleh Davies (2007), bahwa ada tiga mekanisme yang mungkin untuk menjelaskan bisa bertahannya fetus dalam organ ibu adalah:

- a. Pemisahan atomis antara ibu dan janin
- b. Imaturitas antigen janin
- c. *Immunologic 'inertness'* atau toleransi imunologis dari ibu

Kemungkinan yang ketigalah yang paling memungkinkan (Munn, 1998). Adapun interaksi yang terjadi secara imunologis pada *feto-maternal function* adalah interaksi sitotrofoblas dengan sel NK CD 56 Bright dan HLA-G menghasilkan produksi mRNA dan G-CSF, M-CSF, CSF-1, TNF- α , IL-1, IL-8, dan IFN- γ . Kesemua sitokin tersebut akan merangsang proliferasi dan diferensiasi sitotrofoblas. IFN- γ akan merangsang sitotrofoblas untuk mengekspresikan HLA-G dua kali lipat. Sel NK CD56 yang ada di desidua lain dengan sel NK yang beredar di sirkulasi maternal. Interaksi dengan matriks ekstraseluler pada *anchoring villous*, sitotrofoblas mengekspresikan $\alpha 6\beta 4$ untuk berinteraksi dengan laminin dan sinsitiotrofoblas. Untuk sitotrofoblas yang migrasi/invasi akan mengalami perubahan jadi $\alpha 5\beta 1$ agar dapat berikatan dengan fibronektin. Saat invasi ke endovaskuler akan berubah lagi jadi $\alpha 1\beta 1$. Perubahan dari tipe laminin ke fibronektin diduga dipengaruhi oleh faktor serum. Ini telah dibuktikan oleh Bunows, 1994 dengan *Mabs*-nya yang berperan seperti menghasilkan peptida RGD (*arginine-glycine-aspartic acid*) dalam kadar sesuai dosis. Preeklampsia ditandai dengan kegagalan perubahan integrin laminin ke fibronektin (Zhou, 1993).

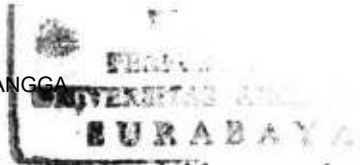
Pada kehamilan normal, ekspresi HLA-G dalam jumlah yang mencukupi selanjutnya ini akan berinteraksi dengan sel NK sehingga merangsang aktivitas ITIMs

(*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*). Hal ini akan mengaktivasi PTP (*protein tyrosine phosphatase*) sehingga sel NK selanjutnya akan membentuk IL-4. Sitokin ini selanjutnya akan mengaktivasi sel T naif untuk membentuk sel Th2 melalui jalur STAT6 (*signal transducer and activator of transcription*) yang memproduksi sitokin Th2 (Brien, 2000; Klien, 2000; Abbas, 2003). Selain itu sel sinsitiotrofoblas juga memproduksi enzim indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) yang berfungsi mengatabolisme triptofan. Sedangkan triptofan yang diperlukan untuk proliferasi sel T (Kudo, 2003; Chaiworapongsa, 2002). Sehingga sinsitiotrofoblas dapat menyupresi aktifitas sel T dan mempertahankan diri terhadap mekanisme penolakan oleh tubuh ibu. Hasil akhir dari interaksi ini adalah berupa tidak terjadinya respon sitolitik terhadap trofoblas. Sehingga trofoblas dapat melakukan invasi secara dalam. Sehingga tidak terjadi insufisiensi plasenta.

2.1.3 Maladaptasi imunologis

Maladaptasi imunologis disini maksudnya adalah terjadinya gangguan adaptasi/toleransi imunologis dari ibu terhadap jaringan hasil konsepsi yang jika pada kehamilan normal ditandai oleh menonjolnya aktivitas sitokin Th2 sehingga janin dapat bertahan dan tumbuh dengan baik. Sedangkan pada kondisi maladaptasi yang terjadi adalah peningkatan sitokin proinflamasi (sitokin Th1). Pada studi yang dilakukan pada penderita dengan preeklampsia dan kehamilan normal didapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik dalam hal kadar sHLA-G dalam plasma pada trimester pertama dan kedua (Yie, 2004).

Pada penderita preeklampsia didapatkan kenyataan bahwa telah terjadi penurunan ekspresi HLA-G. Penurunan ekspresi ini disebabkan oleh adanya *polimorfism* CAC-CAT pada kodon 93 dan delesi 14bp pada 3'UTR. Dikatakan bahwa ada korelasi antara kejadian preeklampsia dengan kelainan genetik tersebut. Dugaan lainnya adalah adanya defek pada gen TAP (*transporter associated with antigen processing*) yang mengekspresikan TAP1



dan TAP2 yang berperan membawa peptida HLA-G melalui aparatus golgi ke permukaan sel. Sehingga jumlah HLA-G dapat berkurang jika dibandingkan kondisi normal (Brien, 2000; Klien, 2000).

Dalam kondisi ekspresi HLA-G pada trofoblas ekstravilus yang rendah ini selanjutnya akan merangsang aktivasi ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine based activation motifs*) pada sel NK desidua sehingga mengaktifkan PTK (*protein tyrosine kinases*). Sel NK diaktivasi oleh tiga target sel yang diliputi antibodi, sel yang terinfeksi virus dan beberapa bakteri intraselular dan sel yang tidak mengekspresikan MHC kelas I seperti pada trofoblas ekstravilus ini. Sehingga sel NK akan memproduksi IFN- γ yang selanjutnya akan mengaktifkan makrofag untuk memproduksi TNF- α , IL-12 (Loke, 1995; Abbas, 2003).

Produksi IL -12 oleh makrofag akan merangsang sel T naif CD4+ untuk membentuk sel Th1 melalui jalur STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*) (Abbas, 2003). Selanjutnya Th1 yang terbentuk akan segera memproduksi sitokin proinflamasi. Sitokin tersebut antara lain TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ (Abbas, 2003). Sitokin TNF- α akan meningkatkan ekspresi iNOS (*inducible NO synthase*) dan menurunkan ekspresi eNOS (*endothelial NO synthase*) dengan akibat akan menurunkan kemampuan vasodilatasi yang tergantung endothel. Sehingga terjadi vasokonstriksi pada preeklampsia. Sitokin ini juga meningkatkan ekspresi E -*selectin* dan molekul adhesi endothel lainnya. Ini mengakibatkan aktivasi endothel.

Kadar IL-6 yang beredar pada penderita preeklampsia mengalami peningkatan. Peningkatan ini kemungkinan karena plasma dari penderita preeklampsia dapat mengaktifkan sel endotel vaskular melalui mekanisme NF- κ B. Sitokin ini dapat meningkatkan rekrutmen limfosit ke jaringan non limfoid dengan meningkatkan ekspresi molekul adhesi (Granger, 2001; Watson, 1996, Munn, 1998). Sedangkan IFN- γ yang diproduksi akan mengaktifkan sel makrofag, merangsang sel B untuk memproduksi Ig G

yang berfungsi untuk opsonisasi untuk fagositosis. Bersama-sama dengan IL-2 akan merangsang diferensiasi sel T CD8⁺ menjadi sel T sitolitik. Bersama-sama dengan TNF- α sitokin ini akan menghambat proliferasi trofoblas (Abbas, 2003, Dekker, 1998). Sitokin ini juga akan merangsang makrofag untuk memproduksi enzim *indoleamine 2,3,4-dioxygenase* (IDO) yang berfungsi mengatabolisme triptofan. Sehingga dapat mengatabolisme triptofan yang diperlukan untuk proliferasi sel T (Kudo, 2003; Chaiwonapongsa, 2002).

Selain karena rangsangan sitokin IFN γ , juga karena sinyal lain dari sel T yang teraktifasi, sehingga menghambat proliferasi sel T dengan cara secepat mungkin mengonsumsi triptofan, beberapa makrofag jaringan secara *invivo* menggunakan mekanisme immunosupresif ini (Kudo, 2003; Chaivrorapongsa, 2002).

Banerjee (2005) membuktikan bahwa pada penderita dengan preeklampsia tidak terjadi peningkatan ekspresi reseptor IFN- γ R2. Kondisi ini menyerupai kondisi hipoksi pada awal masa kehamilan (7-10 minggu). Diduga hal ini yang menjadi penyebab gagalnya perubahan dari sitokin Th1 menjadi sitokin Th2 pada preeklampsia. sehingga pada penderita Preeklampsia terjadi maladaptasi imunologis.

Selain sitokin yang telah disebutkan di atas, sel Th1 juga memproduksi LT (*lymphotoxin*) yang akan merangsang aktifasi neutrofil (Abbas, 2003). Kondisi ini semua disertai dengan produksi MIP-1 α (*Monocyte Inflammatory Protein 1a*) oleh sel sitotrofoblas yang akan memobilisasi sel NK CD⁵⁶ *bright* (Zhou, 1997). Keadaan yang telah disebutkan di atas akan mengakibatkan invasi trofoblas yang dangkal sehingga terjadi iskemi plasenta.

2.1.4 NF- κ B

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) adalah faktor transkripsi yang dapat menginduksi aktivasi gen peradangan (*inflammatory genes*), termasuk TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), molekul MHC kelas 1,

reseptor IL-2, selektin E, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), prekursor serum amiloid A, dan angiotensin. Faktor transkripsi tersebut berikatan dengan daerah promotor dan *enhancer* gen target. Dalam inti, NF- κ B yang dapat berikatan dengan DNA berbentuk heterodimer yang terdiri dari subunit Rel-A dengan berat molekul 65 kDa, yang dahulu disebut p65 dan subunit p50 dengan berat molekul 50 kDa. Tetapi, masing-masing subunit dapat membentuk homodimer yang juga dapat berikatan dengan DNA (Marok et al, 1996; Chen et al 1999).

Pada sel yang tidak dirangsang, NF- κ B terdapat dalam bentuk inaktif di dalam sitoplasma, membentuk kompleks dengan inhibitor I κ B. Berbagai macam rangsangan seperti mitogen, sitokin pro-inflamatori, radiasi ionisasi, sinar ultraviolet, protein virus, LPS bakteri dan ROS dapat menyebabkan fosforilasi dari I κ B sehingga mengaktifkan NF- κ B (Venugopal, 2006). Beberapa sitokin yang ekspresi gen mereka diaktifkan oleh NF- κ B, seperti TNF- α dan IL-2, juga merupakan aktivator NF- κ B, sehingga memberikan suatu potensi untuk siklus *positive feedback* dalam respon peradangan. Terdapat banyak bukti yang menyatakan bahwa senyawa oksigen reaktif, terutama H₂O₂ bertindak sebagai *messenger* dalam jalur aktivasi NF- κ B. Sel yang diberi antioksidan atau mengekspresi secara berlebihan enzim katalase, glutathion peroksidase, atau tioredoksin, menghambat aktivasi NF- κ B yang dirangsang oleh berbagai macam stimuli. Pemberian H₂O₂ pada kultur beberapa jenis sel mengaktifkan NF- κ B (Marok et al, 1996; Schmidt et al, 1996; Kim et al, 2000; Snapper et al, 1996).

Kejadian kunci dari aktivasi NF- κ B adalah induksi fosforilasi dari subunit inhibitor I κ B- α pada residu serin 32 dan 36. Modifikasi kovalen oleh suatu kinase akan menginduksi konjugasi I κ B- α dengan ubiquitin, yang diikuti dengan degradasi inhibitor oleh proteasom. Dissosiasi NF- κ B dari I κ B ini menyebabkan NF- κ B menjadi bentuk aktif, yang kemudian akan mengalami translokasi ke dalam nukleus, dimana kemudian akan berikatan dengan

bagian pengatur (*regulatory sequences*) dari gen target (Marok et al, 1996; Schmidt et al, 1996; Kim et al, 2000; Snapper et al, 1996; Lederer, 1996).

Struktur dan aktivitas NF- κ B

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) pertama kali ditemukan sebagai *B-cell-specific factor* yang berikatan dengan motif urutan DNA pendek yang terdapat pada *enhancer immunoglobulin* rantai ringan κ . Sekarang diketahui bahwa NF- κ B diekspresi oleh semua jenis sel dan memegang peran yang lebih luas dalam transkripsi gen. Telah dikenal 5 anggota famili NF- κ B, yaitu p50 dan p52 (disintesa dalam bentuk prekursor p105 dan p100) yang mengaktifkan transkripsi secara lemah dan mungkin dapat bertindak sebagai represor bila berikatan dengan tempat target sebagai homodimer, p65 dan c-rel yang merupakan aktivator transkripsional dari famili, serta rel B yang diekspresi secara spesifik pada jaringan limfoid. Anggota famili NF- κ B (yang juga dikenal sebagai Rel) memiliki kesamaan pada daerah ujung N yang sangat homolog pada 300 asam amino, dan dikenal sebagai domain homologi Rel (*Rel homology domain*). Domain tersebut memperantarai dimerisasi dan pengikatan dengan DNA. Bentuk yang paling sering dan yang paling aktif dari NF- κ B adalah heterodimer dari p65 (Rel A) dan p50 (NF- κ B1). Heterodimer tersebut adalah bentuk klasik dari NF- κ B. Struktur dimerik NF- κ B memberikan potensi bagi setiap famili NF- κ B dan homodimer Rel untuk memberikan fungsi biologik yang berbeda (Manning & Rao, 1999; Israel & Kourilsky, 1996).

Sebagian besar heterodimer dan homodimer NF- κ B terdapat pada sitoplasma dalam bentuk berikatan dengan suatu famili protein inhibitor yang secara bersama-sama disebut sebagai I κ B. Hanya sel B dan beberapa sel garis monosit/makrofag yang menunjukkan aktivitas NF- κ B inti secara terus menerus. Berbagai macam rangsangan, misalnya phorbol ester pada berbagai macam sel. LPS pada sel pre-B, dan sitokin seperti TNF- α dan IL-1,

menyebabkan degradasi I κ B- α melalui jalur ubiquitin-proteasom setelah terjadi fosforilasi, dan translokasi NF- κ B ke inti, dimana dia dapat mengaktivasi gen target. Homodimer p50 memiliki afinitas yang rendah terhadap molekul I κ B, sehingga dia senantiasa ada di dalam inti. Homodimer ini disebut KBF1, dan adanya aktivitas pengikatan KBF1 kelihatannya berhubungan dengan ekspresi basal dari gen MHC kelas 1. Bila terjadi rangsangan oleh TNF- α misalnya, kompleks yang lebih aktif seperti heterodimer p50 dan p65 akan dilepaskan dari inhibitor sitoplasmik, mengalami translokasi ke inti, dimana dia akan menggantikan posisi homodimer KBF1 dengan menempati dua palindrom (ab) dan (ab'). Suatu hal yang menarik adalah KBF1 dan NF- κ B berikatan dengan afinitas yang hampir sama dengan urutan divergen yang terletak dalam orientasi berlawanan dalam promoter gen β 2-mikroglobulin pada mencit. Faktor transkripsi tersebut diduga memegang peranan dalam pengaturan ekspresi gen MHC kelas 1 dan β 2-mikroglobulin. Hasil penelitian terakhir ini menunjukkan bahwa jenis lain dari kompleks NF- κ B dapat mengatur gen tersebut dalam keadaan tidak terdapat p50 (Israel & Kourilsky, 1996). Aktivitas pengikatan KBF-1 dijumpai pada sebagian besar sel yang telah berdiferensiasi, dimana molekul MHC kelas 1 diekspresi.

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) memiliki peran kunci dalam ekspresi banyak gen sentral dari respon peradangan. Telah dibuktikan adanya partisipasi dari faktor transkripsi NF- κ B dalam ekspresi TNF- α pada monosit, serta ekspresi TNF- α , ICAM-1, dan IL-6. NF- κ B aktif sudah dapat dideteksi pada berbagai macam proses peradangan in vivo, termasuk karena sinar ultraviolet. Pada pemberian endotoksin, NF- κ B cepat teraktivasi pada paru-paru. Keadaan ini berhubungan dengan aktivasi transkripsional dari gen untuk selektin P, selektin E, VCAM-1, dan ICAM-1, serta pengumpulan leukosit (Manning & Reo, 1999).

Sejumlah inhibitor farmakologik terhadap aktivasi NF- κ B juga telah dilaporkan, termasuk antioksidan, inhibitor proteasom, dan metabolit mikrobial. Tetapi karena senyawa tersebut mempengaruhi banyak jalur *signaling* di dalam sel, adalah sulit untuk menyebutkan hubungan sebab dari inhibisi NF- κ B dengan akibat yang memodifikasi penyakit. Penjelasan tentang komponen jalur transduksi sinyal yang menyebabkan aktivasi NF- κ B, memberikan kesempatan terbaik untuk pengembangan inhibitor selektif dari faktor transkripsi ini (Manning & Reo, 1999; Marok et al, 1996).

Aktivasi NF- κ B

Faktor transkripsi NF- κ B diaktivasi oleh sangat banyak sinyal yang berbeda, mulai dari sinar ultraviolet sampai aktivasi sel T. Langkah dasar dari aktivasi NF- κ B kelihatannya hampir sama pada semua kasus. NF- κ B terdapat pada sitoplasma dalam keadaan inaktif, membentuk kompleks dengan protein inhibitor yang disebut I κ B. Protein inhibitor I κ B yang paling penting diantaranya adalah I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ . Anggota famili I κ B yang memiliki *domain ankryrin-like repeat* yang sama, mengatur pengikatan dengan DNA dan lokalisasi protein NF- κ B/Rel dengan cara menutup (*masking*) suatu *nuclear localization signal (NLS)* yang terletak di dekat *domain* homologi Rel. Aktivasi NF- κ B dicapai melalui sinyal yang menginduksi degradasi proteolitik dari I κ B dalam sitoplasma. Rangsangan ekstraseluler memulai suatu kaskade *signaling* yang menyebabkan aktivasi dua kinase I κ B, IKK-1 (IKK α) dan IKK-2 (IKK β), yang memfosforilasi I κ B pada residu serin ujung terminal yang spesifik, yaitu serin 32 dan 36 pada IKK α , serta serin 19 dan 23 pada IKK β . I κ B yang telah difosforilasi kemudian secara selektif akan diubiquitinasi, mungkin oleh suatu E3 ubiquitin ligase, anggota terminal kaskade *ubiquitin-conjugating enzymes*. Pada langkah akhir dari kaskade *signaling* ini, I κ B yang telah difosforilasi dan diubiquitinasi, yang masih tetap berikatan dengan NF- κ B dalam sitoplasma, didegradasi secara selektif oleh proteasom 26S. Proses ini membuat NLS lebih terbuka dan NF- κ B

akan terlepas dari I κ B, sehingga dapat berikatan dengan mesin import nukleus dan mengalami translokasi ke nucleus, dimana dia akan berikatan dengan gen target untuk memulai transkripsi (Manning & Reo, 1999; Marok et al, 1996).

Fosforilasi I κ B bertindak sebagai tanda molekuler yang menyebabkan ubiquitinasi dan degradasi I κ B secara cepat oleh komponen dari sistem ubiquitin-proteasom. Penelitian dengan menggunakan peptida sebagai substrat yang mirip, menunjukkan bahwa fosforilasi I κ B- α menghasilkan suatu tempat pengikatan bagi ubiquitin pada I κ B- α , dan mikroinjeksi dari fosfopeptida ini kedalam sel, dapat meningkatkan aktivasi NF- κ B.

I κ B kinase, IKK-1 dan IKK-2; *activating kinase* sebelumnya, MEKK dan NIK; serta efektor sesudahnya, ligase E3; semuanya merupakan target yang menarik untuk penemuan obat yang secara selektif mengatur fungsi NF- κ B.

Inhibitor NF- κ B

Terdapat tiga kelas dari senyawa penghambat NF- κ B, yaitu inhibitor proteasom, antioksidan, dan inhibitor NF- κ B/AP-1 yang spesifik untuk sel T (Manning & Rao, 1999; Marok et al, 1996).

i. Inhibitor proteasom

Degradasi I κ B diperantarai oleh proteasom 26S, yaitu suatu organel sel yang bertanggung jawab untuk degradasi protein abnormal dan protein yang telah mengalami denaturasi di dalam sitoplasma. Inhibitor proteasom, seperti laktasistin, MG115, dan MG341 telah ditunjukkan menghambat aktivasi NF- κ B. Laktasistin dan MG341, telah ditunjukkan menghambat aktivasi transkripsional dari molekul adhesi sel endotel dan leukosit (Manning & Rao, 1999; Marok et al.,1996).

ii. Antioksidan

Reaksi peradangan biasanya disertai dengan produksi lokal dari senyawa oksigen reaktif, termasuk radikal hidroksil, radikal nitroksil, hidrogen peroksida dan superoksida.

Walaupun peran yang tepat dari metabolit ini dalam pathogenesis penyakit peradangan masih kontroversial, tetapi terdapat bukti untuk peran mereka sebagai *second messenger* dalam mengatur ekspresi NF- κ B dan mitogenesis yang diperantarai Ras. Banyak antioksidan telah diuji *in vivo* dan didapatkan mereka memodulasi aktivasi NF- κ B dan transkripsi molekul adhesi sel endotel (Manning & Rao, 1999).

iii. *Inhibitor NF- κ B dan AP-1*

Suatu kelas dari inhibitor aktivitas NF- κ B dan AP-1 yang spesifik untuk sel T, telah diidentifikasi dalam suatu usaha untuk mengidentifikasi modulator dari ekspresi gen peradangan. Inhibitor yang paling poten dari kelompok ini adalah SP100030. SP100030 merupakan suatu kelas baru yang telah diidentifikasi dari inhibitor NF- κ B dan AP-1 yang memperantarai ekspresi gen peradangan, dan spesifik untuk sel T. Suatu implikasi yang menarik, berhubungan dengan kemungkinan pengaturan silang aktivitas NF- κ B dan Ap-1, adalah sel T mempunyai protein target yang sama yang mengendalikan fungsi NF- κ B dan AP-1 (Manning & Rao, 1999).

2.1.5 *Human Leukocyte Antigen (HLA-G)*

Extravillous trophoblast (EVT) adalah semua sel trofoblas yang ditemukan diluar vili. EVT adalah sel *mononuclear* yang utama, walaupun sel *sinsitium* atau sel *multinuclear* juga ditemukan, terutama pada zona perbatasan yang lebih dalam. EVT ditemukan pada cakram khorionik, khorion halus, pulau sel, kolumna sel, cakram basalis, septum plasenta dan pada dinding dan lumen pembuluh darah uteroplasenta. EVT adalah sel yang mempunyai sifat migrasi yang tinggi, proliferasif dan invasif. Invasi trofoblas pada uterus melibatkan pengikatan sel tersebut pada matriks ekstraseluler, degradasi matriks dan berlanjut dengan migrasi berkesinambungan. Proses tersebut secara ketat diregulasi bersama-sama oleh sel desidua, sel trofoblas itu sendiri, dan beberapa faktor pada dasar plasenta.

HLA-G memegang peran dalam toleransi imun dari semialogenik fetus oleh ibu. HLA-G yang cukup pada trofoblas menyebabkan tidak terjadinya atau tidak memicu respon imunologis ibu. HLA-G adalah sebuah antigen histokompatibilitas mayor yang diekspresi oleh EVT dan dapat melindungi sel dari lisis karena serangan sel *natural killer* (Chumbly et al, 1994; Moffett and Loke, 2004). Selain itu, ekspresi dari HLA-G juga menyebabkan sel dapat terhindar dari perusakan oleh IL-2, yaitu sebuah sitokin sitotoksik pada jaringan desidua (Hamai et al, 1997). Sel sitotrofoblas yang menginvasi desidua mengekspresi HLA-G. Pada kultur, sitotrofoblas yang dimurnikan dapat memicu *up regulation* HLA-G hingga mereka menjadi invasif (McMaster et al, 1995).

Jika HLA-G tidak diekspresikan atau menurun maka sel trofoblas dianggap sebagai *non self* yang mempunyai sifat sebagai antigen sehingga menginduksi pembentukan antibodi pada ibu (di desidua). Antibodi pada desidua mengikat antigen (trofoblas) yang ada dipermukaan sehingga merangsang komplemen 1-9 (C1-C9) dengan jalur klasik. Aktivasi komplemen menyebabkan sel trofoblas menjadi lisis. Debrisnya di fagositosis oleh makrofag dan di hancurkan oleh radikal bebas oksigen yang keluar karena adanya debris. Stimulus tersebut mempunyai efek mempengaruhi proses transkripsi yang menghasilkan sitokin proinflamasi seperti IL-1, TNF- α , dan IL-6.

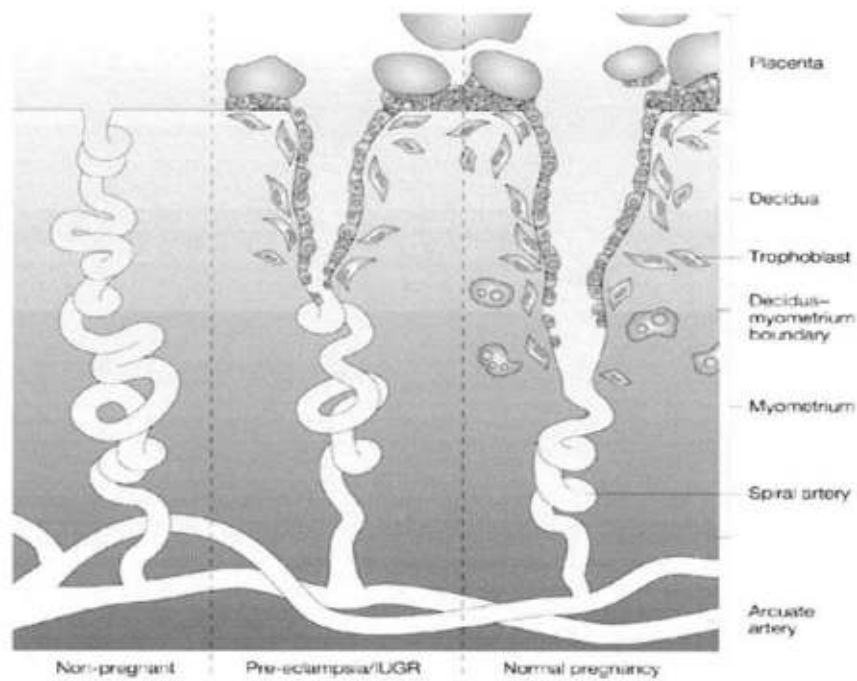
Endotel pembuluh darah bila ada rangsangan dari berbagai sitokin tersebut akan mengeluarkan bahan adhesi molekul monosit (VCAM). Pada monosit dengan adanya VCAM-1 akan mengeluarkan enzim MMP-9 sehingga merusak kolagen tipe 4 dan akan merusak vaskuler. Kerusakan vaskuler akan menyebabkan disfungsi endotel yang menjadi penyebab terjadinya preeklamsia.

Ekspresi protein HLA-G oleh EVT dilaporkan menurun pada preeklamsia (Colbern et al, 1994; Goldman-Wohl et al, 2000; Hara et al, 1996). Terdapat hubungan antara ekspresi HLA-G dengan kegagalan invasi trofoblas pada preeklamsia (O'Brien et al,

2000). Lim et al, (1997) menunjukkan bahwa sitotrofoblas vilus yang dikultur dari kehamilan normal bersifat upregulasi pada HLA-G, sedangkan sitotrofoblas yang dikultur dari kehamilan penderita preeklampsia bersifat tidak mengekspresi HLA-G.

2.1.6 Patofisiologi Preeklampsia

Dalam studi yang dilakukan oleh grup oxford disebutkan bahwa preeklampsia adalah dua tahap proses kelainan plasenta. Yang pertama adalah kegagalan invasi arteri spiralis yang menyebabkan iskemi plasenta. Yang kedua adalah efek iskemi plasenta tersebut terhadap ibu dan janin (Dekker, 1998). Sedangkan Redman dan Sargent (2000) mengemukakan bahwa keberadaan plasenta sebagai penyebab terjadinya preeklampsia adalah penting dan mencukupi untuk dapat memicu terjadinya gangguan ini. Masalah pada plasenta yang umumnya dipertimbangkan adalah tidak adekuatnya sirkulasi uteroplasental. Ini memicu terjadinya hipoksia plasenta, stres oksidatif dan dalam kasus yang berat adalah terjadinya infark. Salah satu abnormalitas yang melibatkan arteri spiralis yang diketahui sebagai faktor predisposisi terhadap terjadinya preeklampsia adalah invasi trofoblas yang dangkal. Kondisi ini berawal dari terjadinya maladaptasi imunologis pada *feto-maternal junction*.



Nature Reviews | Immunology

Gambar 2.3 Invasi Trofoblas (Craven, 2000)

Lebih jauh Redman dan Sargent (2000) mengemukakan bahwa terjadinya preeklampsia adalah diawali oleh faktor plasenta, oleh karena perfusi yang tidak sempurna, atau diawali oleh faktor maternal, oleh karena adanya predisposisi ibu terhadap adanya penyakit arteri, yang kemudian diwujudkan dalam bentuk problem jangka panjang seperti aterosklerosis atau hipertensi kronis. Dari faktor maternal dan plasenta tersebut selanjutnya mengalami konvergensi pada proses aktivasi endotel dan sel granulosit/monosit dengan hasil akhir berupa peningkatan respon inflamasi sistemik dalam wujud preeklampsia. Respon inflamasi sistemik selanjutnya berperan dalam perkembangan atau evolusi dari aterosklerosis akut sehingga lesi tersebut akan memperparah iskemi plasenta dan memberikan umpan balik positif. (Redman, 2000).

Selain itu, pada kondisi preeklampsia terjadi peningkatan laju apoptosis sinsitiotrofoblas. Hal ini diduga terjadi karena stres oksidatif yang terjadi. Selain itu juga dapat terjadi karena penurunan ekspresi XIAP (Gruslin, 2001). Sehingga kondisi ini

meningkatkan deportasi trofoblas. Akibatnya makin meningkat pula mikrofragmen dari sinsitiotrofoblas yang beredar dalam sirkulasi ibu. Ini akan meningkatkan reaksi inflamasi pada ibu (Redman, 2000). Rusterholz (2005) membuktikan bahwa dari produksi IL-1 dari plasenta diduga berperan besar terhadap terjadinya disfungsi endotel. Dan aktivasi sitokin proinflamasi mengakibatkan serangkaian peristiwa yang berakhir dengan kejadian disfungsi endothel.

Adapun faktor maternal yang berperan dalam timbulnya preeklampsia adalah (Laivuori, 2007; Dekker, 2003):

1. Usia ekstrim (≤ 16 tahun dan ≥ 35 tahun): resiko terjadinya preeklampsia meningkat seiring dengan peningkatan usia (peningkatan resiko 1,3 per 5 tahun peningkatan usia) dan dengan interval antar kehamilan (1,5 per 5 tahun interval antara kehamilan pertama dan kedua).

Resiko terjadinya preeklampsia pada wanita usia belasan terutama adalah karena lebih singkatnya lama paparan sperma. Sedang pada wanita usia lanjut terutama karena makin tua usia endothel makin berkurang kemampuannya dalam mengatasi terjadinya respon inflamasi sistemik dan stres regangan hemodinamik.

2. Riwayat Preeklampsia pada kehamilan sebelumnya: riwayat preeklampsia pada kehamilan sebelumnya memberikan resiko sebesar 13,1 % untuk terjadinya preeklampsia pada kehamilan kedua dengan partner yang sama.

3. Riwayat keluarga yang mengalami preeklampsia:

Eklampsia dan preeklampsia memiliki kecenderungan untuk diturunkan secara familial. Hasil studi di Norwegia menunjukkan bahwa mereka yang saudara kandungnya pernah alami preeklampsia estimasi OR (odds ratio) adalah sebesar 2,2. Sedangkan bagi mereka yang satu ibu lain ayah OR-nya sebesar 1,6. Bagi

mereka yang satu ayah lain ibu OR-nya adalah 1,8. Sementara itu hasil studi lain menunjukkan bahwa riwayat keluarga dengan preeklampsia menunjukkan resiko tiga kali lipat untuk mengalami preeklampsia.

4. Paparan sperma, primipaternitas: paparan semen sperma merangsang suatu kaskade kejadian seluler dan molekuler yang menyerupai respon inflamasi klasik. Ini yang kemudian merangsang produksi GM-CSF sebesar 20 kali lipat. Sitokin ini selanjutnya memobilisasi leukosit endometrial. Faktor seminal yang berperan adalah TGF-B1 dalam bentuk inaktif. Selanjutnya plasmin dari semen sperma dan faktor uterus mengubahnya menjadi bentuk aktif. Sitokin TGF-B1 akan merangsang peningkatan produksi GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*). Bersamaan dengan itu sperma yang diejakulasikan juga mengandung antigen-antigen yang turut berperan dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup zigot.
5. Penyakit yang mendasari
 - a. Hipertensi kronis dan penyakit ginjal
 - b. Obesitas, resistensi insulin dan diabetes
 - c. Gangguan trombofilik
 - d. Faktor eksogen
 - i. Merokok
 - ii. Stres, tekanan psikososial yang berhubungan dengan pekerjaan, latihan fisik
 - iii. Infeksi saluran kemih

Penelitian lain yang juga telah membuktikan adanya respon inflamasi sistemik adalah yang telah dilakukan oleh Faas. Dari hasil penelitian Faas (2004), monosit yang berfungsi memproduksi sitokin seperti TNF- α , dengan sitokin tersebut dia mengaktivasi

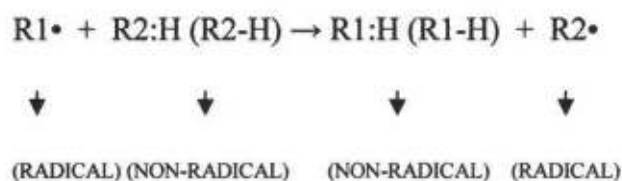
respon inflamasi. Mereka menemukan bahwa produksi TNF- α monosit secara persisten menurun, namun jumlah total sel darah putih dan granulosit secara persisten meningkat pada tikus percobaan yang mendapat infus endotoksin dibandingkan yang mendapatkan infus salin (Faas, 2004). Bukti-bukti ilmiah menunjukkan bahwa peningkatan respon inflamasi berkaitan dengan berbagai manifestasi yang terjadi pada ibu dengan preeklampsia. Temuan yang dilaporkan oleh Faas menambah bukti peran aktivasi monosit dalam patofisiologi preeklampsia. Bahkan, inflamasi berkaitan erat dengan angiogenesis, penolakan imunologis dan iskemi plasenta (Faas, 2004).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Murray, 2003). Karena adanya elektron yang tidak berpasangan maka terdapat konsekuensi berupa kecenderungannya untuk memperoleh elektron dari substansi lain, menjadikan radikal bebas ini menjadi sangat reaktif.

Radikal bebas memiliki dua sifat, yaitu reaktifitas tinggi karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal baru.

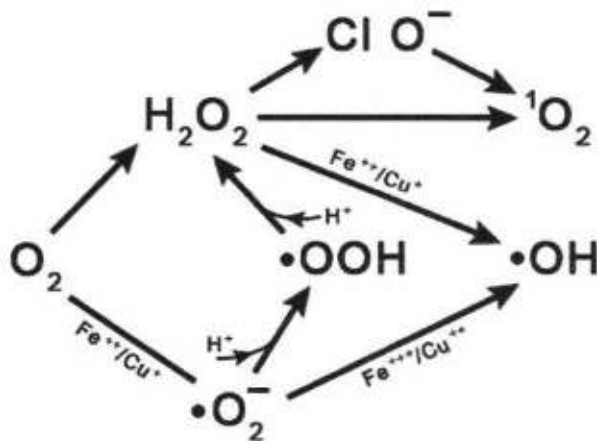
Radikal bebas yang bereaksi dengan non radikal, akan menghasilkan radikal bebas baru dan menyerang senyawa non radikal lain :



Proses ini dapat berulang lagi dan menghasilkan reaksi berantai. Reaksi berantai akan berhenti jika 2 radikal bebas bertemu. Keduanya dapat saling menggunakan elektron tak berpasangannya menjadi senyawa non radikal melalui ikatan kovalennya.

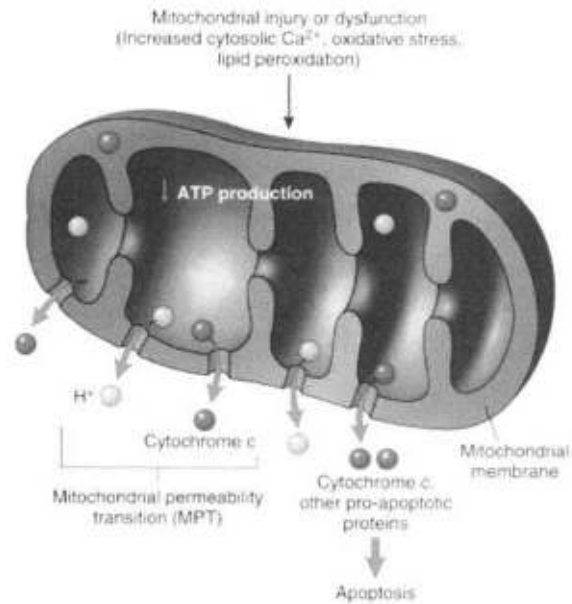


Sumber ROS antara lain melalui proses fisiologis di dalam intraseluler seperti fosforilasi oksidatif dan oksigenasi Hb, dikeluarkan oleh sel inflamasi sebagai pertahanan tubuh melawan organisme, dan dari paparan terhadap radiasi energi tinggi (sinar X dan gamma). Respirasi sel di mitokondria secara fisiologis melalui proses fosforilasi oksidatif menghasilkan energi (ATP) dan ROS (*reactive oxygen species*), yang merupakan radikal bebas yang bersifat toksik terhadap sel. Kurang lebih 2% oksigen yang direduksi dalam mitokondria diubah menjadi superoksida (O_2^-) atau produk dismutase H_2O_2 . Superoksida dan peroksida bereaksi dengan ion logam untuk membentuk generasi radikal yang lain, salah satunya radikal hidroksil.



Gambar. 2.4. Terbentuknya ROS (Soerjohudojo, 2008)

ROS dapat bereaksi dengan banyak senyawa, diantaranya senyawa sederhana seperti asam amino, asam lemak, kolesterol, gula, maupun dengan senyawa kompleks seperti protein dan DNA. Efek yang paling membahayakan dari ROS adalah terhadap 3 komponen penting sel, yaitu membran lipid, protein dan DNA.



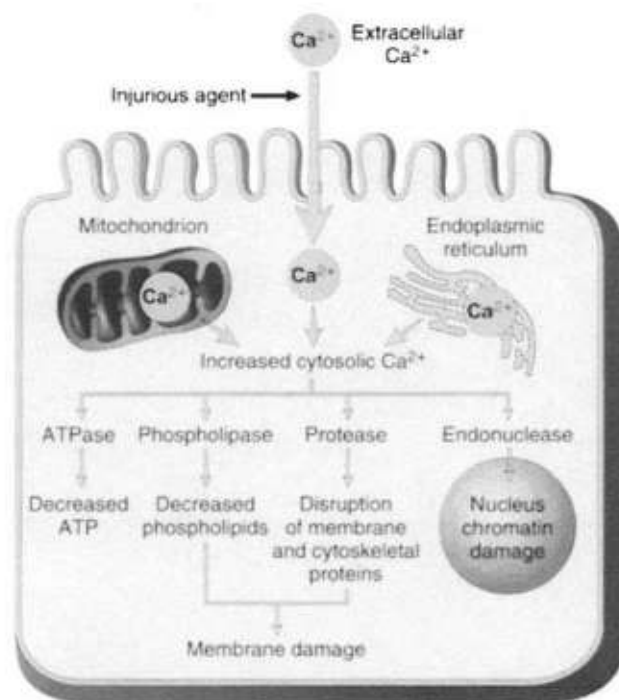
Gambar 2.5 Sumber dan akibat dari peningkatan kalsium sistosolik pada kerusakan sel. ATP, *adenosine triphosphate* (Kumar, 2005).

Nitric oxide (NO) mempunyai elektron yang tidak berpasangan, oleh karena itu, merupakan salah satu spesies radikal bebas. Diproduksi oleh *NO synthase* (NOS), mempunyai masa hidup singkat dan bersifat lipofilik. Secara fisiologis, NO berperan dalam proses vasodilatasi, neurotransmisi, inhibisi agregasi platelet, sebagai pertahanan imun dan dalam proses *signaling* interseluler. Namun, NO dapat bereaksi dengan O_2^- dan membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$), yang merupakan oksidan kuat. Oksidan ini adalah salah satu bentuk *reactive nitrogen species* (RNS) yang mampu merusak DNA, dan bahkan mengelak dari sistem perbaikan DNA (sehingga berujung pada kerusakan dan kematian sel).

Meskipun demikian, tidak semua jenis oksigen reaktif merupakan radikal bebas, misal, oksigen singlet (tunggal) dan H_2O_2 . Sedangkan bentuk oksigen reaktif yang berpotensi merusak jaringan jaringan adalah radikal bebas superoksid, hidrogen peroksida, dan radikal bebas hidroksil. Unsur yang terakhir ini bersifat sangat toksik, tetapi memiliki masa hidup singkat (Murray, 2003)

2.2.1 Efek ROS terhadap membran lipid

Ketidakseimbangan antara oksidan dan sistem pertahanan antioksidan tubuh akan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif karena ROS. Stres oksidatif ini dapat berakibat disfungsi metabolik sel maupun sistemik, hilangnya stabilitas membran sel, dan penyakit. Membran sel lipid adalah bilayer, dibentuk oleh fosfolipid dan kolesterol. Fosfolipid mengandung asam lemak tidak jenuh/*polyunsaturated fatty acids* (PUFA). Radikal bebas (ROO^\cdot , RO^\cdot , dan terutama OH^\cdot) dihasilkan pada saat pembentukan peroksida dari asam lemak tidak jenuh. ROS tersebut kemudian dapat menyebabkan reaksi berantai. ROS bereaksi dengan asam lemak menghasilkan lipid radikal dan lipid peroksida, sedangkan lipid radikal dapat membentuk lipid peroksida yang baru.



Gambar 2.6. Peranan spesies oksigen reaktif pada proses kerusakan sel.

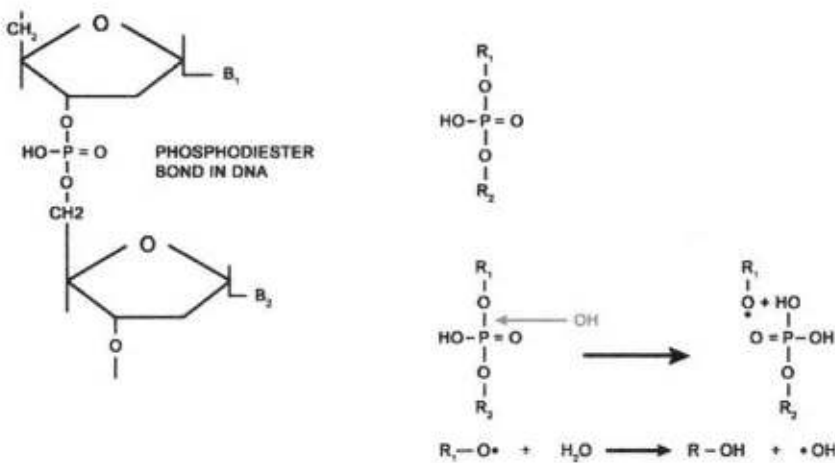
(Kumar,2008)

Stimulus radikal tersebut akan meningkatkan influks Ca^{2+} di dalam sel, sehingga meningkatkan kadar Ca^{2+} intra sel. Peningkatan ini mengaktifkan enzim-enzim pro-apoptosis, diantaranya ATPase, fosfolipase, protease dan endonuklease yang kemudian

berakibat degradasi fosfolipid dan protein sitoskeletal membran dan berakhir dengan kerusakan membran sel (Kumar,2008).

2.2.2 Efek ROS terhadap DNA

DNA merupakan gabungan polinukleotida yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen pada nukleotida yang komplementer. Rantai polipeptida dalam keadaan fisiologis mempunyai panjang yang sama, namun jika terjadi reaksi silang antar atau inner rantai maka dapat berubah struktur dan mengakibatkan hilangnya fungsi biologinya.



DNA CHAIN BREAKING ACTION OF •OH

Gambar 2.7. Rusaknya rantai DNA akibat radikal bebas (Soerjohoedjo, 2008)

2.2.3 Peroksidasi Lipid

Peroksidasi (auto-oksidasi) terhadap lipid yang terpajan oksigen bertanggung jawab atas perusakan jaringan secara *in vivo*, terutama tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak, DNA dan protein struktural maupun protein fungsional. Seperti dijelaskan diatas, efek yang merusak ini dianggap terjadi akibat radikal bebas yang dihasilkan saat pembentukan peroksida dari asam lemak (Murray, 2003). Membran mitokondria dan mikrosom juga sangat sensitif terhadap peroksidasi lipid karena kandungan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) pada fosfolipid membran sangat

tinggi (Soerjohudojo, 2007). Peroksidasi lipid merupakan reaksi yang terus menghasilkan pasokan radikal bebas sehingga terjadi reaksi peroksidasi berikutnya. Keseluruhan proses tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:

i. Inisiasi



Radikal lipid

ii. Propagasi



Radikal peroksilipid



Lipid peroksida

Reaksi lipid peroksil radikal dengan PUFA akan menghasilkan radikal lipid yang baru, sehingga menambah jumlah radikal lipid pada reaksi rantai ini. Fase ini disebut propagasi, yaitu terjadinya reaksi radikal peroksil dengan PUFA yang lain membentuk hidroperoksid dan radikal lemak yang baru, sehingga memperbanyak jumlah radikal di dalam reaksi berantai tersebut.

iii. Terminasi

Reaksi rantai ini dapat berakhir bila terjadi penggabungan dua radikal lipid untuk membentuk asam lemak yang non radikal atau antara radikal dengan suatu senyawa pembasmi radikal.



Secara umum, efek lipid peroksida:

- i. Menyebabkan putusny rantai asam lemak menjadi senyawa toksik dalam sel, yaitu aldehid (sebagai indikator adalah terbentuknya MDA/malondialdehid) dan hidrokarbon (8-hidroksi nonenal, etana, pentana)
- ii. Memicu reaksi silang antar 2 asam lemak atau asam lemak dengan protein yang akan merusak membran sel, sehingga mengganggu keseimbangan osmotik sel dan dapat berakhir dengan kematian sel.

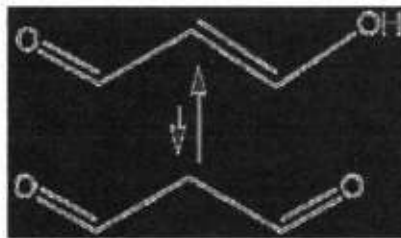
2.2.4 Malondealdehid

Peroksidasi lemak telah diketahui sebagai mekanisme utama kerusakan sel pada sebagian besar sistem biologi. Pada suasana oksidatif, lemak *polyunsaturated* sangat rentan teroksidasi yang kemudian membentuk lipid peroksida yang toksik bagi *host*. PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) peroksida kemudian bereaksi lebih lanjut dan membentuk *malonaldehyde* (MDA).

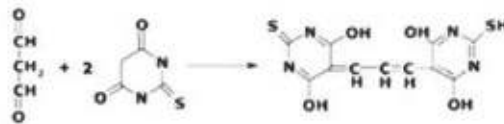


MDA dapat ditemukan pada serum, plasma, jaringan, dan urin, sebagai hasil dari peroksidasi lemak dan sebagai produk sampingan pada biosintesis prostaglandin. MDA termasuk kelompok aldehid reaktif dan merupakan salah satu dari spesies elektrofil reaktif yang dapat menyebabkan stres toksik dalam sel. MDA bereaksi dengan DNA dengan cara membentuk ikatan dengan *deoxyguanosine* dan *deoxyadenosine*. Ikatan dengan DNA terutama adalah pada *pyrimidopurine*, disebut M1G. Penelitian menunjukkan bahwa M1G bersifat mutagenik.

Produk aldehid ini digunakan sebagai biomarker untuk mengukur stres oksidatif pada organisme (Del Rio, 2005). Pada pH rendah dan temperature tinggi, MDA mengalami reaksi berikatan dengan *2-thiobarbituric acid* (TBA) memendarkan fluoresensi kemerahan dari ikatan 1:2 MDA:TBA yang dapat diukur dengan spektrofotometri (Nair, 2008; Janero, 1990). Karena hal tersebut, juga karena sentitifnya metode yang ada untuk menghitung MDA (baik sebagai aldehid bebas maupun sebagai derivat TBA), menjadikan tes TBA banyak digunakan untuk determinasi dan kuantifikasi terjadinya peroksidasi lipid.



Gambar 2.8. Malondealdehid (wikipedia.com)



Gambar 2.9. Reaksi MDA dengan TBA

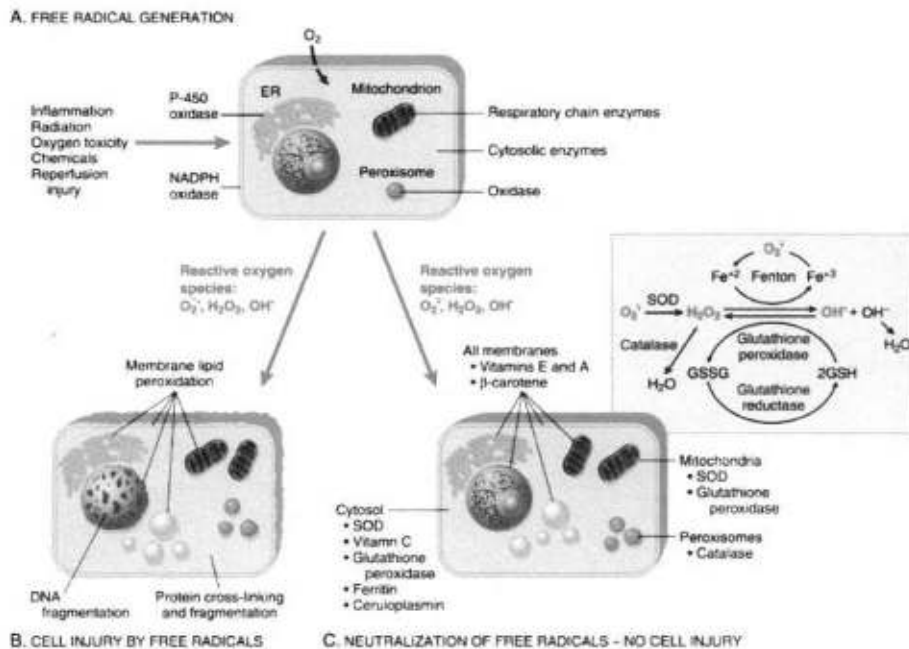
2.3 Stres Oksidatif Pada Preeklampsia

Preeklampsia berhubungan dengan peningkatan marker stres oksidatif pada jaringan plasenta (Raijmakers and Poston, 2004). Dimana pada preeklampsia terdapat kegagalan invasi, mengakibatkan defek plasenta yang berakibat adanya penurunan aliran darah utero plasenta (Martina, 2006).

Invasi trofoblas yang tidak sempurna menyebabkan kegagalan perubahan arteri spiralis yang berdinding tebal dan berliku-liku menjadi pembuluh sinusoid lemah dan bertahanan rendah. Invasi yang tidak sempurna menghasilkan perfusi plasenta yang

terganggu. Hipoksia/reperfusi luka menimbulkan peningkatan ekspresi xantin oksidase dan NADP(H) oksidase dan menghasilkan peningkatan turunan anion superoksida. Peningkatan turunan prooksidan mengganggu keseimbangan stres oksidatif, yang menyebabkan peningkatan lipid peroksidase. Penanda biologis lipid peroksidase meningkat pada plasenta (Takagi, 2004; Wang, 1996).

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, inflamasi dan stres oksidatif berhubungan erat. Stres oksidatif dari preeklampsia tidak hanya terlokalisir pada plasenta tetapi menyebar pada sirkulasi maternal (Hubel, 1998) sehingga juga terdapat respon inflamasi sistemik. Pada kehamilan normal pun terdapat peningkatan marker oksidatif stres, namun pada preeklampsia terdapat respon inflamasi sistemik hebat yang disebabkan karena stres oksidatif sistemik yang lebih (Hubel, 1998; Wickens et al, 1981). Sebuah relevansi klinis menunjukkan kenyataan bahwa antioksidan, termasuk penggunaan vitamin-vitamin antioksidan yang mempunyai potensi fungsi mencegah preeklampsia, juga mempunyai efek anti-inflamasi (Hensley et al, 2000).



Gambar 2.10. A. Pengaruh radikal bebas, B. Stres oksidatif, C. Mekanisme netralisasi radikal bebas

2.4 Curcumin

Pengobatan tradisional akhir-akhir ini semakin populer karena lebih murah, mudah didapatkan dan banyak orang merasakan manfaatnya, tetapi secara umum masih banyak obat tradisional yang belum jelas kandungan aktif dan mekanisme kerjanya. Pemahaman terhadap kandungan aktif dan mekanisme kerja obat tradisional akan membuat pengobatan ini akan semakin mudah diterima. Disamping itu, pertanyaan mengenai pengobatan yang aman, efektif dan terjangkau di masa dewasa ini semakin dipertanyakan. Berbagai obat generik yang muncul terus dikembangkan, seiring dengan ditemukannya efek samping obat-obatan tersebut. Sebagian besar penyakit disebabkan karena disregulasi inflamasi, maka pencarian terhadap agen anti-inflamasi adalah tantangan besar. Steroid, obat anti-inflamasi yang paling banyak dikenal, diketahui mengandung efek samping yang besar. Begitu juga dengan NSAID. Meskipun penggunaan NSAID ini dikatakan dapat untuk digunakan jangka panjang, tetapi tetap tidak seaman dan tidak mempunyai efek kemoprotektif pada kondisi normal. Oleh karena itu, dibutuhkan agen anti-inflamasi yang lebih aman. Di sisi lain, nenek moyang kita telah mengenal berbagai obat-obatan tradisional yang diambil dari alam yang menyimpan berbagai kekayaan flora dan fauna. Curcumin, adalah salah satu bagian dari kekayaan tersebut. Mudah ditemui bahkan sebagai bumbu masakan, sebagai salah satu obat tradisional untuk berbagai macam penyakit selama beberapa abad. Curcumin diketahui mempunyai efek anti-inflamasi yang poten dan dapat menjadi alternatif pengobatan yang telah ada.

2.4.1 Tanaman Kunir (*Curcuma longa*)

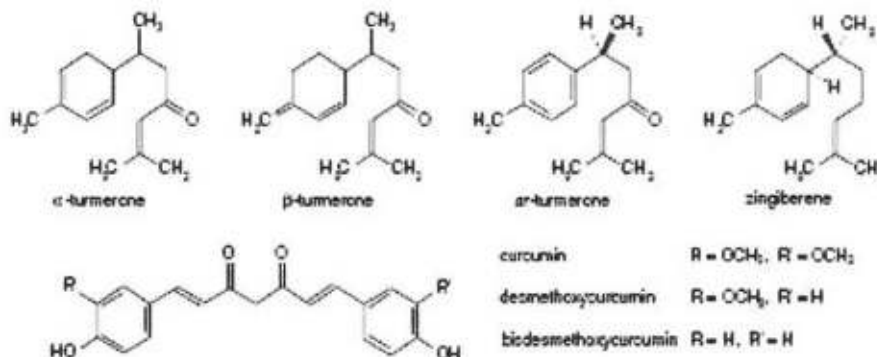
Curcuma longa atau dikenal dengan *Curcuma domestica* Valetton, adalah tanaman yang tumbuh sepanjang tahun, tinggi nya dapat mencapai 1 meter. Mempunyai daun yang panjang (± 50 cm), lebar $\pm 7-25$ cm, berwarna hijau, sedikit bengkok. Mempunyai bunga berwarna kuning pucat. Mempunyai akar berbentuk ovoid (berdiameter ± 3 cm, panjang ± 4

cm) dan tampak gemuk. Memberi warna kuning oranye. Di Indonesia, akar tanaman ini dikenal sebagai kunir. Di Eropa, dikenal sebagai *Indian saffron*. Walaupun bahan ini telah dikenal baik sebagai pemberi warna makanan dan rasa tertentu, tetapi khasiat pengobatannya belum banyak diketahui. Dalam resep pengobatan India dan Cina, tanaman ini digunakan sebagai bahan anti-inflamasi untuk mengobati gas, kolik, sakit gigi, nyeri dada dan kelainan menstruasi. Juga untuk mengobati masalah hati dan lambung, penyembuhan luka dan parut, dan sebagai bahan kosmetik (Aggarwal et al, 2006).

Beberapa spesies dari genus *curcuma* yang lain juga mengandung Curcumin, diantaranya *C. phaeocaulis* (3%) , *C. zedoaria* (0,1%), *C. xanthorrhiza* (1-2%). Namun, telah diteliti bahwa *Curcuma longa* -lah yang mempunyai kandungan Curcumin terbanyak (3-8%).

2.4.2 Kandungan kimia terbesar

Minyak *volatile* (6%) dari tanaman ini berwarna kuning pucat hingga kuning-oranye, mengandung beberapa campuran *zingiberene*, *curcumene*, α - dan β - *turmerone*. Bahan yang memberikan warna (5%) adalah *curcuminoids* yang mengandung 50-60% campuran dari curcumin, *monodesmethoxycurcumin* dan *bidesmethoxycurcumin*. Berikut adalah gambaran struktur bangun *curcuminoids*.



Gambar 2.11. Struktur bangun *Curcuminoid*. (*WHO monograph on selected medicinal plants vol.1, 1999*)

2.4.3 Farmakokinetik dan efek Samping

Absorpsi, metabolisme, distribusi jaringan dari curcumin telah dipelajari selama lebih dari tiga dekade. Studi yang dilakukan pada tikus menunjukkan absorpsi curcumin pada intestinal hingga 60%. Setelah pemberian intravena dan intraperitoneal pada tikus, 50% diekskresikan melalui kandung empedu setelah 5 jam. Penelitian preklinis dosis oral pada tikus menunjukkan sejumlah kecil curcumin di plasma dengan kadar curcumin glucoronide dan curcumin sulfat yang tinggi di plasma dan sejumlah kecil *hexahydrocurcumin*, *hexahydrocurcuminol*, *hexahydrocurcumin glucoronide*. Penelitian curcumin oral (2g/kg) pada tikus yang dilakukan di India, peneliti menyatakan meningkatnya bioavailabilitas curcumin hingga 154% bila pemberian oral bersamaan dengan piperine. Curcumin menunjukkan bioavailabilitas yang rendah pada rodent oleh karena metabolisme di intestinal dan curcumin yang telah diserap mengalami *first pass metabolism* di hepar dan diekskresikan di kandung empedu. Konsentrasi curcumin pada jaringan normal dan colorectal malignan pada pasien yang mengonsumsi 3,6 g setiap hari adalah $12,7 \pm 5,7$ dan $7,7 \pm 1,8$ nmol/g jaringan. (Sharma et al, 2005). Penelitian efek toksik curcumin pada binatang selama ini dilaporkan rendah dengan dosis hingga 5 g/kg yang diberikan oral pada tikus.

Satu studi melaporkan kejadian ulkus pada lambung tikus tapi tidak ditemukan pada penelitian berikutnya. Uji klinis terbaru menyebutkan tidak ada efek toksik dari diet 2% curcumin (1,2 g/kg BB) yang diberikan pada tikus dan 0,2 % diet (300 mg/kgBB) yang diberikan pada mencit selama 14 hari (Sharma et al, 2005).

2.4.4 Kegunaan secara tradisional

Kegunaan curcumin sangat luas. Sebagai antiseptik, analgesik, anti-inflamasi, anti alergi, anti oksidan. Pada pengobatan tradisional, kegunaannya terutama untuk mensuport

penyembuhan luka. Hal ini banyak didapatkan pada masyarakat India. Berikut adalah gambaran kegunaan curcumin dalam pengobatan tradisional:



Figure 3. Traditional uses of curcumin

Gambar 2.12. Kegunaan Curcumin secara tradisional. (Aggarwal et al, 2006)

2.4.5 Target molekular Curcumin

Curcumin dapat mempengaruhi dan memodulasi beberapa faktor transkripsi, sitokin-sitokin, faktor pertumbuhan, kinase, dan enzim-enzim lainnya.

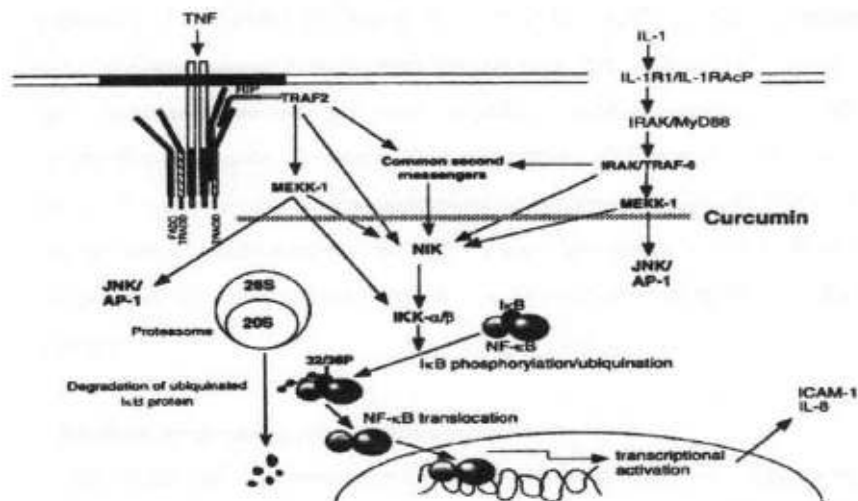
1. Curcumin mensupresi aktivasi faktor transkripsi NF- κ B, yang mengatur ekspresi produk gene pro-inflamasi.

Salah satu faktor transkripsi yang sangat penting pada eukariota untuk mengontrol proliferasi seluler, respon inflamasi, adalah *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B). Sandur pada tahun 2007 menemukan bahwa *curcuminoid* mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menekan aktivasi NF- κ B. Curcumin mengandung dua kelompok *phenyl methoxy*, DMC mengandung satu dan tidak didapatkan pada BDMC oleh karena curcumin merupakan bentuk yang paling aktif kemudian disusul dengan DMC dan BDMC dapat disimpulkan bahwa kelompok *phenyl-methoxyl* juga berkontribusi dalam penekanan aktivasi NF- κ B.

Bagaimana kelompok *penyl-methoxyl* tersebut dapat menekan NF- κ B masih belum jelas.

Penekanan *DNA-binding activity of* NF- κ B berhubungan dengan hambatan aktivitas *reporter* NF- κ B dan dengan menekan NF- κ B akan meregulasi produk gen COX-2, Cyclin D1 dan VEGF. Curcumin paling efektif menekan produk gen tersebut dibanding DMC dan BDMC (Sandur, 2007). Kemampuan curcumin menekan aktivasi NF- κ B yang diinduksi oleh TNF- α sangat kuat dibanding 20 obat analog yang diperiksa oleh Aggarwal et al tahun 2006. Beberapa gen yang ikut terlibat dalam inisiasi imun, fase akut dan respon inflamasi di atur pada tahap transkripsi oleh NF- κ B.

Aktivasi NF- κ B oleh stimulus akan mengaktifkan transkripsi gen *multiple κ B-dependent*. Termasuk diantaranya sitokin-sitokin pro-inflammasi TNF- α , IL-6, IL-8 dan beberapa kemokin, MHC kelas II, ICAM-I, *inducible nitric oxidase synthase*, COX-2 (Gambar. 5) (Jobin et al, 1999). Sitokin-sitokin tersebut kemudian dapat mengaktifasi makrofag untuk menghasilkan NO yang merupakan radikal bebas dan memperburuk reaksi inflamasi.



Gambar 2.13 Mekanisme kerja Curcumin pada aktivasi *Cytokine-induced NF- κ B* (Jobin et al, 1999)

Curcumin mampu menekan jalur NF- κ B dan gen *NF- κ B target cytokines*, dan menghambat induksi sitokin pro-inflamasi, sitokin angiogenik dan *macrofag migration inhibitory factor* oleh NF- κ B pada model in vitro. Curcumin dapat menghambat proses ini melalui:

- 1) Menghambat I κ K (I κ B-kinase), sehingga menghambat aktivasi NF- κ B.
- 2) Menghambat jumlah I κ K (I κ B-kinase) terfosforilasi.
- 3) Mensupresi lokus DNA dimana NF- κ B berikatan (NF- κ B *DNA-binding activity*)

(Gonzalez et al, 2008; Aggarwal et al, 2006).

2. Curcumin menghambat enzim COX-2.

- 1) Curcumin menyebabkan *down-regulation* ekspresi transkripsi dari COX-2, yaitu sebuah enzim yang terkait dengan sebagian besar proses inflamasi.

Berbeda dengan obat penghambat COX-2 selektif yang menghambat aktivitas katalitik enzim COX, Curcumin menghambat ekspresi COX-2 pada tingkat transkripsi.

- 2) Curcumin juga secara langsung menghambat aktivitas enzimatik dari COX-2.
(Aggarwal et al, 2006)

3. Curcumin menghambat ekspresi enzim proinflamasi lain, yaitu 5-LOX, dengan cara menempati lokus aktivasinya dan menghambat aktivitasnya. Juga menghambat produksi metabolit LOX (Aggarwal et al, 2006).

4. Curcumin menyebabkan *down-regulation* dari ekspresi molekul adhesi permukaan sel yang berkaitan dengan inflamasi (Aggarwal et al, 2006).

5. Curcumin menyebabkan *down-regulation* dari ekspresi sitokin-sitokin pro-inflamasi, seperti TNF, IL-6, IL-8, dan kemokin (Aggarwal et al, 2006).

6. Curcumin menghambat aktivitas TNF, yaitu salah satu sitokin pro-inflamasi yang terkuat.

Efek pro-inflamasi TNF dikarenakan TNF dapat mengaktivasi NF- κ B. Curcumin dapat menghambat produksi TNF melalui hambatan ekspresi TNF mRNA (Aggarwal et al, 2006).

7. Curcumin menghambat ekspresi iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) dan menghambat produksi NO.

Nitric oxide (NO) adalah mediator intraseluler, yang disintesis dengan cara oksidasi L-Arginine. Reaksi ini dikatalisasi oleh 3 macam enzim *nitric oxide synthase* (NOS) : *constitutive* NOS (cNOS) yang terdapat di jaringan neuron, *vascular endothelium* NOS (eNOS), *inducible* NOS (iNOS). iNOS dapat diinduksi oleh stimulus inflamasi yang akan merubah konsentrasi mikromolekul dari NO. NO diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi sebagai molekul sinyal untuk aktivasi sistem imun, juga mempunyai aktivitas anti-virus dan anti-tumor. NO yang diproduksi dalam jumlah besar oleh iNOS dan derivatnya (seperti *peroxynitrit* dan nitrogen dioksida) memegang peranan dalam proses inflamasi dan proses karsinogenesis. NO juga bertanggung jawab atas hipotensi dan vasodilatasi pada syok septik. Maka, kemampuan curcumin yang dapat menghambat ekspresi iNOS serta menghambat produksi NO sangat berperan untuk menghambat proses inflamasi (Jang M.K et al , 2004).

8. Curcumin adalah antioksidan kuat, yang dapat mempengaruhi proses inflamasi.

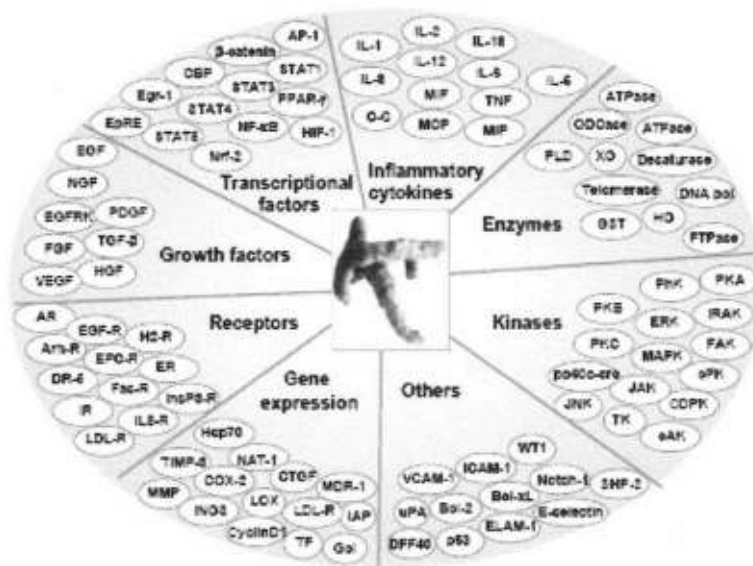
Curcumin diketahui melindungi biomembran terhadap kerusakan oksidatif. Lipid peroksidasi diketahui merupakan reaksi berantai yang dipicu oleh radikal bebas, yang berakibat pada kerusakan membran sel. Hambatan peroksidasi oleh

curcumin utamanya disebabkan efek *scavenging* dari radikal bebas reaksi yang terlibat dalam proses peroksidasi. Curcumin adalah sebuah antioksidan yang unik yang mengandung berbagai macam kelompok fungsional, termasuk diantaranya kelompok B-diketo, karbon-karbon berikatan double, dan cincin *phenyl* yang mengandung sejumlah substituen hidroksil dan metoksi.

Diduga kuat, aktifitas antioksidan berasal dari *phenolic* atau *central methylenic hydrogen* pada bagian *heptadienone*. Jovanovic et al menyimpulkan bahwa curcumin adalah sebuah donor atom H yang luar biasa dengan cara mendonasikan atom H dari kelompok *central methylenic*-nya dibandingkan dari kelompok *phenolic*, disisi lain Barclay et al menyatakan bahwa curcumin mendonasikan atom H dari kelompok *phenolic*-nya. Litwinienko dan Ingold menyatakan aktifitas antioksidan curcumin melalui mekanisme SPLET (*Sequential Proton Loss Electron Transfer*) dimana curcumin bereaksi dengan radikal elektrofilik pada bagian keto-enol terionisasi-nya, dan hasil akhirnya adalah sebuah radikal netral yang kehilangan *phenolic photon*. Hal yang sama terjadi pada radikal *phenoxyl* yang menerima transfer atom H (*H-atom transfer*, HAT) dari kelompok *phenolic hydroxyl* dari anion curcumin pada radikal tersebut. Namun, pada larutan yang tidak terionisasi mekanisme SPLET tidak terjadi, melainkan hanya HAT dari kelompok *phenolic hydroxyl* curcumin kepada radikal.

Mekanisme lain yang penting adalah, curcumin dapat berdegradasi menjadi *trans-6-(4'-hidroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal*, *ferrulic acid*, *ferruloylmethane*, dan *vanillin* pada pH dasar dalam 30 menit. Diantara zat tersebut, *ferrulic acid* dan *vanillin* adalah antioksidan yang stabil (Menon, 2006; Aggarwal et al, 2006).

Berikut adalah konklusi target molekuler yang dapat dipengaruhi oleh curcumin :



Gambar 2.14. Target molekuler dari Curcumin. (Aggarwal et al, 2006)

2.5 Kebuntingan dan Preeklampsia pada Rodent

Pemahaman etiopatogenesis preeklampsia seharusnya menghasilkan strategi baru untuk mencegah dan memberikan terapi penyakit ini. Penelitian etiopatogenesis molekuler dan seluler preeklampsia pada wanita hamil sangat sulit dan mahal. Untuk mengetahui etiopatogenesis preeklampsia dengan menggunakan jaringan trofoblas pada trimester I dan trimester II pada manusia tidak lazim dikerjakan karena merupakan tindakan yang invasif dan mengakibatkan abortus/partus prematurus yang tentunya tidak diperbolehkan secara medis (Sulistiyowati, 2009). Hal ini membuat peneliti melakukan penelitian preeklampsia dengan model hewan coba.

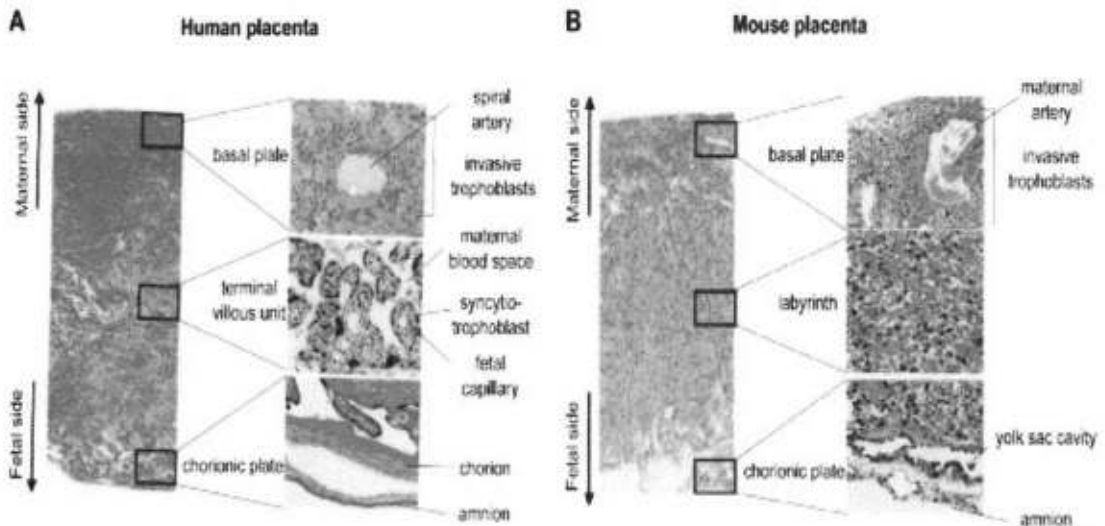
Tabel 2.1 Perbandingan kehamilan dan struktur plasenta pada manusia dan mencit (Lyall, 2007)**Table 14.1.** Comparison of pregnancy and placental structure in humans and mice

	Human	Mouse
Length of gestation	9 months	20 days
Stage of implantation (post-fertilization)	7 days	4.5 days
Initiation of fetal heartbeat	21 days	8.5 days
Vascularization of placental villi	25 days	10 days
Hemochorial blood flow through placenta	Yes	Yes
Chorionic villi lined by syncytiotrophoblast	Yes	Yes
Invasive trophoblast cell subtype entering uterine spiral arteries	Extravillous cytotrophoblast	Trophoblast giant cells

Lyall et al (2007) menyatakan manifestasi kebuntingan rodent sebagian besar tampak berbeda dengan pada manusia, seperti lamanya kebuntingan 3 minggu versus kehamilan 9 bulan, dan bahwa umumnya rodent melahirkan beberapa anak dibanding tunggal. Disamping perbedaan yang tampak tersebut, telah ditemukannya bahwa kebuntingan rodent dapat mengalami preeklampsia, menunjukkan bahwa terdapat banyak persamaan antara rodent dan manusia. Beberapa manifestasi anatomi dan fisiologis kebuntingan pada rodent mirip dengan pada manusia. (Tabel 2.2).

Pada level struktural, buah konsepsi pada rodent, seperti juga pada manusia, menginvasi dinding uterus setelah implantasi dan memicu kenaikan aliran darah maternal pada situs implantasi dengan cara merangsang angiogenesis baik pada maternal maupun konsepsi dan merangsang vasodilatasi (Cross et al, 2002). Lapisan terluar sel plasenta rodent (*trophoblast giant cells*), analog dengan sel sitotrofoblas ekstra vilus pada manusia, menginvasi masuk kedalam arteri spiralis menggantikan lapisan endotel, merangsang

perubahan dari arteri berbatas endothel menjadi bentuk spatium darah (*hemochorealis*) berbatas trofoblas. Sebagian besar plasenta matur mempunyai struktur berbentuk vilus yang menyerupai pohon, disebut juga *labyrinth*, yang membentuk lapisan permukaan sedemikian rupa untuk pertukaran nutrisi dan gas/respirasi. (Cross, 2000; Cross et al., 2003; Rossant and Cross, 2001). *Labyrinth* diliputi oleh tiga lapisan trofoblas (dua lapisan sinsitiotrofoblas), dan mempunyai satu inti yang padat akan jaringan kapiler. Sedangkan pada level fisiologikal, rodent dan manusia menunjukkan pola tekanan darah yang mirip selama usia kehamilan akhir yang mungkin diinisiasi oleh faktor fetoplenta (Davisson et al, 2002; Wong et al, 2002).



Gambar 2.15 Perbandingan plasenta pada tikus dan manusia

Mempelajari perkembangan dan fisiologi kehamilan dengan menggunakan rodent bunting mempunyai banyak keuntungan, karena dimungkinkannya dilakukan kontrol genetik dan pengaruh lingkungan. Juga, karena masa gestasi yang singkat dan ukuran traktus reproduksi yang relatif kecil, memungkinkan dapat dilakukannya analisa proses kehamilan secara detail.

2.5.1 *Mus Musculus* (Mencit)

Mencit termasuk dalam genus *Mus*, subfamili Murinae, famili Muridae, order Rodentia.

Siklus Birahi Mencit

Lama siklus birahi *Mus Musculus* 4-5 hari dan berdasarkan perubahan epitel vagina dapat dibagi 4 fase yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.

Fase Proestrus merupakan fase pemasakan folikel sebagai persiapan untuk ovulasi dan proliferasi endometrium yang diikuti oleh pengecilan corpus luteum dari siklus sebelumnya. Fase ini kira-kira 12 jam dan pada sediaan hapus vagina tampak adanya sel-sel kecil dengan inti bulat

Fase estrus merupakan fase terpenting dalam siklus estrus karena hanya pada fase ini betina mau menerima pejantan untuk kopulasi. Selain itu, ovulasi terjadi pada dekat akhir periode estrus. Fase ini berlangsung 12-14 jam. Pada sediaan hapus vagina terdapat sel kornifikasi yaitu sel epitel vagina yang mengalami penandukan dan seringkali intinya piknotis atau tanpa inti.

Fase metestrus terjadi segera setelah ovulasi. Fase ini dibagi 2 yaitu metestrus I dan II yang masing-masing 15 jam dan 6 jam. Metestrus pada sediaan hapus vagina tampak sel kornifikasi dan mulai tampak sel leukosit

Fase Diestrus merupakan fase yang panjang sekitar 57-60 jam, pada sediaan hapus vagina terlihat sel epitel.

2.5.2 HLA-G pada mencit

Protein Qa-2 merupakan protein MHC Class Ib terikat glikospaspatidil inositol (GPI) yang ditemukan pada permukaan sel T tikus dan embrio preimplantasi, adalah produk dari gen PED (*preimplantation embryo development*) (Abigail, 2000). Protein Qa-2 pada tikus secara fungsional homolog dengan *human leukocyte antigen* (HLA-G) pada

manusia (Martina, 2006). Keduanya berperan dalam imunoregulasi, mengatur pertumbuhan embrionik awal dan kelangsungan hidup embrio selanjutnya. Qa-2 diekspresikan pada permukaan sel embrio tikus preimplantasi mulai dari tingkat 2 sel dan berlanjut sampai tingkat blastosit yang selanjutnya akan diekspresikan pada *inner cell mass* dan trofektoderm.

Embrio yang mengekspresikan Qa-2 menghasilkan kecepatan pembelahan yang lebih cepat selama perkembangan preimplantasi. Efek tidak tergantung dari lingkungan maternal karena embryo Qa-2 positif juga berkembang lebih cepat pada *in vitro*. Pemindahan Qa-2 menggunakan teknik enzimatik atau mikroinjeksi antisens memperlambat kecepatan perkembangan, sementara mikroinjeksi dari Q7 dan/atau Q9 DNA yang menghasilkan kode protein Qa-2 meningkatkan kecepatan pembelahan embrio. Selain tahap perkembangan preimplantasi, gen *Ped* juga memberikan keuntungan survival sampai *term*. Postnatal, mencit dengan Qa-2 positif menghasilkan perbaikan saat lahir dan berat yang cukup. Elizabeth (2008) menjelaskan mencit yang mengekspresikan Qa-2 memiliki keuntungan *survival* pada mencit dewasa. Warner dan Brenner memasukkan ulasan komprehensif gen *Ped* dan pencarian homolog manusianya dalam ulasan luas mereka pada regulasi genetik dari *survival* embrio preimplantasi.

HLA-G dan Qa-2, seperti seluruh manusia dan protein Class I manusia, secara struktural serupa dan berinteraksi dengan reseptor sistem imun bawaan dan daptan. Reseptor sistem imun bawaan pada mencit menghasilkan fungsi yang serupa pada reseptor NK manusia (Sulistyowati, 2009).

Tabel 2.2 Perbandingan dari HLA-G and Qa-2, Produk gen *Ped* (Martina, 2006)

<i>Feature</i>	<i>HLA-G</i>	<i>Qa-2</i>
<i>MHC Class I B molecule, binding nonapeptide</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Membrane-bound and soluble isoforms</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Expression by preimplantation embryos</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Increases preimplantation growth rate</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Enhances fetal survival</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Increases birth weight</i>	<i>Unknown</i>	<i>Yes</i>
<i>Increase weaning weight</i>	<i>Unknown</i>	<i>Yes</i>
<i>Short cytoplasmic tail</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>GPI linkage of short tail to membrane</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>
<i>Increased cell proliferation with cross-linking</i>	<i>Unknown</i>	<i>Yes</i>
<i>Acts as a signal transduction molecule</i>	<i>Unknown</i>	<i>Probable</i>

Kemiripan antara HLA-G dan Qa-2 disimpulkan pada Tabel I. Dapat ditarik kesimpulan bahwa HLA-G merupakan gen *Ped* mencit yang secara fungsional sangat ideal homolog dengan manusia (Martina, 2006).

2.6 Model Preeklampsia pada Mencit

Seperti yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya, Protein Qa-2 pada tikus secara fungsional homolog dengan *human leukocyte antigen* (HLA-G) pada manusia (Martina, 2006). HLA-G dan Qa-2, seperti seluruh manusia dan protein Class I manusia, secara struktural serupa dan berinteraksi dengan reseptor sistem imun bawaan dan daptan. Reseptor sistem imun bawaan pada mencit menghasilkan fungsi yang serupa pada reseptor NK manusia (Sulistiyowati, 2009).

Peneliti membuat model preeklampsia pada mencit dalam penelitian ini dengan menekan ekspresi protein Qa-2 mencit menggunakan antibodi anti Qa-2. Mencit dengan antibodi Qa-2 negatif ini diasumsikan mempunyai predisposisi untuk menjadi preeklampsia. Hal ini sesuai dengan dasar teori pada wanita hamil dengan preeklampsia

terdapat ekspresi HLA-G yang rendah. Sitotrofoblas vilus yang dikultur dari kehamilan normal bersifat upregulasi pada HLA-G, sedangkan sitotrofoblas yang dikultur dari kehamilan penderita preeklampsia bersifat tidak mengekspresi HLA-G (Lim et al., 1997). Penelitian *in vivo* sebelumnya membuktikan bahwa penggunaan antibodi anti Qa-2 dapat digunakan untuk membuat model Qa-2 negatif yang menunjukkan adanya disfungsi endotel pada mencit. Qa-2 negatif ditandai dengan perpendaran fluoresen yang redup pada pemeriksaan imunofluoresen (Sulistyowati, 2009).

Bagaimanapun juga dalam penelitian ini peneliti tidak mengevaluasi gejala preeklampsia. Sedangkan mencit dengan anti Qa-2 negatif tidak hanya dapat diasumsikan memiliki predisposisi preeklampsia melainkan dapat juga terjadi pada keadaan lain seperti *Taenia crassiceps murine cysticercosis*, yaitu suatu penyakit parasit pada mencit yang cenderung berkembang pada mencit dengan anti Qa-2 negatif. Supresi protein Qa-2 juga dilakukan untuk membuat mencit model *Behcet's disease* (Behcet's disease-like mouse model) (Lee et al, 2010).

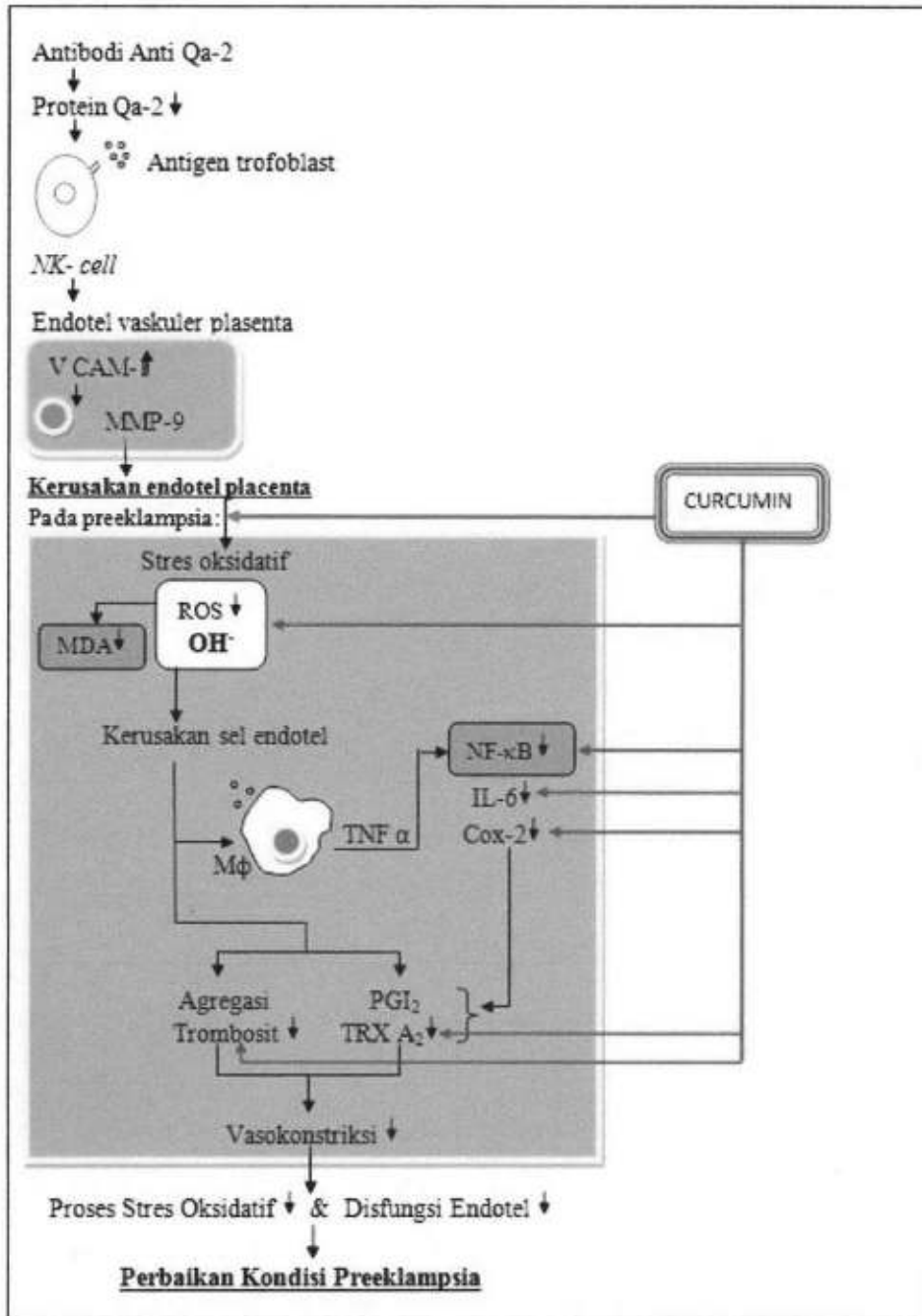
Mencit model preeklampsia tersebut dapat dikonfirmasi dengan mengevaluasi gejala preeklampsia pada umumnya, seperti hipertensi, proteinuria atau gejala lainnya. Tekanan darah pada mencit dapat diukur menggunakan transducer yang ditanamkan pada arteri karotis mencit, atau menggunakan alat pemantau BIOPAC® system MP 150 (Armenia et al., 1997). Proteinuria pada mencit dapat diukur secara kimia klinik menggunakan spektrofotometri.

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :



: Variabel bebas

—————> : Mempengaruhi



: Variabel terikat

—————> : Menghasilkan

—————> : Pemberian perlakuan

3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Perkembangan dan rasio kecepatan pembelahan embrio preimplantasi dipengaruhi oleh dua hal, yaitu genetik dan lingkungan (nutrisi dan sebagainya). Secara genetik, pada mencit yang menentukan adalah gen Q7 dan Q9. Ekspresi kedua gen maupun salah satunya tersebut menunjukkan perkembangan dan pembelahan embrio yang lebih baik, lebih cepat (*PED fast embryo, Qa-2⁺*) dan kehamilan yang lebih viabel bila dibandingkan dengan gen Q7 dan Q9 yang tidak berekspresi (*PED slow embryo, Qa-2⁻*). Hal ini disebabkan pada ekspresi positif Q7 maupun Q9, terjadi produksi protein Qa-2. Qa-2 adalah produk gen *preimplantation embryo development (PED gene)* yang ditemukan pada permukaan *inner cell mass* dan sel trofoektoderm embrio (Mc elhinny et al, 1998). Merupakan sebuah protein *major histocompatibility complex* klas I. Protein tersebut berperan dalam memicu rasio kecepatan fertilitas (Lerner et al, 1988), menurunkan resiko abortus spontan (Ober et al, 1997), melindungi embrio dari serangan *natural killer cell* (King et al, 1998), dan meningkatkan ketahanan survival dan perkembangan embrio (Warner et al, 1998).

Pada embrio dengan ekspresi protein Qa-2 negatif (dalam penelitian ini diinduksi oleh pemberian antibodi anti Qa-2), sel trofoblas embrio, termasuk bakal plasenta, akan dikenali sebagai antigen asing, yang kemudian akan diserang oleh *natural killer cell*. Destruksi ini menyebabkan kerusakan endotel plasenta, yang ditunjukkan dengan meningkatnya VCAM-1. Peningkatan protein ini akan mempengaruhi dan memicu monosit untuk melepaskan MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*) yang dapat merusak sel endotel vaskuler plasenta, menyebabkan kerusakan dan disfungsi endotel vaskuler plasenta lebih lanjut. Pada penelitian sebelumnya, terbukti adanya peningkatan VCAM-1 yang signifikan pada mencit bunting dengan Qa-2⁻ dibandingkan mencit dengan Qa-2⁺ (Sulistyowati, 2008).

Prinsip diatas identik dengan preeklampsia pada manusia, dimana terjadi disfungsi endotel plasenta karena ekspresi HLA-G yang rendah atau negatif. HLA-G dan Qa-2 adalah homolog, keduanya merupakan protein MHC klas I yang mempunyai fungsi yang identik. Pada preeklampsia, stres oksidatif karena disfungsi endotel menyebabkan produksi radikal bebas meningkat, yang dapat diukur dengan parameter spektrofotometri karena reaksinya dengan senyawa malondealdehid. Salah satu oksidan penting yang dihasilkan plasenta iskemia adalah radikal hidroksil (OH^\cdot) yang sangat toksik dan destruktif terhadap membran sel. Reaksi OH^\cdot dengan asam lemak tak jenuh dari membran sel menghasilkan peroksida lemak. Peroksida lemak selain merusak membran sel lebih lanjut, juga akan merusak nukleus dan protein sel endotel.

Kerusakan sel ini akan menyebabkan aktivasi makrofag, sehingga melepaskan $\text{TNF-}\alpha$, yang kemudian menginduksi translokasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ menuju lokusnya didalam nukleus. Aktivasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ini mengaktivasi sel untuk menghasilkan sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL-6, Cox-2 dan $\text{TNF-}\alpha$. Produksi Cox-2 menyebabkan peningkatan tromboksan, yang merupakan bahan vasokonstriktor kuat.

Kerusakan sel endotel lebih lanjut dan produksi sitokin-sitokin proinflamasi memperberat disfungsi endotel dengan segala akibatnya, yaitu gangguan eikosanoid (penurunan prostasiklin dan peningkatan tromboksan) dan meningkatnya agregasi platelet sehingga terjadi vasokonstriksi yang akan memperberat disfungsi endotel dan berujung pada kondisi preeklampsia.

Curcumin dapat menghambat dan menetralsir radikal bebas dengan mekanisme SPLET (*sequential proton loss electron transfer*) (Aggarwal, 2007), mensupresi aktivasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ yang diinduksi oleh $\text{TNF-}\alpha$ (*TNF-}\alpha\text{-induced activation of NF-}\kappa\text{B}*) dengan cara menghambat translokasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sub unit p65 (Karunakaran,

2007), menghambat enzim Cox-2 dengan cara *down regulasi* ekspresi transkripsi dari Cox-2 (Aggarwal, 2007), menyebabkan *down regulasi* ekspresi sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan kemokin, menghambat tromboksan dan agregasi platelet (Miriya et al, 2007).

Diharapkan dengan pemberian curcumin yang dapat menghambat faktor-faktor molekuler tersebut, didapatkan perbaikan stress oksidatif sehingga memperbaiki kondisi preeklampsia.

3.3 Hipotesis Penelitian

Jumlah ekspresi NF- κ B dan kadar malondealdehid pada mencit yang diberi perlakuan curcumin lebih sedikit daripada kontrol.

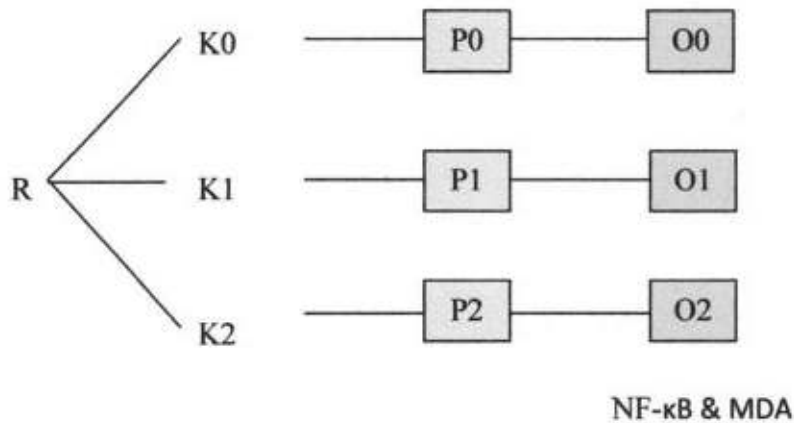
BAB 4

METODE PENELITIAN

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *post test only control group design*, secara *double blind*.



Keterangan gambar :

Sampel diambil secara random.

K0: Kelompok mencit kontrol.

P0: Mencit dibuntingkan. Jika positif bunting, disuntik sediaan antibodi anti-QA2 (anti Qa-2) pada kebuntingan hari ke-1, 10 ng pada kebuntingan hari ke-2, 10 ng lagi pada kebuntingan hari ke-3 dan 10 ng pada kebuntingan hari ke-4. Pada hari ke-5 dan selanjutnya diberi perlakuan plasebo selama 14 hari.

O0: Mencit dikorbankan. Diperiksa jumlah ekspresi NF-κB pada jaringan trofoblas dan kadar MDA serum.

K1: Kelompok mencit yang mendapat perlakuan tipe 1.

P1: Mencit dibuntingkan. Jika positif bunting, disuntik sediaan antibodi anti-QA2 (anti Qa-2) pada kebuntingan hari ke-1, 10 ng pada kebuntingan hari ke-2, 10 ng lagi pada kebuntingan hari ke-3 dan 10 ng pada kebuntingan hari ke-4. Pada hari ke-5 dan selanjutnya diberi perlakuan curcumin peronde 100 mg/kg BB selama 14 hari.

O1: Mencit dikorbankan. Diperiksa jumlah ekspresi NF- κ B pada jaringan trofoblas dan kadar MDA serum.

K2: Kelompok mencit yang mendapat perlakuan tipe 2.

P2: Mencit dibuntingkan. Jika positif bunting, disuntik sediaan antibodi anti-QA2 (anti Qa-2) pada kebuntingan hari ke-1, 10 ng pada kebuntingan hari ke-2, 10 ng lagi pada kebuntingan hari ke-3 dan 10 ng pada kebuntingan hari ke-4. Pada hari ke-5 dan selanjutnya diberi perlakuan curcumin peronde 240 mg/kg BB selama 14 hari.

O2: Mencit dikorbankan. Diperiksa jumlah ekspresi NF- κ B pada jaringan trofoblas dan kadar MDA serum.

4.2 Sampel dan Besar sampel

4.2.1 Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) yang memenuhi kriteria sampel penelitian. Hewan coba tersebut diperoleh dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Surabaya.

Penelitian hewan coba ini berdasarkan pertimbangan bahwa secara medis, terdapat keterbatasan etik untuk dilakukan pada manusia. Sedangkan pada hewan

rodents, telah diketahui pada kelompok hewan tersebut dapat timbul preeklampsia. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat banyak kemiripan antara *rodents* dan manusia, dari segi anatomi kehamilan maupun fisiologinya (Lyall et al., 2007).

4.2.2 Kriteria sampel

1. Mencit (*Mus musculus*) betina yang sehat
(Secara inspeksi ditunjukkan dengan gerak lincah, tidak lesu, kulit bersih tanpa luka, mata terang dan tidak layu. Frekuensi denyut jantung dan nafas masing-masing dalam rentang : suhu 37,5 °C – 39 °C, frekuensi denyut jantung 330–480 kali permenit, frekuensi pernafasan 80–120 kali pementit.)
2. Tidak bunting
3. Fertil (sudah pernah beranak)
4. Umur 3-4 bulan
5. Berat badan 20-35 gram
6. Diperoleh dari lokasi yang sama

4.2.3 Kriteria putus uji

Mencit betina yang sakit atau mati atau terjepit kandang setelah perlakuan adaptasi 1 minggu di kandang dan atau setelah dibuntingkan, atau setelah mendapatkan suntikan antibodi anti-QA2, sonde curcumin maupun plasebo.

4.2.4 Besar Sampel

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

Dengan $t = 3$, maka didapatkan :

$$(3 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$n \geq 8,5 \sim 9$$

Untuk menghindari kematian atau *drop out* ditambahkan 10 % dari jumlah sampel. Maka, didapatkan jumlah sampel per kelompok = 10 ekor mencit.

4.3 Variable penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Variabel bebas : Curcumin 100 mg/kgBB mencit dan
Curcumin 240 mg/kgBB mencit.

Variabel tergantung : Ekspresi NFkB , kadar Malondealdehid.

4.3.2 Definisi Operasional

Curcumin :

Bahan serbuk curcumin bermerek dagang MERCK mengandung bahan aktif curcumin 90%. Berat serbuk curcumin yang dibutuhkan diukur dengan cara ditimbang dengan timbangan mikro.

Ekspresi NFkB :

Ekspresi NFkB adalah pendaran cahaya yang tampak pada sediaan plasenta (jaringan tropoblast) mencit yang dicat dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal NFkB anti-p65 dari mencit. Pendaran antibodi

NFkB anti-p65 ini menunjukkan adanya faktor transkripsi NFkB yang teraktivasi untuk menghasilkan sitokin pro-inflamasi.

Perubahan yang diamati dalam pemeriksaan ini adalah NFkB yang diekspresikan pada inti sel trophoblast yang ditandai dengan warna coklat muda hingga coklat tua. Metode pemeriksaan yang dilakukan merupakan modifikasi dari Yamasita *et al* (2004), dimana data yang didapat merupakan rata-rata skoring sel imunoreaktif dari lima lapangan pandang berbeda dengan pembesaran 1000x. Adapun cara skoring menurut metode ini adalah sebagai berikut :

Skor 0 : Inti sel tropoblas tidak ada yang terwarnai (tidak imunoreaktif)

Skor 1 : Inti sel tropoblas terwarnai (imunoreaktif) < 10 % dari total sel

Skor 2 : Inti sel tropoblas terwarnai (imunoreaktif) 10-50 % dari total sel

Skor 3 : Inti sel tropoblas terwarnai (imunoreaktif) > 50 % dari total sel

Berdasarkan hasil skoring tersebut, selanjutnya dilakukan interpretasi ekspresi NFkB terhadap hasil yang didapat seperti berikut :

Negatif : bila skor 0 dan 1.

Positif : bila skor 2 dan 3.

Kadar Malondealdehid :

Kadar Malondealdehid (MDA) adalah besaran yang didapatkan dari pengujian aktivitas penangkapan radikal hidroksil oleh suatu antioksidan dengan metode deoksiribosa menggunakan gula deoksiribosa sebagai model makromolekul yang akan didegradasi. Produk degradasi deoksiribosa oleh radikal hidroksil dapat bereaksi dengan asam tiobarbiturat dalam suasana asam dengan

bantuan pemanasan dan menghasilkan suatu produk berwarna merah muda yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 532 nm (Halliwell *et al.*, 1987). Analisis MDA merupakan analisis radikal bebas secara tidak langsung untuk menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk.

4.4 Bahan penelitian

4.4.1 Bahan serbuk curcumin

Bahan serbuk curcumin bermerek dagang MERCK mengandung bahan aktif curcumin 90%.

4.4.2 Larutan curcumin

1. Larutan C0

- Larutan ini diberikan untuk mencit kelompok perlakuan 0 (K0)
- Rata- rata berat mencit K0 = 33 g. (n=9).
- Larutan C0 tidak mengandung Curcumin. Hanya menggunakan aquades sebagai plasebo
- Tiap ekor mencit kelompok K0 disonde dengan 1 cc aquades (C0) per hari selama 14 hari

2. Larutan C1

- Larutan ini diberikan untuk mencit kelompok perlakuan 1 (K1)
- Rata- rata berat mencit K1 = 25 g. (n=9).
- Curcumin yang dibutuhkan 100 mg/kg BB mencit, sediaan serbuk curcumin mengandung zat aktif Curcumin 90%.

- Perhitungan :

$$100\%/90\% \times 100 \text{ mg/kgBB mencit} = 111,11 \text{ mg/kg BB mencit}$$

$$= 0,111 \text{ mg/ 1 g mencit}$$

$$\text{Berat badan 25 g} = 2,775 \text{ mg Curcumin 90\% per ekor mencit per hari}$$

$$9 \text{ ekor mencit} = 24,975 \text{ mg Curcumin 90\% per kelompok per hari}$$

$$\text{Untuk 14 hari} = 349,65 \text{ mg Curcumin 90\%}.$$

- Langkah Pembuatan :

1. Siapkan 349,65 mg serbuk Curcumin 90%
2. Siapkan 17,4825 mg serbuk CMC Na (5%)
3. Siapkan aquades 6 cc, panaskan diatas api bunsen sampai hangat
4. Siapkan aquades 120 cc
5. Serbuk CMC Na digerus, dicampur sedikit demi sedikit dengan aquades 6 cc yang telah hangat hingga bercampur
6. Masukkan serbuk Curcumin sedikit demi sedikit
7. Setelah tercampur tambahkan aquades 120 cc, aduk hingga merata
8. Larutan siap.

- Tiap ekor mencit kelompok K1 disonde dengan 1 cc Larutan C1 per hari selama 14 hari

3. Larutan C2

- Larutan ini diberikan untuk mencit kelompok perlakuan 2 (K2)
- Rata- rata berat mencit K1 = 35 g. (n=9).
- Curcumin yang dibutuhkan 240 mg/kg BB mencit, sediaan serbuk curcumin mengandung zat aktif Curcumin 90%.

- Perhitungan :

$$100\%/90\% \times 240 \text{ mg/kgBB mencit} = 266,66 \text{ mg/kg BB mencit}$$

$$= 0,266 \text{ mg/g BB mencit}$$

Berat badan 30 g = 7,98 mg Curcumin 90% per ekor mencit per hari

9 ekor mencit = 71,82 mg C90% per hari

Untuk 14 hari = 1005,48 mg C90%.

- Langkah Pembuatan :

1. Siapkan 1005,48 mg serbuk Curcumin 90%

2. Siapkan 50,274 mg serbuk CMC Na (5%)

3. Siapkan aquades 6 cc, panaskan diatas api bunsen sampai hangat

4. Siapkan aquades 120 cc

5. Serbuk CMC Na digerus, dicampur sedikit demi sedikit dengan aquades 6 cc yang telah hangat hingga bercampur

6. Masukkan serbuk Curcumin sedikit demi sedikit

7. Setelah tercampur tambahkan aquades 120 cc, aduk hingga merata

8. Larutan siap.

- Tiap ekor mencit kelompok K2 disonde dengan 1 cc Larutan C2 per hari selama 14 hari

4.4.3 Bahan antibodi anti-Qa2

Sediaan berupa larutan antibodi anti-Qa2 (SK44) 2 ml setara dengan antibodi Anti-Qa2 100 µg produksi pabrik *Santa Cruz Biotechnology*.

4.4.4 Larutan antibodi anti-Qa2

- Dibutuhkan antibodi anti-Qa2 10 ng untuk diinjeksikan pada tiap ekor mencit K0, K1, K2.
- Langkah Pembuatan :
 1. Diambil 10 μl ($\approx 0,5 \mu\text{g}$) sediaan anti-Qa2
 2. Diencerkan dengan cara ditambah aquades 9.990 μl ($\approx 9,99 \text{ ml}$) sehingga volume total menjadi 10.000 μl ($\approx 0,5 \mu\text{g}$).
 - 10.000 $\mu\text{l} \approx 0,5 \mu\text{g} \approx 500 \text{ ng}$
 - 10 ml $\approx 500 \text{ ng}$
 - 0,2 ml $\approx 10 \text{ ng}$ (Setiap 0,2 ml larutan $\approx 10 \text{ ng}$)
- Tiap ekor mencit kelompok K0,K1,K2 diinjeksi dengan 0,2 ml Larutan antibodi anti-Qa2 per hari selama 4 hari

4.4.5 Bahan hormon *Pregnant More Serum Gonadotropin* (PMSG)

Sediaan berupa serbuk bermerek dagang *Foligon* mengandung 1000 IU PMSG, disertai dengan solven 5 cc.

4.4.6 Larutan hormon *Pregnant More Serum Gonadotropin* (PMSG)

- Dibutuhkan PMSG 5 IU untuk diinjeksikan pada tiap ekor mencit K0, K1, K2.
- Langkah Pembuatan :
 1. 1000 IU serbuk PMSG dicampur dengan 5 cc solven
 2. Diambil 1 cc dari campuran diatas (1cc $\approx 200 \text{ IU}$)

3. Diencerkan dengan cara ditambah aquades 3 cc (≈ 200 IU) sehingga volume total menjadi 4 cc (≈ 200 IU).
 - 4 cc ≈ 200 IU
 - 0,1 cc ≈ 5 IU (Setiap 0,1 cc larutan ≈ 5 IU)
- Tiap ekor mencit kelompok K0,K1,K2 diinjeksi dengan 0,1 cc larutan PMSG pada hari pertama perlakuan.

4.4.7 Bahan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG)

Sediaan berupa serbuk bermerek dagang *Chorulon* mengandung 1500 IU hCG, disertai dengan solven 5 cc.

4.4.8 Larutan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG)

- Dibutuhkan hCG 5 IU untuk diinjeksikan pada tiap ekor mencit K0, K1, K2.
- Langkah Pembuatan :
 1. 1500 IU serbuk hCG dicampur dengan 5 cc solven
 2. Diambil 1 cc dari campuran diatas (1cc ≈ 300 IU)
 3. Diencerkan dengan cara ditambah aquades 5 cc (≈ 300 IU) sehingga volume total menjadi cc (≈ 300 IU).
 - 6 cc ≈ 300 IU
 - 0,1 cc ≈ 5 IU (Setiap 0,1 cc larutan ≈ 5 IU)
- Tiap ekor mencit kelompok K0,K1,K2 diinjeksi dengan 0,1 cc larutan PMSG pada hari ketiga perlakuan.

4.4.9 Pakan & minum mencit

Selama 22 hari perlakuan, mencit diberi pakan setiap hari menggunakan pelet Hi-Pro-Vite 511 dan 521 (PT. Charoen Pokphdan, Indonesia) dan minum yang bersumber dari PDAM Surabaya secara *ad libitum*.

4.5 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Agustus 2010.

4.6 Teknik Penelitian

Membuntingkan Mencit :

- a. Melakukan sinkronisasi birahi, yaitu mencit betina dewasa usia 3-4 bulan dengan berat badan 20-35 gram disuntik 5 IU hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) sub kutan, 48 jam kemudian disuntik 5 IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) sub kutan, dibiarkan selama 17 jam.
- b. Mencit betina tersebut dikawinkan secara *monomating* yaitu satu persatu mencit betina yang sudah disinkronisasi birahi dimasukkan kedalam kandang yang berisi satu mencit jantan umur 7 bulan.
- c. Diagnosis bunting didapatkan 17 jam setelah dikawinkan dan dievaluasi adanya *vaginal plug* (sumbat vagina yang menutupi vagina mencit dari serviks sampai dengan vulva).

Suntikan antibodi anti-QA2 :

Sediaan antibodi anti-QA2 didapatkan berupa sediaan dari pabrik, disuntikkan pada semua kelompok mencit bunting hari ke I sampai IV, dengan dosis per hari 10 ng. Qa-2 negatif akan terjadi pada dosis 40 ng yaitu pada kebuntingan hari ke-5 (Sulistyowati, 2009).

Suntikan subkutan :

Lokasi yang sering dipakai untuk suntikan subkutan adalah daerah punggung dan leher. Teknik yang umum adalah dengan memegang lipatan kulit dengan satu tangan sementara jarum dimasukkan di bawah kulit pada dasar lipatannya. Rasa sakit setelah penyuntikan dapat dihindari dengan teknik penyuntikan perlahan atau volume yang tidak terlalu banyak. Hal yang harus dihindari adalah komplikasi adanya kemungkinan jarum mengenai pembuluh darah atau bahkan kemungkinan materi masuk ke dalam pembuluh darah.

Pemberian personde :

Bahan larutan curcumin (untuk kelompok perlakuan) atau aquades (untuk kelompok kontrol) dimasukkan dalam spuit 1 cc disondekan dengan alat khusus sonde untuk mencit yaitu jarum yang panjangnya sekitar 10 cm dengan ujung tajam telah dimodifikasi dengan ditambah bentukan bundar untuk kemudian dimasukkan kedalam mulut mencit.

Pengukuran Malondealdehid :

1. Diambil 0,1 cc serum
2. Ditambah larutan PBS 0,9 cc
3. Dikocok kemudian dipusingkan dengan putaran 3000 rpm selama 15 menit
4. Diambil supernatant sebanyak 0,8 cc
5. Ditambahkan TCA 15% sebanyak 1 cc
6. Ditambahkan TBA 0,37% 1 cc dalam HCl 0,25 N
7. Dipanaskan dalam *waterbath*, dalam suhu 80°C selama 15 menit
8. Didinginkan pada suhu ruang
9. Dipusingkan dengan putaran 3000 rpm selama 15 menit
10. Diukur absorbansi supernatan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

Pengecatan Imunohistokimia:

1. Uterus dari ketiga kelompok mencit dipreparasi, diambil bagian yang terdapat implan (plasenta).
2. Sampel plasenta difiksasi dengan formalin buffer 10%,
3. Dehidrasi dengan xylol 2 kali selama 5 menit;
4. Alkohol seri masing-masing 5 menit;
5. Dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit;

6. Sampel difiksasi dengan 0,3% Triton-x dalam PBS + 0,1% *Fetal Calf Serum* (FCS) selama 60 menit;
7. cuci/bilas PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit;
8. Proses embeding parafin
9. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom hingga masing-masing potongan mempunyai ketebalan 5 μm .
10. *Coating* dengan antibodi Qa-2 yang berlabel FITC dan larutan Hoescth dengan inkubasi antibodi primer suhu (anti Qa-2) dingin 30-60°C; *Mounting* dengan gliserin;
11. Diamati dengan mikroskop fluoresen.

4.7 Pengolahan dan analisis data

4.7.1 Kadar Malondealdehid

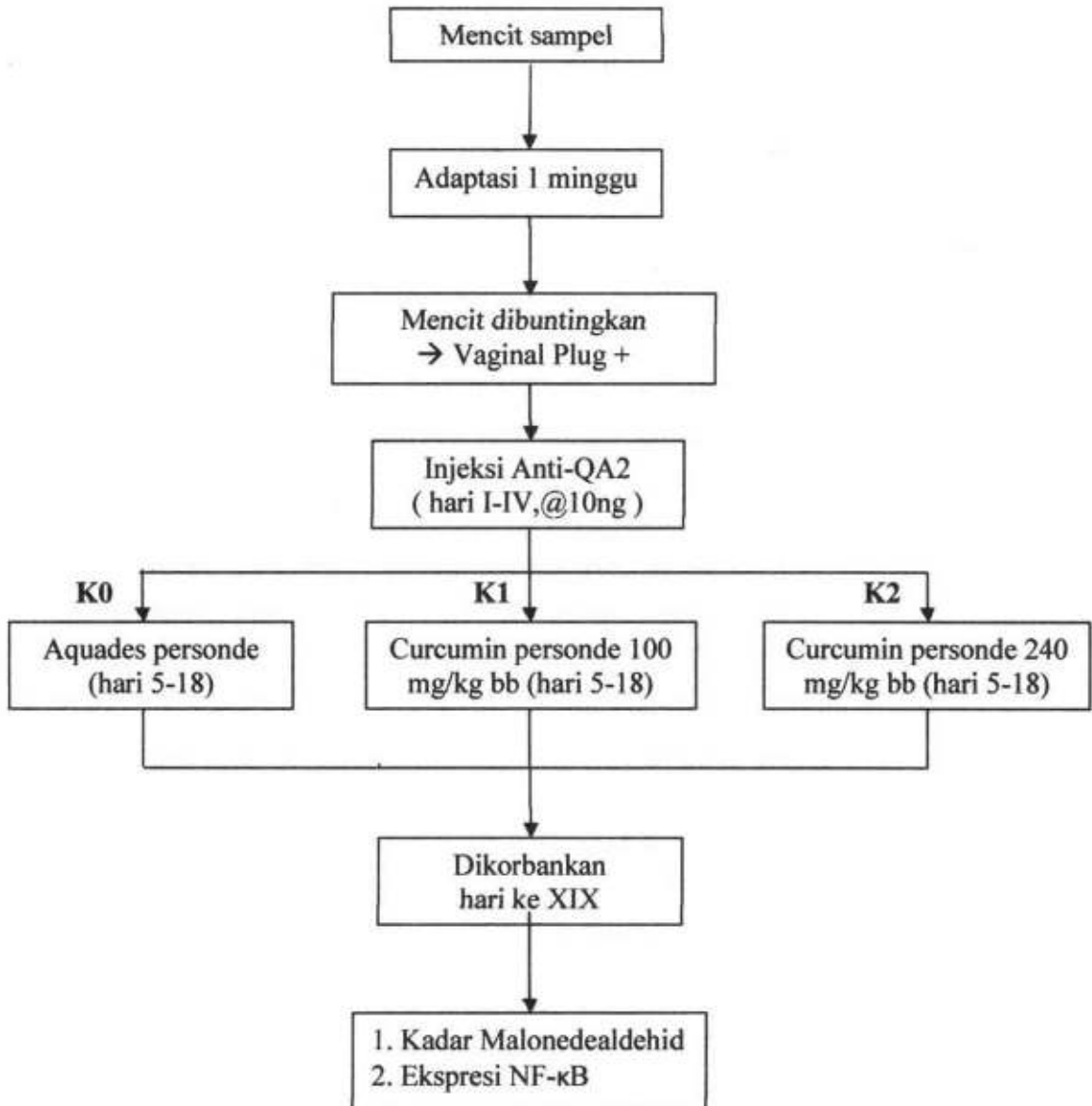
Data kadar malondealdehid adalah data numerik. Jenis hipotesis yang dipakai oleh peneliti adalah komparasi antar data 3 kelompok sampel yang tidak berpasangan. Peneliti bermaksud mengolah data menggunakan uji analitik One Way ANOVA (*Analisis of Variance*) dengan program statistik komputer, dimana didahului oleh pengolahan data secara deskriptif, uji normalitas dan uji kesamaan varians.

4.7.2 Ekspresi NF- κ B

Data Ekspresi NF- κ B adalah data numerik. Jenis hipotesis yang dipakai oleh peneliti adalah komparasi antar data 3 kelompok sampel yang tidak berpasangan. Peneliti bermaksud mengolah data menggunakan uji analitik One Way ANOVA (*Analisis of*

Variance) dengan program statistik komputer, dimana didahului oleh pengolahan data secara deskriptif, uji normalitas dan uji kesamaan varians.

4.8 Kerangka operasional



BAB 5
HASIL DAN ANALISIS
PENELITIAN

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1. Data Penelitian

5.1.1. Sampel (*Mus musculus*)

Peneliti menggunakan hewan coba *Mus musculus* sebagai sampel. Kuantitas larutan curcumin yang diberikan pada setiap kelompok disesuaikan dengan berat badan kelompok mencit sampel.

Tabel 5.1. Berat badan mencit perlakuan

Nomor Mencit	Mencit betina Kontrol (K0)	Mencit betina Perlakuan 1 (K1)	Mencit betina Perlakuan 2 (K2)
1	35	20	25
2	25	25	20
3	35	30	35
4	30	25	25
5	35	25	35
6	30	25	35
7	30	20	30
8	35	30	30
9	35	25	35
X	32.2 ≈ 33	25	30

Rerata berat badan mencit pada kelompok kontrol adalah 33 gram, pada kelompok perlakuan 1 adalah 25 gram, dan pada kelompok perlakuan 2 adalah 30 gram. Berdasarkan rerata berat badan tersebut kuantitas serbuk sediaan curcumin yang digunakan untuk kelompok perlakuan 1 sebanyak 349,65 mg, untuk kelompok perlakuan 2 sebanyak 1005,48 mg, sedangkan mencit kelompok kontrol tidak menggunakan curcumin.

Tabel 5.2. Perlakuan pada kelompok mencit

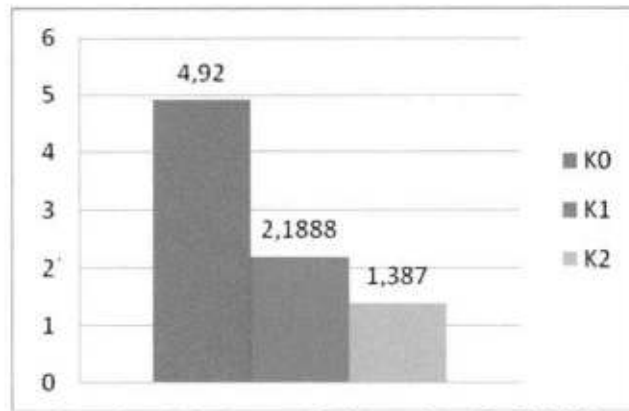
Kelompok Mencit	Anti Qa-2	Plasebo	Curcumin 100 mg/kg BB	Curcumin 240 mg/kg BB
KO (kontrol)	+	+	-	-
K1(perlakuan 1)	+	-	+	-
K2(perlakuan 2)	+	-	-	+

5.1.2. Data kadar malondealdehid

Tabel 5.3. Kadar malondealdehid pada tiap kelompok sampel

Nomor Mencit	Kadar Malondealdehid		
	K0	K1	K2
1	3.725	2.257	1.279
2	6.049	1.768	1.401
3	4.581	2.257	1.279
4	5.070	3.113	1.523
5	4.826	1.646	1.401
6	6.171	1.890	1.523
7	4.459	2.379	1.279
8	4.948	1.767	1.401
9	4.459	2.623	1.401
X	4.920	2.188	1.387

Rerata kadar malondealdehid kelompok kontrol sebesar 4,920, untuk kelompok perlakuan 1 sebesar 2,188, sedangkan untuk kelompok perlakuan 2 sebesar 1,387.

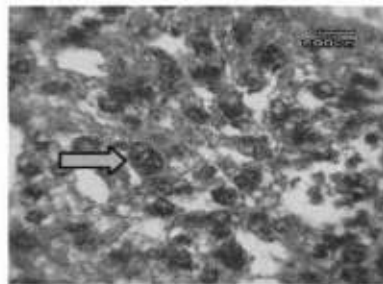


Gambar 5.1. Rerata kadar malondealdehid

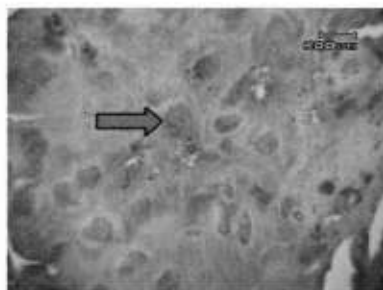
Rerata kadar malondealdehid kelompok kontrol paling tinggi dibanding kelompok yang lain, rerata kadar malondealdehid kelompok perlakuan 1 lebih rendah, sedangkan rerata kadar malondealdehid kelompok perlakuan 2 paling rendah diantara ketiganya.

5.1.3. Data ekspresi NF- κ B

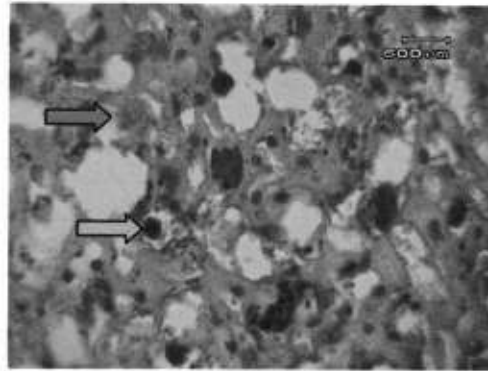
Pendaran pada inti sel yang berwarna coklat diinterpretasikan sebagai ekspresi NF- κ B positif (panah berwarna kuning pada gambar), sedangkan pendaran pada inti berwarna biru diinterpretasikan ekspresi NF- κ B negatif (panah berwarna merah).



Gambar 5.2. Lapangan pandang imunohistokimia kelompok kontrol.



Gambar 5.3. Lapangan pandang imunohistokimia kelompok perlakuan 1



Gambar 5.4. Lapangan pandang imunohistokimia kelompok perlakuan 2

Tiap preparat plasenta mencit pada tiap kelompok perlakuan dinilai sebanyak lima lapangan pandang pada pembesaran 1000 kali untuk kemudian diinterpretasi.

Tabel 5.4. Skor sel imunoreaktif* terhadap NF- κ B pada kelompok mencit

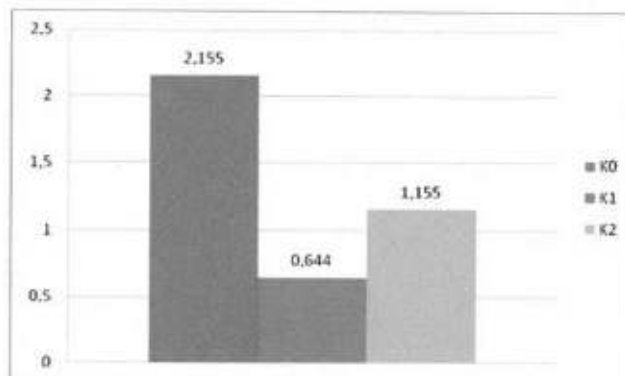
No.	K0			K1			K2		
	Skor sel imunoreaktif	X	I	Skor sel imunoreaktif	X	I	Skor sel imunoreaktif	X	I
1	3.2.1.3.1.	2,0	+	0.0.0.1.1.	0,4	-	2.1.1.0.1.	1	-
2	1.1.1.2.1	1,2	-	1.1.0.1.2.	1	-	1.2.2.2.1.	1,6	-
3	1.1.0.0.0.	0,4	-	1.1.0.2.2.	1,2	-	0.1.1.2.0.	0,8	-
4	3.3.3.3.3.	3	+	1.1.0.0.0.	0,4	-	1.0.2.0.0.	0,6	-
5	2.3.2.3.3.	2,6	+	0.0.0.1.0.	0,2	-	2.3.3.1.1.	2	+
6	1.3.3.3.3.	2,6	+	2.2.0.0.1.	1	-	1.0.1.0.0.	0,4	-
7	3.2.2.3.3.	2,6	+	0.1.1.0.1.	0,6	-	2.2.0.1.1.	1,2	-
8	2.3.3.3.3.	2,8	+	1.0.0.2.1.	0,8		1.2.2.0.0.	1	-
9	3.2.1.2.2.	2	+	0.0.0.1.0.	0,2	-	3.2.2.1.1.	1,8	-
X		2,155	+		0,644	-		1,155	-

Keterangan: * dilihat pada 5 lapangan pandang untuk tiap ekor sampel mencit.

X = rerata skor sel imunoreaktif pada 5 lapangan pandang.

I = interpretasi ekspresi NF- κ B.

Rerata sel imunoreaktif terhadap NF- κ B kelompok kontrol sebesar 2,155 untuk kelompok perlakuan 1 sebesar 0,644, sedangkan untuk kelompok perlakuan 2 sebesar 1,155.



Gambar 5.5. Rerata Skor sel imunoreaktif terhadap NF-κB

Rerata sel imunoreaktif terhadap NF-κB kelompok kontrol paling tinggi dibanding kelompok yang lain, rerata kadar malondealdehid kelompok perlakuan 1 lebih rendah dibanding kontrol, sedangkan rerata kadar malondealdehid kelompok perlakuan 2 lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, namun lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan 1.

5.2. Analisis Data Penelitian kadar malondealdehid

Peneliti ingin membandingkan (komparasi) antar rerata kadar malondealdehid antar kelompok secara statistik analitik. Data kadar malondealdehid dapat dikategorikan sebagai data numerik dan ketiga kelompok data merupakan kelompok data tidak berpasangan. Bila data mempunyai distribusi normal dan varian sama, maka analisis dapat menggunakan uji *one way ANOVA*. Bila data tidak berdistribusi normal atau mempunyai varian tidak sama maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Bila dari uji statistik terbukti ada perbedaan bermakna paling tidak terhadap dua kelompok sampel, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*. Uji dan penghitungan yang dilakukan peneliti menggunakan program statistik komputer.

5.2.1. Uji normalitas distribusi data

Data kelompok K0, K1 dan K2 masing-masing diuji normalitas distribusi menggunakan uji Shapiro-Wilk karena besar sampel <50 . Dikatakan distribusi data normal bila $p > 0,05$.

Tabel 5.5. Hasil uji normalitas distribusi data (Uji Shapiro-Wilk)

Kelompok Perlakuan	Mean \pm SD	P	Kesimpulan ($p > 0,05$ distribusi normal)
K0	4,9208 \pm 0,777797	0,402	Distribusi normal
K1	2,1888 \pm 0,477893	0,400	Distribusi normal
K2	1,3874 \pm 0,095372	0,055	Distribusi normal

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok (pada tabel) menunjukkan bahwa distribusi data ketiga kelompok adalah normal.

5.2.2. Uji homogenitas varians data

Data kelompok K0, K1 dan K2 diuji homogenitas varians menggunakan uji Levene's. Dikatakan distribusi data normal bila $p > 0,05$.

Tabel 5.6. Hasil uji homogenitas varians data (Uji Levene's)

Antar Kelompok Perlakuan	P	Kesimpulan ($p > 0,05$ varians sama)
K0, K1, K2	0,012	Varians berbeda

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok menunjukkan angka $p = 0,012$. Karena $p < 0,05$ dapat ditarik kesimpulan terdapat dua kelompok yang mempunyai varians data yang berbeda secara

bermakna. Oleh karena tidak memenuhi syarat varians sama, tidak dapat menggunakan uji *one way ANOVA*. Sebagai alternatifnya digunakan uji *Kruskal Wallis*.

5.2.3. Uji Kruskal Wallis

Data kelompok K0, K1 dan K2 masing-masing diuji signifikansi dengan Kruskal Wallis. Dikatakan berbeda signifikan bila $p < 0,05$.

Tabel 5.7. Hasil uji signifikansi dengan Kruskal Wallis

Kelompok Perlakuan	Mean Rank	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K0	23	0,000	Berbeda bermakna
K1	14		
K2	5		

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok menunjukkan angka $p=0,000$. Karena $p < 0,05$ dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan kadar malondealdehid antara dua kelompok perlakuan secara bermakna.

Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan maka harus dilakukan analisis *Post Hoc*. Sebagai analisis *Post Hoc* peneliti menggunakan uji t test 2 sampel tidak berpasangan (*non independent t test*) dimana diasumsikan varians tidak sama.

5.2.4. Uji t test 2 sampel tidak berpasangan

5.2.4.1. Uji t test 2 sampel tidak berpasangan antara kelompok K0 dan K1

Tabel 5.8. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K0 dan K1

Kelompok Perlakuan	Mean	Mean Difference	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K0	4,92089	2,732000	0,000	Berbeda bermakna
K1	2,18889	2,732000	0,000	

Dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan bermakna rerata kadar malondealdehid antara kelompok mencit yang diberi perlakuan plasebo (K0) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 100 mg/kg BB (K1).

5.2.4.2. Uji t test 2 sampel tidak berpasangan antara kelompok K0 dan K2

Tabel 5.9. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K0 dan K2

Kelompok Perlakuan	Mean	Mean Difference	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K0	4,92089	3,533444	0,000	Berbeda bermakna
K2	1,38744	3,533444	0,000	

Dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan bermakna rerata kadar malondealdehid antara kelompok mencit yang diberi perlakuan plasebo (K0) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 240 mg/kg BB (K2).

5.2.4.3. Uji t test 2 sampel tidak berpasangan antara kelompok K1 dan K2

Tabel 5.10. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K1 dan K2

Kelompok Perlakuan	Mean	Mean Difference	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K1	2,18889	0,801444	0,001	Berbeda bermakna
K2	1,38744	0,801444	0,001	

Dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan bermakna rerata kadar malondealdehid antara kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 100 mg/kg BB (K1) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 240 mg/kg BB (K2).

5.3. Analisis data ekspresi NF- κ B

Peneliti ingin membandingkan (komparasi) antar rerata ekspresi NF- κ B antar kelompok secara statistik analitik. Data ekspresi NF- κ B dapat dikategorikan sebagai

data numerik dan ketiga kelompok data merupakan kelompok data tidak berpasangan. Bila data mempunyai distribusi normal dan varian sama, maka analisis dapat menggunakan uji *one way ANOVA*. Bila data tidak berdistribusi normal atau mempunyai varian tidak sama maka menggunakan uji *Kruskal Wallis* seperti diatas. Bila dari uji statistik terbukti ada perbedaan bermakna paling tidak terhadap dua kelompok sampel, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*. Uji dan penghitungan yang dilakukan peneliti menggunakan program statistik komputer.

5.3.1. Uji normalitas distribusi data

Data kelompok K0, K1 dan K2 masing-masing diuji normalitas distribusi menggunakan uji Shapiro-Wilk karena besar sampel < 50 . Dikatakan distribusi data normal bila $p > 0,05$.

Tabel 5.11. Hasil uji normalitas distribusi data (Uji Shapiro-Wilk)

Kelompok Perlakuan	Mean \pm SD	p	Kesimpulan ($p > 0,05$ distribusi normal)
K0	2,1556 \pm 0,84722	0,070	Distribusi normal
K1	0,6444 \pm 0,37118	0,363	Distribusi normal
K2	1,1556 \pm 0,54569	0,748	Distribusi normal

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok (pada tabel) menunjukkan bahwa distribusi data ketiga kelompok adalah normal.

5.3.2. Uji homogenitas varians data

Data kelompok K0, K1 dan K2 diuji homogenitas varians menggunakan uji Levene's. Dikatakan distribusi data normal bila $p > 0,05$.

Tabel 5.12. Hasil uji homogenitas varians data (Uji Levene's)

Antar Kelompok Perlakuan	p	Kesimpulan (p>0,05 varians sama)
K0, K1, K2	0,167	Varians sama

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok menunjukkan angka $p=0,167$. Karena $p>0,05$ dapat ditarik kesimpulan bahwa varians data sama. Oleh karena itu, memenuhi syarat menggunakan uji *one way ANOVA*.

5.3.3. Uji *one way ANOVA*

Data kelompok K0, K1 dan K2 masing-masing diuji signifikansi dengan *one way ANOVA*. Dikatakan berbeda signifikan bila $p<0,05$.

Tabel 5.13. Hasil uji signifikansi dengan *one way ANOVA*

Kelompok Perlakuan	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K0	0,000	Berbeda bermakna
K1		
K2		

Hasil penghitungan p menggunakan program statistik komputer untuk masing-masing kelompok menunjukkan angka $p=0,000$. Karena $p<0,05$ dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan rerata ekspresi NF- κ B antara dua kelompok perlakuan secara bermakna.

Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan maka harus dilakukan analisis *Post Hoc*, yaitu uji beda nyata terkecil (BNT).

5.3.4. Uji beda nyata terkecil

Tabel 5.14. Hasil uji beda signifikansi antara kelompok K0 dan K1

Perbandingan Antara Kelompok Perlakuan	<i>Mean Difference</i>	p	Kesimpulan (p<0,05 berbeda bermakna)
K0 & K1	1,5111	0,000	Berbeda bermakna
K0 & K2	1,0000	0,002	Berbeda bermakna
K1 & K2	-0,5111	0.093	Tidak berbeda bermakna

Dapat ditarik kesimpulan terdapat perbedaan bermakna rerata ekspresi NF- κ B antara kelompok mencit yang diberi perlakuan plasebo (K0) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 100 mg/kg BB (K1), dan antara kelompok mencit yang diberi perlakuan plasebo (K0) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 240 mg/kg BB (K2). Sedangkan perbedaan antara kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 100 mg/kg BB (K1) dengan kelompok mencit yang diberi perlakuan curcumin 240 mg/kg BB (K2) tidak bermakna secara statistik.

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6**PEMBAHASAN**

Preeklampsia masih menjadi salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas ibu dan janin terkait dengan kehamilan dan persalinan. Preeklampsia dapat menimbulkan komplikasi pada ibu maupun janin yang dikandung. Penggunaan agen platelet dan antioksidan telah digunakan sebagai terapi selama ini. Dewasa ini literatur mengenai curcumin telah banyak berkembang. Banyak penelitian membuktikan bahwa curcumin diantaranya dapat bermanfaat sebagai anti inflamasi, antiplatelet, dan anti oksidan kuat (Aggarwal et al., 2007). Ekspresi NF- κ B dan kadar malondealdehid adalah dua diantara parameter stres oksidatif pada mencit model preeklampsia. Peneliti ingin mengetahui apakah pemberian curcumin dapat menurunkan ekspresi NF- κ B dan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia pada dua dosis yang berbeda.

Terdapat tiga kelompok mencit pada penelitian ini. Ketiganya dijadikan model disfungsi endotel dengan menghilangkan protein Qa-2, yaitu dengan cara diberi antibodi anti-Qa-2 (injeksi). Kelompok K0 tidak mendapat perlakuan curcumin, hanya aquades sebagai plasebo. Kelompok K1 mendapat perlakuan curcumin 100mg/kgBB yang terbukti dapat berfungsi sebagai anti inflamasi, sedangkan kelompok K2 mendapat perlakuan curcumin 240mg/kgBB (dosis lebih besar dimana pada penelitian sebelumnya terbukti juga menurunkan ekspresi VEGF (Ashon S et al, 2009).

6.1. Pemberian curcumin menurunkan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia

Peroksidasi lemak telah diketahui sebagai mekanisme utama kerusakan sel pada sebagian besar sistem biologi. Pada suasana oksidatif, lemak *polyunsaturated* sangat rentan teroksidasi yang kemudian membentuk lipid peroksida yang toksik bagi *host*. PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) peroksida kemudian bereaksi lebih lanjut dan membentuk malondealdehid (MDA). MDA dapat ditemukan pada serum, plasma, jaringan, dan urin, sebagai hasil dari peroksidasi lemak dan sebagai produk sampingan pada biosintesis prostaglandin. MDA termasuk kelompok aldehid reaktif dan merupakan salah satu dari spesies elektrofil reaktif yang dapat menyebabkan stres toksik dalam sel. Malondealdehid (MDA) dapat dipakai sebagai parameter stres oksidatif. Menurut literatur, peningkatan stress oksidatif dapat meningkatkan kadar malondealdehid. (Halliwell et al., 1987). Analisis kadar MDA merupakan analisis radikal bebas secara tidak langsung untuk menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk.

Kelompok kontrol dikondisikan sebagai model preeklampsia yang tidak mendapat terapi curcumin mempunyai kadar malondealdehid paling tinggi diantara ketiganya. Kelompok perlakuan 1 yang mendapat terapi curcumin 100 mg/kg BB mempunyai kadar malondealdehid lebih rendah dan kelompok perlakuan 2 yang mendapat terapi curcumin 240 kg/kgBB mempunyai kadar malondealdehid paling rendah. Ketiga kelompok tersebut berbeda signifikan secara statistik. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian curcumin menurunkan stress oksidatif yang terjadi pada mencit model preeklampsia.

6.2. Pemberian curcumin menurunkan ekspresi NF- κ B pada mencit model preeklampsia

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) adalah faktor transkripsi yang dapat menginduksi aktivasi gen peradangan (*inflammatory genes*), termasuk TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), molekul MHC kelas 1, reseptor IL-2, selektin E, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), prekursor serum amiloid A, dan angiotensin. Faktor transkripsi tersebut berikatan dengan daerah promotor dan enhancer gen target. Dalam inti, NF- κ B yang dapat berikatan dengan DNA berbentuk heterodimer yang terdiri dari subunit Rel-A dengan berat molekul 65 kDa, yang dahulu disebut p65 dan subunit p50 dengan berat molekul 50 kDa. Tetapi, masing-masing subunit dapat membentuk homodimer yang juga dapat berikatan dengan DNA (Marok et al, 1996; Chen et al 1999).

Pada sel yang tidak dirangsang, NF- κ B terdapat dalam bentuk inaktif di dalam sitoplasma, membentuk kompleks dengan inhibitor I κ B. Berbagai macam rangsangan seperti mitogen, sitokin pro-inflamatori, radiasi ionisasi, sinar ultraviolet, protein virus, LPS bakteri dan ROS dapat menyebabkan fosforolasi dari I κ B sehingga mengaktifkan NF- κ B (Venugopal, 2006). Beberapa sitokin yang ekspresi gen mereka diaktifkan oleh NF- κ B, seperti TNF- α dan IL-2, juga merupakan aktivator NF- κ B, sehingga memberikan suatu potensi untuk siklus *positive feedback* dalam respon peradangan. Terdapat banyak bukti yang menyatakan bahwa senyawa oksigen reaktif, terutama H₂O₂ bertindak sebagai messenger dalam jalur aktivasi NF- κ B. Sel yang diberi antioksidan atau mengekspresi secara berlebihan enzim katalase, glutathion peroksidase, atau thioredoksin, menghambat aktivasi NF- κ B yang

dirangsang oleh berbagai macam stimuli. Pemberian H₂O₂ pada kultur beberapa jenis sel mengaktifkan NF- κ B (Marok et al, 1996; Schmidt et al, 1996; Kim et al, 2000; Snapper et al, 1996).

Kelompok kontrol dikondisikan sebagai model preeklampsia yang tidak mendapat terapi curcumin mempunyai skor ekspresi NF- κ B paling tinggi diantara ketiganya. Kelompok perlakuan 1 yang mendapat terapi curcumin 100 mg/kg BB mempunyai skor ekspresi NF- κ B lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (berbeda signifikan secara statistik). Kelompok perlakuan 2 yang mendapat terapi curcumin 240 mg/kgBB mempunyai skor ekspresi NF- κ B lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (berbeda signifikan secara statistik), namun lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan 1 (tidak berbeda signifikan secara statistik). Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian curcumin menurunkan stress oksidatif yang terjadi pada mencit model preeklampsia, namun pemberian curcumin pada dosis lebih tinggi (240 mg/kgBB) justru menurunkan kemampuan curcumin untuk menurunkan stress oksidatif (ditunjukkan dengan ekspresi NF- κ B yang kembali meningkat).

Jurnal baru yang diterbitkan tahun 2009 mengulas bahwa curcumin justru berfungsi sebagai prooksidan pada dosis tinggi (Banarjee et al., 2009). Diduga bahwa curcumin bereaksi dengan radikal bebas membentuk *phenoxy-radical* yang lebih tidak reaktif. Ekspresi NF- κ B yang kembali meningkat pada dosis tinggi kemungkinan berasal dari akumulasi sisa *phenoxy-radical* yang berlebihan sehingga bertindak sebagai prooksidan yang kemudian dapat mengaktifasi NF- κ B.

Mungkin kemudian akan timbul pertanyaan mengapa kadar malondelhid tidak meningkat pada pemberian curcumin dosis tinggi dibandingkan pemberian curcumin dosis rendah. Hal ini dimungkinkan karena malondealdehyd adalah parameter stres oksidatif yang diperiksa dari serum yaitu merupakan pemeriksaan pada tingkat sistemik. Sedangkan ekspresi NF- κ B merupakan pemeriksaan pada tingkat molekuler. Pada tubuh hewan coba, tingkat molekuler lebih sensitif terhadap perubahan. Perubahan yang terjadi dapat mempengaruhi tingkat molekuler kemudian tingkat seluler. Bila perubahan tersebut mempengaruhi tingkat seluler dalam jumlah besar, dapat mempengaruhi tingkat organ untuk kemudian dapat mempengaruhi tingkat sistemik.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1. Kesimpulan**

1. Curcumin dosis 100 mg/kg BB menyebabkan penurunan jumlah ekspresi NFkB pada mencit model preeklampsia.
2. Curcumin dosis 240 mg/kg BB menyebabkan penurunan jumlah ekspresi NFkB pada mencit model preeklampsia.
3. Curcumin dosis 100 mg/kg BB menyebabkan penurunan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia.
4. Curcumin dosis 240 mg/kg BB menyebabkan penurunan kadar malondealdehid pada mencit model preeklampsia.
5. Penurunan kadar malondealdehid lebih besar pada kelompok yang diberikan Curcumin dosis 240 mg/kg BB dibandingkan dengan yang diberi Curcumin dosis 100 mg/kg BB.
6. Penurunan jumlah ekspresi NFkB lebih besar pada kelompok yang diberikan Curcumin dosis 100 mg/kg BB dibandingkan dengan yang diberi Curcumin dosis 240 mg / kg BB.
7. Pada dosis 240 mg/kg BB curcumin dapat menjadi pro-oksidan yang menurunkan kemampuan curcumin sebagai anti-oksidan.

7.2. Saran

1. Perlu diadakan penelitian lanjutan kadar curcumin yang dapat berfungsi optimal sebagai anti-oksidan tanpa menunjukkan efek pro-oksidan.

2. Untuk menunjang hasil penelitian ini, hendaknya dilakukan penelitian terhadap efek samping pemberian curcumin terhadap hasil konsepsi mencit.
3. Dapat dilakukan penelitian lanjutan dimana bahan aktif didapat dengan menggunakan simplisia dari *C. Longa*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, 2003. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Phyladelphia: WB Saunders Company, 235-381
- Aggarwal BB et al. The mollecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, Springer Science, 2007
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the indian solid gold, Springer Science, 2007; 1-76.
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, Curcumin: the indian solid gold. Springer,595: 1-13, 2006.
- Armenia, Yuliandra dan Rusdi, Daun Tanaman Akar Mambu(*connarus grandis* jack.) Sebagai Obat Hipertensi:Efektivitas Ekstrak Etanolnya pada Tikus Hipertensi 2k1c Goldblatt. Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 12, No. 2, 2007.
- Banerjee S, Smallwood A, Moorhead J, Chambers AE, Papageorghiou A, Campbell S, And Nicholaides K, 2005. Placental Expression of Interferon- γ (IFN- γ) And It's Receptors IFN- γ R2 Fail To Switch From Early Hypoxic To Late Normotensive Development In Preeclampsia. J Clin Endokrinol Metab, 90:944-52.
- Banerjee, M. and Cruickshank, J. K. Pregnancy as the prodrome to vascular dysfunction and cardiovascular risk. Nat Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine 2006
- Bhatt DL. Aspirin resistance: more than just a laboratory curiosity. J Am Coll Cardiol, 2004; 43:1127-1129
- Brien MO, Dausset J, Carosella ED, Mureau P, 2000. Analysis of the Role of HLA-G in Preeclampsia. Human Immunology, 61:1126-1131.
- Chaiworapongsa T, Gervasi MT, Refuerzo J, Espinoza J, Yoshimatsu J, Berman S, Romero R, 2002. Maternal Lymphocyte Sub Populations (CD45RA+ And CD45RO+) In Preeclampsia. Am J Obstetry Gynecol, 187:889-93.

- Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *Jama*. 2001;285:1607–1612.
- Chumbley G , King A , Robertson K , King Ashley Holmes N , Loke Y W. Resistance of HLA-G and HLA-A2 Transfectants to Lysis by Decidual NK Cells .(1994) *Cell Immunol* 155:312–322, pmid:8181068
- Colbern GT, Chiang MH, Main EK. Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1994 May;170(5 Pt 1):1244–1250.
- Comiskey, M., Goldstein, C.Y., Evidence that HLA-G is functional homolog of mouse QA-2, the ped gene product. National Institutes Of Health, 2003.
- Craven CM, Zhao L, Ward K. Lateral placental growth occurs by trophoblast cell invasion of decidual veins. *Placenta* 2000 21:160-169
- Craven CM, Zhao L. Lateral placental growth occurs by trophoblast cell invasion of decidual veins. *Placenta* 2000; 21 : 160
- Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog Horm Res* 2002 , 57:221-234.
- Cunningham FG, Gant Norman, Leveno KJ, Gilstrap, William's Obstetrics, 22th ed, 2005, 567-618
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janat Pour M, Zou Y, Logand SK, And Fisher SJ, 1994. Integrin Swithing Regulates Normal Trophoblast Invation. *Development*, 120:3657-66.
- Davies CJ. Why is fetal allograft not rejected? *J. Anim Sci*. 2007. 85:E32-E35. doi:10.2527/jas.2006-492.
- Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM et al. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2002: 39: 337–342.
- Derry Sheena. And Loke. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *BMJ* 2000; 321 : 1183 doi:10.1136/bmj.321.7270.1183

- Duley L, Henderson-Smart DJ, Knight M, et al. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. In: The Cochrane Library, Issue 2, 2007. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Search date 2006.
- Elizabeth S. Taglauer², Ann S. Trikhacheva³, Joyce G. Slusser⁴, Margaret G. Petroff. Expression and Function of PDCD1 at the Human Maternal-Fetal Interface¹. BOR Papers in Press. Published on June 11, 2008 as DOI:10.1095
- Erez, O., Romero, R., Over-expression of the thrombin receptor (PAR-1) in the placenta in preeclampsia: a mechanism for the intersection of coagulation and inflammation. National Institutes Of Health, 2008.
- Faas MM, Moes H, de Vos P. Monocyte cytokine production during pregnancy. *J. Leukoc. Biol.* 2004 75: 153-154
- Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Bakker WW. Glomerular inflammation in pregnant rats after infusion of low dose endotoxin. An immunohistological study in experimental pre-eclampsia. *Am J Pathol* 1995
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ, 1997. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. *Science*, 277(5332):1669-1677.
- Gibson P, Carson M. Hypertension and pregnancy, *Medicine Ob/Gyn, Psychiatry and surgery*, 2006.
- Gonzalez, A.M., Orlando, R.A., Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *BioMed central*, 2008.
- Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bannett WA, Khalil RA, 2001. Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischaemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension*, 38:718-30.
- Gruslin A, Qiu Q and Tsang BK (2001) X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. Biol Reprod 64,1264-1272.*
- Gruslin A, Qiu Q and Tsang BK, 2001. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Expression and the Regulation of Apoptosis During Human Placental Development. *Biology of Reproduction*, 64:1264-1272.

- Hamai Y, Fuii T, Yamashita T, Nishina H, Kozuma S, Mikami Y, Taketani Y. Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor- α levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38:89–9
- Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y: Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 1996;36:349–358
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabitta, S.P., Salsman, S. And Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 28. 1456-62.
- Hubel CA. Dyslipidemia, iron, and oxidative stress in preeclampsia: assessment of maternal and fetoplacental interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 1998
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-40.
- Jang, M.K., Lee, H.J., A curcuminoid and two sesquiterpenoids from curcuma zedoaria as inhibitors of nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Arch Pharm Res* Vol 27, No.12, 1220-1225, 2004.
- Jobin, C., Holt, L., Bradham, C. A., Streetz, K., Brenner, D. A., Sartor, R. B. (1999). TNF Receptor-Associated Factor-2 Is Involved in Both IL-1 β and TNF- α Signaling Cascades Leading to NF- κ B Activation and IL-8 Expression in Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* 162
- K. H. Lim, Y. Zhou, M. Janatpour, M. McMaster, K. Bass, S. H. Chun, and S. J. Fisher. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in preeclampsia. *m J Pathol.* 1997 December; 151(6): 1809–1818.
- Klein J And Sato A, 2000. The HLA System-Second of Two Parts. *The New England Journal of Medicine*, 343(11):782-786.

- Krauss T, Kuhn W, Lakoma C, Circulating endothelial cell adhesion molecules as diagnostic markers for the early identification of pregnant women at risk for development of preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 1997; 177 : 443-9
- Kudo Y, Boyd CAR, Sargent IL, Redman CWG, 2003. Decreased Triptophan Catabolism by Placental Indoleamin 2,3-dioxygenase In Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 188:719-26
- Laivuori H, Genetic aspects of preeclampsia. *Frontiers in Bioscience* 12, 2372-2382, January 1, 2007.
- Lee, H.S., Antiplatelet property of *Curcuma Loga L.* rhizome-derived ar-turmerone. *CAT INIST* 97: 2006.
- Lee, M., et al, The role of Qa-2, the functional homolog of HLA-G, in a Behcet's disease-like mouse model induced by the Herpes Virus Simplex. *Journal of Inflammation* 2010,7:31.
- Leela, N.K., Shafi, P.M, Chemical composition of essential oils of turmeric (*Curcuma longa L.*). *Acta pharm.* 52(2002) 137 - 141.
- Loke YW and King A, 1995. *Human Implantation: Cell biology and immunology.* Cambrige: Cambrige University Press, 32-101.
- Lyall F, Belfort M. *Pre-eclampsia Etiology and clinical practice.* Cambridge University Press, 2007.
- Martina Comiskey, Carol M. Warner and Danny J Schust, MHC Molecules of the Preimplantation Embryo and Throphoblast; *Immunology of Pregnancy* 2006; 130-147
- Maternal mortality in 2005: estimates developed by WHO, UNICEF, UNFPA and the World Bank. Geneva, World Health Organization, 2007 (http://www.who.int/reproductive-health/publications/maternal_mortality_2005/index.html, accessed 14 August 2008).
- McMaster MT, Librach CL. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 1995; 154 : 3771
- Menon, V.P., Sudheer, A.R., The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Springer*, 595: 105-126, 2006.

- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J. W., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation.. *Science* 278
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, 1998. Prevention of Allogenic Fetal Rejection By Tryptophan Catabolism. *Science*, 281(5380):1191-1193.
- Murray, Robert K.; Granner, Daryl K.; Mayes, Peter A. Rodwell, Victor, W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry (26th Edition)*.. McGraw-Hill.
- Mutter, W., Karumanchi, S.A., Molecular mechanism of preeclampsia. National Institutes Of Health, 2006
- Mutter, W., Karumanchi, S.A., Molecular mechanism of preeclampsia. National Institutes Of Health, 2006
- Nair, C. L. O'Neil, P. G. Wang "Malondialdehyde" *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, 2008, John Wiley & Sons, New York. Article Online Posting Date: March 14, 2008
- Nien, J.K., Mazaki-Tovi, S., Adiponectin in severe preeclampsia. National Institutes Of Health, 2007.
- Norwitz ER, Schust DJ, and Fisher SJ, 2001. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345: 1400-1408.
- Norwitz ER, Wilson T, Secretary component : a potential regulator of endometrial-decidual prostaglandin production in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183 : 108-17
- Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta*. 2004;25 A:S72-78.
- Redman CW And Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science* 2000; Vol. 308. no. 5728.
- Robbins and Cotran pathologic basis of disease.—7th ed./[edited by] Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. International Edition ISBN 0-8089-2302-1. 2005, Elsevier Inc

- Roberts, J. M. (1998) Pregnancy related hypertension. In: *Maternal Fetal Medicine*, (Creasy, R.K. & Resnik, R., eds.), pp. 883–872. 4th Edition. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Roeshadi RH. Hipertensi dalam Kehamilan. Dalam Hariadi R. Ilmu kedokteran fetomaternal Surabaya; Himpunan Kedokteran fetomaternal POGI, 2004
- Roeshadi RH. Hipertensi dalam Kehamilan. Dalam Hariadi R. Ilmu kedokteran fetomaternal Surabaya; Himpunan Kedokteran fetomaternal POGI, 2004; p494-8
- Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001 , 2:538-548.
- Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P.S., Comparative effects and an analog of curcumin on alcohol and PUVA induced oxidative stress. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 7(2):274-283, 2004.
- S. V. Jovanovic, S. Steenken, C. W. Boone, and M. G. Simic, H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc* 121, 9677–9681 (1999).
- Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal BB. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005;
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461).
- Sitotrofoblas vilus yang dikultur dari kehamilan normal bersifat upregulasi pada HLA-G, sedangkan sitotrofoblas yang dikultur dari kehamilan penderita preeklampsia bersifat tidak mengekspresi HLA-G (Lim et al., 1997).
- Soerjohudojo. *Kuliah Biologi Molekuler: Reactive Oxygen Species*. 2008
- Soerjohudojo. *Kuliah Biologi Molekuler: Reactive Oxygen Species*. 2007

- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, et al. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 2004.
- Wang, Y. and S.W. Walsh, 1996. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 3: 179-184.
- Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC And Brown KA, 1996. IL-6 Acts On Endothelial Cells to Preverentially Increase Their Adherence for Lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 105:112-19
- WHO monograph on selected medicinal plants vol.1. WHO Geneva. (1): 115-124, 1999.
- Wibowo N. Patogenesis Preeklampsia. Prosiding Seminar Konsep Mutakhir Preeklampsia; Jakarta, Indonesia,2001.
- Wickens, D., Wilkins, M.H. and Lunec,J. et al. (1981). Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.*, 18: 158 – 162.
- Wickens, D., Wilkins, M.H., Lunec, J., Ball, G. And Dormandy, T.L. (1981). Free radical oxidation (Peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.* 18,158-162
- Wochenschr, Preeclampsia theories and speculations; *The Mid Euro J of Med*, Marz 2003
- Wochenschr, Preeclampsia theories and speculations; *The Mid Euro J of Med*, Marz 2003; 115/5-6: 145-8
- Yie S, Li L, Li Y, And Librach C, 2004. HLA-G Protein Concentration in Maternal Serum in Placental Tissue Are Decreased in Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 191(2):974-83
- Zhou Y, Damsky CH And Fisher SJ, 1997. Preeclampsia is Assosiated With Failure of Human Cytotrophoblast to Mimic Avascular Adhesions Phenotype. *J Clin Invest*, 99(9):2152-2164

LAMPIRAN

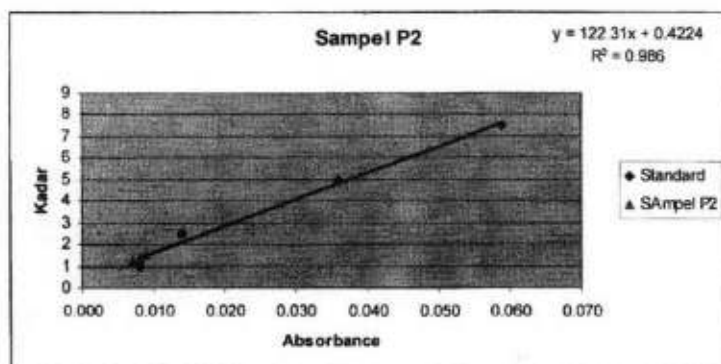
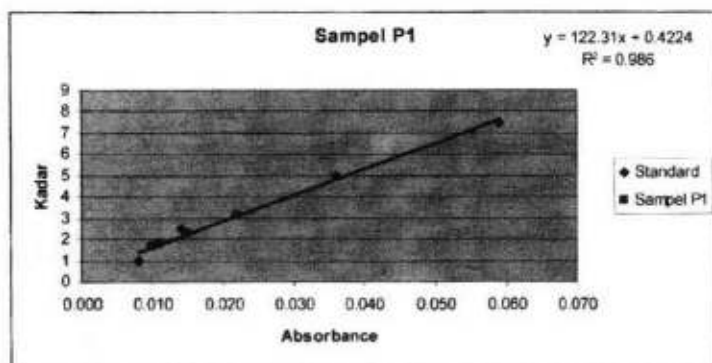
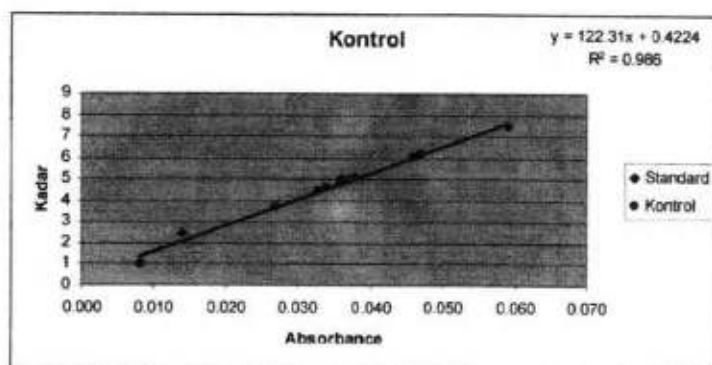
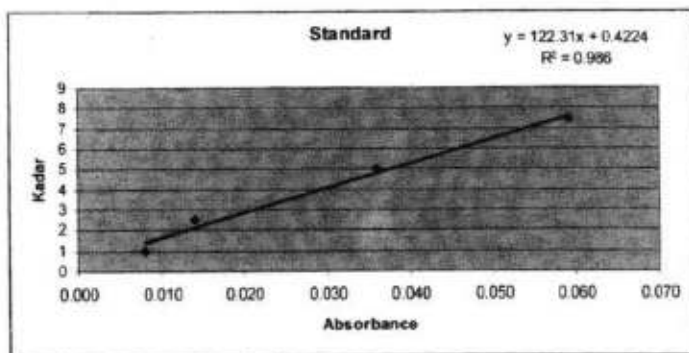
Lampiran 1**Lembar Tabel Perlakuan**

Kelompok Mencit	Anti Qa-2	Plasebo	Curcumin 100 mg	Curcumin 240 mg
KO (kontrol)	+	+	-	-
K1 (perlakuan 1)	+	-	+	-
K2 (perlakuan 2)	+	-	-	+

Lampiran 2**Data Hasil Penelitian****2.1. Tabel Hasil Malondealdehid**

Nomor Mencit	Absorban Malondealdehid			Kadar Malondealdehid		
	K0	K1	K2	K0	K1	K2
1	0.027	0.015	0.007	3.725	2.257	1.279
2	0.046	0.011	0.008	6.049	1.768	1.401
3	0.034	0.015	0.007	4.581	2.257	1.279
4	0.038	0.022	0.009	5.070	3.113	1.523
5	0.036	0.010	0.008	4.826	1.646	1.401
6	0.047	0.012	0.009	6.171	1.890	1.523
7	0.033	0.016	0.007	4.459	2.379	1.279
8	0.037	0.011	0.008	4.948	1.767	1.401
9	0.033	0.018	0.008	4.459	2.623	1.401

2.2. Kurva Absorbansi Malondealdehid



2.3. Ekspresi NF- κ B

No.	K0			K1			K2		
	Skor sel imunoreaktif	X	I	Skor sel imunoreaktif	X	I	Skor sel imunoreaktif	X	I
1	3.2.1.3.1.	2,0	+	0.0.0.1.1.	0,4	-	2.1.1.0.1.	1	-
2	1.1.1.2.1	1,2	-	1.1.0.1.2.	1	-	1.2.2.2.1.	1,6	-
3	1.1.0.0.0.	0,4	-	1.1.0.2.2.	1,2	-	0.1.1.2.0.	0,8	-
4	3.3.3.3.3.	3	+	1.1.0.0.0.	0,4	-	1.0.2.0.0.	0,6	-
5	2.3.2.3.3.	2,6	+	0.0.0.1.0.	0,2	-	2.3.3.1.1.	2	+
6	1.3.3.3.3.	2,6	+	2.2.0.0.1.	1	-	1.0.1.0.0.	0,4	-
7	3.2.2.3.3.	2,6	+	0.1.1.0.1.	0,6	-	2.2.0.1.1.	1,2	-
8	2.3.3.3.3.	2,8	+	1.0.0.2.1.	0,8		1.2.2.0.0.	1	-
9	3.2.1.2.2.	2	+	0.0.0.1.0.	0,2	-	3.2.2.1.1.	1,8	-
X	2,155		+	0,644		-	1,155		-

Keterangan: * dilihat pada 5 lapangan pandang untuk tiap ekor sampel mencit.

X = rerata skor sel imunoreaktif pada 5 lapangan pandang.

I = interpretasi ekspresi NF- κ B.

Lampiran 3

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1.5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	2,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1.5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Tabel 8.1. Konversi Perhitungan Dosis untuk Beberapa Jenis Hewan dan manusia (Ghosh, 1971)

Lampiran 4

2.4. Pengolahan data (menggunakan SPSS)

EXAMINE VARIABLES=MDA BY Perilaku /PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT /COMPARE GROUP /STATISTICS DESCRIPTIVES /CINTERVAL 95 /MISSING LISTWISE /NOTOTAL.

Explore

Output Created		13-Aug-2010 21:03:55
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values for dependent variables are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any dependent variable or factor used.
Syntax		EXAMINE VARIABLES=MDA BY Perilaku /PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT /COMPARE GROUP /STATISTICS DESCRIPTIVES /CINTERVAL 95 /MISSING LISTWISE /NOTOTAL.
Resources	Processor Time	0:00:01.591
	Elapsed Time	0:00:01.920

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Perilaku pada sampel

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
Perilaku pada sampel		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar Malondealdehid	Plasebo	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Curcumin 100 mg/kg BB	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Curcumin 240 mg/kg BB	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

Descriptives

Perlakuan pada sampel			Statistic	Std. Error	
Kadar Malondealdehid	Plasebo	Mean	4,92089	,259286	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		4,32302
			Upper Bound		5,51876
		5% Trimmed Mean	4,91788		
		Median	4,82600		
		Variance	,805		
		Std. Deviation	,777797		
		Minimum	3,725		
		Maximum	5,171		
		Range	2,446		
		Interquartile Range	1,101		
		Skewness	,494		,717
		Kurtosis	-,025		1,400
		Curcumin 100 mg/kg BB			Mean
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			1,82155	
	Upper Bound			2,55623	
5% Trimmed Mean	2,16771				
Median	2,25700				
Variance	,226				
Std. Deviation	,477893				
Minimum	1,646				
Maximum	3,113				
Range	1,467				
Interquartile Range	,734				
Skewness	,798			,717	
Kurtosis	,174			1,400	
Curcumin 240 mg/kg BB				Mean	1,38744
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,31414	
			Upper Bound	1,46075	
		5% Trimmed Mean	1,38594		
		Median	1,40100		
		Variance	,009		
		Std. Deviation	,095372		
		Minimum	1,279		
		Maximum	1,523		
		Range	,244		
		Interquartile Range	,183		
		Skewness	,216	,717	
		Kurtosis	-1,041	1,400	

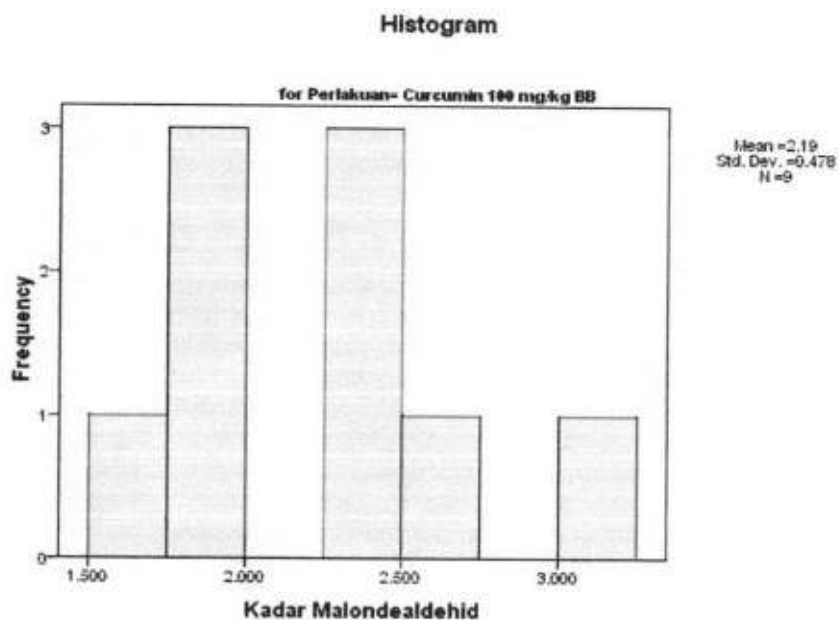
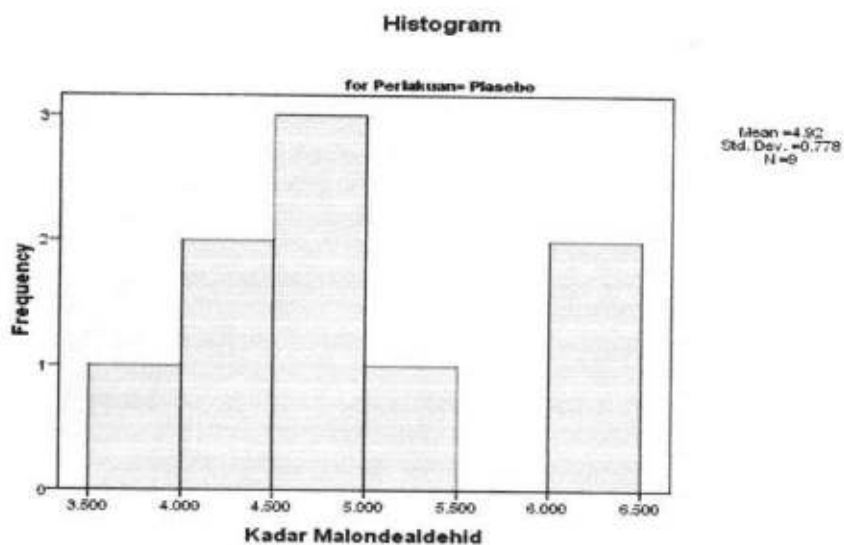
Tests of Normality

Perlakuan pada sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar Malondealdehid						
Plasebo	,202	9	,200 [*]	,921	9	,402
Curcumin 100 mg/kg BB	,179	9	,200 [*]	,921	9	,400
Curcumin 240 mg/kg BB	,223	9	,200 [*]	,838	9	,055

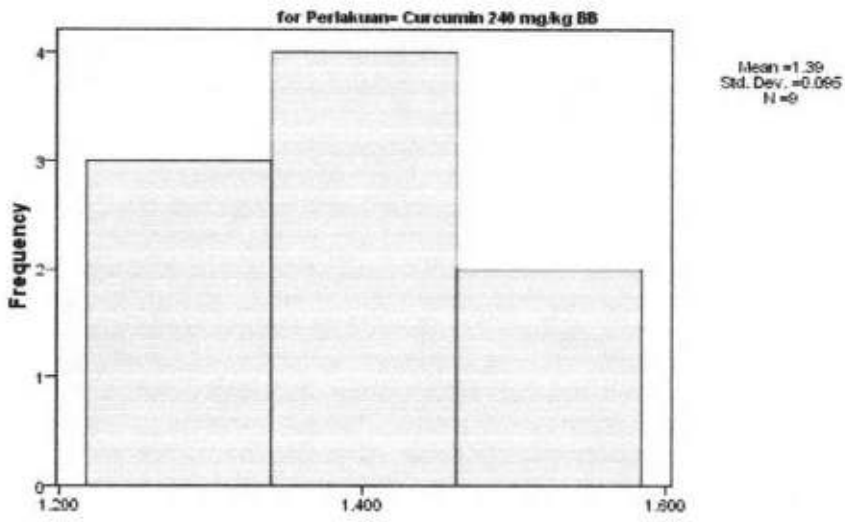
a. Lilliefors Significance Correction

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

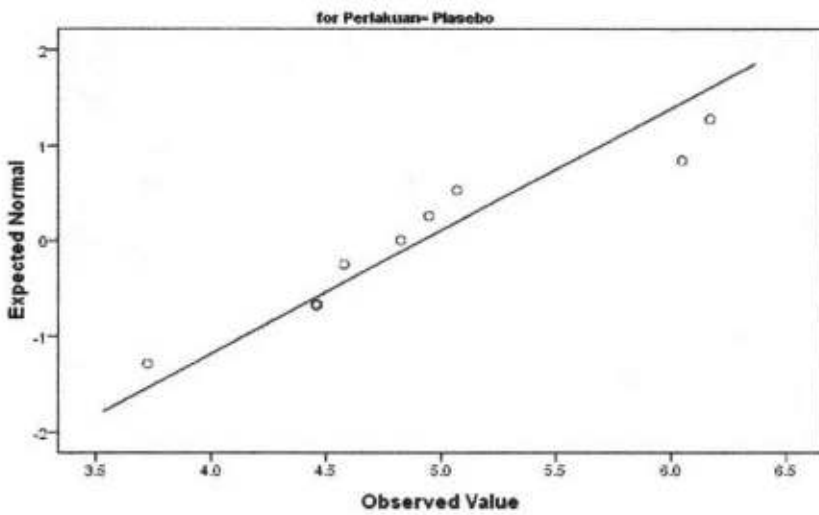
**Kadar Malondealdehid
Histograms**



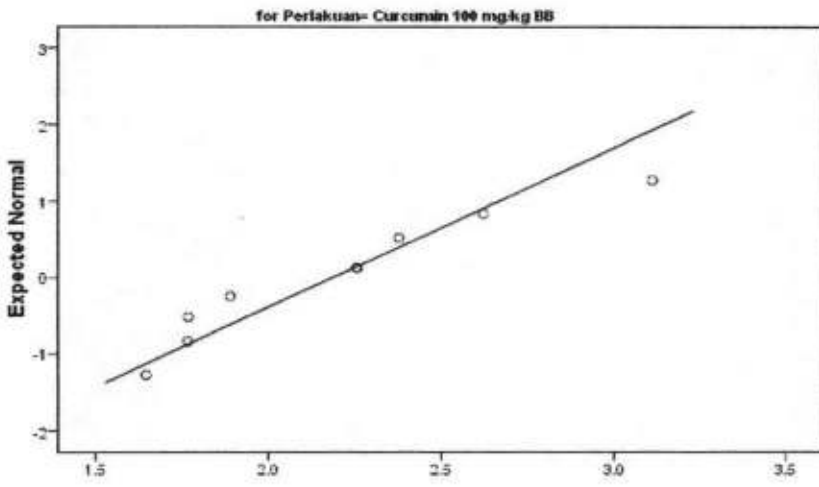
Histogram



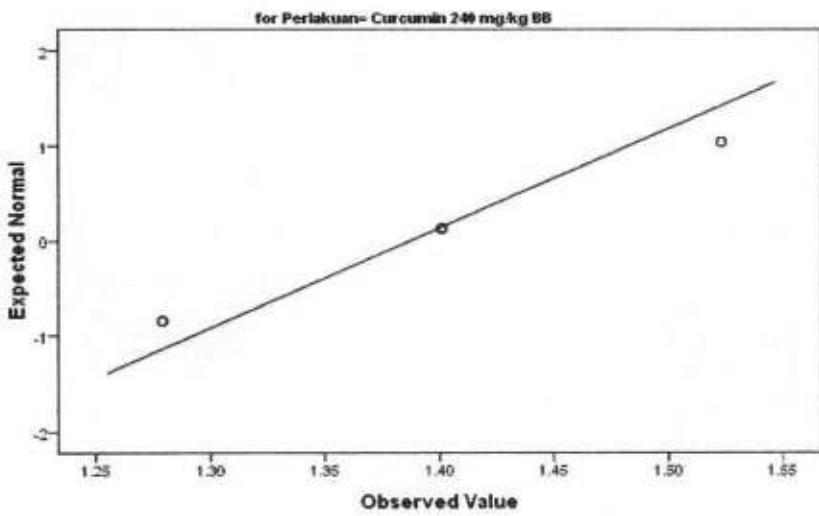
Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid



Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid

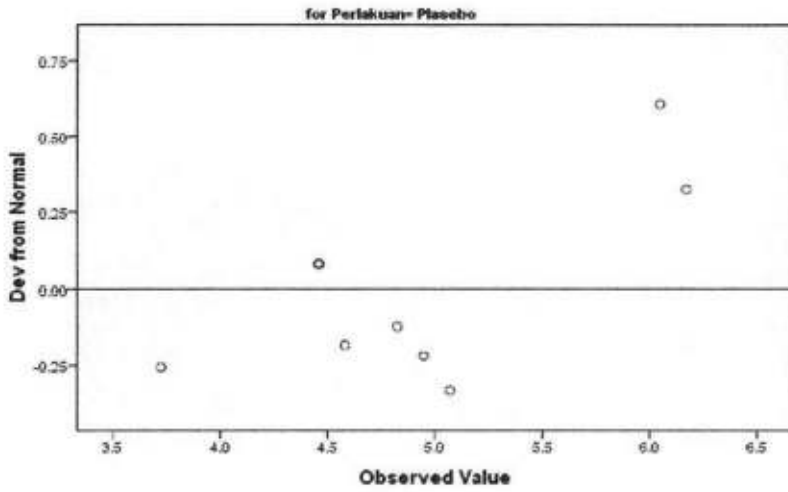


Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid

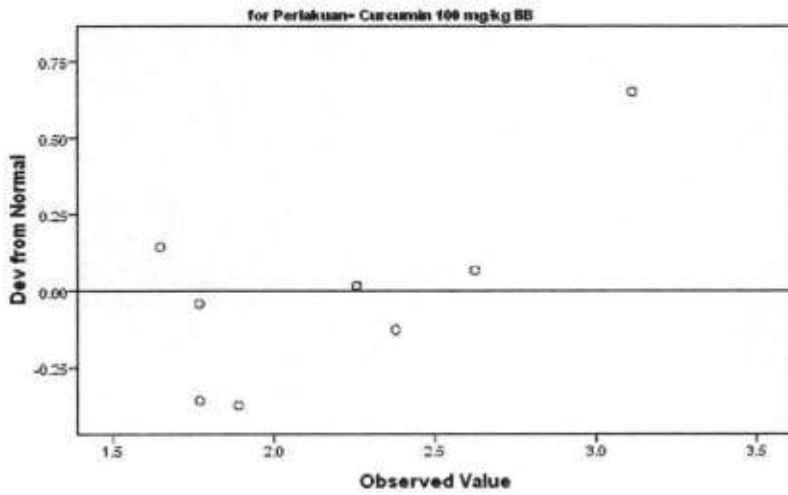


Detrended Normal Q-Q Plots

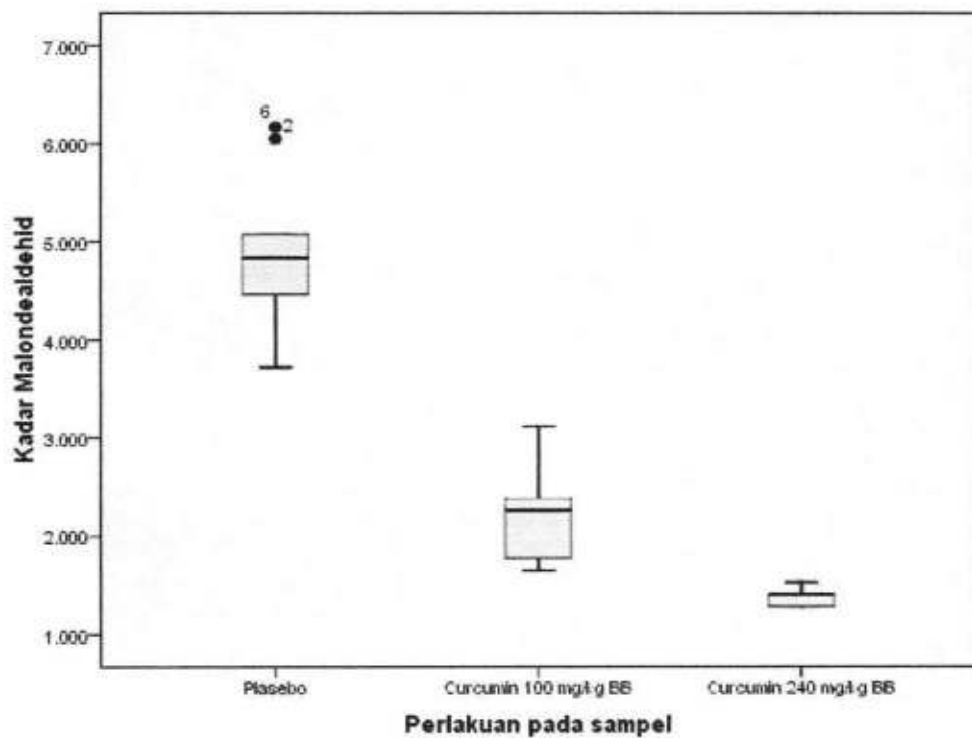
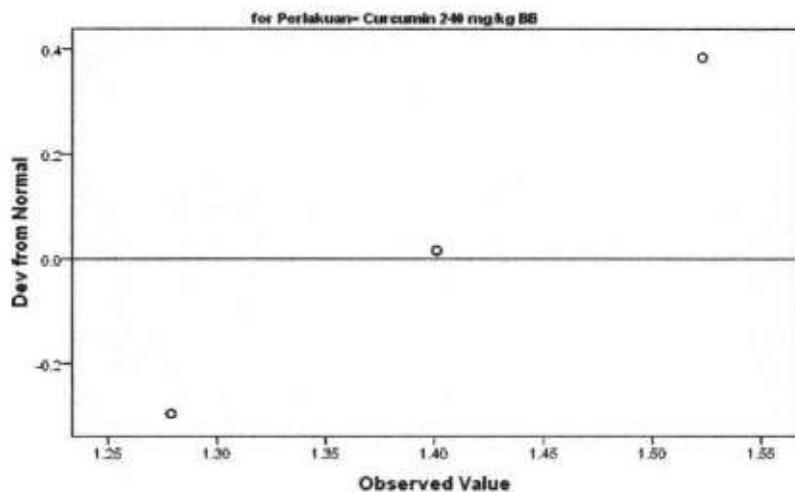
Detrended Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid



Detrended Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid



Detrended Normal Q-Q Plot of Kadar Malondealdehid



Oneway

Notes

Output Created	13-Aug-2010 21:15:58	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY MDA BY Perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	0:00:00.015
	Elapsed Time	0:00:00.010

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Test of Homogeneity of Variances

Kadar Malondealdehid

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,319	2	24	,012

ANOVA

Kadar Malondealdehid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61,774	2	30,887	109,991	,000
Within Groups	6,740	24	,281		
Total	68,514	26			

NPAR TESTS /K-W=MDA BY Perlakuan(1 3) /MISSING ANALYSIS.

NPar Tests

Notes

Output Created	13-Aug-2010 21:18:57	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS /K-W=MDA BY Perlakuan(1 3) /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000
	Number of Cases Allowed ^a	112347

a. Based on availability of workspace memory.

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Perlakuan pada sampel	N	Mean Rank
Kadar Malondealdehid Placebo	9	23,00
Curcumin 100 mg/kg BB	9	14,00
Curcumin 240 mg/kg BB	9	5,00
Total	27	

Test Statistics^{a,b}

	Kadar Malondealdehid
Chi-Square	23,264
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan pada sampel

T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 2) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).

T-Test

Notes

Output Created	13-Aug-2010 21:22:00	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 2) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Group Statistics

Perlakuan pada sampel		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Kadar Malondealdehid	Plasebo	9	4,92089	,777797	,256266
	Curcumin 100 mg/kg BB	9	2,18689	,477893	,156298

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Kadar Malondealdehid	Equal variances assumed	1,074	,315	8,978	16	,000	2,732000	,304293	2,069927	3,377073
	Equal variances not assumed			8,978	13,287	,000	2,732000	,304293	2,076054	3,387946

T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).

T-Test

Notes

Output Created	13-Aug-2010 21:22:37	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Group Statistics

Perlakuan pada sampel		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Kadar Malondealdehid	Plasebo	9	4,92089	,777797	,256266
	Curcumin 240 mg/kg BB	9	1,38744	,095372	,031791

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								Interval of the Difference		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Kadar Malondealdehid	Equal variances assumed	8,989	,009	13,527	16	,000	3,533444	,261207	2,979710	4,087179
	Equal variances not assumed			13,527	8,241	,000	3,533444	,261207	2,934146	4,132743

T-TEST GROUPS=Perlakuan(2 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).

T-Test

Notes

Output Created	13-Aug-2010 21:22:59	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS=Perlakuan(2 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=MDA /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT.sav

Group Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Perlakuan pada sampel				
Kadar Malondealdehid	9	2,18889	,477893	,159298
Curcumin 100 mg/kg BB				
Curcumin 240 mg/kg BB	9	1,36744	,095372	,031791

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								Interval of the Difference		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Kadar Malondealdehid	Equal variances assumed	11,104	,004	4,934	16	,000	,801444	,162439	,457089	1,145800
	Equal variances not assumed			4,934	8,636	,001	,801444	,162439	,431609	1,171280

SAVE OUTFILE='D:\Data Dina\THESIS\DATA MENCIT FIX.sav' /COMPRESSED.

EXAMINE VARIABLES=NFkB BY Perlakuan /PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT /COMPARE GROUP /STATISTICS DESCRIPTIVES /INTERVAL 95 /MISSING LISTWISE /NOTOTAL.

Explore

Notes

Output Created	19-Aug-2010 21:06:23	
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\data mencit ku.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values for dependent variables are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any dependent variable or factor used.

Syntax	EXAMINE VARIABLES=NFKB BY Perlakuan /PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT /COMPARE GROUP /STATISTICS DESCRIPTIVES /INTERVAL 95 /MISSING LISTWISE /NOTOTAL	
Resources	Processor Time	0:00:01.529
	Elapsed Time	0:00:01.540

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\data mencit_ku.sav

Perlakuan pada sampel

Perlakuan pada sampel		Case Processing Summary					
		Cases				Total	
		Valid		Missing		N	Percent
Ekspresi NFkB	Plasebo	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
Plasenta	Curcumin 100 mg/kg BB	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Curcumin 240 mg/kg BB	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

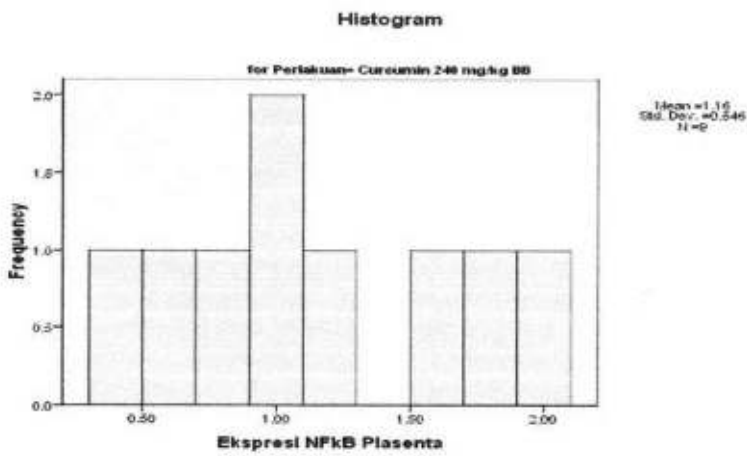
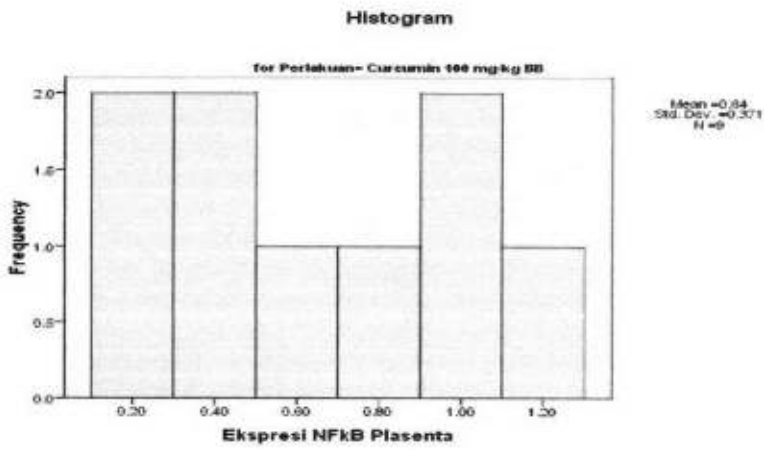
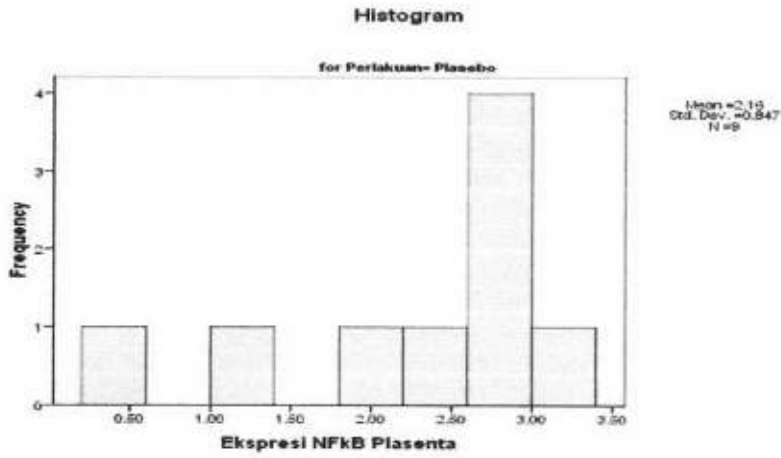
Perlakuan pada sampel		Statistic		Std. Error		
Ekspresi NFkB Plasenta	Plasebo	Mean	2,1556		,26241	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,5043		
			Upper Bound	2,8068		
		5% Trimmed Mean	2,2062			
		Median	2,6000			
		Variance	,718			
		Std. Deviation	,84722			
		Minimum	,40			
		Maximum	3,00			
		Range	2,60			
		Interquartile Range	1,10			
		Skewness	-1,362		,717	
		Kurtosis	1,216		1,400	
		Curcumin 100 mg/kg BB	Curcumin 100 mg/kg BB	Mean	,6444	
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			,3591		
	Upper Bound			,9298		
5% Trimmed Mean	,6383					
Median	,6000					
Variance	,138					
Std. Deviation	,37118					
Minimum	,20					
Maximum	1,20					
Range	1,00					
Interquartile Range	,70					
Skewness	,189				,717	
Kurtosis	-1,566				1,400	
Curcumin 240 mg/kg BB	Curcumin 240 mg/kg BB			Mean	1,1556	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,7361		
			Upper Bound	1,5750		
		5% Trimmed Mean	1,1508			
		Median	1,0000			
		Variance	,298			
		Std. Deviation	,54569			
		Minimum	,40			
		Maximum	2,00			
		Range	1,60			
		Interquartile Range	1,00			
		Skewness	,299		,717	
		Kurtosis	-1,072		1,400	

Perlakuan pada sampel		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi NFkB	Plasebo	,256	9	,093	,848	9	,070
Plasenta	Curcumin 100 mg/kg BB	,189	9	,200	,916	9	,363
	Curcumin 240 mg/kg BB	,168	9	,200	,955	9	,748

a. Lilliefors Significance Correction
*. This is a lower bound of the true significance.

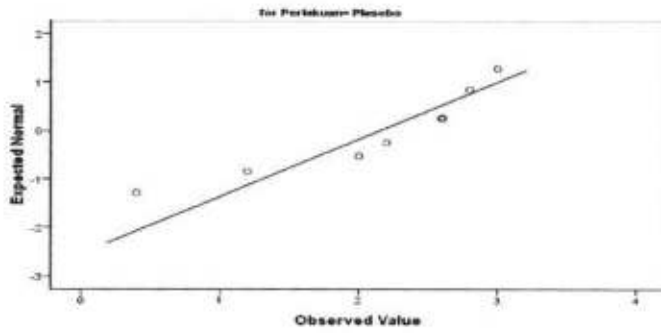
Ekspresi NFkB Plasenta

Histograms

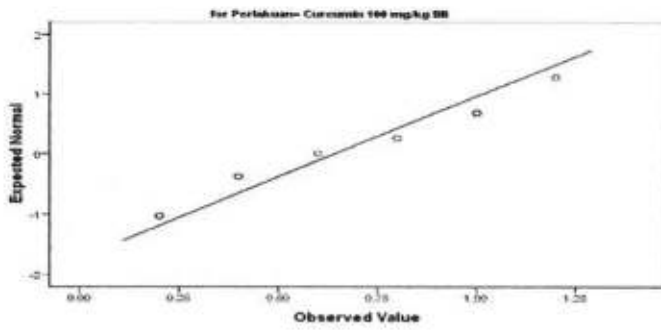


Normal Q-Q Plots

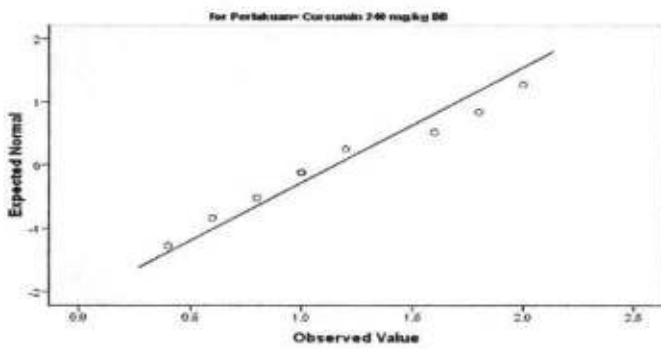
Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta



Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta

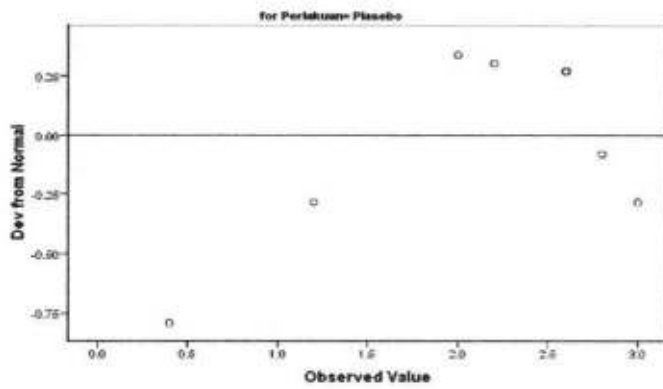


Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta

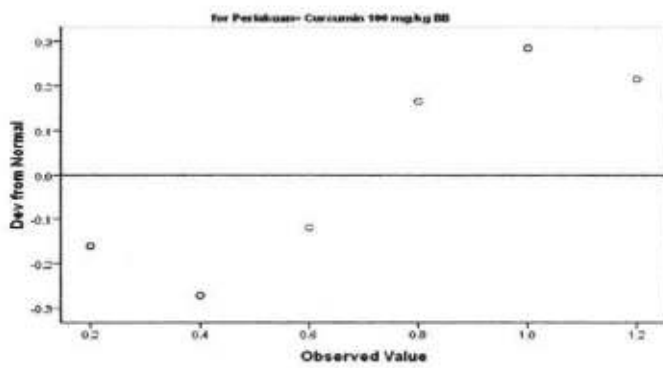


Detrended Normal Q-Q Plots

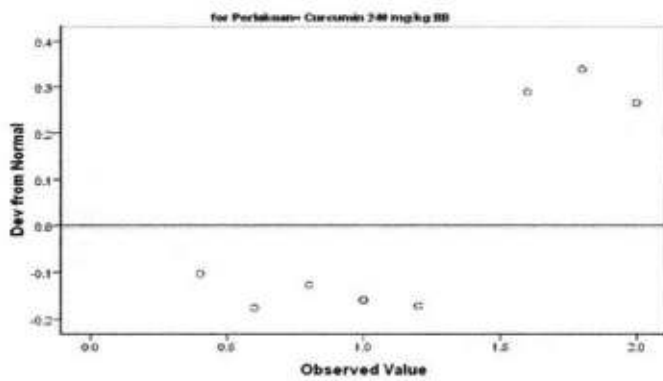
Detrended Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta

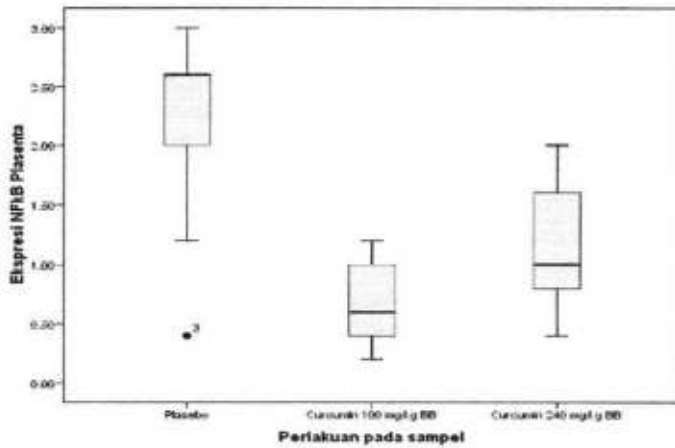


Detrended Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta



Detrended Normal Q-Q Plot of Ekspresi NFkB Plasenta





ONEWAY NFkB BY Perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.

Oneway

Notes		
Output Created		19-Aug-2010 21:07:55
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\data mencit ku.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY NFkB BY Perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\data mencit ku.sav

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi NFkB Plasenta			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,928	2	24	,167

ANOVA

Ekspresi NFkB Plasenta					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,634	2	5,317	13,830	,000
Within Groups	9,227	24	,384		
Total	19,861	26			

ONEWAY NFkB BY Perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=LSD ALPHA(0,05).

Oneway

Notes		
Output Created		19-Aug-2010 21:10:05
Comments		
Input	Data	D:\Data Dina\THESIS\data mencit ku.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

Syntax	ONEWAY NFKB BY Perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet1] D:\Data Dina\THESIS\data mencit ku.sav

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresl NFKB Plasenta

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,928	2	24	,167

ANOVA

Ekspresl NFKB Plasenta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,634	2	5,317	13,830	,000
Within Groups	9,227	24	,384		
Total	19,861	26			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Ekspresl NFKB PlasentaLSD

(I) Perlakuan pada sampel	(J) Perlakuan pada sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence	
					Lower Bound	Upper Bound
Plasebo	Curcumin 100 mg/kg BB	1,51111	,29229	,000	,9079	2,1144
	Curcumin 240 mg/kg BB	1,00000	,29229	,002	,3967	1,6033
Curcumin 100 mg/kg BB	Plasebo	-1,51111	,29229	,000	-2,1144	-,9079
	Curcumin 240 mg/kg BB	-,51111	,29229	,093	-1,1144	,0921
Curcumin 240 mg/kg BB	Plasebo	-1,00000	,29229	,002	-1,6033	-,3967
	Curcumin 100 mg/kg BB	,51111	,29229	,093	-,0621	1,1144

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

Lampiran 5

JADWAL PENELITIAN CURCUMIN Dr.DINA
TEKNIS PELAKSANAAN KELOMPOK KONTROL (K0)

Tanggal
Hari ke	1	2	3	4
Hari Bunting	(-)	(-)	(-)	(-)
Perlakuan	PMSG		HCG	VP

Bila VP(+)=Oa

Bila VP(-)=Ob

- * Betina dikembalikan lagi ke kandang, dikumpulkan lagi dengan jantan (1:1) hari 4-8, pada hari ke 8 dianggap bunting hari 1 --> K (kawin)
- * Betina diberi Anti Qa2 @ 10 ng pada hari ke 8,9,10,11 (hari bunting 1-4) --> Q1-Q4
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 12-25 (hari bunting 5-18) --> C0.1-C0.14
- * Pembedahan hari ke 26 (hari bunting 19) --> B

Tanggal	*	**	***	****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Hari Bunting					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Perlakuan	K	K	K	K	Q1	Q2	Q3	Q4	C0.1	C0.2	C0.3	C0.4	C0.5	C0.6	C0.7	C0.8	C0.9	C0.10	C0.11	C0.12	C0.13	C0.14	B	

*Jantan diambil

- * Betina diberi anti Qa2 @ 10 ng pada hari 4,5,6 (hari bunting 1-4) --> Q1-Q4
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 8-21 (hari bunting 5-18) --> C0.1-C0.14
- * Pembedahan hari ke 22 (hari bunting 19) --> B

Tanggal
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22				
Hari Bunting	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19				
Perlakuan	Q1	Q2	Q3	Q4	C0.1	C0.2	C0.3	C0.4	C0.5	C0.6	C0.7	C0.8	C0.9	C0.10	C0.11	C0.12	C0.13	C0.14	B				

JADWAL PENELITIAN CURCUMIN Dr.DINA
TEKNIS PELAKSANAAN KELOMPOK PERLAKUAN 1 (K1)

Tanggal
Hari ke	1	2	3	4
Hari Bunting	(-)	(-)	(-)	(-)
Perlakuan	PMSG		HCG	VP

Bila VP(+)=Ia

Bila VP(-)=Ib

- * Betina dikembalikan lagi ke kandang, dikumpulkan lagi dengan jantan (1:1) hari 4-8, pada hari ke 8 dianggap bunting hari 1 --> K (kawin)
- * Betina diberi Anti Qa2 @ 10 ng pada hari ke 8,9,10,11 (hari bunting 1-4) --> Q1-Q4
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 12-25 (hari bunting 5-18) --> C1.1-C1.14
- * Pembedahan hari ke 26 (hari bunting 19) --> B

Tanggal
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26			
Hari Bunting					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Perlakuan	K	K	K	K	Q1	Q2	Q3	Q4	C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	C1.5	C1.6	C1.7	C1.8	C1.9	C1.10	C1.11	C1.12	C1.13	C1.14	B			

- * Jantan diambil
- * Betina diberi anti Qa2 @ 10 ng pada hari 4,5,6 (hari bunting 1-4) --> Q1-Q4
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 8-21 (hari bunting 5-18) --> C1.1-C1.14
- * Pembedahan hari ke 22 (hari bunting 19) --> B

Tanggal
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22							
Hari Bunting	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19							
Perlakuan	Q1	Q2	Q3	Q4	C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	C1.5	C1.6	C1.7	C1.8	C1.9	C1.10	C1.11	C1.12	C1.13	C1.14	B							

JADWAL PENELITIAN CURCUMIN Dr.DINA
TEKNIS PELAKSANAAN KELOMPOK PERLAKUAN 2 (K2)

Tanggal
Hari ke	1	2	3	4
Hari Bunting	(-)	(-)	(-)	(-)
Perlakuan	PMSG		HCG	VP

Bila VP(+)=IIa

Bila VP(-)=IIb

- * Betina dikembalikan lagi ke kandang, dikumpulkan lagi dengan jantan (1:1) hari 4-8, pada hari ke 8 dianggap bunting hari 1 --> **K (kawin)**
- * Betina diberi Anti Qa2 @ 10 ng pada hari ke 8,9,10,11 (hari bunting 1-4) --> **Q1-Q4**
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 12-25 (hari bunting 5-18) --> **C2.1-C2.14**
- * Pembedahan hari ke 26 (hari bunting 19) --> **B**

Tanggal
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
Hari Bunting					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Perlakuan	K	K	K	K	Q1	Q2	Q3	Q4	C2.1	C2.2	C2.3	C2.4	C2.5	C2.6	C2.7	C2.8	C2.9	C2.10	C2.11	C2.12	C2.13	C2.14	B		

- * Jantan diambil
- * Betina diberi anti Qa2 @ 10 ng pada hari 4,5,6 (hari bunting 1-4) --> **Q1-Q4**
- * Betina diberi sonde aquades 1ml hari ke 8-21 (hari bunting 5-18) --> **C2.1-C2.14**
- * Pembedahan hari ke 22 (hari bunting 19) --> **B**

Tanggal
Hari ke	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22						
Hari Bunting	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19						
Perlakuan	Q1	Q2	Q3	Q4	C2.1	C2.2	C2.3	C2.4	C2.5	C2.6	C2.7	C2.8	C2.9	C2.10	C2.11	C2.12	C2.13	C2.14	B						

KETERANGAN KELAIKAN
ETIK



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 098-KE

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

PENELITIAN BERJUDUL : Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Ekspresi
NF-KB dan Kadar Malondealdehid Pada Hewan
Mus musculus Model Preeklampsia

PENELITI UTAMA : Dina Priliasanti S., dr.

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN** : Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

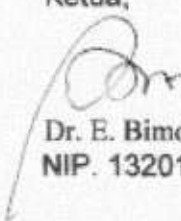
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 25 Agustus 2010

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,


Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 130687305

Ketua,


Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.
NIP. 132014464