

DISERTASI

KORELASI DEFISIENSI ASAM FOLAT DENGAN KADAR TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 DAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I DALAM SERUM INDUK DAN TULANG KEPALA JANIN TIKUS

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS DAN OBSERVASIONAL KLINIS
UNTUK MENJELASKAN TERBENTUKNYA DEFEK TULANG
PADA MENINGOKEL

Dis
K 24/04
San
K



MOCHAMMAD ISTIADJID EDDY SANTOSO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**



**KORELASI DEFISIENSI ASAM FOLAT DENGAN KADAR
TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 DAN INSULIN-LIKE
GROWTH FACTOR-I DALAM SERUM INDUK DAN
TULANG KEPALA JANIN TIKUS**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS DAN OBSERVASIONAL KLINIS
UNTUK MENJELASKAN TERBENTUKNYA DEFEK TULANG
PADA MENINGOKEL**

Dis
K 24/04
San
k

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Rabu
Tanggal : 12 Mei 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB



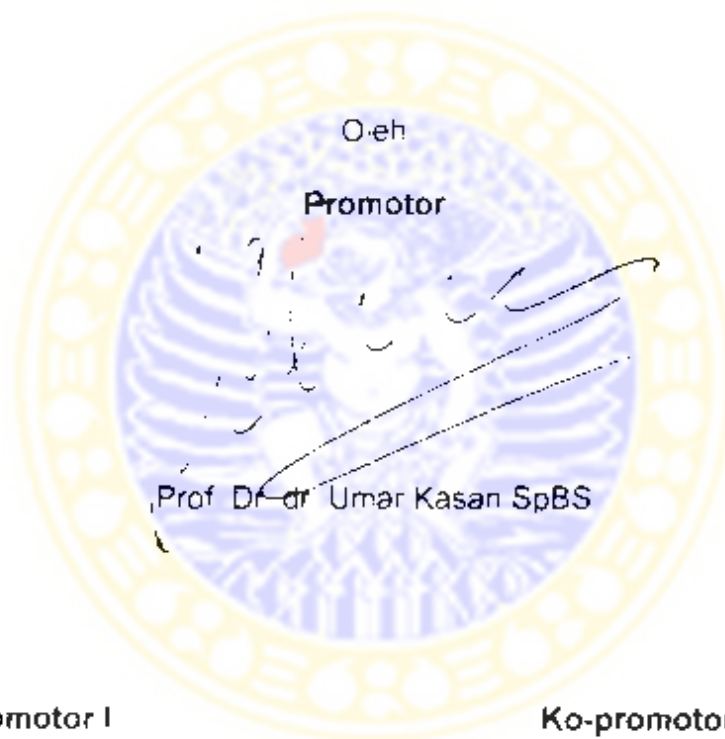
Oleh :

MOCHAMMAD ISTIADJID EDDY SANTOSO
NIM. 099813103 D

Lembar Pengesahan

NASKAH DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 24 MEI 2004



Ko-promotor I

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Retno Moestiati Loekito".

Prof. Dr. dr. Retno Moestiati Loekito

Ko-promotor II

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Abdul Hafid Bajamal".

Dr. dr. Abdul Hafid Bajamal SpBS

Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 14 April 2004

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Marsetio Donosepoetro, dr., SpPK

Anggota : 1. Prof. Dr. Umar Kasan, dr., SpBS
2. Prof. Dr. Retno Moestiati Loekito, dr.
3. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., SpBS
4. Prof. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.
5. Prof. Dr. Kahdar Wiriadisastra, SpS, SpBS
6. Dr. F.M. Judajana, dr., SpPK

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor: 3168/JO3/PP/2004
Tanggal : 26 April 2004

Promotor ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga
Prof. Dr. dr. Umar Kasan SpBS

Ko-Promotor I : Prof. Dr. dr. Retno Moestiati Loekito

Ko-Promotor II : Dr. dr. Abdul Hafid Bajamal SpBS



UCAPAN TERIMAKASIH

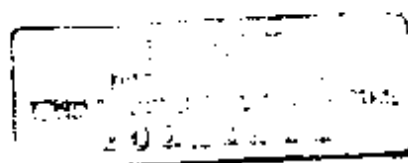
Pertama kali saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Yang Maha-penyayang dan Maha-pengasih atas segala rahmat dan karunia-Nya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ucapan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. H. Umar Kasan, dr., SpBS, guru besar Ilmu Bedah Saraf Universitas Airlangga, bahwa selaku Promotor beliau telah menghantarkan saya melewati jenjang pendidikan tertinggi. Dengan penuh kesabaran dan penuh pengertian, beliau senantiasa membimbing, mendorong semangat dan meningkatkan rasa percaya diri saya. Kepada beliau, semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah, serta melipatgandakan pahala-Nya.

Ungkapan rasa terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya haturkan kepada almarhum Prof. Dr. Widanto Hardjowasito, dr., SpB, SpBP, guru besar Universitas Brawijaya di bidang Ilmu Bedah Plastik, bahwa semasa masih bersama saya, beliau selaku Ko-Promotor telah memberikan inspirasi, dorongan semangat dan bimbingan tiada henti sampai akhir hayat beliau, yang sangat berarti bagi penyelesaian disertasi saya. Dari beliaulah saya memperoleh bahan-bahan dan ide awal yang sangat penting dalam proses pendidikan doktor ini.

Ucapan terimakasih dan penghargaan yang tulus saya sampaikan kepada Prof. Dr. Retno Moestiati Loekito, dr., guru besar di bidang Ilmu Anatomi-Histologi Universitas Brawijaya selaku Ko-Promotor I yang telah membimbing, memberikan saran-saran dan membantu keperluan saya dalam banyak hal sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan membuat disertasi ini. Semoga Tuhan Yang Mahaesa membalasnya dengan pahala berlipat-ganda.

Ungkapan terimakasih juga saya sampaikan kepada guru saya dalam bidang Ilmu Bedah Saraf di Universitas Airlangga, Dr. H. Abdul Hafid Bajamal,



dr., SpBS selaku Ko-Promotor II yang telah memberikan saran-saran, bimbingan dan koreksi sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya pada beliau.

Saya menghaturkan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpB(K)TKV serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD., atas pemberian kesempatan bagi saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Kepada yang terhormat Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muh. Amin, dr., SpP dan mantan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono dr., SpTHT, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga, saya menghaturkan terimakasih.

Ucapan terimakasih juga saya sampaikan kepada yang terhormat Prof. Dr. Hj. Juliati Hood Assegaff, dr., MS., SpPA., FIAC sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, atas nasehat, dorongan dan perhatian yang diberikan selama saya mengikuti Program Doktor.

Kepada Staf Pengajar dan Panitia Penguji dari ujian kualifikasi hingga ujian disertasi pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas segala bimbingan dan arahan pengetahuan untuk menunjang disertasi. Beliau-beliau yang terhormat adalah: Prof. H. Basoeki Wirjowidjono, dr., SpBS, Prof. Gunawan Budiarto, dr., SpS., Prof. Dr. Marsetio Donosepoetro, dr., SpPK, Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr., Prof. H. Eddy Pranowo Soedibyo, dr., MPH (almarhum), Prof. Pumomo Suryohudoyo, dr., Prof. Sutandyo Wignyosubroto, MPA., Prof. Dr. P.G. Konthen, dr., SpPD, Prof. Dr. Koento Wibisono Siswomihardjo, Prof. Dr. H.J. Glinka SVD, H. Fuad Amsyari, dr., MPH, PhD., Prof. Dr. M.Zainuddin Drs. Apt., Prof. Dr. Sarmanu. drh., Prof. Dr. Kuntoro, dr. MPH., Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS, Widodo J.Pudjirahardjo, dr., MS, MPH, DrPH., Prof. Dr. Kahdar Wiriadisastra, dr., SpS, SpBS. Siti Pariani, dr., MPH, PhD, Dr. F.M. Judajana, dr., SpPK, Dr. L. Dison, Drs. MA, dan Dr. Irwan Setiabudi, dr.

Ungkapan rasa terimakasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. H. Bambang Gurnitno, Ir., dan mantan Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. H. Eka Afnan Troena, SE, serta Prof. H.M. Baisoeni, Drs., atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor. Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya: Haryanto, dr. MSPH dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya: Achmad Rudiyanto, dr., SpPD, KE, saya ucapkan terimakasih atas dorongannya untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga.

Ucapan terimakasih saya haturkan kepada Prof. Koentjoko, drh., MScAgr., PhD dan Prof. Dr. H. Mulyohadi Ali, dr., SpFK, atas saran-saran, koreksi dan masukan beliau-beliau dalam cara menyusun komposisi bahan rangsum bagi hewan-coba tikus yang sangat berguna dan vital bagi penelitian saya. Ungkapan terimakasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Dr. Solimun Ir., MS dan Hidayat Sujuti, dr., PhD, atas saran dan koreksi mengenai kerangka teori, metodologi, analisis data dan perhitungan statistika.

Kepada Direktur dan mantan Direktur Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang : Arman Ardjito Endarso, dr., MPH, Tarbinu Kasmono, dr., MPH, dan Prapto Rahardjo, dr., saya mengucapkan terimakasih atas ijin untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSU Dr. Saiful Anwar Malang, Dr. H. Moh. Hidayat, dr., SpB, SpOT, serta mantan Kepala Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya H. Martopo Marnadi dr., SpB dan H. Rochmad Idjra'i, dr., SpB(K)D (almarhum) atas ijin yang diberikan untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga, serta atas segala perhatian dan dorongan semangat selama saya mengikuti Program Doktor. Ucapan terimakasih juga saya sampaikan untuk seluruh staf pengajar di Laboratorium Ilmu Bedah yang telah memberi dorongan semangat kepada saya. Khusus untuk sejawat saya dr. Farhad Bal'afir, SpBS, saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dalam pengadaan literatur dan pengambilan sampel tulang pasien meningokel. Ucapan

terimakasih juga saya sampaikan kepada para peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis-I Ilmu Bedah antara lain Solahudin Hasyim, dr., Billy Daniel Messakh, dr., Agoeng Suprijadi, dr., Susetyo Hari Pumomo, dr., yang telah membantu saya dalam pengiriman sampel tulang pasien serta penyiapan naskah dan presentasi disertasi. Saya juga mengucapkan terimakasih kepada staf sekretariat Laboratorium Bedah Subagyo. Drs., Ny. SE Wisnandari, Dra., Nn.Toeti Joeniati, Ny. Sri Wulandari, Ny. Koenawati dan lain-lain' atas dorongan semangatnya.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. Hj. Setyowati, dr., MKes., atas ijin yang diberikan untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin. Kepada Sejawat Hj. Umi Kalsum, dr., MKes., yang telah banyak memberikan bantuan dan saran-saran selama berlangsungnya penelitian, saya sampaikan terimakasih. Kepada para staf farmakologi : Ny. Ferida, Ny. Hari Muljani dan khususnya Sdr. Danny Kurniawan, yang telah membantu saya dalam memelihara, membuat rangsum, memberikan sonde, pengambilan sampel penelitian, serta tindakan histerotomi terhadap hewan-coba tikus., saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya. Kepada seluruh pimpinan dan karyawan Laboratorium Klinik Prodia, saya juga menghaturkan terima-kasih atas kerjasamanya dalam pemeriksaan kadar asam folat darah.

Ungkapan rasa terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya, Dr. Soemamo, dr., SpMK, atas ijin yang diberikan kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Sejawat di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya, yaitu : Dr. I.G. Ketut Muliarta, dr., Hj. Loeki Enggar Fitri, dr., Mkes., Nur Permatasari drg., Wibi Riawan, SSI., Aulani'am, drh., DES, dan anggota staf Biomedik lainnya : Sdri. Afrida, Sdri. Pujiani A.MD, dan Sdr.Bambang Eko Mulyono, yang dengan ketrampilannya di bidang kerja laboratorium,

Korelasi Defisiensi Asam Folat dengan Kadar *Transforming Growth Factor- β 1* dan *Insulin-Like Growth Factor-I* dalam Serum Induk dan Tulang Kepala Janin

Penelitian Eksperimental Laboratoris dan Observasional Klinis untuk Menjelaskan Terbentuknya Defek Tulang Kepala pada Meningokel

Mochammad Istiadjid Eddy Santoso

Meningokel merupakan penyakit kongenital dari kelainan embriologis yang disebut *Neural tube defect (NTD)*. Meningokel disebabkan oleh banyak faktor dan melibatkan banyak gen (multifaktoral dan poligenik). Banyak sekali penelitian yang mengungkap bahwa sekitar tujuh puluh persen kasus *NTD* dapat dicegah dengan suplementasi asam folat, sehingga defisiensi asam folat dianggap sebagai salah satu faktor penting dalam teratogenesis meningokel. Basis molekul defisiensi asam folat adalah kurang adekuatnya enzim-enzim yang mentransfer gugus karbon dalam proses metilasi protein dalam sel, baik dalam nukleus maupun mitokhondria, sehingga terjadi gangguan biosintesis DNA dan RNA, serta kenaikan kadar homosistein.

Defek tulang pada meningokel secara embriologis terjadi akibat gangguan proses neurulasi, yaitu tetap melekatnya ektoderm epidermis dengan ektoderm neural sehingga migrasi sel-sel mesoderm pembentuk tulang ke tempat tersebut terhambat dengan akibat di area itu tidak terbentuk tulang (teori non-separasi dari Stenberg). Dalam proses ini, faktor pertumbuhan yang berfungsi memacu sintesis matriks tulang mungkin juga berperan. Terdapat dua macam faktor pertumbuhan dimaksud di atas yaitu *TGF- β* (khususnya *TGF- β 1*) dan *IGF-I*, yang dalam banyak penelitian telah dibuktikan aksinya pada pembentukan tulang.

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengungkap korelasi defisiensi asam folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum maupun dalam tulang, serta

telah banyak sekali membantu saya dalam hal pemeriksaan darah (Elisa) dan jaringan tulang (imunohistokimia), mulai dari awal sampai selesai.

Secara khusus terlebih dahulu saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada pasien meningokel dan keluarganya atas kerelaan, pengertian dan bantuannya untuk memberikan izin pada saya mengambil sedikit spesimen tulang untuk pemeriksaan laboratorium, sehingga saya dapat menyelesaikan Program Doktor. Tanpa pengertian, kerelaan dan izin dari beliau-beliau, penelitian untuk disertasi ini tidak mungkin terlaksana dengan baik. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada mereka.

Saya haturkan ungkapan terimakasih yang tak terhingga kepada semua guru saya mulai dari Sekolah Taman Kanak-kanak, Sekolah Rakyat Negeri-IV, Sekolah Menengah Pertama Negeri-II, Sekolah Menengah Atas Negeri-I (semuanya di kota Klaten, Jawa Tengah), para dosen saya di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, para pengajar saya di Laboratorium Ilmu Penyakit Saraf Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Ilmu Penyakit Saraf Universitas Airlangga, sampai dengan dosen-dosen saya di Laboratorium Ilmu Bedah Saraf Universitas Airlangga.

Kepada teman-teman sekelas peserta-didik Program Doktor Universitas Airlangga yang berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Kelompok I5), yaitu : Nannerl Hutaryo Pakasi, dr., SpM., Dr. H. Moh. Hidayat, dr., SpB, SpOT, H.Abiyoso, dr., SpP, Dr. H.M. Soemarmo, dr., SpB(K)D, Dr. H. Respati Suryanto Dradjad, dr., SpOT, Dr. H.Sanarto Santoso, dr., DTM&H, SpMK, HMS Chandra Kusuma, dr., SpA(K), Dr. H. Djoni Djunaedi, dr., SpPD, Dr.H. Noorhamdani AS, dr., DMM, SpMK, H. Teguh Wahyu Sardjono, dr., DTM&H, MSc., H.Achdiat Agoes, dr., SpS, H. Hari Bagianto, dr., SpAn.KIC., Mardhani, dr., SpA(K) dan Bambang Pardjianto, dr., SpB, SpBP, saya sampaikan ucapan terimakasih yang tak terhingga atas segala kerjasama yang baik serta saling mendukung dalam suka dan duka selama bersama-sama menjalani pendidikan.

Ucapan terimakasih dan ungkapan penghargaan yang setinggi-tingginya saya haturkan kepada almarhum ayahanda saya R.S. Sastrosoebroto serta kedua ibunda saya almarhumah R.A. Siti Lasijah dan almarhumah R.A.

korelasi kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut dalam tulang kepala pasien meningokel dengan lebar defek. Bila kedua hal tadi telah terungkap, maka proses teratogenesis meningoke. menjadi lebih jelas. Penelitian ini menggunakan dua macam cara, sesuai dengan hipotesis yang hendak diuji, yaitu metode eks-perimental laboratoris dengan hewan-coba tikus dan metode observasional klinis pada pasien meningokel.

Derajat defisiensi asam folat dikelompokkan dalam kategori berat dan ringan sesuai dengan rangsum yang diberikan, yaitu rangsum sangat rendah folat dan rangsum rendah folat, sedangkan untuk kontrol adalah rangsum cukup folat. Komposisi rangsum dibuat sesuai dengan standar kandungan dan takaran *purified diet* yang selama ini telah digunakan, meliputi : glukosa, selulosa, casein non-vitamin, *sunflower oil*, choline-cl., mineral, vitamin tanpa folat dan *trace element*. Asam folat dengan tiga takaran yang berbeda untuk setiap kelompok hewan-coba, diberikan lewat sonde oral. Enambelas minggu setelah pemberian diet, darah hewan-coba diambil untuk pemeriksaan kadar asam folat, *TGF-β1* dan *IGF-I*. Hewan-coba kemudian dikawinkan, setelah janin lahir diambil tulang kepalanya untuk pemeriksaan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I*. Pada pasien meningokel, sewaktu operasi eksisi dengan metode standar, jaringan tulang tepi defek diambil sedikit untuk pemeriksaan *TGF-β1* dan *IGF-I*, dan lebar defek diukur dengan antropometer Martin.

Hasil analisis data menunjukkan adanya korelasi yang cukup kuat kadar asam folat dalam eritrosit dengan kadar *TGF-β1* ($p= 0.077$, $r=0.346$) dan *IGF-I* ($p= 0.020$; $r= 0.475$) dalam serum induk. Korelasi kadar asam folat dalam serum dengan kadar *TGF-β1* serum ($p= 0.062$, $r= 0.351$) cukup kuat, sedangkan korelasinya dengan kadar *IGF-I* serum kurang kuat ($p= 0.429$, $r= 0.155$). Terdapat korelasi yang kuat kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk dengan kadar *TGF-β1* ($p= 0.017$, $r= 0.361$) dan *IGF-I* ($p= 0.000$, $r= 0.517$) dalam tulang kepala janin. Juga terdapat korelasi-negatif yang kuat antara kadar *TGF-β1* tulang kepala janin dengan jumlah sel apoptosis ($p= 0.001$, $r= - 0.541$), serta kadar *IGF-I* dengan jumlah sel nekrosis ($p= 0.004$, $r= - 0.469$), sedangkan

korelasi-negatif kadar *TGF-β1* dengan jumlah sel nekrosis ($p= 0.180$, $r= -0.219$) dan kadar *IGF-I* dengan jumlah sel apoptosis ($p= 0.701$, $r= -0.064$) sangat lemah. Pada pasien meningokel, terdapat korelasi-negatif yang kuat antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* di tulang kepala tepi defek dengan lebar defek (*TGF-β1* $p=0.009$, $r= -0.648$; *IGF-I*: $p= 0.025$, $r= -0.426$).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa secara keseluruhan terdapat korelasi kadar asam folat yang cukup kuat dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I*, serta jumlah sel apoptosis dan nekrosis; demikian juga dengan proses terbentuknya defek tulang pada pasien meningokel. Hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan tentang konsep baru terbentuknya defek tulang kepala pada meningokel yang dikaitkan dengan defisiensi asam folat. Penelitian ini juga bermanfaat untuk memperluas aspek pencegahan bagi kasus meningokel dan kelainan *neural tube defect* pada umumnya, serta aspek pengobatan terhadap kasus defek tulang kepala, bahkan sejak pasien masih berada di dalam kandungan.

Kata kunci : Defisiensi asam folat, *TGF-β1*, *IGF-I*, Meningokel

SUMMARY

Correlation between Folic Acid Deficiency and Transforming Growth Factor- β 1 and Insulin-Like Growth Factor-I Concentrations in Serum and Skull

Experimental and Observasional Studies to Explain The Mechanism of Defect-Forming at The Skull of Meningocele Patients

Mochammad Istiadjid Eddy Santoso

Pathogenesis of neural tube defects (NTDs), especially meningocele is not concludedly yet. The etiology of this congenital anomaly is multifactorial and polygenic. About 70% of NTDs could be prevented by supplementation of folic acid during the periconceptional period. Despite the importance of this primary health-care measure, the mechanism by which folic acid exerts its preventive effect is not clearly known. It has been demonstrated a common 667C \rightarrow T mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Cystathion-B Synthetase (CBS), and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) genes and also increases the homocysteine level.

Bone defect in meningocele, embryologically is caused by abnormality of neurulation process i.e. a sustained adhesion between neural ectoderm (brain) and surface ectoderm (epidermis) in the midline, prevents mesodermal cells migrating to this site of adhesion and delay the closure of rostral neuropore (Sternberg's non-separation theory). Thus, no bony structure can be found at this area. There is a role of growth factors action in stimulation of bone matrix in this process i.e. : transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and insulin-like growth factor-I (IGF-I).

This study has been done using thirty Dawley-Sprague rats, which were assigned into three groups. First ten rats were fed with very low content folic acid purified diet, a second group were fed with low content folic acid diet, and the third group were fed with normal folic acid content diet. After sixteen weeks the blood samples were taken to examine folic acid (FIA method), TGF- β 1 and IGF-I (ELISA method) concentrations. Folic acid levels in the RBC and serum were measured then. Level of TGF- β 1 and IGF-I in the serum of mother rats and in the skull of the baby rats were measured too. A little piece of bone around the defect of meningocele patients was taken during standard excision, and the diameter of the defected bone was also measured. From this sample of bone was examined the level of TGF- β 1 as well as IGF-I immunohistochemically.

Relative significant positive correlation was found between folic acid level in the RBC and serum TGF- β 1 level ($r = 0.346$; $p = 0.077$) and IGF-I levels ($r = 0.475$, $p = 0.020$). Positive correlation between folic acid serum level and TGF- β 1 serum level was also significant ($r = 0.351$, $p = 0.062$), while with IGF-I serum level, was not significant ($r = 0.155$, $p = 0.429$). Same findings also proved that between the level of TGF- β 1 and IGF-I in the serum of mother and the levels of TGF- β 1 and IGF-I in the baby's skull (TGF- β 1: $p = 0.017$, $r = 0.361$; IGF-I: $p = 0.000$, $r = 0.517$). A negative correlation was found in meningocele patients between bone TGF- β 1 and IGF-I concentrations and the diameter of the defected bone (TGF- β 1: $p = 0.009$, $r = -0.648$; IGF-I: $p = 0.025$, $r = -0.426$).

This study indicates that folic acid deficiency will reduces the level of TGF- β 1 and IGF-I in the mother's serum and the baby's skull, and then causes failure of the closure process of the skull during embryonic development, with consequence of bone defect. These findings also indicate that deficiency of Folic acid - TGF β 1 - IGF1 complex have an important role in the teratogenesis of NTDs, especially meningocele, as an environmental risk factor.

Keywords : Encephalocele, folic acid deficiency, growth factors.

Correlation between Folic Acid Deficiency and Transforming Growth Factor- β 1 and Insuline-like Growth Factor-I Concentrations in Serum and Skull

Experimental and Observasional Studies to Explain The Mechanism of Defect-Forming at The Skull of Meningocele Patients

Mochammad Istiadjid Eddy Santoso

ABSTRACT

Objective: To determine the correlation between folic acid deficiency and growth factors TGF- β 1 and IGF-I to explain the mechanism of skull defect in meningocele patients.

Design: Thirty mature Sprague-Dawley rats were divided into three groups. Purified diet with 10 ug of folic acid was given to first group, 30 ug to the second group, and 50 ug to the third group. After sixteen weeks the blood samples were taken to examine folic acid (FIA method), TGF- β 1 and IGF-I (ELISA method) concentrations. After pregnancy and delivery (through hysterotomy at 18th-19th gestation's day), the skull bone samples of baby-rats were taken to examine the TGF- β 1 and IGF-I concentrations with immunohistochemistry method. The bone sample from the edge of the skull defect of meningocele patients were taken to examine the concentrations of TGF- β 1 and IGF-I, also with immunohistochemistry method.

Results: There was positive correlation between folic acid serum concentration and TGF- β 1 and IGF-I serum concentrations; and also folic acid and TGF- β 1 and IGF-I skull concentrations. Negative correlation was found between TGF- β 1 and IGF-I concentrations in defect-bone of meningocele patients and the width of skull defects, were also found.

Conclusion: Folic acid deficiency could cause defect-forming of the skull by lowering TGF- β 1 and IGF-I concentrations in the serum and skull

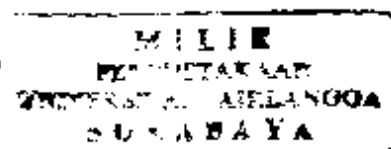
Key words: Folic acid deficiency, Growth factors Encephalocele, Neural tube defects

DAFTAR ISI

Halaman judul	i
Prasyarat Gelar	ii
Halaman pengesahan	iii
Penetapan Panitia penguji	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	vi
RINGKASAN	xii
SUMMARY	xv
ABSTRACT	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR TABEL	xxv
DAFTAR GRAFIK	xxvi
DAFTAR SINGKATAN	xxvii
DAFTAR ISTILAH	xxix
DAFTAR LAMPIRAN	xxx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.4.1 Manfaat akademis	9
1.4.2 Manfaat praktis	9
1.5 Keterbatasan penelitian	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Definisi meningokel	12
2.2 Klasifikasi	12
2.3 Epidemiologi	15
2.4 Embriologi	19
2.4.1 Pembentukan neural tube (tabung saraf)	19

2.4.2 Pembentukan tulang tengkorak.....	25
2.5 Etiologi meningokel	29
2.5.1 Faktor genetik	29
2.5.2 Faktor teratogen	29
2.5.3 Faktor nutrisi	30
2.6 Teratologi meningokel	31
2.6.1 Gangguan neurulasi	31
2.6.2 Gangguan post-neurulasi	32
2.7 Protein-protein pembentuk tulang	35
2.7.1 Transforming Growth Factor- β	35
2.7.2 Insulin-like Growth factor-I	42
2.7.3 Kolagen	46
2.7.4 DNA dan RNA	48
2.8 Peran <i>TGF-β</i> dan <i>IGF-I</i> dalam metabolisme tulang	52
2.9 Peran <i>TGF-β</i> dan <i>IGF-I</i> dalam embriogenesis	59
2.10 Asam folat	63
2.11 Apoptosis dan nekrosis	72
2.12 Landasan teori	78
2.13 Penelitian defisiensi nutrisi dengan hewan-coba	80
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	86
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	86
3.2 Hipotesis Penelitian	91
BAB 4 METODE PENELITIAN	92
4.1 Penelitian untuk menguji hipotesis pertama dan kedua	92
4.1.1 Rancangan penelitian	92
4.1.2 Obyek dan replikasi	94
4.1.3 Perlakuan terhadap sampel	95
4.1.4 Variabel penelitian	97
4.1.5 Definisi operasional variabel	100
4.1.6 Bahan penelitian	101
4.1.7 Cara pengukuran	102

1. Pengukuran asam folat	102
2. Pengukuran <i>TGF-β1</i> serum	103
3. Pengukuran <i>IGF-I</i> serum	103
4. Pengukuran <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam tulang	104
5. Penghitungan jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam tulang kepala janin	106
4.1.8 Instrumen penelitian	107
4.1.9 Prosedur pengambilan dan pengumpulan sampel ..	108
4.1.10 Lokasi dan waktu penelitian	109
4.1.11 Cara analisis data	109
4.2 Penelitian kedua untuk menguji hipotesis keenam.....	110
4.2.1 Rancangan penelitian.....	110
4.2.2 Populasi dan sampel penelitian	110
4.2.3 Bahan penelitian dan cara pengukuran	111
4.2.4 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel	111
4.2.5 Instrumen penelitian	112
4.2.6 Lokasi dan waktu penelitian	112
4.2.7 Cara analisis data	112
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN	113
5.1 Analisis deskriptif data penelitian	114
5.1.1 Pengamatan terhadap hewan-coba	114
5.1.2 Kadar asam folat dalam eritrosit dan serum	120
5.1.3 Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam serum	127
5.1.4 Hubungan kadar asam folat dengan <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam serum.....	130
5.1.5 Korelasi diet rendah folat terhadap kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam serum.....	132
5.1.6 Pengamatan terhadap janin yang dilahirkan	135
5.1.7 Kadar <i>TGF-β 1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam tulang kepala janin	139



5.1.8 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> dalam serum dengan kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> dalam tulang kepala janin tikus	140
5.1.9 Jumlah sel yang mengalami Apoptosis dan nekrosis	143
5.1.10 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> tulang kepala janin dengan jumlah sel apoptosis dan nekrosis...	144
5.1.11 Korelasi tidak langsung kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> serum induk tikus dengan lebar defek tulang pasien maningokel	146
5.1.12 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> dalam tulang dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel	149
5.2 Analisis patologik dan histopatologik	150
5.2.1 Ekspresi <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> dalam tulang kepala janin tikus	153
5.2.2 Penampang melintang tulang kepala janin tikus normal	158
5.2.3 Apoptosis dan nekrosis sel-sel tulang kepala janin tikus	161
5.2.4 Ekspresi <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> dalam tulang kepala pasien meningokel	165
BAB 6 PEMBAHASAN	166
6.1 Kadar asam folat dalam eritrosit dan serum	166
6.2 Korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus dengan kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> serum induk tikus.....	169
6.3 Korelasi diet rendah folat dengan kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> serum induk tikus	174
6.4 Morfologi janin yang dilahirkan	176
6.5 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-1</i> serum dengan kadarnya	

dalam tulang kepala janin tikus	180
6.6 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dengan jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam tulang kepala janin tikus	182
6.7 Korelasi tidak langsung kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam serum induk tikus dengan lebar defek pasien meningokel	187
6.8 Korelasi kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam tulang tepi defek dengan lebar defek pada tulang kepala pasien meningokel .	188
6.9 Gambaran histopatologis	192
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	194
7.1 Kesimpulan	194
7.2 Saran	196
DAFTAR PUSTAKA	199
LAMPIRAN	210



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1 Pasien meningokel oksipital	13
Gambar 2.2.2 Pasien meningokel nasofrontal	13
Gambar 2.2.3 Pasien meningokel nasoorbital	14
Gambar 2.2.4 Pasien meningokel lumbosakral	14
Gambar 2.2.5 Defek tulang pada meningokel	15
Gambar 2.4.1 Pembentukan Ektoderm, Mesoderm dan Kaskade Gen ..	21
Gambar 2.4.2 Pembentukan <i>Neural Tube</i>	24
Gambar 2.4.3 Pembentukan Tulang Kepala	28
Gambar 2.7.1 Transduksi Sinyal <i>TGF-β</i>	40
Gambar 2.10.1 Metabolisme Metionin dan Homosistein	69
Gambar 2.10.2 Skema Konversi Folat	70
Gambar 2.10.3 Peranan Folat dalam Biosintesis dan Reaksi Metilasi ...	71
Gambar 2.11 Hubungan Hiperhomosisteinemia dengan Kematian Sel	76
Gambar 3.1.1 Kerangka Konsep Penelitian	87
Gambar 3.1.2 Kerangka Teori	88
Gambar 4.1.1 Rancangan Penelitian	93
Gambar 4.1.2 Skema pelaksanaan penelitian	109
Gambar 5.1.1 Hubungan Antar Variabel Penelitian Hasil Analisis <i>SEM</i>	128
Gambar 5.1.2 Janin tikus masing-masing kelompok	133
Gambar 5.1.3 Hubungan Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> Tulang dengan Lebar Defek Pasien Meningokel (Hasil Analisis <i>SEM</i>) ..	148
Gambar 5.2.1 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-A	150
Gambar 5.2.2 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-B	151
Gambar 5.2.3 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-C	152
Gambar 5.2.4 Sediaan-A dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti <i>TGF-β1</i>	154
Gambar 5.2.5 Sediaan-B dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti <i>TGF-β1</i>	155
Gambar 5.2.6 Sediaan-C dengan pengecatan imunohistokimia, metode	

peroksidase poliklonal antyibodi anti <i>TGF-β1</i>	156
Gambar 5.2.7 Sediaan irisan melintang tulang kepala janin tikus.....	157
Gambar 5.2.8 Sediaan dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti <i>rat</i> Caspase3	159
Gambar 5.2.9 Sediaan dengan pengecatan imunohistokimia metode peroksidase poliklonal antibodi anti <i>TGF-β1</i>	160
Gambar 5.2.10 Sediaan-I tulang pasien meningokel	162
Gambar 5.2.11 Sediaan-II tulang pasien meningokel	163
Gambar 5.2.12 Sediaan-III tulang pasien meningokel	164




DAFTAR TABEL

Tabel 2.11	Perbedaan Nekrosis dan Apoptosis	77
Tabel 2.13.1	Data Biologis Tikus	81
Tabel 2.13.2	Contoh Purified Diet	84
Tabel 2.13.3	Komposisi <i>Purified Diet</i> semisintetis untuk hewan-coba ...	85
Tabel 5.1.1	Berat Badan Tikus Berdasar Umur	115
Tabel 5.1.2	Kadar Asam Folat dalam Eritrosit	117
Tabel 5.1.3	Kadar Asam Folat dalam Serum	118
Tabel 5.1.4	Absorbansi <i>TGF-β1</i> dalam Serum	121
Tabel 5.1.5	Konsentrasi <i>TGF-β1</i> dalam Serum	122
Tabel 5.1.6	Absorbansi <i>IGF-I</i> dalam Serum	124
Tabel 5.1.7	Konsentrasi <i>IGF-I</i> dalam Serum	125
Tabel 5.1.8	Kadar Asam Folat Eritrosit, <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam Serum.....	129
Tabel 5.1.9	Kadar Asam Folat Serum, <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam Serum	130
Tabel 5.1.10	Berat Badan Janin Tikus	134
Tabel 5.1.11	Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam Tulang Kepala Janin Per-Kelompok Tikus.....	137
Tabel 5.1.12	Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam Serum dan dalam Tulang Per-Kelompok Tikus	139
Tabel 5.1.13	Jumlah Sel yang Apoptosis dan Nekrosis dalam Tulang Kepala Janin Tikus Per-Kelompok	142
Tabel 5.1.14	Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> Tulang Kepala Janin serta Jumlah Sel Apoptosis dan Nekrosis Per-Kelompok Tikus	144
Tabel 5.2.1	Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> dalam Tulang Defek dan Lebar Defek Pasien Meningokel	147


DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1.1 Berat Badan Tikus Per-Kelompok Berdasar Umur.....	116
Grafik 5.1.2 Kadar Asam Folat dalam Eritrosit Tiap Kelompok Tikus...	119
Grafik 5.1.3 Kadar Asam Folat dalam Serum Tiap Kelompok Tikus ...	119
Grafik 5.1.4 Absorbansi TGF- β 1 dalam Serum Tiap Kelompok Tikus ...	123
Grafik 5.1.5 Konsentrasi TGF- β 1 dalam Serum Tiap Kelompok Tikus ...	123
Grafik 5.1.6 Absorbansi IGF-I dalam Serum Tiap Kelompok Tikus	126
Grafik 5.1.7 Konsentrasi IGF-I dalam Serum Tiap Kelompok Tikus	126
Grafik 5.1.8 Kadar Asam Folat Eritrosit, TGF- β 1 dan IGF-I dalam Serum Tiap Kelompok Tikus	129
Grafik 5.1.9 Kadar Asam Folat Serum, TGF- β 1 dan IGF-I dalam Serum Tiap Kelompok Tikus	131
Grafik 5.1.10 Berat Badan Janin Tiap Kelompok Tikus	135
Grafik 5.1.11 Kadar TGF- β 1 dan IGF-I Tulang Kepala Janin Tikus	138
Grafik 5.1.12 Kadar TGF- β 1 dan IGF-I dalam Serum dan Tulang Tiap Kelompok Tikus	141
Grafik 5.1.13 Jumlah Sel Apoptosis dan Nekrosis pada Tulang Kepala Janin Tikus Tiap Kelompok.....	143
Grafik 5.1.14 Kadar TGF- β 1 dan IGF-I dalam Tulang Kepala serta jumlah sel Apoptosis dan Nekrosis Tiap Kelompok Tikus	145

DAFTAR SINGKATAN



Anova	: Analysis of Variance
As	: Arsen
B	: Boraks
BMP	: Bone morphogenetic protein
CBS	: Cystation Beta-Synthetase
Co	: Cobalt
Cu	: Cuprum
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
ECM	: Extracellular Matrix
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fe	: Ferum
FPB	: Folate Binding Protein
FS	: Formyltetrahydrofolate Synthetase
HRP	: Horseradish Peroksidase
I	: Iodine
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor-1
IgG	: Immunoglobulin-G
Mn	: Mangan
Mo	: Molibdat
m-RNA	: Messenger Ribose Nucleic Acid
MS	: Methionine Synthetase
MTHFD	: Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase



MTHFR	:	Methylenetetrahydrofolate Reductase
Ni	:	Nikel
NTDs	:	Neural tube defects
PABA	:	Para-amino Benzoic Acid
PAF	:	Platelet Activating Factor
PGE-2	:	Prostaglandine E-2
Pte-Glu	:	Pteroyl Glutamate
PTH	:	Parathyroid Hormone
RAL	:	Rancangan Acak Lengkap
RCD	:	Randomized Completely Design
RIA	:	Radio Immuno Assay
RNA	:	Ribo Nucleic Acid
Se	:	Selenium
SHMT	:	Serine Hydroxymethyl Transferase
Sn	:	Stano
SST	:	Succinyl Sulphathiazole
TGF-β	:	Transforming Growth Factor-Beta
THF	:	Tetrahydrofolate
TIMP	:	Tissue Inhibitor of metalloproteinase
TMB	:	Tetramethyl Benzidine
V	:	Vanadat
Zn	:	Zincum

DAFTAR ISTILAH

Apoptosis	: Kematian sel terprogram untuk menjaga homeostasis
Blastisist	: Sel-sel embrional
Defek gen	: Kelainan struktur gen
Defek tulang	: Lubang pada tulang kepala
Eksekusi	: Mematikan tikus dengan cara memenggal leher
Histerotomi	: Membuka perut dan rahim untuk mengeluarkan janin
Khondroblas	: Sel muda pembentuk tulang rawan
Konversi	: Perubahan suatu senyawa kimia menjadi senyawa lain
Korelasi	: Hubungan antar variabel pada penelitian yang sama
Korelasi-negatif	: Semakin tinggi nilai suatu variabel, semakin rendah nilai variabel yang lain, atau sebaliknya
Korelasi-positif	: Semakin tinggi nilai suatu variabel, semakin tinggi pula variabel yang lain
Korelasi tidak langsung	: Hubungan antara variabel penelitian yang satu dengan variabel penelitian lain yang berbeda
Nekrosis	: Kematian sel akibat trauma, hipoksia, atau hipotermi
Osteoblas	: Sel muda pembentuk tulang
Perikonsepsional	: Sekitar masa pemuahan sel telur
Purified diet	: Ransum hewan-coba dari bahan yang dimurnikan
Radikal bebas oksigen	: Senyawa molekul oksigen yang mempunyai elektron tak berpasangan
Spesies	: Jenis makhluk hidup
Strain	: Galur, bagian dan spesies

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	<i>Ethical Clearance</i> untuk penelitian tikus	211
Lampiran 2	<i>Ethical Clearance</i> untuk penelitian pasien meningokel	212
Lampiran 3	Contoh <i>Informed Consent</i>	216
Lampiran 4	Anova Uji Konsistensi Hasil Pengamatan Kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i>	217
Lampiran 5	Data mentah kadar asam folat dalam eritrosit Tikus	218
Lampiran 6	Data mentah kadar asam folat dalam serum Tikus	219
Lampiran 7	Data mentah konsentrasi <i>TGF-β1</i> serum induk dan kurva baku	220
Lampiran 8	ANOVA <i>TGF-β1</i> serum induk Tikus	223
Lampiran 9	Data mentah konsentrasi <i>IGF-I</i> serum induk dan kurva baku	224
Lampiran 10	ANOVA <i>IGF-I</i> serum induk Tikus	227
Lampiran 11	Berat badan tikus selama penelitian	228
Lampiran 12	Data mentah kadar <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> tulang kepala janin	229
Lampiran 13	ANOVA <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> tulang kepala janin tikus	231
Lampiran 14	Jumlah apoptosis dan nekrosis tulang kepala janin tikus ...	235
Lampiran 15	ANOVA apoptosis dan nekrosis	236
Lampiran 16	Data perhitungan <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> sampel pasien meningokel	238
Lampiran 17	ANOVA <i>TGF-β1</i> dan <i>IGF-I</i> sampel pasien meningokel	239
Lampiran 18	Hasil Analisis SEM (Structural Equation Modeling)	241
Lampiran 19	Surat Telah Melakukan Penelitian di Lab. Biomedik	260
Lampiran 20	Bagan Pemeriksaan Asam Folat dalam Darah Tikus (RIA)	261
Lampiran 21	Prosedur Pemeriksaan Elisa <i>TGF-β1</i> / <i>IGF-I</i> darah Tikus	262
Lampiran 22	Bagan Pemeriksaan <i>TGF-β1</i> Tulang metode Imunohistokimia	264
Lampiran 23	Bagan Pemeriksaan <i>IGF-I</i> Tulang metode	

	Imunohistokimia	265
Lampiran 24	Bagan Pemeriksaan Apoptosis & Nekrosis metode	
	Imunohistokimia	266



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Meningokel adalah kelainan kongenital berupa penonjolan selaput otak dan cairan otak lewat defek (lubang) pada tulang kepala. Bila sebagian jaringan otak ikut menonjol, disebut meningoensefalokel atau ensefalokel (Charoonsmith & Suwanwela, 1984; Davids *et al.*, 1984; Hoving, 1993). Kelainan ini merupakan bagian dari gangguan yang dinamakan defek tabung saraf (*neural tube defects, NTD's*) (Acuna *et al.*, 2000; Boonvisut, 1997; Charoonsmith & Suwanwela, 1984; Martinez-Lage, 1996).

Prevalensi tertinggi meningokel adalah di Asia Tenggara, khususnya di kalangan ras Melayu (Suwanwela, 1983). Frekuensi pasien meningokel di beberapa klinik bedah saraf di Jawa Timur (Surabaya dan Malang) lebih tinggi dibanding di Jawa Tengah (Solo, Yogya dan Semarang) (Haryo & Istiadjid, 1999). Penderita umumnya berasal dari keluarga tidak mampu dan berpendidikan rendah. Cacat yang terjadi berupa deformitas pada wajah yang berdampak gangguan kosmetik, fungsional, mental dan sosial. Untuk mengobatinya harus dilakukan pembedahan yang memerlukan biaya relatif sangat mahal, dengan risiko yang cukup besar.

Defisiensi asam folat yang terjadi dari saat konsepsi sampai usia kehamilan akhir trimester pertama diyakini sebagai faktor yang paling berperan dalam kejadian penyakit defek tabung saraf meskipun mekanismenya belum diketahui (Agthong & Wiwanitkit, 2002; Brouwer, 1999; Hoving, 1993). Pemberian



suplemen asam folat saat awal kehamilan (perikonsepsional) dapat mencegah sekitar 70% kasus *NTD* (Daly *et al.*, 1997; Eskes *et al.*, 1998; Hall & Solehdin, 1998; Scott, 1998; Wortington-Roberts, 1997). Sampai saat ini mekanisme terjadinya defek tulang kepala pada meningokel yang berkaitan dengan defisiensi asam folat, belum jelas diketahui.

Defisiensi asam folat dapat menyebabkan masalah patobiologis karena gangguan dalam siklus metilasi enzimatik yang berakibat : hiperhomosisteinemia, perubahan genetik dan atau gangguan sintesis protein (Brouwer *et al.*, 1998; Donosepoetro, 1998; Vohra *et al.*, 2000). Asam folat dengan bentuk aktifnya asam tetrahidrofolat memiliki tiga aksi metabolik, pertama diperlukan untuk ko-enzim dalam konversi homosistein menjadi metionin, kedua sebagai ko-faktor pada enzim yang mensintesis *DNA* dan *RNA*, dan ketiga untuk proses metilasi dalam pembentukan protein (Acuna *et al.*, 2000; Brouwer, 1999; Donosepoetro, 1998).

Secara empirik telah dibuktikan bahwa defisiensi asam folat dengan hiperhomosisteinemia dapat mengganggu proses embriogenesis, bahkan mengakibatkan abortus, karena kegagalan migrasi dan implantasi embrio (Gardner *et al.*, 1999; Margawati, 1999). Sewaktu awal pertumbuhan fetus, sintesis asam nukleat dan protein berada dalam kondisi puncak, dan selama masa itu kebutuhan folat maternal meningkat tajam. Bila folat tidak mencukupi, sintesis asam nukleat akan terhambat dan sel-sel tidak mampu memfasilitasi *DNA* untuk replikasi. Terhambatnya siklus metilasi mengakibatkan ketidak-mampuan *DNA*

untuk mensintesis protein, lipid dan mielin (Fleming & Copp, 1988; Martinasevic *et al.*, 1999).

Untuk mencegah *NTD*, para peneliti (antara lain Copp, 1998; Gross *et al.*, 2001; Mc Nulty *et al.*, 2000; Martinasevic *et al.*, 1999 dan Rosenquist *et al.*, 1996) menyarankan fortifikasi atau penambahan asam folat ke dalam bahan pangan yang setiap hari dikonsumsi penduduk, misalnya pada tepung gandum. Tetapi sejauh ini belum diperoleh penjelasan pengaruh fortifikasi folat tersebut terhadap perbaikan status folat masyarakat dan efeknya dalam meningkatkan mutu gen dan berbagai produknya, termasuk kadar *growth factor*, sebagai basis molekul pencegahan *NTD*. Untuk meyakinkan para penentu kebijakan dalam bidang kesehatan, mungkin diperlukan beberapa penelitian tentang pengaruh positif asam folat sebagai bahan informasi yang lebih mendasar dan lebih akurat agar saran yang baik itu dapat diterima. Perlu pula diyakinkan bahwa kecukupan asam folat di dalam darah ibu pra-hamil atau hamil muda akan berpengaruh positif terhadap kualitas kesehatan anak yang akan dilahirkan, sehingga tercegah dari berbagai macam cacat kongenital.

Keadaan hiperhomosisteinemia mungkin juga menyebabkan gangguan dari homeostasis bagi aktivitas sel yang normal. Kematian sel berupa apoptosis adalah mekanisme yang bersifat fisiologis untuk mempertahankan homeostasis. Apoptosis dipercepat dan diperbanyak oleh karena kerusakan gen (*DNA*), sedangkan nekrosis disebabkan oleh hipoksia, hipotermia, cedera khemis dan mekanis (Abbas *et al.*, 1997; Gusev & Skvortsova, 2003; Simpson & Russell, 1998). Kematian sel dapat dipicu terjadi lebih awal oleh gangguan homeostasis,

yang menimbulkan kondisi disebut *accelerated program cell death*. Disini terjadi perubahan ekspresi gen beberapa sitoken (antara lain *TGF- β* dan *TNF- α* dengan reseptor *Fas*) serta terbentuknya radikal bebas oksigen. Kedua hal tersebut dapat menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel, sehingga timbul perlangsungan kaskade apoptosis, yang kemudian melepaskan hambatan *CAD (Caspase Activated DNA-ase) inhibitor*. Selanjutnya *CAD* merusak *DNA*, dan terjadilah apoptosis (Abbas *et al.*, 1997; Sirica, 1996). Nekrosis juga dapat disebabkan oleh stres oksidatif radikal bebas, disebut nekrosis sekunder (Abbas *et al.*, 1997; Stoian *et al.*, 1996).

Berbagai penelitian terdahulu banyak mengungkap masalah yang berkaitan dengan aspek klinis, teknik pembedahan, histologis, epidemiologis dan embriologis dari meningokel. Oi & Matsumoto (1990) menganalisis perbedaan morfologis kasus anensefal dan meningokel, membandingkan proses maturasi neuronal untuk menyempurnakan klasifikasi standar yang telah ada. Hoving (1993) meneliti berbagai aspek meningokel, yaitu : proses separasi ektoderm neural dan ektoderm permukaan setelah penutupan neuropor rostral pada embrio, gambaran klinis, radiologis dan neuropatologis meningokel. Dalam sepuluh tahun terakhir para peneliti mencari basis molekuler defisiensi asam folat yang berupa perubahan gen, disimpulkan terdapat defek beberapa gen, antara lain gen *MTFHR (Methyltetrahydrofolate Reductase)*, *CBS (Cystathion B-Synthetase)* dan terjadinya mutasi gen $677C \rightarrow T$ pada kasus meningokel non-familier (Zittoun, 1998; Eskes, 1998; Fowler *et al.*, 1998; Wilkie & Morris-Kay, 2001)

Secara embriologis ada beberapa teori yang mencoba menjelaskan sebab kegagalan penutupan tabung saraf. Yang banyak dianut para peneliti adalah teori gangguan neurulasi, yaitu tetap bertahannya perlekatan ektoderm neural (saraf) dengan ektoderm epidermis (permukaan) pada garis tengah sewaktu proses organogenesis di awal kehamilan, sehingga terjadi hambatan migrasi sel-sel mesoderm pembentuk tulang di tempat adesi dua lapisan ektoderm tersebut. Keadaan ini menyebabkan di daerah itu tidak ada pembentukan tulang sehingga terjadi defek. Teori ini disebut teori 'non-separasi' dari Sternberg (Hoving, 1993).

Belum ditemukan penjelasan yang menasari tetap melekatnya (non-separasi) kedua lapisan ektoderm. Diduga terdapat peranan substansi mediator berupa beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*). Faktor pertumbuhan yang berfungsi mensintesis jaringan tulang adalah *Transforming Growth Factor- β* (*TGF- β*). khususnya isomer *TGF- β 1* dan *Insulin-like Growth Factor-1* (*IGF-1*) (Canalis *et al.*, 1988; Cohick & Clemmons, 1995; Roth *et al.*, 1997; Sirica, 1996). Pada tingkat molekuler, belum diketahui secara jelas korelasi defisiensi asam folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* dan mekanisme terbentuknya defek pada tulang kepala pasien meningokel. Bila nantinya dapat dijelaskan korelasi defisiensi asam folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1*, maka spektrum pencegahan meningokel dan pengobatan defek tulang kepala pada janin dapat diperluas

Tulang kepala tersusun atas bermacam sel tulang yang terdiri dari osteoblas, khondroblas, osteosit dan khondrosit, serta matriks tulang, yaitu kolagen tipe-1, kolagen tipe-2, osteokalsin, osteospondin, kartilago dan

sebagainya. Fungsi sel tulang dipacu oleh dua faktor pertumbuhan, yaitu *TGF- β 1* dan *IGF-1* (Joyce *et al.*, 1990; Massague *et al.*, 1990; Sirica, 1996; Steed, 1997). Sudah ada beberapa penelitian yang mengungkap aktifitas dua faktor pertumbuhan tersebut dalam memacu pertumbuhan dan pembentukan tulang, misalnya pada kasus kraniosinostosis (sutura sudah mengalami fusi sempurna sebelum waktunya) (Roth, *et al.*, 1997) dan akromegali (Steed, 1997), kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* lebih tinggi dibanding kadarnya yang normal.

Selain berperan dalam proses fertilisasi dan tumbuh kembang (embriogenesis), *TGF- β 1* dan *IGF-1* telah dibuktikan berfungsi sebagai faktor pertumbuhan tulang pada hewan-coba. Kombinasi keduanya yang ditambahkan secara eksogen (aplikasi sistemik) pada kelinci percobaan menyebabkan percepatan penutupan defek kalvaria (Roth *et al.*, 1997), demikian juga halnya bila kedua *growth factor* tersebut diberikan secara aplikasi lokal (Beck *et al.*, 1991) *TGF- β 1* dan *IGF-1* telah pula dibuktikan dapat menstimulasi pertumbuhan tulang baru, baik secara endokondral maupun intramembran (Canalis *et al.*, 1998; Yakar *et al.*, 2002). Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengungkap korelasi kedua faktor pertumbuhan tadi dengan defek tulang pada meningokel.

Yang mendasari terjadinya meningokel adalah fusi tulang kepala tidak sempurna sehingga terbentuk defek. Dapat diduga bahwa pada saat terjadi proses fusi tulang kepala terdapat kekurangan kadar satu atau lebih dari faktor pertumbuhan yang berfungsi untuk menstimulasi sintesis tulang, yaitu *TGF- β 1* dan *IGF-1*. Berhubung terjadinya meningokel ada kaitannya dengan defisiensi

asam folat, maka dapat diduga pula terdapat korelasi defisiensi asam folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk maupun tulang kepala janin, dan dengan lebar defek pada tulang kepala yang mungkin akan terjadi. Oleh karena sampai sekarang belum ada penelitian mengenai korelasi antara defisiensi asam folat dengan perubahan kadar kedua *growth factor* dan jumlah kematian sel (*apoptosis/nekrosis*), serta dengan lebar defek tulang kepala pada meningokel, maka dilakukan penelitian ini untuk menjelaskan masalah dan berbagai dugaan yang telah dikemukakan.

Oleh karena pada manusia secara etis dan medis tidak mungkin dilakukan penelitian dengan memberikan perlakuan defisiensi nutrisi, sebaliknya pada hewan-coba kemungkinan diperoleh cacat bawaan defek tulang kepala kecil sekali, karena kemungkinan meningokel merupakan kelainan yang bersifat *species* atau *strain spesific*, maka penelitian ini akan dilakukan dengan dua macam rancangan, yaitu : eksperimental laboratoris menggunakan hewan-coba tikus dan observasional klinis dengan subyek pasien meningokel.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diungkapkan, dapat disimpulkan rumusan masalah penelitian sebagai berikut :

- 1.2.1 Apakah ada korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus?
- 1.2.2 Apakah ada korelasi diet rendah folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus melalui rendahnya kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus?
- 1.2.3 Apakah ada korelasi kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus?
- 1.2.4 Apakah ada korelasi kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis?
- 1.2.5 Apakah ada korelasi tidak langsung kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek tulang kepala pada pasien meningokel?
- 1.2.6 Apakah ada korelasi kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala di tepi defek dengan lebar defek tulang kepala pada pasien meningokel?

1.3. Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- 1.3.1 Mengungkap korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus.
- 1.3.2 Mengungkap korelasi diet rendah folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus melalui rendahnya kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus.

- 1.3.3 Mengungkap korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* di dalam serum induk tikus dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus.
- 1.3.4 Mengungkap korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis.
- 1.3.5 Mengungkap korelasi tidak langsung kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel.
- 1.3.6 Mengungkap korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala di tepi defek dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

Menemukan konsep baru mengenai terbentuknya defek tulang kepala pada meningokel dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler, yaitu dengan mengungkap bahwa defisiensi asam folat dapat menimbulkan lubang pada tulang kepala penderita meningokel melalui penurunan kadar faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I*. Dengan demikian akan diperoleh bukti bahwa *TGF-β1* dan *IGF-I* adalah substansi mediator bagi terbentuknya defek pada tulang kepala meningokel.

1.4.2 Manfaat praktis

Bila telah dapat dibuktikan bahwa *TGF-β1* dan atau *IGF-I* merupakan substansi mediator bagi terbentuknya lubang tulang kepala pada meningokel, maka :

- a. Kedua faktor pertumbuhan tersebut di masa datang dapat digunakan sebagai substansi baru dalam pencegahan meningokel dan pengobatan defek tulang kepala, bahkan sewaktu pasien masih berada dalam kandungan.
- b. Perlu diperkenalkan dan diperjuangkan penambahan (fortifikasi) asam folat ke dalam bahan-pangan harian yang dikonsumsi secara kontinyu oleh masyarakat, misalnya garam dapur.

1.5 Keterbatasan penelitian

Penelitian ini hendak mengungkap secara lebih mendalam terbentuknya defek tulang kepala pada meningokel dengan mencari hubungan antara faktor yang diduga sebagai penyebab dengan faktor pertumbuhan yang berfungsi mensintesis tulang. Disadari bahwa proses penutupan tabung saraf termasuk fusi tulang kepala terjadi saat trimester pertama kehidupan intrauterin, sehingga sangat sulit untuk menelitinya secara langsung terhadap subyek sewaktu periode awal kehamilan, bahkan dengan penelitian eksperimental pada hewan-coba sekali pun

Insidens meningokel pada manusia hanya sekitar 1-2 dalam 10.000 kelahiran hidup, maka untuk memperoleh kasus baru memerlukan waktu yang lama. Sedangkan pada penelitian dengan hewan-coba, oleh karena insidens cacat ini belum diketahui, maka untuk mendapatkan kasus janin hewan-coba yang lahir dengan meningokel atau *NTD* pada umumnya, juga diperlukan waktu yang lama, dengan derajat defisiensi asam folat yang bervariasi, serta menggunakan hewan-coba yang jumlahnya banyak dan spesies yang beragam. Di samping itu, meningokel mungkin merupakan kelainan bersifat *species* atau

strain specific, yang bisa timbul pada manusia, tetapi mungkin tidak dapat terjadi pada spesies rodensia (termasuk tikus) *strain* tertentu, ataupun hewan spesies lain.

Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan dua macam rancangan, yaitu eksperimental laboratoris dengan subyek hewan-coba tikus, dan observasional klinis dengan subyek pasien meningokel. Dengan cara tersebut diharapkan diperoleh hasil maksimal mendekati yang diharapkan sesuai dengan tujuan penelitian, yaitu mendapatkan penjelasan tentang substansi mediator (*growth factor*) yang menghubungkan defisiensi asam folat dengan terbentuknya defek pada tulang kepala meningokel.

Sebenarnya tidak ada satu jenis hewan-coba pun yang dapat mewakili manusia. Pada penelitian ini dipilih hewan-coba tikus karena spesifikasi hewan ini dalam hal metabolisme sedikit ada kedekatan dengan manusia, yaitu : mamalia, omnivora, dan mudah berkembang biak sehingga oleh para peneliti, tikus dianggap sebagai hewan-coba baku dalam penelitian eksperimental dalam masalah toksikologi, teratologi, onkologi dan nutrisi, dimaksudkan untuk dapat diekstrapolasikan pada manusia.

Penelitian ini juga hanya melibatkan pasien meningokel, yang seharusnya adalah pasien dengan *NTD* berat seperti anensefali atau kraniosisis. Di samping sangat jarang didapat, pasien *NTD* berat umumnya hanya dapat bertahan hidup beberapa jam atau hari dan *unoperable*. sehingga tidak mungkin diambil spesimen jaringan. Pasien spina bifida, di samping juga lebih jarang didapat, pada tindakan operasi tidak dilakukan pengambilan sebagian jaringan tulang.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi meningokel

Meningokel adalah suatu kelainan kongenital berupa penonjolan selaput otak berikut cairan otak lewat defek (lubang) pada tulang kepala. Bila penonjolan tersebut disertai pula dengan jaringan otak, disebut meningoensefalokel atau ensefalokel (Charoonsmith & Suwanwela, 1984; Hoving, 1993). Meningokel merupakan bagian dari kelainan yang disebut *neural tube defects (NTD)* (Acuna, et al., 2000; Boonvisut, 1997; Martinez-Lage, 1996).

2.2 Klasifikasi

Berdasarkan lokasi, meningokel dibagi : frontal, parietal, sinsipital, basal, nasal dan orbital. Pembagian tersebut secara klinis lebih praktis, tetapi tidak menggambarkan secara jelas letak defek tulang kepala. Charoonsmith & Suwanwela (1984) menyusun klasifikasi meningokel berdasar letak defek tulang kepala sebagai berikut :

- a. Meningokel oksipital
- b. Meningokel lengkung kranium : interfrontal, interparietal, temporal, fontanel anterior, fontanel posterior
- c. Meningokel frontoetmoid : nasofrontal, nasoetmoid, nasoorbital
- d. Kraniosisis : celah wajah kranial atas, celah wajah basal, celah oksipitoservikal, akranium dan anensefal.

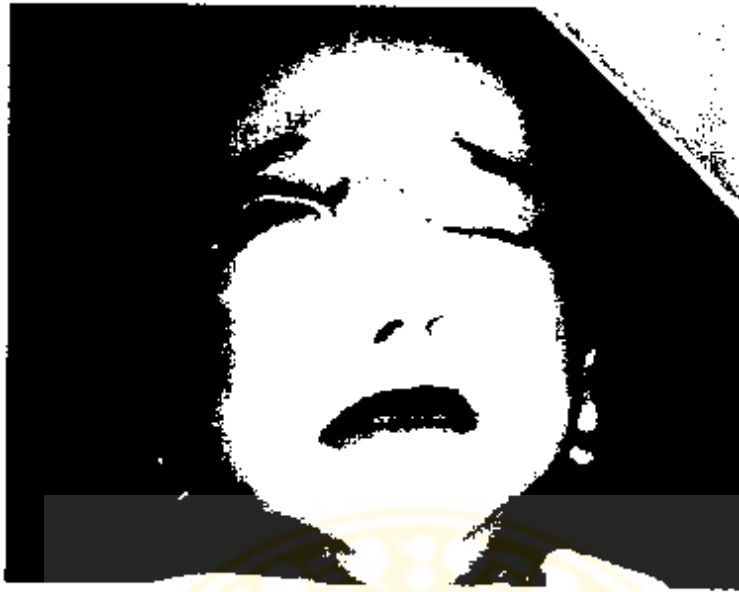




Gambar 2.2.1. Pasien meningokel oksipital



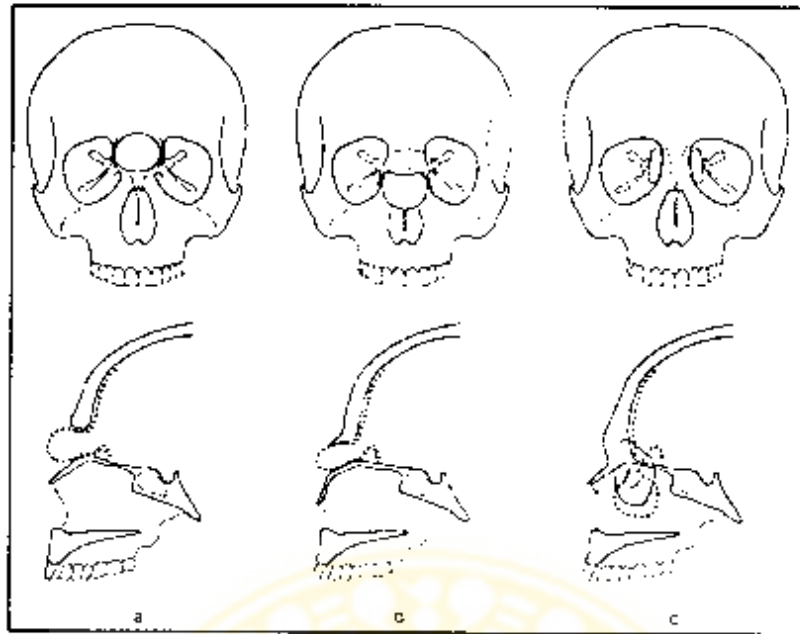
Gambar 2.2.2 Pasien meningokel nasofrontal
(Saiful & Istiadjid.1999)



Gambar 2.2.3 Pasien meningoel nasoorbital



Gambar 2.2.4 Pasien meningoel lumbosakral
(Saiful & Istiadjid, 1999)



**Gambar 2.2.5 Defek tulang pada meningokel
(Hoving, 1993)**

2.3. Epidemiologi

Insidens meningokel mempunyai distribusi geografi yang khas. Di Asia Tenggara, meningokel frontoetmoid mempunyai insidens relatif lebih tinggi dibanding bagian dunia lain. Insidens meningokel di kawasan Asia Tenggara diperkirakan 1-2 kasus per 10.000 kelahiran hidup (Suwanwella, 1972; Hoving 1993) Berikut ini disampaikan berbagai laporan tentang penderita meningokel di beberapa daerah di berbagai kawasan.

Beberapa makalah tentang meningokel telah dipublikasikan di Amerika Serikat, sayang jumlah penderitanya tidak dikaitkan dengan estimasi angka kelahiran di daerah bersangkutan. Ingraham (1943) melaporkan 6 kasus meningokel frontal dari total 84 kasus meningokel yang ada selama 20 tahun di rumah sakit anak Massachusett. Selama periode 36 tahun, di klinik Mayo,

Minnesota. Fisher et al.(1952) menemukan 59 kasus kranium bifidum yang 8 di antaranya berlokasi di bagian frontal kepala. Ingraham & Matson (1954) mengungkapkan 1433 kasus lesi disrafisme, di antaranya terdapat 187 kasus meningokel dengan lokasi 9 nasal, 1 nasofaringeal, 11 frontal, 27 parietal dan 139 oksipital. Dalam periode 20 tahun, di Indianapolis, Mealu et al.(1970) menemukan 67 penderita meningokel, dengan lokasi 55 oksipital, 8 nasofrontal, 3 interparietal dan 1 nasofaringeal (Hoving,1993).

Para peneliti di Eropa Barat, sebagaimana dikutip oleh Suwanwela (1972) dan Hoving(1993), melaporkan kasus-kasus meningokel yang menarik untuk diperbandingkan. Di Negeri Belanda, De Vet (1957) mendapatkan 27 penderita meningokel yang didapatnya selama 20 tahun , dari tahun 1936 sampai tahun 1956 di klinik St. Ursula, Wassenaar. 2 di antaranya berlokasi di nasal. 1 di regio frontal dan sisanya di oksipital. Schmidt dan Luyendijk (1974) mendapatkan 9 kasus meningokel nasal dalam periode 19 tahun, ini merupakan 36% dari jumlah total meningokel.

Beberapa penelitian epidemiologis tentang meningokel di Afrika telah dipublikasikan. Acquaviva et al.(1972) melaporkan 82 kasus meningokel, yang terdiri dari 75 meningokel frontoetmoid dan 7 meningokel basal. Ohaegbulam & Saddeq (1979) memperoleh 29 penderita meningokel dalam periode 5 tahun di Nigeria, terdiri dari 80% oksipital dan 20% frontal. Unuigbo (1977) mendapatkan 5 kasus meningokel di antara 8500 orang suku Igbos Nigeria selama kurun waktu 6 tahun. 3 di antaranya adalah meningokel anterior yang relatif sering terjadi pada kelompok etnis ini. Mabogunje (1990) melaporkan 64 penderita dengan kranium

bifidum di Nigeria Utara yang didapatnya selama 15 tahun, 8 kasus berupa meningokel nasofrontal dan 44 kasus adalah meningokel oksipital. Kalangu et al.(1990) mempublikasikan pengalamannya memeriksa CT-Scan 8 penderita meningokel anterior yang didapatnya selama 5 bulan di Harare, Zimbabwe. Lipschitz et al.(1969) melaporkan 34 kasus dengan meningokel yang didapat selama 2.5 tahun di Soweto, Afrika Selatan. Ketigapuluh empat kasus meningokel tersebut terdiri dari 17 oksipital, 15 frontoetmoidal dan 2 parietal. De Klerk & De Villiers (1973) melaporkan 39 penderita meningokel di rumah sakit Cape Town, antara tahun 1963-1972, delapan belas kasus berlokasi di regio frontalis, 17 di regio oksipitalis dan 4 di regio parietalis (Hoving, 1993).

Di Indonesia sampai saat ini belum ada penelitian tentang prevalensi dan insidens meningokel berdasarkan populasi penduduk di suatu daerah tertentu. Hanya diperoleh informasi bahwa frekuensi meningokel di beberapa klinik bedah saraf di Jawa Timur lebih tinggi daripada di Jawa Tengah. Di Solo dan Semarang, frekuensi meningokel berkisar antara 3%-6%. sedangkan di Surabaya dan Malang antara 8%-9% (Haryo & Istiadjid, 1999). Hidayat (1991) melaporkan insidens kelainan kongenital sistem saraf di RSSA Malang adalah 44,3 per 10.000 persalinan, dan insidens meningokel ada 8.2 per 10.000 persalinan.

Belum diperoleh informasi untuk menjelaskan bahwa kasus meningokel di kawasan Asia Tenggara (ras Mongoloid) lebih banyak terletak di bagian nasofrontal, sedangkan di kawasan yang lain meningokel lebih banyak di regio oksipital, karena banyak faktor yang terlibat (multifaktorial). Salah satu kemungkinan adalah perbedaan bentuk kranium antara ras Mongoloid yang relatif bulat

(brakhisefal) dan bermacam ras di Asia Tengah (Semit), Afrika (Negroid), Eropa, Amerika dan Australia (Kaukasoid) yang lonjong (dolikhosefal) berdampak pada perbedaan tumpuan tekanan jaringan otak terhadap dasar tengkorak (Agthong & Wiwanikit, 2002; Boonvisut *et al.*, 1998).

Menurut Loekito (1992) bermacam bentuk kepala dapat ditentukan dengan pengukuran indeks kepala (*index cephalicus*). Indeks kepala adalah lebar kepala dibagi panjang kepala, dikalikan 100. Lebar maksimal kepala adalah jarak terlebar kepala, diukur tegak lurus dengan bidang medial sagital tengkorak (antara eurion kanan dan eurion kiri), sedangkan panjang maksimal kepala adalah jarak dari glabella sampai titik paling dorsal pada os oksipitalis di garis median (opistokranion). Berdasarkan indeks ini Saller membedakan bentuk kepala sebagai berikut (Loekito, 1992) :

	Laki-laki	wanita
hiperdolikhosefal	s/d 70.9	s/d 71.9
dolikhosefal	71.0 s/d 75.9	72.1 s/d 76.9
mesosefal	76.0 s/d 80.9	77.0 s/d 81.9
brakhisefal	81.0 s/d 85.4	82.0 s/d 86.4
hiperbrakhisefal	85.5 s/d 90.9	86.5 s/d 91.9
ultrabrakhisefal	di atas 91	di atas 92

2.4. Embriologi

2.4.1 Pembentukan *neural tube*

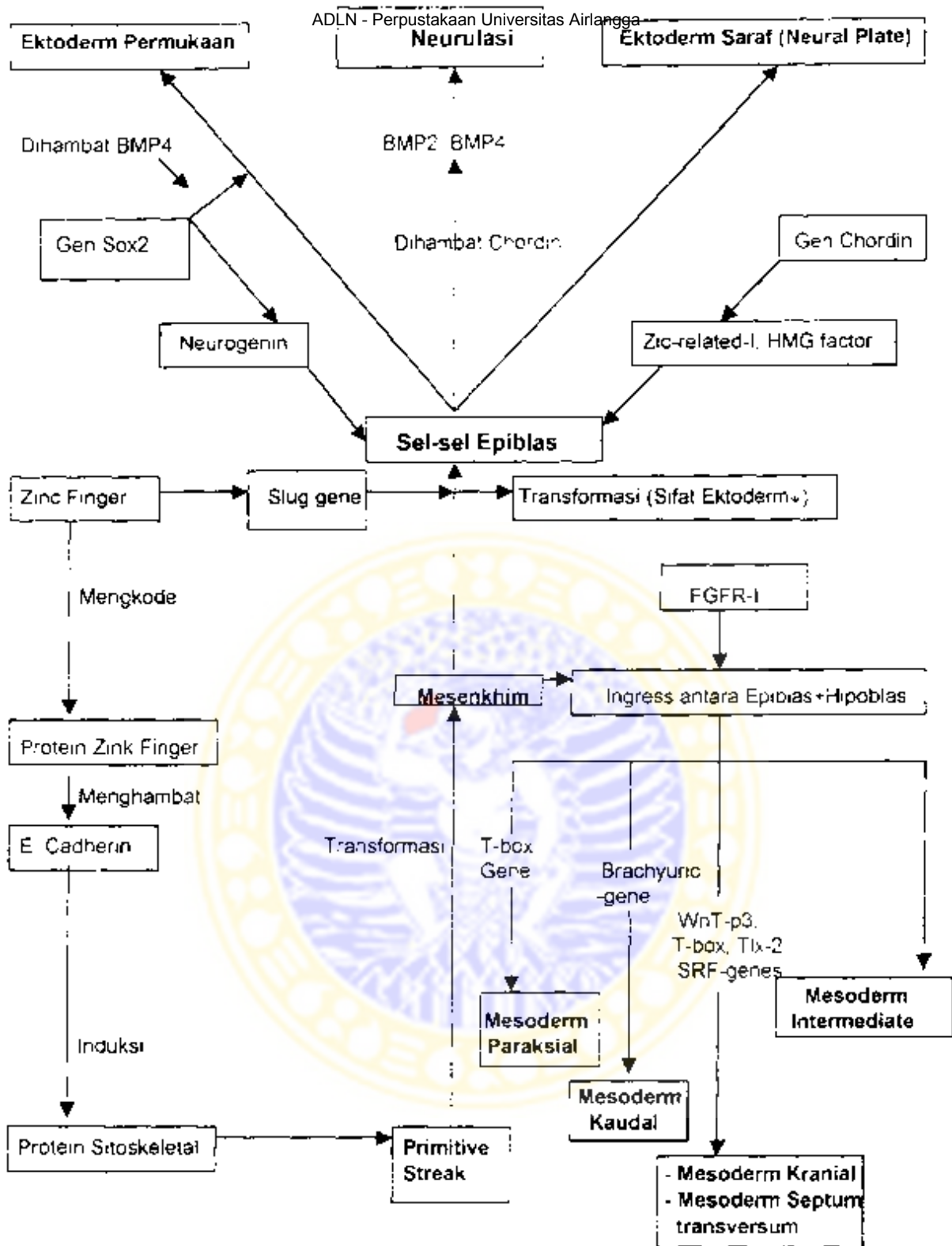
Susunan saraf pusat timbul pada minggu ketiga embrional, berbentuk sebagai lempeng penebalan ektoderm berbentuk kasut, disebut lempeng saraf (*neural plate*). Lempeng itu terletak pada daerah dorsal, di tengah dan depan blastoporus. Tepi lateral lempeng ini segera meninggi untuk membentuk dua lipatan saraf (*neural fold*) (Larsen, 2001; Sadler, 1995).

Pada perkembangan selanjutnya, lipatan saraf makin meninggi, saling mendekati garis tengah dan akhirnya bersatu, dengan demikian terbentuklah tabung saraf (*neural tube*). Penyatuan dimulai pada daerah leher, berlangsung ke arah sefalik dan kaudal dengan pola yang tidak teratur. Pada ujung kaudal dan kranial janin, penyatuan tersebut agak tertunda, sehingga neuroporus anterior dan posterior untuk sementara menghubungkan rongga tabung saraf dengan rongga amnion. Penutupan neuroporus anterior terjadi pada hari ke-25 kehidupan embrio sedangkan neuroporus posterior menutup kira-kira dua hari kemudian (Jurloff & Harris, 2000; Larsen, 2001; Sadler, 1995).

Pada mamalia penutupan tabung saraf terjadi pada beberapa tempat sepanjang aksis antero-posterior. Kegagalan penutupan pada neuroporus posterior menyebabkan spina bifida, sedangkan kegagalan penutupan bagian anterior tabung saraf mengakibatkan anensefalus, eksensefalus, ensefalokel atau meningokel (Agthong & Wiwanitkit, 2002; Jurloff & Harris, 2000).

Sel-sel *neural plate* menyusun neuroektoderm, dan induksi mereka mengawali peristiwa yang disebut proses neurulasi. Induksi sel adalah suatu proses yang rumit, melibatkan stimulasi sekelompok sel terhadap jaringan sekitar. Proses ini berulang-ulang terjadi selama organogenesis. Sinyal dari proses dan bermacam gen yang mengatur peristiwa ini belum jelas diketahui. Berbagai molekul pemberi-sinyal diduga adalah anggota dari superfamili *transforming growth factor- β* (*TGF- β*), termasuk *activin* dan *fibroblast growth factors* (*FGF*).

Meskipun demikian, berbagai molekul pemberi-sinyal itu telah diidentifikasi dan dapat berperan sebagai *morphogens*. Contoh molekul dengan aktivitas seperti-morphogen (*morphogen-like activity*) adalah asam retinoat, neurotransmitter, dan produk dari *Wnt genes*. *Morphogens* memicu kaskade peristiwa perkembangan sel dan pada banyak kasus, proses awalnya adalah aktivasi *homeobox genes*. Berbagai gen tersebut berfungsi sebagai penyandi faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen lain (Sadler, 1995).



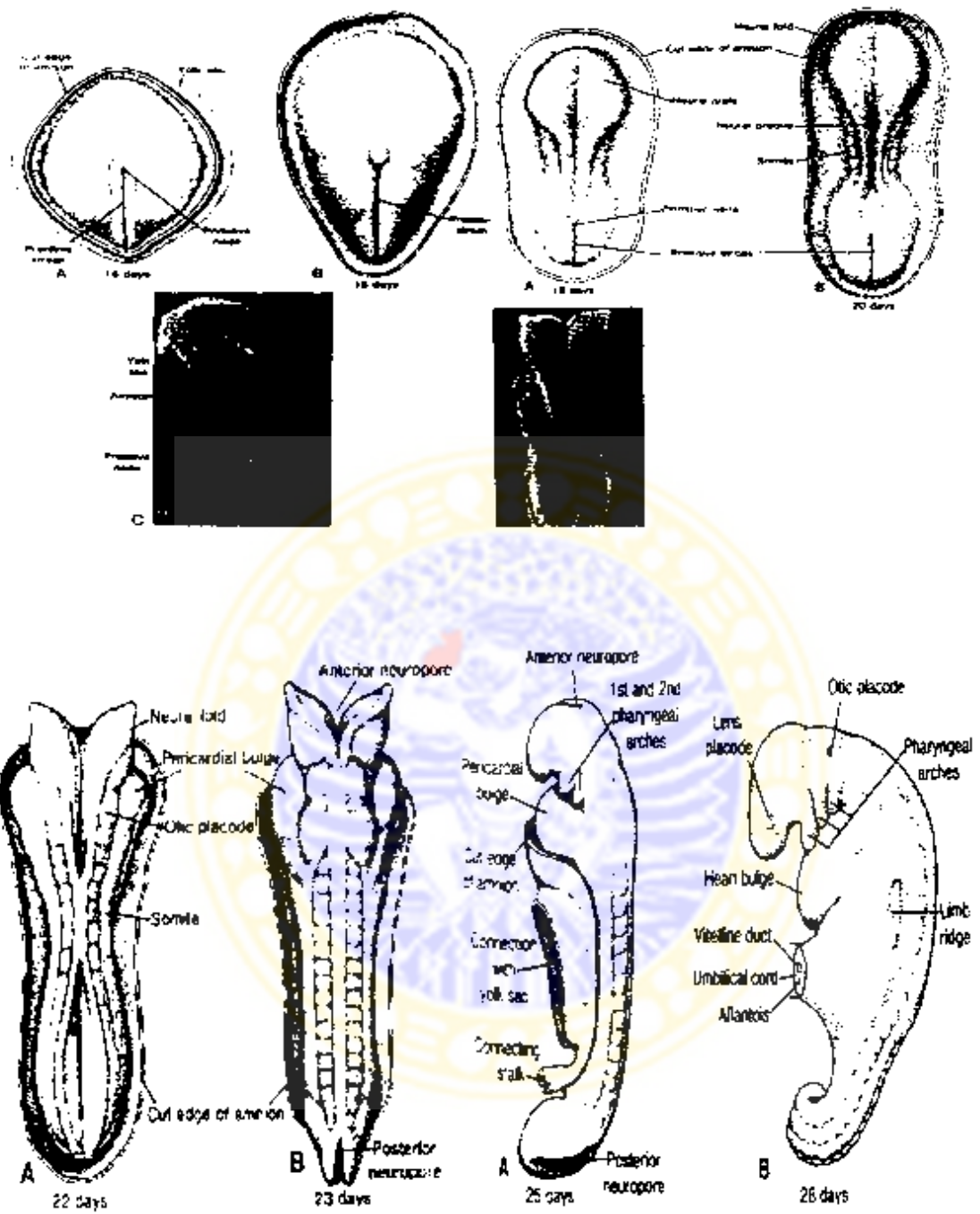
Gambar 2.4.1 Pembentukan Ektoderm, Mesoderm dan Kaskade Gen (Larsen, 2001)

Proses pertumbuhan embrio manusia disebut epigenesis. Sel-sel epiblas membentuk *primitive streak* melalui proses involusi, dan segera bertransformasi dari berbagai sel apitelial menjadi berbagai sel mesenkhimal. Gen yang menghambat karakteristik ektoderm dalam berbagai sel mesenkhim dari *primitive streak* adalah gen *slug*, suatu faktor transkripsi *zink finger*. Dalam keadaan demikian, ekspresi berbagai molekul adesi sel-ke-sel seperti E-Cadherin sementara terhenti, sedangkan ekspresi protein sitoskeletal (vimentin) berjalan terus. Transformasi sel epiblas dari epitelial ke mesenkhimal merupakan awal kemampuan sel tersebut untuk *ingress* atau bermigrasi lewat *primitive streak* ke dalam ruang antara epiblas dan hipoblas, membentuk lapisan endoderm dan mesoderm definitif. Disini terlibat aksi beberapa macam gen, seperti *Rho gene*, *Ras gene*, dan *Rac1* serta bermacam *growth factor*, *transcription factor* dan *adhesion / counteradhesion factor*. Contohnya adalah *fibroblast growth factor receptor-1(FGFR-1)*. Bila ekspresi beberapa macam gen tadi terhambat, sejumlah sel akan terakumulasi dan mati di dalam ruang antara epiblas dan hipoblas (Larsen, 2001).

Perkembangan mesoderm intra-embriionik juga dipengaruhi banyak gen. Gen-gen *T-box* berperan dalam penyusunan dan diferensiasi mesoderm pada mamalia. Gen *Tbx-6* dibutuhkan untuk pembentukan mesoderm paraksial. Produk yang dikode oleh gen *brachyury* atau *T gene* diperlukan untuk menyusun mesoderm kaudal, termasuk notochord. Penyusunan mesoderm kranial mungkin diatur oleh gen *f-box* lain, yaitu , *Wnt-13*, *Tlx-2* dan *serum respons factor (SRF)*.

Mesoderm *intermediate* diatur oleh *fibroblast growth factor-9 (FGF-9)* (Larsen, 2001; Wilkie & Morriss-Kay, 2001).

Sejumlah sel yang pada saat gastrulasi tetap berada di dalam epiblas akan tumbuh menjadi ektoderm permukaan (epidermis) dan ektoderm saraf (neural). Perkembangan dari epiblas menjadi bermacam jenis jaringan diatur oleh berbagai faktor induktif dan supresif. Sebagai contoh, protein yang dikode oleh gen *chordin* menginduksi ekspresi faktor transkripsi *zinc-finger*, yaitu *zic-related-1 (zic-r1)*, dan suatu *Sry-related HMG factor*, *Sox-2*, yang pada gilirannya dibutuhkan untuk aktivasi gen *neurogenin*. Sebaliknya, protein *bone morphogenetic* yang dikode oleh *BMP-4* menghambat ekspresi *zic-r1* dan *Sox-2* pada saat penyusunan ektoderm permukaan. Disamping itu, *chordin*, *noggin*, *gremlin* dan *follicle-stimulating hormone* menghambat sinyal *BMP-2* dan *BMP-4* dalam neurulisasi epiblas. Penghantar (*inducers*) langsung perkembangan *neural plate* adalah antara lain *geminin* dan *FGF-2*. *Geminin* menghantar ekspresi *neurogenin-related-1 factor* dalam perkembangan sistem saraf. Demikian halnya, *FGF-2* menghantar ekspresi gen-gen *orthodentical-related (Otx-1 dan Otx-2)* yang berperan sebagai pusat organisasi selama periode gastrulasi dan perkembangan neural (Larsen, 2001; Wilkie & Morriss-Kay, 2001).



Gambar 2.4.2 Pembentukan *Neural Tube* (Sadler, 1995)

2.4.2 Pembentukan tulang tengkorak

Sistem skeletal berkembang dari lempeng (*plate*) mesoderm paraksial dan lateral (lapisan somatik) serta dari *neural crest* (krista neuralis). Mesoderm paraksial menyusun rangkaian jaringan menempati tiap sisi dari *neural tube*, dikenal sebagai somitomer pada regio kepala dan pada regio kaudal oksipital. Somit berdiferensiasi menjadi bagian ventromedial disebut sklerotom dan bagian dorsolateral disebut dermatomiotom. Pada akhir minggu ke-empat, sel sklerotom menjadi polimorf dan membentuk jaringan ikat longgar, dikenal sebagai mesenkhim atau jaringan ikat embrional. Sel-sel mesenkhimal bermigrasi dan berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel, yaitu fibroblas, khondroblas dan osteoblas (sel-sel pembentuk tulang) (Sadler, 1995).

Sel *neural crest* di regio kepala berdiferensiasi menjadi mesenkhim dan ikut serta dalam pembentukan tulang tengkorak dan wajah. Somit dan somitomer oksipital juga berperan dalam penyusunan kalvaria dan basis kranii. Pada tulang pipih kepala (kalvaria), mesenkhim berdiferensiasi langsung menjadi tulang, suatu proses yang disebut sebagai 'osifikasi membranous'. Sebaliknya pada kebanyakan tulang, sel-sel mesenkhim pada awalnya berubah menjadi model kartilago-hialin, yang pada gilirannya mengalami 'osifikasi secara endokondral' (Sadler, 1995; Larsen, 2001).

Pada awalnya lapisan mesoderm membentuk lembaran tipis jaringan ikat longgar pada kedua sisi garis tengah. Menjelang sekitar hari ke-17, sebagian sel di dekat garis tengah akan berkembang dan membentuk mesoderm paraksial. Di sebelah lateral, lapisan mesoderm tetap tipis dan disebut lempeng lateral yang

dalam perkembangan berikutnya akan pecah menjadi dua lapis. Satu lapis bergabung dengan mesodermal yang melapisi amnion, disebut sebagai lapisan mesoderm somatik atau parietal yang nantinya akan membentuk dinding lateral dan ventral tubuh. Satu lapis lagi akan bergabung dengan mesoderm yang melapisi kandung kuning telur, disebut lapisan mesoderm splanknik atau viseral. Jaringan yang menghubungkan mesoderm paraksial dengan mesoderm lempeng lateral, disebut mesodermal *intermediate*, yang kelak menjadi nefrotom (O'Rahilly & Muller, 1992; Sadler, 1995).

Sel epiteloid yang membentuk dinding ventral dan medial somit kehilangan bentuk epitelnya menjadi polimorf dan berpindah mengelilingi korda dorsalis pada permulaan minggu ke-empat. Kelompok sel ini membentuk jaringan ikat longgar yang dikenal sebagai mesenkhim yang nantinya menjadi pembentuk kerangka tubuh dan tulang tengkorak. Dinding dorsal somit yang masih tertinggal disebut dermatom, yang akan menjadi miotom (benih otot), dermis dan jaringan subkutan (Larsen, 2001; O'Rahilly & Muller, 1992; Sadler, 1995).

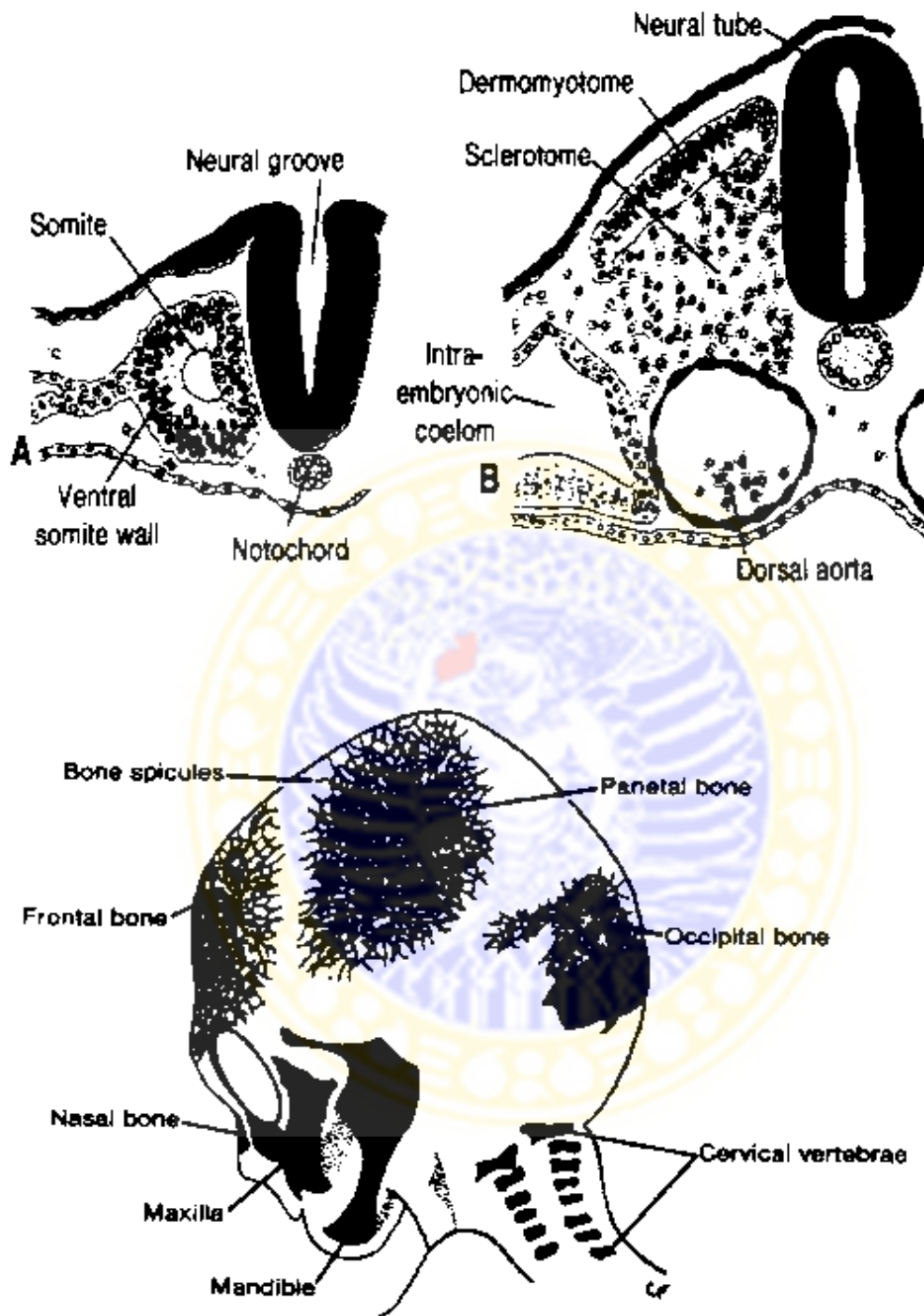
Pembentukan tulang tengkorak bermula dari lapisan benih mesoderm yang nampak selama perkembangan embrional minggu ketiga. Kemampuan mesenkhim untuk membentuk tulang tidak terbatas dari sel sklerotom saja, tetapi terjadi juga pada lapisan mesoderm somatik dinding tubuh tempat tulang iga terbentuk.

Tulang tengkorak terdiri dari neurokranium dan viserokranium. Neurokranium merupakan tulang pelindung otak, sedangkan viserokranium merupakan tulang yang menyusun wajah. Neurokranium dibagi menjadi dua bagian, yaitu (Larsen, 2001; O'Rahilly & Muller, 1992; Sadler, 1995):

1. Bagian membranosa yang terdiri atas beberapa tulang pipih seperti os frontal, os parietal, os temporal dan os oksipital yang mengelilingi otak sebagai suatu kubah.
2. Bagian kartilaginosa atau khondrokranium, yang membentuk tulang dasar tengkorak.

Viserokranium terdiri atas beberapa tulang wajah yang berkembang dari tulang rawan hialin yang berasal dari lengkung insang pertama dan kedua. Tulang kepala sebagian dibentuk oleh sel krista neuralis, yang berdiferensiasi menjadi sel mesenkhim (O'Rahilly & Muller, 1992; Sadler, 1995).





Gambar 2.4.3 Pembentukan Tulang Tengkorak (Sadler, 1995)

2.5 Etiologi meningokel

Sampai dengan saat ini etiologi pasti meningokel masih belum diketahui karena tidak ada faktor tunggal sebagai kunci penyebab. Etiologi mungkin merupakan gabungan dari banyak faktor sebagai berikut : keturunan, lingkungan geografi, bulan konsepsi, usia maternal, kondisi sosial ekonomi, diet maternal, usia ibu, obat-obatan dan pencemaran beberapa zat tertentu (Hoving, 1993).

Telah disimpulkan tiga faktor utama penyebab meningokel, yaitu : 1) faktor genetik, 2) faktor teratogenik dan 3) faktor nutrisi. Dapat dikatakan bahwa etiologi meningokel adalah multifaktorial dan poligenik. Dari ketiga faktor tadi, defisiensi nutrisi khususnya asam folat merupakan faktor penyebab yang paling banyak disepakati (Boonvisut *et al.*, 1998; Daly *et al.*, 1997; Hall & Solehdin, 1998).

2.5.1 Faktor genetik

Faktor genetik bukan merupakan faktor primer penyebab meningokel. Kombinasi antara lingkungan intrauterin termasuk defisiensi nutrisi dengan didapatkannya defek gen dominan tertentu menyebabkan kemungkinan timbulnya meningokel menjadi lebih besar. Beberapa studi kasus yang pernah dilakukan jarang sekali didapatkan adanya hubungan famili di antara penderita meningokel (Hoving, 1993; Sarful & Istiadjid, 1999)

2.5.2 Faktor teratogen

Zat teratogen yang diperkirakan menjadi penyebab meningokel adalah salisilat, fenitoin, hipervitaminosis-A, infeksi jamur pada makanan, serta sinar ronsen. Tiga zat pertama menginduksi timbulnya meningokel di daerah parietal

dan oksipital, sedangkan sinar ronsen pada manusia diduga dapat mengakibatkan meningokel intranasal (Hall&Solehdin.1998; Hoving, 1993).

2.5.3 Faktor nutrisi

Para peneliti umumnya sependapat bahwa faktor lingkungan merupakan etiologi terpenting pada meningokel. Diet kurang asam folat dan *zink* pada ibu selama periode kritis pertama kehamilan dan kontaminasi fungus pada makanan akibat tingginya kelembaban udara selama musim hujan, dilaporkan berperan dalam terjadinya meningokel. Sekitar 70% kasus *NTD* dapat dicegah dengan pemberian suplemen vitamin (Daly *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2001; Hall & Solehdin, 1998; Smitchells *et al.*, 1982).

Defisiensi elemen nutrisi, khususnya asam folat, pada awal kehamilan merupakan salah satu faktor etiologi yang banyak dikaitkan dengan meningokel. Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya hambatan penutupan tabung saraf saat kehidupan embrional. Zat makanan yang bersifat antagonis vitamin, misalnya: alkohol dan jamur, juga berperanan. Terdapat hubungan yang erat antara defisiensi asam folat dan antagonis vitamin dengan timbulnya defek tulang kepala. Proses kehamilan sendiri juga potensial menyebabkan defisiensi nutrisi, yaitu bila ada *nausea dan vomitus* (Eskes *et al.*, 1998; Hall & Solehdin, 1998; Hoving, 1993).

2.6 Teratologi meningokel

Banyak teori yang berusaha menjelaskan proses teratologi meningokel. Pada garis besarnya teori tersebut dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu :
1) gangguan neurulasi dan 2) gangguan post-neurulasi.

2.6.1 Gangguan neurulasi

Teori gangguan neurulasi pertama kali dikemukakan oleh Sternberg pada tahun 1929. Dinyatakan bahwa lokasi penutupan akhir dari neuropor rostral terletak di garis tengah, tepat sebelah kranial dari plakode nasal (*Riechfeldern*). Area ini nantinya se-level dengan area triangularis, yang pada akhir perkembangan nantinya disebut glabella (Hoving, 1993). Berdasarkan penemuan embriologis tadi diformulasikan teori patogenesis meningokel fronto-etmoid sebagai berikut. Hubungan yang tetap bertahan antara ektoderm neural (otak) dan ektoderm permukaan (epidermis) pada garis tengah disebabkan oleh defek atau keterlambatan (*delay*) penutupan neuropor rostral di tempat akhir penutupan yang nantinya disebut foramen caecum. Migrasi sel mesoderm pembentuk tulang kepala di antara ektoderm saraf dan ektoderm permukaan di garis tengah akan terhambat pada tempat adesi tersebut (O'Rahilly & Muller, 1992; Hoving, 1993).

Dengan demikian defek struktur tulang mesodermal di garis tengah pada meningokel dapat dijelaskan. Sternberg menyimpulkan bahwa gangguan primer penutupan bagian rostral neuropor, secara sekunder berakibat kelangkaan jaringan mesodermal pada garis tengah di tempat tersebut. Ide dasar gangguan penutupan *neural tube* dalam kaitannya dengan teratogenesis meningokel tersebut dikemukakan pula oleh beberapa peneliti lain (Naim-Ur-Rahman, 1979;

Smith *et al.*, 1981; O'Rahilly & Muller, 1992). Lapisan ektoderm di tempat itu mensekresi *ligand* superfamili *TGF- β* . Zat ini mempengaruhi aktivitas banyak sel di lempeng atap, yang juga mulai mengekspresikan *ligand TGF- β* tertentu (Gonias *et al.*, 2000).

2.6.2 Gangguan post-neurulasi

Gangguan post-neurulasi kemungkinan meliputi lima proses, yaitu :

a. Adesi sekunder antara ektoderm saraf dan ektoderm permukaan.

Bila ada sebuah titik lemah pada kranium, maka di tempat itu akan timbul hambatan dalam perkembangan tulang tengkorak. Adesi antara kulit, duramater dan otak akibat tekanan intrauterin menyebabkan penonjolan, sehingga terbentuk meningokel.

b. Pembukaan kembali (*reopening*) tabung saraf

Padgett (1970) mengemukakan bahwa neurosisis disebabkan oleh adanya defek tabung saraf. Kasus ensefalokraniosisis dan mielo(rakhi)sisis juga terbukti sebagai akibat lain dari kegagalan penutupan tabung saraf embrional atau dari pembukaannya kembali setelah proses penutupan (Hoving, 1993).

c. Distensi berlebihan tabung saraf akibat hidrosefalus

Karena banyak kasus meningokel yang berhubungan dengan ventrikel otak, diperkirakan meningokel terjadi karena pembesaran hidrosefalus. Distensi berlebihan yang progresif pada bagian rostral tabung saraf akan mengakibatkan kranium fenestrum, kranium bifidum dan eksensefalus (Hoving, 1993).

d. Ketidakseimbangan mesodermal primer

Teori ketidakseimbangan ini digunakan untuk menerangkan berbagai penyakit defek mesodermal termasuk defek tengkorak. Tidak terbentuknya duramater dan adanya perbedaan tekanan antara kompartemen intravaskuler pembuluh darah otak dan cairan amnion akan menyebabkan penonjolan otak melalui lubang pada tengkorak (O'Rahilly & Muller, 1992; Hoving, 1993).

e. Gangguan perkembangan foramen coecum

Holl pada tahun 1993 mendiskripsikan bahwa pertemuan mesodermal antara duramater intrakranial (falk) dan fontikulus nasofrontalis terjadi pada bakal foramen coecum. Pada meningokel, defek kepala di tempat ini diyakini sebagai gangguan primer dalam perkembangan foramen coecum (Hoving, 1993).

Teori non-separasi Sternberg memandang gangguan pada pemisahan ektodermal saraf dan ektodermal epidermis sebagai dasar patogenesis anomali di garis tengah tengkorak, termasuk meningokel. Dengan pemeriksaan histologis dapat diketahui pemisahan lapisan ektoderm saraf dan ektoderm permukaan. Selain itu juga diamati bermacam lapisan dalam *cele* (tonjolan) dan juga adanya jaringan otak dalam *cele*. Pemisahan membrana basalis dari lapisan ektodermal saraf dan epidermis di garis tengah merupakan tahap akhir dari penutupan lipatan neural, yang terjadi mulai dari penutupan neuroporus anterior (neuroporus rostral) pada usia 19 sampai 27 hari usia kehamilan. Di prosensefalon, aktivitas itu tidak ada sewaktu tahap pemisahan kedua epitel, tetapi degenerasi sel dapat membantu terjadinya pemisahan antar membrana basalis yang semula bersatu (Hoving, 1993).

Ektoderm saraf dan ektoderm permukaan dihubungkan oleh beberapa lamina yang terbentuk dari jaringan khorda. Untuk yang di garis tengah, dihubungkan oleh perluasan jaringan khorda dan tonjolan sitoplasma. Bila banyak sel mati maka akan terbentuk *apoptotic bodies* yang mengisi ruangan bebas-sel di membrana basalis, berakibat tertimbunnya *apoptotic bodies* tersebut. Hal ini yang memunculkan suatu hipotesis mengenai peran degenerasi sel pada proses pemisahan membrana basalis (O'Rahilly & Muller, 1992; Sadler, 1995).

Di samping itu, aktivitas kista neuralis (*neural crest*) yang terjadi sebelum, selama, dan sesudah adesi prosensefalon mendukung dan berkaitan dengan proses pemisahan ektoderm neuralis dan ektoderm spidermis. Gangguan pemisahan ektoderm neuralis dan ektoderm epidermis dapat dipandang sebagai dasar patogenesis anomali di garis tengah tengkorak, khususnya meningokel. Gangguan pertumbuhan septum hidung serta pembentukan hidung berikutnya dapat berperan pada proses hemiasi yang mengakibatkan terjadinya meningokel.

Kemungkinan lain, awal terjadinya meningokel yaitu adanya kegagalan fusi dari berbagai macam tulang di frontal basis (yaitu os frontalis, os etmoidal, os nasal dan tulang orbita), yang juga merupakan batas tulang intramembranous dan tulang endokondral, sehingga lebih mudah terbentuk defek. Secara embriologis, kegagalan fusi tersebut akibat dari gangguan dari stadium post-neurulasi, yaitu pertumbuhan tulang di daerah tersebut terhenti dan kemudian membuka kembali (teori *reopening of neural tube*) (O'Rahilly & Muller, 1992; Hoving, 1993).

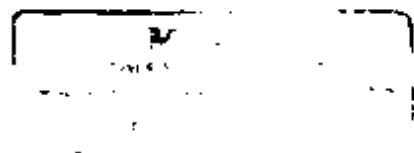
2.7 Protein-protein pembentuk tulang

Protein sangat diperlukan dalam proses pembentukan jaringan, karena berbagai macam protein struktural dan fungsional ikut mengambil bagian di hampir semua proses dalam sel. Protein struktural terdapat dalam membran, serabut kontraktif dan filamen intraseluler. Protein fungsional seperti enzim, *DNA* dan *growth factor* sangat dibutuhkan sebagai katalisator dan pemacu sintesis berbagai senyawa kimia untuk kehidupan (Emery, 1992; Suryo, 1997).

Protein dibuat dari suatu seri asam amino. Gabungan dari dua asam amino disebut dipeptida, sedangkan gabungan dari banyak asam amino disebut polipeptida. Polipeptida yang mempunyai berat molekul lebih dari 10 kDa, adalah suatu protein (Suryo,1997). Beberapa protein yang berperan dalam sintesis tulang adalah :

2.7.1 *Transforming Growth Factor- β* (*TGF- β*)

TGF- β adalah suatu *growth factor* dua rantai polipeptida dengan berat molekul 25 kDa. Faktor pertumbuhan ini beraksi multifungsional, mempengaruhi banyak macam sel, menstimulasi diferensiasi, proliferasi dan adesi setiap sel target. Umumnya *TGF- β* merupakan stimulus bagi sel mesenkhimal (mesodermal) dan inhibitor bagi sel epitelial dan neuroektodermal. Beberapa reseptor spesifik terhadap protein ini telah ditemukan di hampir seluruh jenis sel mamalia dan efek molekul ini bervariasi tergantung jenis sel dan tingkat pertumbuhan (Gonias *et al.*,2000; Vinals & Pouyssegur, 2001). Efek adesinya adalah mengontrol pembentukan kolagen dan berbagai komponen matriks ekstrasel seperti laminin, integrin, trombospondin, tenaskin dan fibronektin. Aksi *TGF- β*



dipengaruhi ikatannya terhadap berbagai reseptor permukaan sel (Cheifetz, *et al.*, 1999; Sirica, 1996). *TGF- β 1* terkandung dalam konsentrasi tinggi pada *platelet* manusia dan tulang mammalia, tetapi diproduksi pula oleh beberapa sel jaringan lain dalam jumlah yang lebih sedikit (Cheifetz *et al.*, 1999).

TGF- β memiliki banyak peran pada sel kultur, antara lain stimulasi pergerakan dan proliferasi pada jenis sel tertentu, sedangkan untuk jenis sel lain, faktor pertumbuhan ini bersifat menghambat. Dengan demikian, *TGF- β* mempunyai efek paradoksikal, sebagai contoh: *in vivo* dia menstimulasi angiogenesis, sedangkan *in vitro* dia menghambat proliferasi dan motilitas sel endotel. Dari lima bentuk *TGF- β* , *TGF- β 1* memiliki efek menghambat aktivitas sel endotel, sedangkan *TGF- β 2* sampai dengan *TGF- β 5* tidak memiliki aksi tersebut. Efek *TGF- β* ini tergantung pada komposisi matriks ekstrasel yang mendukung sel kultur. *TGF- β* menginduksi pembentukan jaringan kapiler dari sel-sel endotel dalam tiga dimensi yang tumbuh dalam jel kolagen, tetapi bukan sel endotel yang tumbuh di atas kultur jaringan elastik (Gonias, *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1997).

Terdapat dua macam *TGF*, yaitu *TGF- α* dan *TGF- β* , yang tidak ada hubungannya secara struktural maupun fungsional. Faktor pertumbuhan ini dapat mengubah fenotipe setiap sel yang terstimulasi. Semua sel mempunyai reseptor untuk *TGF- β* dan secara potensial dapat merespons faktor pertumbuhan ini. *TGF- β* dapat menstimulasi sintesis kolagen, proteoglikan, elastin dan fibronektin (Joyce *et al.*, 1990; Steed, 1997). *TGF- β* telah terbukti merupakan mitogen yang poten bagi makrofag, sel otot polos dan osteoblas. Sebaliknya, faktor per-

tumbuhan ini beraksi inhibitor bagi pertumbuhan sel endotel, beberapa jenis sel epitel dan limfosit di dalam kultur. Faktor pertumbuhan ini terikat dengan protein-pengikat terlarut seperti decorin, α 2-makroglobulin, betaglikan, trombospondin dan α -fetoprotein (Sirica,1996; Comper,1996). *TGF- β* dapat secara langsung mengatur sintesis bermacam-macam molekul dalam matriks ekstrasel, termasuk kolagen, fibronektin, elastin dan glikosaminoglikan, tetapi secara simultan dapat menghambat pergantian matriks ekstrasel dengan menginduksi "*tissue inhibitor of metalloproteinase*" (*TIMP*) (Sirica,1996; Vinals & Pouyssegur,2001)

TGF- β 1 merupakan faktor pertumbuhan yang terbanyak ditemukan pada matriks tulang, dikeluarkan pada saat ada resorpsi tulang, berfungsi memperkuat aktivitas osteoblas untuk meningkatkan sintesis kolagen dan meningkatkan kecepatan aposisi tulang serta menghambat diferensiasi osteoklas, sehingga *growth factor* ini berperan dalam mengkoordinasi *remodeling* tulang (Cohen *et al.*, 1992).

TGF- β 1 adalah modulator penting dalam respons imun, baik seluler maupun humoral. Sitoken ini menghambat aktivitas B-limfosit, *T helper* dan T-limfosit sitotoksik, thimosit, sel *natural killer* (NK) serta sel *lymphokine-activated killer* (LAK), monosit dan sejumlah tipe sel hematopoetik. Sebaliknya, *TGF- β 1* beraksi stimulan dalam mengaktivasi makrofag untuk mensekresi beberapa *growth factor*, dan bekerjasama dengan IL-2 dan IL-5, faktor pertumbuhan ini mengendalikan sekresi IgA oleh B-limfosit aktif (Cheifetz *et al.*, 1999; Massague *et al.*, 1998). *TGF- β* juga berperan dalam mengkoordinasi morfogenesis dan

remodeling jaringan mesenkhim selama pertumbuhan embrional (Margawati, 1999. Nowak *et al.*, 1999).

Aktivitas *TGF- β* dikontrol dan dirangsang oleh hormon paratiroid (*PTH*). *TGF- β* adalah stimulator terkuat pada pembentukan tulang, didapatkan dalam kadar 0.1 mg/kg, dan tulang merupakan sumber terbesar *TGF- β* di dalam tubuh. Selain atas rangsangan hormon paratiroid, aktivitas *TGF- β* dipengaruhi pula oleh Interleukin-1(*IL-1*) dan vitamin-D (Cohen *et al.*, 1992; Comper, 1996; Sirica, 1996).

Salah satu substansi yang merupakan superfamili dari *TGF- β* adalah *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, terdiri dari BMP-1 sampai dengan 7; hanya BMP-1 yang struktur proteinnya berbeda. *BMP* mempunyai kemampuan untuk menginduksi sel jaringan ikat mesenkhimal menjadi sel osteoprogenitor pembentuk tulang, sehingga *BMP* mempunyai aksi osteoinduktif (Cohen *et al.*, 1992). *BMP* mempunyai aktivitas yang sama dengan *TGF- β 1*, yaitu menginduksi pembentukan tulang ectopik bila berada dalam matriks tulang yang mengalami demineralisasi. Induksi tersebut berlanjut melalui granulasi, khondrogenesis, pembentukan osteoid (*bone matrix* yang tidak bermineral) dan kalsifikasi (Sirica, 1996).

Aksi *TGF- β 1* dimediasi oleh ikatannya terhadap kompleks reseptor permukaan sel. Kebanyakan sel memiliki tiga kelas ukuran satuan ikatan (*binding subunit*) terhadap *TGF- β 1* atau *TGF- β 2*, yaitu satuan ikatan reseptor tipe-I (53 kDa), tipe-II (70-85 kDa) dan tipe-III (250-350 kDa). Reseptor tipe-III adalah proteoglikan kondroitin/heparin-sulfat (betaglikan) yang ada dalam bentuk ikatan membran maupun larutan, mengikat *TGF- β 1* dan *TGF- β 2* dengan afinitas yang sama, tetapi memiliki *domain* sitoplasmik yang sangat pendek sehingga tidak

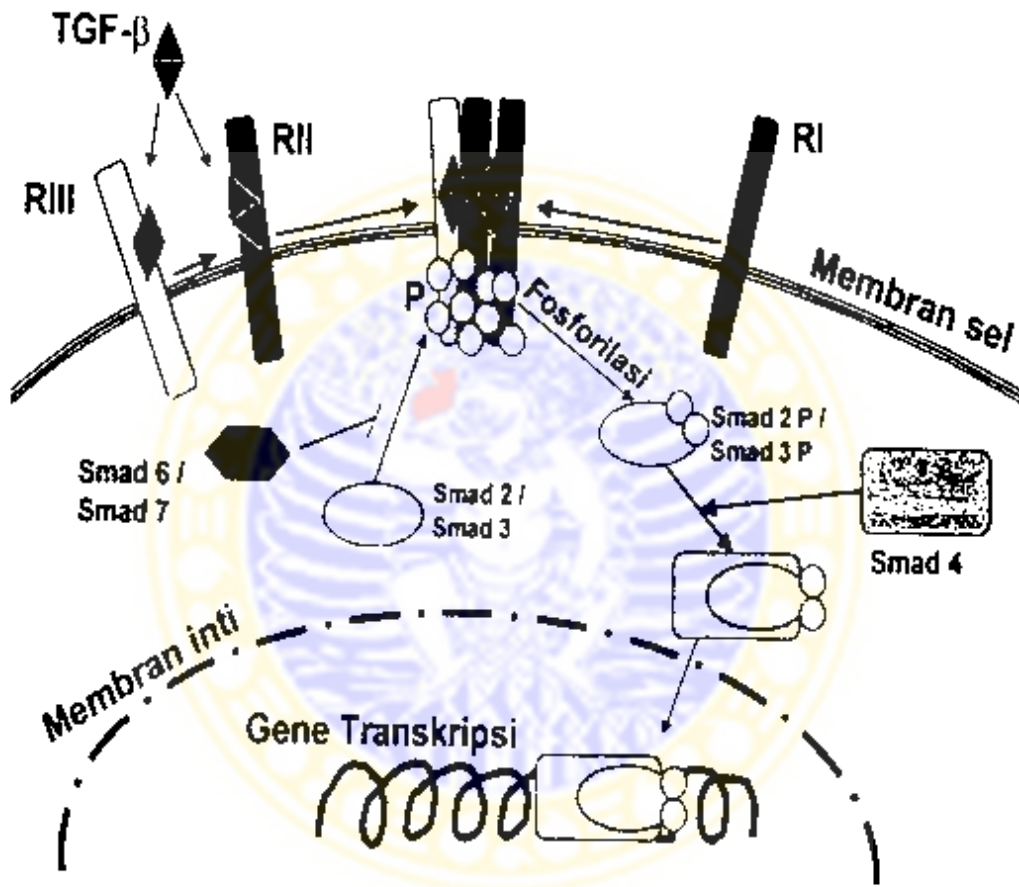
dapat digunakan untuk transduksi sinyal. Reseptor tipe-I dan tipe-II adalah serin/treonin-kinase. keduanya diperlukan untuk transduksi sinyal. Reseptor tipe-II mempunyai afinitas yang jauh lebih tinggi terhadap *TGF-β1* dibandingkan *TGF-β2*. Tanpa reseptor tipe-II, reseptor tipe-I tidak dapat mengikat *TGF-β* (Cheifetz *et al.* 1999; Massague *et al.* 1998).

Cheifetz *et al.* (1999) menyimpulkan bahwa selain berperan dalam proses fertilasi dan embriogenesis, *TGF-β1* juga berfungsi sebagai faktor stimulus fungsi berbagai macam sel atau sintesis beberapa zat lain, yaitu :

1. merangsang proliferasi fibroblas dan osteoblas
2. peningkatan (*enchancement*) sintesis protein matriks
3. induksi monosit untuk memproduksi sitoken
4. meningkatkan khemotaksis fibroblas, monosit dan neutrofil
5. peningkatan fungsi efektor *in vivo* dan fenotipe memori dari antigen-spesifik sel-sel *T-helper*
6. stimulasi sekresi IgA dari sel B.

TGF-β1 dalam bentuk aktif akan berikatan dengan reseptor yang terletak di membran sel, diikuti serangkaian aktifitas molekuler yang meningkatkan proses fibrogenesis, khondrogenesis dan osteogenesis. Setelah berikatan dengan reseptor tipe-II dan III, dengan dukungan reseptor tipe-I membentuk kompleks yang akan mengaktifkan komponen mitokondria *Smad-2* dan *Smad-3* menjadi *Pospho-Smad 2* dan *3*, yang dengan bantuan *Smad-4* akan memasuki inti dan berikatan dengan elemen molekul aktivator transkripsi untuk memproduksi *mRNA*. Pada fibroblas khondroblas dan osteoblas, peningkatan *mRNA* akan di-

ikuti peningkatan sintesis beberapa macam kolagen, yang menimbulkan fibrogenesis, khondrogenesis dan osteogenesis (Donosepoetro, 2003; Wells, 2000).



Gambar 2.7.1 Transduksi Sinyal *TGF-β*
(Wells, 2000)

Observasi lain yang melengkapi perihal mekanisme sinyal *TGF- β* adalah:

1. menginduksi perubahan ekspresi protein *Jun B*, *c-fos* dan *c-myc*,
2. menghambat fosforilasi protein retinoblastoma *cell-cycle dependent*,
3. terlibat dalam sintesis protein *guanine nucleotide-binding*, dan
4. pergantian phosphatidyl inositol, serta
5. translokasi protein Kinase C dari sitosol ke membran sel.

(Massague *et al.*, 1998)

Di samping sebagai stimulator, aktivitas *TGF- β 1* juga bersifat penghambat (inhibitor), termasuk :

- a. menghambat pertumbuhan limfosit, sel endotel, keratinosit dan sel tumor tertentu,
- b. menghambat sekresi IgG dan IgM dari sel B,
- c. menghambat *respiratory burst capacity* dalam monosit,
- d. menekan progenitor hematopoetik yang tergantung pada IL-3,
- e. menghambat megakaryositopoiesis,
- f. menghambat steroidogenesis dalam sel Leydig dan adrenokortikal, serta
- g. menghambat diferensiasi adiposit dan miosit.

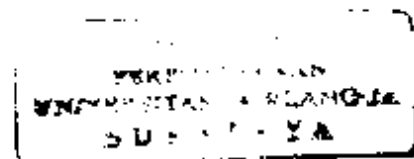
(Joyce *et al.*, 1990; Massague *et al.*, 1998)

2.7.2 *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)*

Insulin-like growth factor (IGFs) ditemukan oleh Salmon dan Doughaday sewaktu mengamati bahwa serum tikus mengandung suatu *growth hormone-dependent factor* yang mampu menginduksi penyatuan sulfur ke dalam kartilago. Selanjutnya di tahun 1960 para peneliti berhasil mengisolasi suatu faktor (substansi) dari serum manusia yang berefek seperti insulin pada jaringan otot dan lemak. Pada tahun 1976, dua faktor yang secara biokimiawi berbeda (*IGF-I* dan *IGF-II*) berhasil dipisahkan dari serum manusia, keduanya memiliki karakter seperti somatomedin. Somatomedin C (*Sm-C*) identik dengan *IGF-I* (Cohen *et al.*, 1992; Steed, 1996).

Serum manusia mengandung beberapa *IGF* : dua macam bentuk mayor, yaitu *IGF-I* atau *Sm-C* (7.65 kDa) dan *IGF-II* (7.47 kDa) serta sejumlah varian sekuens minor yang mempunyai kontribusi kurang dari 10% dari *NSILA (nonsuppressible insulin-like activity)* di dalam serum. *IGF-I* dan *IGF-II* merupakan polipeptida rantai tunggal terdiri dari 70 dan 67 asam amino dan mengandung empat *domain A, B, C* dan *D*. *Domain A* dan *B* dari *IGF-I* dan *IGF-II* berbagi 40-43% homolog asam amino dengan *domain A* dan *B* dari pro-insulin manusia, sedangkan *domain C* dan *D* dari *IGF* tidak jelas kaitannya. Homolog sekuens antara *IGF-I* dan *IGF-II* manusia adalah 62%, dan telah disepakati bahwa insulin, *IGF-I* dan *IGF-II* berasal dari gen-moyang yang sama (Cheng *et al.*, 2000).

Insulin-like Growth Factor atau somatomedin adalah polipeptida yang 50% asam aminonya homolog dengan pro-insulin dan mempunyai aktivitas seperti insulin. *Growth factor* ini merupakan faktor *trophic* yang beredar dengan kadar



tinggi dalam aliran darah dan memediasi efek *growth hormone*. *In vivo*, *IGF-I* disekresi oleh sel beberapa jaringan, terutama sel hepar (hepatosit) (Steed, 1997). *IGF-I* identik dengan somatomedin-C, sedangkan *IGF-II* identik dengan somatomedin. *Growth factor* ini beredar di sirkulasi perifer dalam keadaan terikat pada protein pengangkut disebut *IGF-binding protein-3 (IGFBP-3)*. Hanya kurang 5% *IGF-I* plasma yang beredar dalam keadaan tidak terikat. Sintesis *IGF-I* dirangsang oleh *PTH* dan protaglandin-E2 (*PGE2*), sedangkan penghambatnya adalah kortisol. Sintesis *IGF-I* juga distimulasi oleh *growth hormon (GH)* dan dipengaruhi oleh beberapa faktor lain. Sebaliknya, *IGF-I* dapat menghambat kelenjar hipofisis memproduksi *GH*, sehingga terbentuk suatu *feedback mechanism* (Cheng *et al.*, 2000; Cohick & Clemmons, 1995).

IGF-I dapat beraksi lewat reseptor permukaan spesifik yang terdapat pada berbagai jenis sel, termasuk hepatosit, adiposit, khondrosit, fibroblas, eritrosit, limposit serta sel dari jaringan saraf dan hipofisis. Reseptor *IGF* (dan juga insulin) tipe I adalah *tyrosine kinase*, yang 84% terdapat dalam *domain* sitoplasmik. Reseptor *IGF-I* tipe II adalah reseptor *mannose-6-phosphate*, mengandung 2207 asam amino *domain* ekstrasel dan 164 asam amino pada ujung sitoplasma tanpa aktivitas *tyrosine kinase*. Reseptor *mannose-6-phosphate* mengatur lalulintas protein yang mengandung *mannose-6-phosphate* dan memasukkannya ke dalam siklus yang berada dalam kompartemen golgi, endosom dan membran plasma (Cohen *et al.*, 1992).

Para peneliti telah membuktikan bahwa hepar (hepatosit) adalah tempat utama sintesis *IGF-I* pada manusia dan tikus hidup. Meskipun hepar tikus mati juga merupakan sumber *IGF-II*, tetapi belum diketahui jumlahnya. Dari pemeriksaan kultur jaringan, fibroblas juga dibuktikan merupakan sumber *IGF* pada manusia maupun tikus. Di samping hepar, beberapa organ lain seperti ren, paru, pankreas, testis serta jaringan saraf dan jantung dapat menyumbang jumlah *IGF* dalam sirkulasi (Cohick & Clemmons, 1995)

Kadar *IGF-I* dan *IGF-II* tergantung pada banyak faktor, termasuk usia penderita, jenis kelamin, kadar hormonal dan status nutrisi. Beberapa hormon yang mengatur kadar *IGF-I* dan *IGF-II* adalah prolaktin, hormon tiroid dan hormon seks. Pada manusia, kadar *IGF-I* plasma adalah rendah selama kehidupan fetal dan neonatal, secara gradual naik sewaktu usia anak dan mencapai puncak saat pertengahan pubertas, kemudian secara gradual menurun selama usia dewasa. Rerata kadar *IGF-I* plasma sedikit lebih tinggi pada wanita dibandingkan lelaki usia yang sama (Cheng *et al.*, 2000).

Kenaikan kadar *IGF-I* telah diungkapkan pada kasus akromegali. Aktivitas faktor pertumbuhan ini adalah menstimulasi : 1) sintesis glikogen, protein dan glikosaminoglikan; 2) transport glukosa dan asam amino menembus membran sel, serta 3) sintesis kolagen. Belum pernah ada laporan tentang uji klinis *IGF-I* dan *IGF-2* (Cheng *et al.*, 2000; Steed, 1997).

Insulin-like Growth Factor yang terdapat dalam jaringan tulang adalah *IGF-I* dan *IGF-II*. *IGF-I* meningkatkan kecepatan aposisi tulang melalui peningkatan replikasi preosteoblast dan meningkatkan sintesis kolagen oleh osteoblas, serta

menurunkan resorpsi tulang. Secara umum *IGF-I* berperan dalam mempertahankan massa tulang normal (Sirica, 1996; Steed, 1997).

TGF- β 1 dan *IGF-I* secara *in-vivo* maupun *in-vitro* pada hewan percobaan telah dibuktikan berfungsi sebagai faktor pertumbuhan tulang. Kombinasi keduanya yang ditambahkan secara eksogen pada kelinci percobaan menyebabkan percepatan penutupan defek kalvaria (Roth *et al.*, 1997). Thaler *et al.* (1993) membuktikan bahwa pemberian *IGF-I* secara sistemis lewat pompa infus mini-osmotik pada bagian punggung binatang percobaan (tikus Sprague-Dawley) menyebabkan penutupan prematur sutura frontal anterior. Penemuan ini menarik, karena sutura anterior tikus Sprague-Dawley biasanya tetap terbuka sepanjang kehidupan hewan ini (Moss, 1990). *IGF-I* juga berperan sangat penting dalam pertumbuhan fetus (Margawati, 1999; O'Neil, 1997).

IGF-I dan *TGF- β 1* adalah dua faktor pertumbuhan yang terdapat berlimpah di dalam matriks tulang (Cohen *et al.*, 1992). *IGF* awalnya dideteksi dan dimurnikan dari tulang dan telah diidentifikasi dua macam *IGF* yang berbeda pada binatang pengerat dan manusia yaitu *IGF-I* dan *IGF-II*. Dua faktor pertumbuhan tulang tersebut telah dibuktikan menstimulasi pertumbuhan tulang baru, baik secara endokondral maupun secara intramembran (Canalis *et al.*, 1998). Imunoreaktivitas *TGF- β 1* telah sering ditemukan berada di lokasi penyembuhan fraktur tulang dan aplikasi lokal *TGF- β 1* dan *IGF-I* menyebabkan percepatan penutupan defek kranium (Beck *et al.*, 1991).

IGF-I berperan penting dalam pengaturan anabolik pada metabolisme tulang dan kartilago. Osteoblas dan khondrosit yang memproduksi *growth factor*

ini mempunyai reseptor yang bereaksi dengannya. *IGF-I* sangat diperlukan dalam pertumbuhan tulang, penurunan kadar *IGF-I* atau reseptornya menyebabkan pengurangan ukuran tulang pada kelahiran. *IGF-I* dilaporkan banyak diekspresi selama penyembuhan fraktur dan menstimulasi pembentukan tulang, hal tersebut menunjukkan peranannya sebagai faktor autokrin/parakrin berpotensi regenerasi tulang (Shimoaka *et al.*, 2004).

Yakar *et al.* (2002) melaporkan bahwa penurunan kadar *IGF-I* pada serum menciit menyebabkan pemendekan pertumbuhan linear. Lempong pertumbuhan tibia bagian proksimal menciit secara total lebih pendek pada zona proliferaatif dan zona hipertrofik khondrosit. Terjadi pula penurunan 10% densitas mineral tulang dan lebih dari 35% penurunan lingkar dan ketebalan perosteum. Pengobatan dengan *IGF-I* selama 4 minggu dapat memperbaiki panjang total dari lempeng pertumbuhan proksimal tibia menciit.

2.7.3 Kolagen

Kolagen adalah protein berbentuk serabut kaku tidak larut yang terdapat dalam semua organ. Senyawa ini merupakan jenis protein yang paling banyak dijumpai dalam tubuh manusia. Protein tersebut merupakan konstituen tulang tempat semua serabut ditata membentuk sudut tertentu sehingga dapat menahan gaya perobekan dari segala arah. Kurang lebih setengah bagian dari berat kering tulang adalah kolagen. Itu yang menyebabkan tulang menjadi padat dan kuat (McGilvery & Goldstein, 1996).

Polipeptida yang menyusun kolagen dibentuk di dalam fibroblas, osteoblas dan khondroblas pada tulang dan tulang rawan, sebagai zat pendahulu yang

mudah larut. Zat pendahulu tersebut disekresi ke dalam ruang ekstrasel sebelum dimodifikasi untuk mendapatkan bentuk akhirnya yang kaku. Bila dibutuhkan untuk memberikan kekuatan, fibroblas dapat meletakkan kolagen pada tempat yang perlu kekuatan, misalnya pada tepi luka (Cohen *et al.*, 1992; Sirica, 1996).

Molekul kolagen dibentuk oleh tiga rantai polipeptida yang terpilin membentuk struktur mirip tali (*triple helix*). Struktur seperti itu terjadi karena adanya glisin pada setiap gugus. Karena adanya glisin tersebut memungkinkan setiap rantai berputar satu putaran di tiap tiga gugus, dengan pilinan ke kiri. Di samping glisin, terdapat gugus prolin dan hidroksi-prolin yang ditempatkan dalam heliks triple tersebut, membuat struktur menjadi stabil (McGilvery & Goldstein, 1996).

Sampai saat ini telah ditemukan paling tidak 7 jenis gen rantai polipeptida kolagen. Kolagen yang berasal dari berbagai jaringan jenisnya berbeda-beda tergantung pada jenis rantai polipeptida yang dihasilkan. Kolagen utama dalam tubuh, kolagen tipe-1 merupakan 90% dari kolagen total tubuh manusia dewasa, terdapat dalam tulang, tendon, kornea, jaringan lunak dan jaringan parut; ini kandungan karbohidratnya paling rendah. Kolagen tipe-2 terdapat dalam tulang rawan dan dibuat oleh khondrosit. Kolagen tipe-3 merupakan bagian utama kolagen pada dinding pembuluh darah dan kulit janin. Jenis ini terdapat dalam jaringan parut dan semua jaringan lunak dewasa, tetapi tidak dijumpai pada tulang dan tendon. Kolagen tipe-4 adalah kolagen pada membrana basalis, mempunyai jembatan disulfida dengan kandungan karbohidrat yang paling tinggi. Kolagen tipe-5 belum diketahui komposisinya, terdapat pada membrana basalis, jaringan plasenta dan epidermis (Sirica, 1996; McGilvery & Goldstein, 1996).

2.7.4 DNA dan RNA

a. DNA (*deoxyribonucleic acid*)

Miescher (1869), peneliti pertama yang menyelidiki susunan kimia nukleus sel, mendapatkan bahwa nukleus sel tidak terdiri dari karbohidrat, protein maupun lemak, melainkan terdiri dari zat yang mengandung fosfor sangat tinggi. Zat itu disebutnya nuklein, yang kemudian diubah menjadi asam nukleat, karena asam ikut menyusunnya. Asam nukleat terdiri dari dua tipe, yaitu : *DNA (deoxyribonucleic acid)* dan *RNA (ribonucleic acid)* (Emery, 1992; Harris, 1994; Suryo, 1997).

DNA umumnya terdapat dalam kromosom di inti sel, sedangkan *RNA* dan protein banyak terdapat dalam sitoplasma. Susunan molekuler *DNA* dalam semua tipe sel yang berbeda-beda dari suatu organisme adalah sama, sedangkan susunan *RNA* dan protein bervariasi dari satu tipe sel ke tipe sel lainnya, baik kualitas maupun kuantitas (Suryo, 1997). Sebagian terbesar *DNA* terdapat dalam kromosom, sedikit *DNA* terdapat juga dalam organel seperti mitokondria tumbuhan dan hewan, juga terdapat dalam kloroplas ganggang dan tumbuhan tingkat tinggi (Emery, 1992).

Asam nukleat tersusun atas nukleotida, terdiri dari gula, pospat dan basa yang mengandung nitrogen. Molekul *DNA* adalah suatu polinukleotida, terdiri dari:

- Molekul gula penyusun *DNA* adalah sebuah pentosa, disebut deoksiribosa
- Molekul pospat berupa PO₄
- Basa nitrogen yang menyusun *DNA* dibedakan atas:
 - a. kelompok pirimidin, terdiri atas basa sitosin (S) dan timin (T)

b. kelompok purin, terdiri atas basa adenin (A) dan guanin (G)

Pada tahun 1953 Watson & Crick mengemukakan bahwa molekul *DNA* umumnya mempunyai bentuk seperti 'pita spiral dobel saling berpilin' (*double helix*) (Emery, 1992. Harris, 1994; Montgomey *et al.*, 1993; Suryo, 1997). Penelitian Chargaff (1955) dengan hidrolisis *DNA* membuktikan bahwa pada berbagai macam mahluk ternyata jumlah adenin selalu sama dengan jumlah timin ($A = T$), demikian pula dengan sitosin dan guanin ($S = G$). Maka aturan Chargaff menyatakan bahwa perbandingan A/T dan S/G selalu mendekati satu. Watson & Crick berpendapat bahwa struktur *double helix* hanya dapat stabil apabila basa adenin dari satu pita berpasangan dengan basa timin dari pita pasangannya, demikian pula basa sitosin berpasangan dengan basa guanin. Pasangan adenin dengan timin dihubungkan oleh dua atom H, sedangkan pasangan sitosin dengan guanin oleh tiga atom H (Emery, 1992)

DNA pada umumnya terdapat dalam kromosom, dan kromosom terdapat di dalam inti sel. Seperti diketahui sel yang membelah selalu didahului oleh pembelahan inti sel. Berarti bila kromosom membelah, molekul *DNA* juga membelah. Dikenal beberapa hipotesis mengenai replikasi (pembelahan) *DNA* (Suryo, 1997), yaitu:

1. Secara semikonservatif, bila *double helix* dari molekul *DNA* yang lama membuka dengan perantaraan enzim, kemudian di samping tiap pita yang lama dibentuk pita *DNA* baru.
2. Secara konservatif, molekul *DNA* yang lama tetap, *double helix* tidak membuka, tetapi di samping molekul *DNA* yang lama dibentuk molekul *DNA* baru.

3. Secara dispersif, yaitu molekul *DNA* putus menjadi beberapa bagian dan dari beberapa potongan itu dibentuk *DNA* baru.

c. RNA (*Ribonucleic acid*)

RNA berbeda dengan *DNA* dalam beberapa hal, yaitu mengenai (Emery, 1992; Suryo, 1997):

1. Ukuran dan bentuk

Pada umumnya molekul *RNA* lebih pendek daripada *DNA*. Bentuk *DNA* *double helix*, sedangkan *RNA* berbentuk *single strand* (pita tunggal). Meskipun demikian pada beberapa virus tanaman (misalnya reovirus), *RNA* berupa pita dobel tetapi tidak berpilin seperti spiral.

2. Susunan kimia

Molekul *RNA* juga merupakan polimer nukleotida. Perbedaannya dengan *DNA* adalah :

- a. gula yang menyusunnya bukan deoksiribosa melainkan ribosa
- b. basa pirimidin yang menyusunnya bukan timin, melainkan urasil (U)

3 Lokasi

DNA umumnya terdapat di dalam kromosom, sedangkan *RNA* tergantung dari macamnya, yaitu :

- a. *mRNA* (*messenger RNA*) terdapat dalam nukleus. *mRNA* dicetak oleh salah satu pita *DNA* yang berlangsung dalam nukleus.
- b. *tRNA* (*transfer RNA*) terdapat dalam sitoplasma. Molekul *tRNA* berbentuk seperti daun semanggi yang pada beberapa bagian, basa-basa berpasangan tetapi tidak membentuk *double helix* seperti pada molekul *DNA*.

- c. *rRNA (ribosome RNA)* terdapat terutama di dalam ribosom. Molekulnya berupa pita tunggal, tidak bercabang dan mempunyai bagian yang basa-basa komplementernya saling berpasangan tetapi tidak berupa *double helix*.

4. Fungsi

DNA berfungsi memberi informasi genetik, sedangkan fungsi *RNA* tergantung dari macamnya, yaitu (Emery, 1992; Suryo, 1997):

- a. *mRNA* bertugas menerima informasi/keterangan genetik dari *DNA*. Proses ini disebut 'transkripsi' dan berlangsung di dalam inti sel.
- b. *tRNA* bertugas mengikat asam amino yang terdapat dalam sitoplasma. Sebelum dapat diikat oleh *tRNA*, asam amino bereaksi terlebih dahulu dengan ATP (adenosin triposfat) agar berenergi dan menjadi aktif. *tRNA* membawa asam amino terikat itu ke ribosom. Di sini berlangsung perubahan informasi genetik yang dinyatakan oleh urutan basa dari *mRNA* ke urutan asam amino dalam protein yang dibentuk. Proses perubahan ini dinamakan 'translasi'.
- c. *rRNA* bertugas mensintesis protein dengan menggunakan bahan asam amino. Proses ini berlangsung di dalam ribosom dengan hasil akhir berupa polipeptida

2.8 Peranan *TGF-β* dan *IGF-I* dalam metabolisme tulang

Tulang merupakan lempengan mineral tersusun teratur secara lamelar, relatif hiposeluler, terdiri atas tulang kortikal dan spongiosa. Tulang tersusun atas lapisan osteon, disebut sebagai sistem Havers, yaitu susunan melingkar berbentuk silinder mengitari pembuluh darah sentral yang dihubungkan dengan saluran Havers. Saluran ini berisi kapiler, arteriola, vanula, nervus dan saluran limfe. Di antara osteon terdapat susunan lamela intersisialis. Serat penyusun lamela saling berhubungan tetapi tidak pernah memotong lapisan semen. Lapisan semen merupakan pembentuk tepi osteon. Nutrisi tulang diperoleh melalui sirkulasi intraoseus (Drajat, 2002, Hammersen, 1993; Junquera *et al.*, 1995).

Jaringan tulang tersusun atas matriks dan sel tulang. Matriks tulang merupakan 90% dari seluruh massa tulang, sedangkan sel tulang terdiri dari osteoblas, osteosit dan osteoklas. Osteoblas berfungsi untuk membentuk tulang, osteosit sebagai regulator tulang dan osteoklas berfungsi meyerap tulang. Sel tulang berasal dari *stem-cell* mesenkhim dan *stem-cell* hematopoetik. Yang berasal dari *stem-cell* mesenkhim akan mengalami diferensiasi menjadi pre-osteoblas, osteoblas, *bone-lining cells* atau *resting osteoblast* dan osteosit. Yang berasal dari *stem-cell* hematopoetik monosit, terdapat dalam sumsum tulang maupun peredaran darah yaitu preosteoklas atau osteoklas.

2.8.1 Macam sel tulang

Susunan sel tulang terdiri dan 95% osteosit, dan yang 5% terbagi 94% bone lining cell, 5% osteoblas dan 1% osteoklas (Hauschka, 1992).

a. Sel mesenkhim

Sel mesenkhim adalah sel belum terdiferensiasi, mempunyai kemampuan untuk berubah menjadi fibroblas, kondrosit dan osteoblas termasuk preosteoblas. Sel ini dapat memasuki tulang melalui migrasi dari jaringan lunak atau melalui aliran darah. Sebelum diferensiasi, bentuk sel ini ireguler, mempunyai satu inti, sedikit sitoplasma dan sedikit organel (Hauschka, 1992; Junquiera *et al.*, 1995).

b Osteoblas

Osteoblas adalah sel yang memproduksi osteoid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral. Ketika sedang mensintesis matriks, osteoblas banyak mengandung retikulum endoplasmik, membran Golgi dan mitokhondria. Osteoblas mensintesis serat kolagen tipe-1 serta protein non-kolagen lain, dan mensekresinya ke ekstrasel. Hormon paratiroid dan sitoken lokal akan merangsang osteoblas untuk melepaskan mediator guna mengaktifkan osteoklas. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang akan menurun kemampuannya untuk mensintesis tulang. bentuk sel menjadi pipih, disebut *bone lining cells*. Osteoblas yang berada di tengah matriks akan menjadi osteosit.

Osteoblas berasal dari sel mesenkhim bersifat pluripoten. Faktor yang mempengaruhi diferensiasi osteoblas antara lain : *BMP (Bone Morphogenetic Protein)* yang termasuk superfamili *TGF- β* , interleukin, *IGF-I*, dan *PDGF (Platelet Derived Growth Factor)* Osteoblas memproduksi protein struktural, seperti kolagen, osteokalsin dan regulator protein berupa *growth factor*. *IGF-I* akan merangsang *resting osteoblast* menjadi osteoblas aktif (Buckwalter, 1995).

c. *Bone lining cells*

Bone lining cells disebut juga *resting osteoblast* atau *surface osteocyte*. Sel ini mempunyai sedikit sitoplasma dan organel. Jika dirangsang dengan PTH, sel ini akan berkontraksi dan mengeluarkan enzim kolagenase untuk membuang lapisan osteoid, sehingga memudahkan kerja osteoklas untuk menyerap tulang.

d. Osteosit

Osteosit merupakan 90% dari sel tulang, terletak di antara matriks yang mengalami mineralisasi. Sel ini mempunyai satu inti, jumlah organel bervariasi, demikian pula volume sitoplasma. Sitoplasma osteosit memanjang dan bercabang-cabang, badan sel berbentuk elips atau menyerupai lensa. Osteosit berhubungan dengan osteosit lain melalui cabang sitoplasma. Hubungan antar sel ini menjangkau permukaan luar dan dalam tulang.

e. Osteoklas

Osteoklas termasuk keluarga monosit berasal dari garis stem hematopoetik. Sel prekursor osteoklas terdapat dalam sumsum tulang dan sirkulasi darah. Jika mendapat rangsangan, sel prekursor ini berproliferasi dan menyatu membentuk sel besar berinti banyak, menjadi osteoklas. Sel osteoklas mempunyai inti tiga sampai duapuluh, mitokhondria dan lisosom dalam jumlah yang sangat banyak. Osteoklas aktif, di dalam sitoplasmanya dipenuhi oleh mitokhondria untuk menyediakan energi guna menyerap tulang. Osteoklas menyerap matriks tulang dengan sangat efisien, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks. Endosom yang mengandung pompa proton pada membran akan menurunkan pH dari 7 menjadi 4. Keasaman ini akan melarutkan

mineral dan selanjutnya untuk merusak matriks, osteoklas akan mengeluarkan protease. Setelah osteoklas selesai menyerap tulang, dia akan membelah menjadi sel mononuklear (Drajat, 2002; Hammersen, 1993).

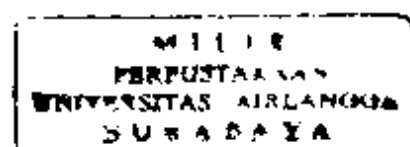
2.8.2 Matriks tulang

Matriks tulang spongiosa maupun kompakta tersusun atas matriks organik dan anorganik. Komponen anorganik merupakan 65% dari seluruh massa tulang, komponen organik 25% dan air 10%. Komponen organik terbesar adalah kolagen sebagai pembentuk tulang dan memungkinkan tulang menahan regangan. Komponen anorganik atau mineral berfungsi menahan beban tekanan. Kolagen merupakan 90% dari keseluruhan matriks organik, 10% glikoprotein nonkolagen dan proteoglikan spesifik tulang. Macam kolagen terbanyak adalah tipe-1 dan tipe-2, sebagian kecil tipe-5 dan tipe-12. Matriks tulang mengandung faktor pertumbuhan yang berperan mengatur fungsi sel tulang. Faktor pertumbuhan terdiri dari famili *Transforming Growth Factor- β* (*TGF- β*), *Insulin-like Growth Factor-I* (*IGF-I*), *Insulin-like Growth Factor-II* (*IGF-II*), *Bone Morphogenetic Proteins* (*BMP's*), *Platelet Derived Growth Factor* (*PDGF*), *Interleukin-1* (*IL-1*), *Interleukin-6* (*IL-6*), dan *Colony Stimulating Factor* (*CSF*) (Hauschka, 1992).

Matriks anorganik atau mineral mempunyai dua fungsi pokok, yaitu sebagai cadangan ion dan membuat tulang menjadi struktur yang kuat dan keras. Kalsium tubuh 99% terdapat di dalam tulang 85% posfor, 40%-60% natrium dan magnesium terdapat dalam kristal mineral tulang. Dengan menyediakan cadangan ion, matriks anorganik membantu mempertahankan konsentrasi cairan ekstra-seluler dan mempertahankan fungsi fisiologis (Buckwalter *et al.*, 1995)

Berbagai *growth factor* terdapat di dalam matriks, memiliki reseptor yang sesuai terdapat pada membran plasma. Setiap faktor pertumbuhan mempunyai karakter reseptor tertentu dan *ligand* spesifik, serta rangkaian *post-binding signalling*. Rangsangan faktor pertumbuhan pada osteoblas mengikuti jalur protein-G (Hauschka, 1992). *TGF- β* merupakan faktor pertumbuhan terbanyak ditemukan dalam matriks tulang. mempunyai berat molekul 25 kD. *TGF- β* berfungsi merangsang aktivitas osteoblas untuk meningkatkan sintesis kolagen. Selain meningkatkan kecepatan aposisi tulang, *TGF- β* menghambat diferensiasi osteoklas. *TGF- β* adalah stimulator terkuat pada pembentukan tulang, didapatkan dalam kadar 0.1 mg/Kg, dan tulang merupakan sumber terbesar *TGF- β* dalam tubuh. Selain atas rangsangan hormon paratiroid (*PTH*), aktivitas *TGF- β* dipengaruhi oleh *IL-1* dan *1,25-dihydroxyvitamine-D*. Selain berasal dari sel tulang, *TGF- β* diproduksi oleh platelet, limfosit-T, limfosit-B dan makrofag. *TGF- β* mengatur proliferasi sel, diferensiasi dan sintesis matriks ekstraseluler. *TGF- β* merangsang ekspresi gen untuk pembentukan kalus, merangsang proliferasi sel mesenkhim dan diferensiasi osteoblas serta khondrosit (Cohen *et al.*, 1992; Joyce *et al.*, 1990; Mundy, 1993).

Insulin-like Growth Factor (IGF) yang terdapat dalam jaringan tulang adalah *IGF-I* dan *IGF-II*. Sintesis *IGF-I* dirangsang oleh *PTH* dan prostaglandin E2 (*PGE2*) dan dihambat oleh kortisol. *IGF-I* meningkatkan kecepatan aposisi tulang melalui peningkatan replikasi preosteoblas dan sintesis kolagen serta penurunan resorpsi tulang. Secara umum *IGF-I* berperan dalam mempertahankan massa



tulang normal. *IGF-I* identik dengan somatomedin-C, mempunyai berat molekul 7.6 kD (Cohen *et al.*, 1992; Sirica, 1996; Steed, 1996).

Interleukin-1 (IL-1) merupakan perangsang utama untuk resorpsi tulang, merangsang mitogenik prekursor osteoklas, meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoklas. Fungsi tersebut diperkuat oleh *Tumor Necrosing Factor- α* (*TNF- α*), bekerja secara sinergi dengan *PTH* dan peptida terkait-*PTH*. Interleukin-6 (IL-6) merupakan protein fase akut, memperkuat resorpsi tulang bersama IL-1 dan *TNF- α* melalui rangsang mitogenesis dari garis osteoklas. Sintesis IL-6 dipengaruhi oleh *PTH*, IL-1 dan Vitamin-D (Sirica, 1996).

Bone Morphogenetic Protein (BMP) adalah anggota superfamili *TGF- β* , merangsang diferensiasi sel progenitor menjadi osteoblas dan khondroblas, berperan pada pembentukan tulang ektopik. *BMP* terdapat dalam matriks tulang dan dilepas bersama aktivitas resorpsi pada daerah yang mengalami cedera. *BMP* mempunyai berat molekul rendah (19 kDa), didapatkan dari pemurnian dan ekstraksi proteoglikan atau dari demineralisasi tulang (Cohen *et al.*, 1992).

Fisiologi tulang yang normal maupun patologis berkaitan erat dengan angiogenesis. Proses perkembangan dan penyembuhan tulang tergantung pada kecukupan pembentukan sejumlah kapiler baru dari pembuluh darah yang sudah ada, itu diperlukan untuk nutrisi dan oksigenasi. Selama osifikasi intramembran dan endokondral, spekula tulang dan kuncup osteogenik banyak dilingkupi dan disusupi kapiler. Mekanisme molekuler sudah semakin jelas, beberapa sitoken dan saling keterkaitannya memegang peranan penting dalam pembentukan, pertumbuhan dan regenerasi pembuluh darah. *Vascular endothelial growth factor*

(*VEGF*), suatu glikoprotein terikat-heparin, berperan sentral dalam perkembangan dan modulasi angiogenesis. *VEGF* diekspresi dalam jaringan hipervas-kuler merupakan mitogen *cell-specific* endotelial. Penyembuhan tulang memerlukan angiogenesis yang adekuat, dan dalam konteks ini *VEGF* juga sangat berperan. Ekspresi *VEGF* dalam osteoblas dan sel sejenis-osteoblas dapat ditingkatkan oleh beberapa sitoken dan *growth factor*, termasuk prostaglandin E1 (*PGE1*) dan *PGE2*, *insulin-like growth factor-I (IGF-I)*, *platelet derived growth factor (PDGF)*, dan *1 α ,25-dihydroxyvitamin D3* (Saadeh *et al.*, 1999).

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), suatu faktor pertumbuhan ber-efek luas, memacu diferensiasi dan proliferasi osteoblas. Di samping itu, *growth factor* yang bersumber di tulang dan makrofag ini diekspresi dalam kadar yang tinggi selama pertumbuhan dan perkembangan tulang, proses yang tergantung pada kecukupan pasokan darah. *TGF- β 1* berperan ganda, sebagai stimulator sekaligus inhibitor poten. Agar dapat menginduksi angiogenesis, *TGF- β 1* memerlukan lingkungan inflamatorik untuk meningkatkan produksi *VEGF*. Pada proses penyembuhan tulang, *TGF- β 1* menstimulasi migrasi dan memodulasi proliferasi osteoblas. Aplikasi eksogen *TGF- β 1* mempercepat penyembuhan tulang, baik intramembran maupun endokondral serta mempercepat penutupan defek tulang membranous (Joyce *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1997).

Berkaitan dengan pentingnya *TGF- β 1* dan *VEGF* dalam proses angiogenesis dan penyembuhan tulang, muncul dugaan bahwa *TGF- β 1* dapat mengatur ekspresi *VEGF* di dalam osteoblas. Telah dibuktikan bahwa *TGF- β 1* dapat meningkatkan *mRNA VEGF* di dalam osteoblas primer maupun osteoblas klonal.

Pembandingan nyata dari mekanisme ini adalah pada tingkat transkripsional dari osteoblas klonal. Ekspresi berlebihan dari reseptor tipe-II dominan-negatif oleh transfer gen termediasi-adenovirus dapat memutus sinyal transduksi dan secara bermakna menurunkan stimulasi *TGF- β 1* eksogen terhadap *mRNA VEGF*. Di samping itu, *TGF- β 1* meningkatkan produksi protein *VEGF* oleh sel osteoblas, dan peningkatan ini dapat dihambat oleh deksametason. Modulasi yang sinkron dan harmonis antara *TGF- β 1*, *mRNA VEGF* dan ekspresi protein terlihat muncul selama penyembuhan fraktur tulang membranous (Saadeh et al., 1999).

2.9 Peranan *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam embriogenesis

Sejak keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro* yang disertai dengan lahirnya anak sapi jantan pada tahun 1981, berbagai upaya perbaikan teknik telah dilakukan. Karena beberapa faktor pertumbuhan diperlukan untuk perkembangan embrio, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, maka beberapa faktor pertumbuhan seperti *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)*, *Transforming Growth Factor (TGF)*, *Plateket Derived Endothelial Cell Growth Factor (PDGF)*, atau *Leukemia Inhibitory Factor (LIF)* telah sering diimbuhkan ke media pematangan dan media pembiakan untuk meningkatkan kemampuan oosit berkembang ke tahap morula (blastosis) (Margawati, 1999). Telah juga dilakukan penggabungan faktor pertumbuhan dan hormon steroid atau gonadotropin ke dalam media pematangan untuk meningkatkan perolehan jumlah oosit masak.

Juga telah ditemukan faktor pertumbuhan dan reseptornya di ovarium dan sel granulosa dan di cairan folikel. Perkembangan terakhir, diperoleh informasi bahwa beberapa anggota *growth factor* berperan pada perkembangan awal

embrio sapi. Gardner *et al.* (1998) telah meneliti *IGF* yang dihasilkan dari perkembangan embrionik mencit, dalam kaitannya dengan *genotyping* embrio yang mengalami mutasi terhadap komposisi konsepsi dilihat dari genotip *trophectoderm* dan *inner cell mass (ICM)* embrio mencit. Nowak *et al.* (1998) mempublikasikan tentang stimulasi *TGF- β* terhadap pertumbuhan blastosis mencit melalui mekanisme yang melibatkan *Parathyroid Hormone related Protein (PTHrP)*. Interaksi antara konsepsi dan saluran reproduksi memberikan dukungan penting bagi perkembangan dan preimplantasi embrio. Ketika terjadi konsepsi (awal kebuntingan), pada saat tersebut mulai terjadi kerjasama antara embrio dan saluran reproduksi yang mengikutkan peran faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan diwujudkan dengan dua cara, yaitu secara autokrin (berasal dari embrio sendiri) dan parakrin (berasal dari *oviduct* dan uterus). Pada hewan mencit, pengeluaran *LIF* akan mencapai puncaknya sebanyak dua kali, pertama pada waktu ovulasi dan kedua pada waktu umur kebuntingan 4 hari dan kemudian menurun pada umur kebuntingan 5 hari bersamaan dengan terjadinya implantasi embrio (Margawati, 1999).

Studi tentang embrio preimplantasi dan *oviduct* menunjukkan adanya beberapa faktor yang terlibat dalam interaksi antara embrio dan faktor pertumbuhan. Berdasar asalnya ada tiga macam faktor, yaitu autokrin, parakrin dan lingkungan. Faktor pertumbuhan yang berasal dari embrio terlibat dengan cara autokrin, sedangkan yang berasal dari *oviduct* dan uterus terlibat secara parakrin. Interaksi yang lebih rumit dapat saja terjadi, misalnya keterlibatan autokrin dan parakrin dari *IGF-I* yang diatur di lingkungan mikro uterus oleh reseptor *IGF-I* dan protein

pengikat *IGF* yang akan dikendalikan secara lokal di uterus dan di embrio itu sendiri (Garder *et al.*, 1998).

Ketika konsepsi terjadi, faktor pertumbuhan yang berasal dari embrio maupun saluran reproduksi mulai bekerja. Pada manusia terdapat beberapa faktor pertumbuhan yang dianggap berperan selama proses kehamilan, yaitu *Epithelial Growth Factor (EGF)* dan *TGF α* yang berpengaruh luas pada sel-sel endometrium dan mesenkhim. *Fibroblast Growth Factor (FGF)* berperan hanya pada mesenkhim, serta *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* dan *Platelet Derived Endothelial Growth Factor (PDEGF)* berperan hanya terbatas pada sel endotelial. Berbagai macam sitoken berperan lebih banyak secara tidak langsung dibandingkan secara langsung pada sel endotelial. Misalnya, Interleukin- β 1 (IL- β 1) merupakan salah satu sitoken bersifat agonis yang berperan pada tahap awal perkembangan embrio sapi (Paula-Lopes *et al.*, 1998).

Penambahan *EGF* sebanyak 10 ng/ml pada media biakan berisi embrio mencit menunjukkan bahwa embrio 8-sel yang dieramkan selama 72 jam baik secara tunggal maupun kelompok akan mengalami peningkatan jumlah embrio yang berkembang ke tahap *hatched blastocyst*. Perkembangan embrio 2-sel ke tahap blastosist yang dieramkan selama 72 jam akan meningkat dua kali bila media biakan diimbui *EGF* (49%) dibandingkan tanpa penambahan *EGF* (28%) dan peningkatan akan lebih tinggi lagi bila diimbui dengan kombinasi *EGF* dan *TGF- β 1* (87%). Sedangkan embrio 8-sel yang dieramkan tunggal selama 32 jam akan mengalami peningkatan perkembangannya ke tahap blastosist pada media

yang diimbuhi *EGF* (95%) dibandingkan tanpa pengimbuhan *EGF* (86%) (Margawati, 1999).

Transforming Growth Factor- β (*TGF- β*) adalah faktor pertumbuhan yang mengatur proliferasi sel, produksi matriks ekstraseluler (*extracellular matrix, ECM*), perlekatan dan migrasi embrio serta embriogenesis (Massague, 1990). Nowak et al. (1999) memperlihatkan *TGF- β* dan *PTHrP* berperan penting pada proses preimplantasi embrio mencit. Tetapi dari penelitian yang sama tidak terlihat adanya pengaruh *PTHrP* terhadap pembentukan blastosist dan jumlah sel *ICM* dan trophoectoderm serta jumlah total pembelahan sel, dibandingkan kelompok kontrol. *PTHrP* diketahui sangat meningkatkan pertumbuhan tropoblast.

IGF merupakan senyawa peptida, dan diduga menjadi perantara hormon pertumbuhan pada uterus dibawah kontrol hormon steroid. *IGF* berperan untuk implatasi embrio pada manusia (Murphy, 1994). *IGF-II* memperlihatkan peranannya dalam komposisi fetus, jaringan embrionik bagian luar dan bersama trophoectoderm dan *ICM* mengendalikan volume cairan ekstraseluler fetus (Gardner et al., 1999). *IGF-II* dari embrio yang mengalami mutasi bersifat heterogen, berasal dari induk jantan tikus yang disebut *Igf2 ko*. Munculnya *Igf2 ko* pada fetus dan kantung kuning telur (*yolk sac*) diakibatkan rendahnya kadar *IGF-II* yang berasal dari derivat *ICM* dengan penurunan berat basah lebih dari 25%. sedangkan yang dari trophoectoderm menyebabkan penurunan berat basah kurang dari 12% (gardner et al., 1999).

Margawati (1999) menyimpulkan bahwa keberadaan berbagai faktor pertumbuhan seperti *LIF*, *EGF*, *IGF-I*, *TGF- β* dan *PAF* diperlukan pada perkem-

bangun embrio *in vitro* dan sebagai faktor pemicu bagi perkembangan zigot ke tahap preimplantasi embrio. Faktor pertumbuhan autokrin berperan pada perkembangan embrio *in vitro* dan parakrin berhubungan dengan kondisi lingkungan mikro dari uterus untuk perkembangan embrio ke tahap preimplantasi. Pengimbuhan *PAF*, *IGF-I*, dan *IGF-II* pada media pembiakan embrio berkepadatan rendah dapat meningkatkan prosentase perolehan blastosist, sedangkan pengimbuhan *EGF* dan *TGF* atau kombinasinya pada biakan tunggal dapat meningkatkan perkembangan embrio ke tahap embrio pre-implantasi. *IGF-I* dan *TGF- β* diketahui berpengaruh terhadap jumlah sel dari *ICM* dan trophoc-toderm pada embrio preimplantasi dan berat basah konsepsi.

2.10 Asam folat

Asam folat (bahasa latin : folium, berarti daun) pertamakali diisolasi dari daun bayam, tetapi kemudian menunjukkan distribusi biologis yang amat luas. Zat dengan biopotensi asam folat terdapat banyak tersebar dalam berbagai bahan makanan, baik nabati maupun hewani. Sayur-mayur berwarna hijau, buah-buahan, dan hati hewan mempunyai kandungan asam folat yang tinggi. Pemasakan di dapur rumah tangga atau pengolahan teknologi pangan dapat merusak asam folat sampai 50-95% dari kadar total yang ada dalam bahan mentah asalnya (Acuna *et al.*, 2000; Sediaoetama, 1997)

Vitamin ini terdiri dari tiga komponen utama, yaitu: asam glutamat, asam p-aminobenzoat dan suatu turunan senyawa heterosiklik dengan cincin yang berdifusi, disebut pteridin. Kekurangan asam folat yang juga dikenal dengan asam pteroilglutamat ini, menyebabkan sejenis anemia dengan eritrosit yang

tidak cukup matang sebagaimana mestinya. Asam folat sendiri tidak mempunyai aktivitas ko-enzim, tetapi molekul ini tereduksi secara enzimatis di dalam jaringan menjadi asam tetrahidrofolat (THF) yang merupakan bentuk ko-enzim aktif. Asam tetrahidrofolat berfungsi sebagai pembawa sementara gugus 1-karbon di dalam sejumlah reaksi kompleks enzimatis. Gugus metil (-CH₃), metilen (-CH₂-), metinil (-CH=), formil(-CHO) atau formino (-CH=NH) dipindahkan dari suatu molekul ke molekul lainnya (Lehninger, 1995; McGilvery & Goldstein, 1996). Fungsi folat pada jaringan tubuh adalah mentransfer beberapa macam unit satu karbon dalam metabolisme. Unit-unit satu karbon yang dihasilkan selama metabolisme asam amino digunakan dalam interkonversi metabolik asam amino dan dalam biosintesis komponen purin dan pirimidin dari asam nukleat, yang dibutuhkan untuk pembelahan sel. Folat merupakan kelompok ko-enzim dan berfungsi bersama dengan bermacam enzim yang bersangkutan. Telah bertambah jelas bahwa bentuk poliglutamat folat merupakan ko-enzim alamiah (McGilvery & Goldstein, 1996).

Folat adalah bagian dari vitamin B-kompleks, terkait dengan asam pteroilglutamat (Pte-Glu) yang bertindak sebagai ko-faktor enzim yang mentransfer satu unit karbon di dalam berbagai jalur metabolik (*metabolic pathways*). Metabolisme satu-karbon yang dimediasi folat merupakan salah satu dari reaksi biokimia di dalam sel yang paling penting. Folat diperlukan untuk sintesis protein dalam asam nukleat dan mitokondria, serta metabolisme asam amino dan proses seluler lain yang melibatkan transfer satu unit-karbon. Folat dapat bertin-

dak sebagai donor karbon atau dapat pula sebagai akseptor (Brouwer *et al*, 1998; Lehninger, 1995)

Bentuk paling dominan dari folat yang beredar adalah *5-methyltetrahydrolic acid (5-mTHF)*. Vit.B12 mengkonversi *5-mTHF* menjadi tetrahidrofolat (THF), suatu bentuk metabolik-aktif folat lain yang diperlukan dalam berbagai proses biokimia penting. Senyawa ini muncul sewaktu biosintesis metionin yang dikatalisis oleh enzim metionin-sintetase dan ko-faktor metilkobalamin. Selama pembentukan metionin, enzim metionin-sintetase menggunakan *5mTHF* sebagai sumber gugus metil. Kurangnya produksi THF oleh sel mengakibatkan sel tersebut terhambat dalam mensintesis asam amino purin dan timin untuk replikasi *DNA* dan terhambat memetabolisme histidin dan serin (Bouwer *et al.*, 1998; Brouwer, 1999; Donosepoetro, 1998). Untuk memperjelas keterangan tentang metabolisme metionin dan homosistein serta konversi asam folat dan siklus metilasi, disajikan Gambar 2.8.1, 2.8.2 dan 2.8.3.

Reduksi vitamin asam folat menjadi bentuk aktif tetrahidrofolat terjadi dalam dua tahap. Pada tahap pertama, dua pasang atom hidrogen berturut-turut ditambahkan. Tahap kedua yang dikatalisis oleh reduktase dehidrofolat dihambat kuat-kuat oleh beberapa obat tertentu, yaitu yang digunakan untuk terapi beberapa macam kanker. Karena tetrahidrofolat merupakan enzim esensial di dalam biosintesis asam timidilat, suatu nukleotida pembangun *DNA*, maka obat-obat tersebut dapat menghambat replikasi *DNA* pada sel kanker tertentu (Lehninger, 1995; McGilvery & Goldstein, 1996).

Beberapa bakteri tidak membutuhkan peranan asam folat sebagai faktor pertumbuhan, sebab organisme tersebut dapat membuatnya sendiri jika tersedia asam p-aminobenzoat (*PABA = para-aminobenzoic acid*)), sebagai salah satu komponen asam folat. *PABA* adalah vitamin bagi organisme/bakteri tersebut. Untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang memerlukan *PABA* digunakan preparat sulfanilamid atau derivatnya (Johnson, 1972; Lehninger, 1995).

Asam folat ditimbun terutama dalam hepar, yang dapat mencapai kadar 5-9 ug/gram jaringan basah. Ginjal juga merupakan tempat penimbunan dengan kadar 3 ug/g. Kadar asam folat di dalam eritrosit dan leukosit hanya 5% - 10% kadarnya dalam hati. Diperkirakan folat total di dalam tubuh manusia dewasa hanya 5 - 10 mg/kg (McGilvery & Goldstein, 1996).

Bentuk aktif asam folat adalah ko-enzim: asam tetrahidrofolat dan enzim metilentetrahidrofolat-reduktase, yang dapat mentransfer gugus formil, hidroksi-metil, metilen dan formil. Proses reaksi transfer itu berkaitan dengan biosintesis *DNA*, *RNA*, purin, metionin dan serin, serta katabolisme histidin (Zittoun, *et al.*, 1998; Hol *et al.*, 1998). Kekurangan ko-enzim tetrahidrofolat menyebabkan terhambatnya metilasi homosistein menjadi metionin, menimbulkan hiperhomosisteinemia (Bouwer, 1999). Hiperhomosisteinemia di samping dapat mengakibatkan cacat kongenital, juga mempertinggi risiko penyakit kardio-vaskuler, stroke, demensia dan Alzheimer (Eskes *et al.*, 1998; Moeliandari, 2003; Ray & Laskin, 1999)

Botto & Mastroiacovo (1998) mengeksplorasi interaksi antar-gen yang digunakan untuk mengevaluasi kemungkinan hubungan *NTD* dengan mutasi

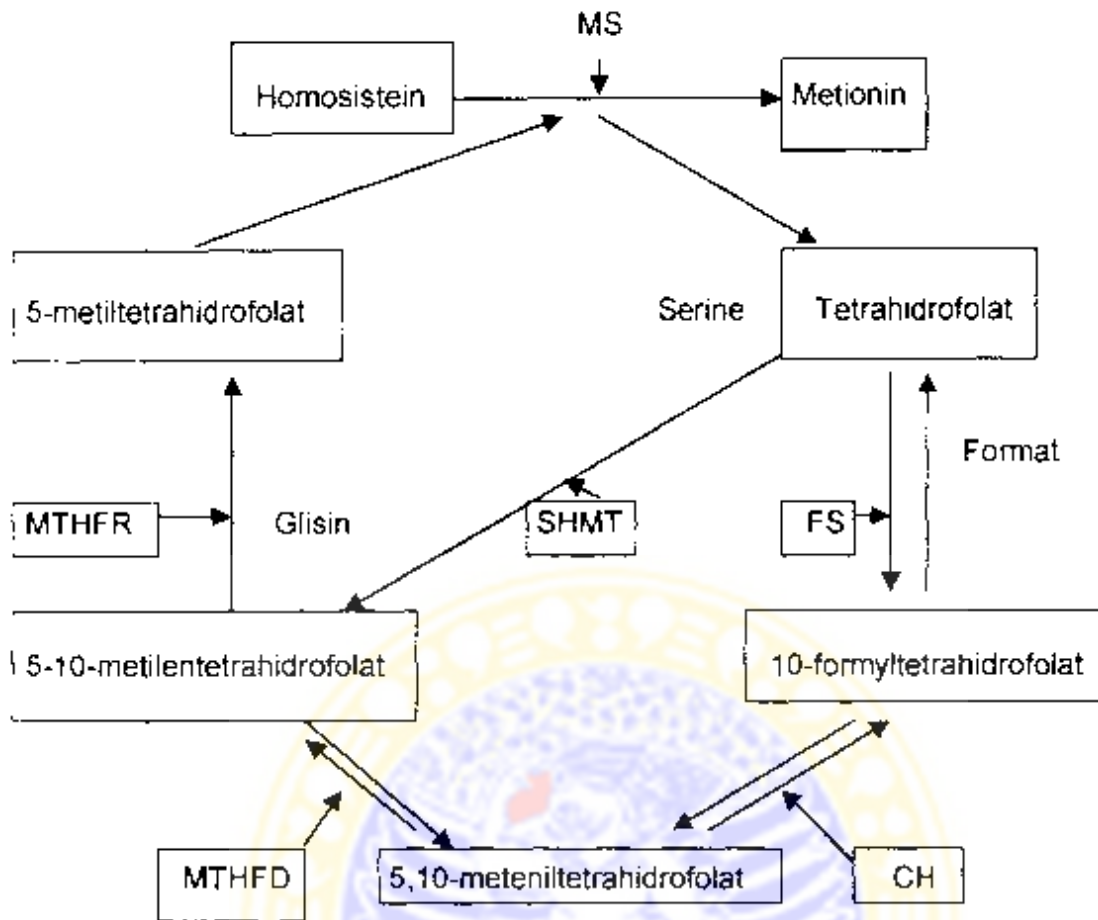
spesifik dua gen, yaitu 5,10-metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR) dan cistation-beta sintase (CBS). Mereka mendapatkan bahwa dibandingkan genotipe yang umum, homozigositas untuk mutasi MTHFR saja adalah berkaitan dengan dua kali risiko kenaikan *NTD*, sedangkan homozigositas untuk mutasi CBS saja bukan merupakan faktor risiko. Homozigositas individual untuk mutasi kedua lokus tersebut mempunyai lima kali risiko untuk mengalami *NTD* dibanding mereka yang genotipenya normal. Scott (1998) melaporkan bahwa mutasi gen pada mencit *Pax 3* yang menyandi faktor transkripsi pengatur ekspresi protein, tidak seluruhnya berkaitan dengan metabolisme folat. Ada kemungkinan pada model hewan-coba ini, suplemen asam folat mencegah kegagalan penutupan *neural tube* karena vitamin itu meningkatkan sintesis *DNA* dan proliferasi sel di tempat neurulasi.

Defisiensi asam folat dapat disebabkan oleh asupan dalam diet yang rendah, malabsorpsi karena penyakit gastrointestinal, penggunaan yang tidak adekuat karena kurangnya enzim, pengobatan dengan antagonis folat, alkohol dan obat kontrasepsi oral, serta kebutuhan folat yang meningkat selama kehamilan dan beberapa kelainan proliferasi seluler. Rendahnya kadar asam folat dalam serum mencerminkan stadium pertama balans folat negatif yang 'mungkin' akan diikuti dengan turunnya kadar folat di jaringan. Rendahnya kadar asam folat dalam eritrosit mencerminkan stadium kedua balans folat negatif yang 'pasti' diikuti rendahnya kadar asam folat dalam jaringan (Acuna *et al.*, 2000)

Untuk mencegah tingginya risiko penyakit akibat defisiensi asam folat berupa abortus, cacat bawaan seperti *NTD* dan *CHD* (*Congenital Heart Defect*),

serta penyakit jantung koroner dan Alzheimer pada orang dewasa. Eskes *et al.* (1998), Oakley *et al.* (1996), Ray & Laskin (1999) dan beberapa peneliti lain mengusulkan fortifikasi asam folat ke dalam tepung gandum, sehingga asupan asam folat tiap penduduk bertambah dengan paling tidak 400 μ g/hari.





MTHFR = 5,10-metilentetrahydrofolat reduktase

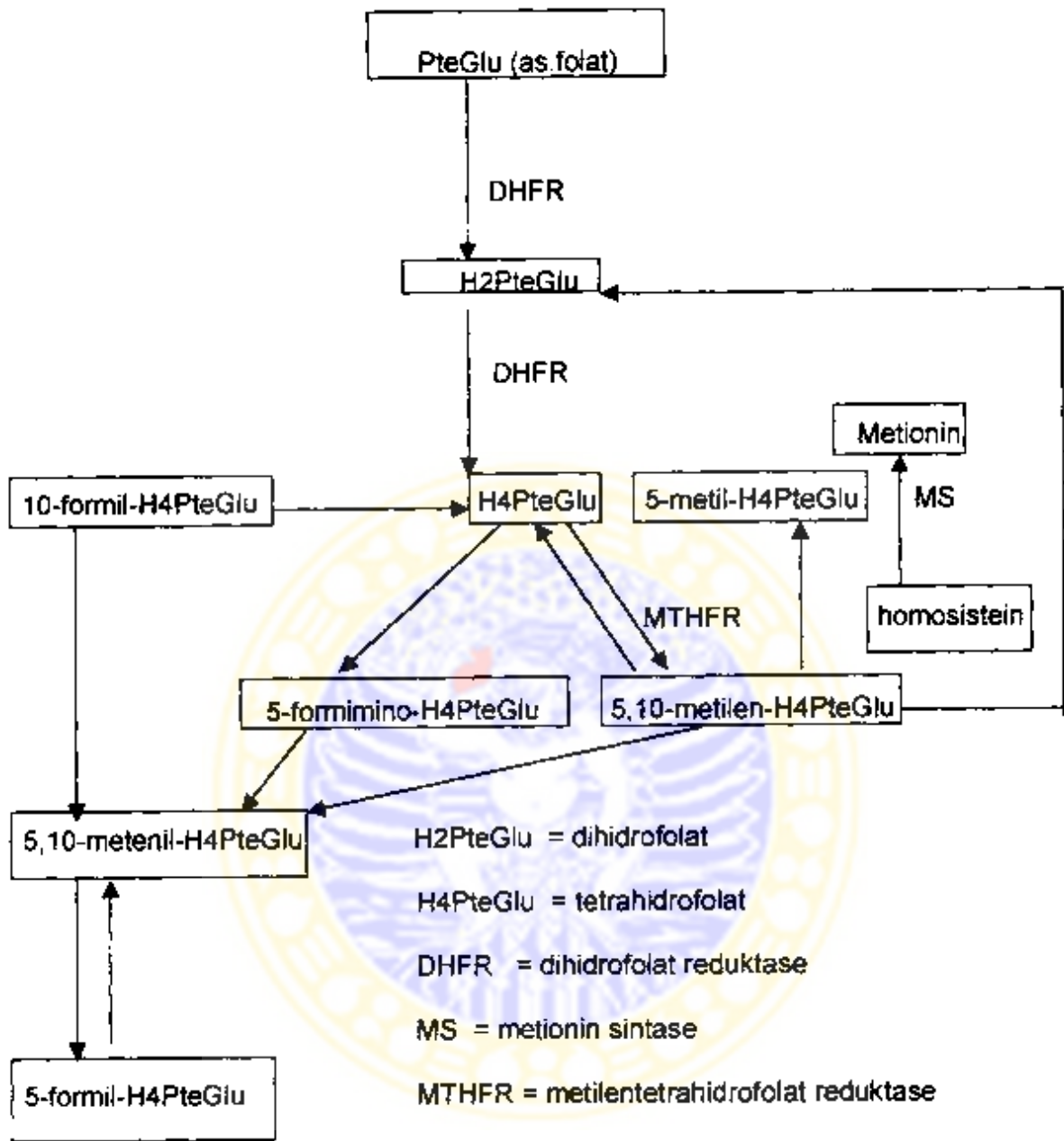
MTHFD = 5,10-metilentetrahydrofolat dehidrogenase

CH = 5,10-metilentetrahydrofolat siklohidrolase

FS = 10-formiltetrahydrofolat sintase . MS = metionin sintase

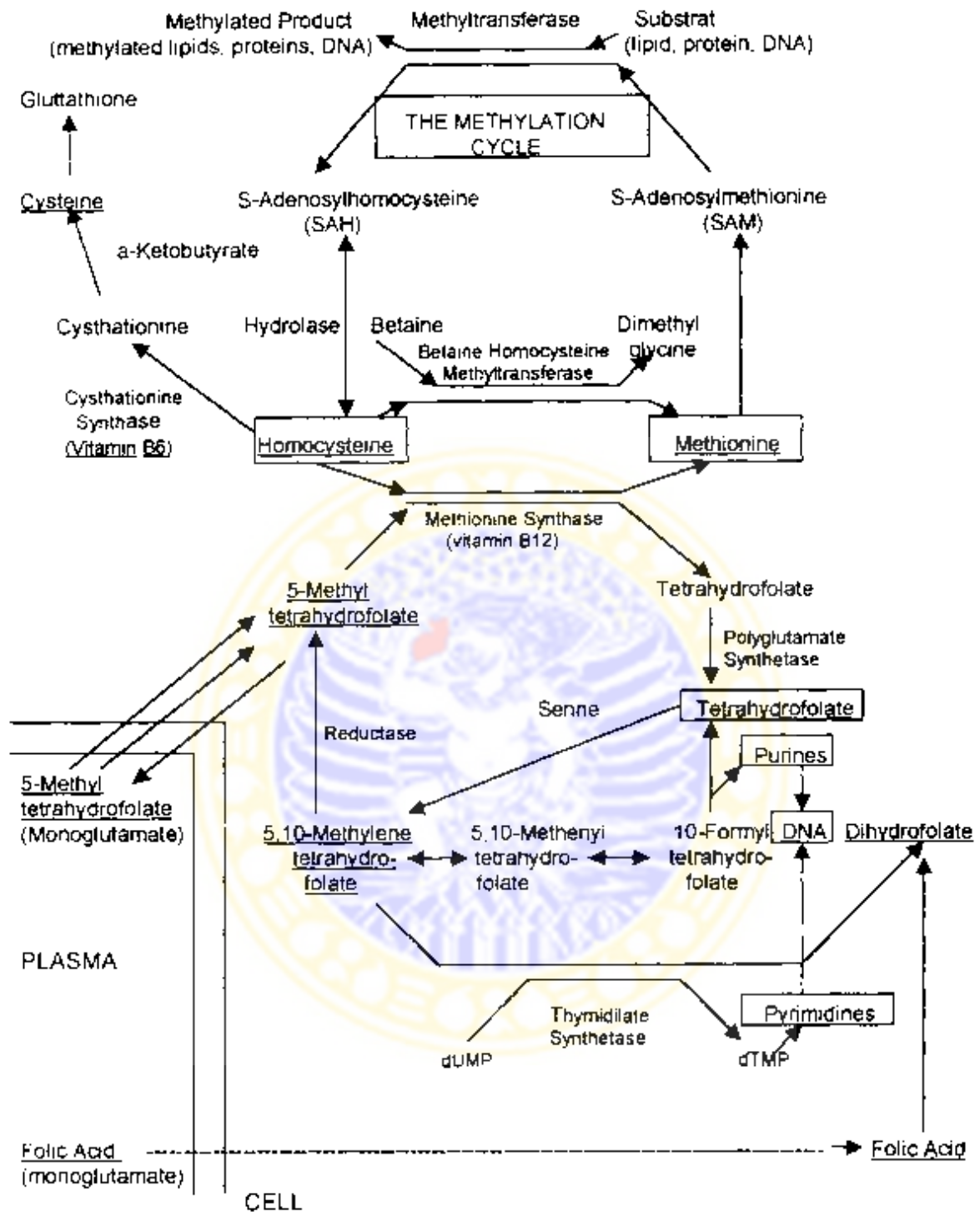
SHMT = serinehidroksilmetiltransferase

Gambar 2.10.1 Metabolisme Metionin dan Homosistein
(Brouwer *et al.*, 1998)



Gambar 2.10.2 Skema Konversi Folat (Brouwer, 1999)

MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUKABAYA



Gambar 2.10.3 Peranan Folat dalam Biosintesis dan Reaksi Metilasi (Donosepoetro, 1998)

2.11 Apoptosis dan nekrosis

Kematian sel dapat terjadi akibat dua mekanisme yang berbeda, yaitu apoptosis dan nekrosis. Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang fisiologis dan terkendali. Disini nukleus mengalami kondensasi dan fragmentasi. membran plasma mengkerut, memperlihatkan *blebbing* dan vesikulasi pada sitoplasma, dan kebanyakan sel yang mati segera difagositosis oleh makrofag tanpa ada isi sel yang tersisa. Keadaan itu kontras berbeda dengan nekrosis, yang setelah adanya kerusakan membran plasma dan nukleus, isi sel ditumpah keluar menyebabkan reaksi inflamatoris lokal (Abbas *et al.*, 1997; Lomaga *et al.*, 2000).

Pada situasi fisiologis, umumnya kondisi homeostasis dijaga dengan kematian sel, yaitu dengan proses apoptosis. Sebagai contoh, eliminasi sejumlah sel yang tidak diinginkan selama embriogenesis, atrofi dan involusi dari sejumlah sel hormon-responsif sebagai akibat penurunan kadar hormon tertentu, itu semua disebabkan oleh apoptosis. Kematian sel terprogram (*programmed cell death*) merujuk pada konsep banyak macam sel yang diprogram untuk mati, kecuali diselamatkan oleh beberapa faktor pertumbuhan dan atau faktor penyelamat khusus (Lomaga *et al.*, 2000).

Kematian sel terprogram adalah suatu mekanisme homeostatik dalam sistem imun, yang fungsi utamanya adalah untuk mempertahankan ukuran dari *lymphoid pool* (atau macam kelompok sel yang lain) agar konstan sepanjang kehidupan. Apoptosis bertanggungjawab untuk 1) eliminasi limfosit prekursor yang telah gagal untuk mengekspresikan berbagai reseptor antigen fungsional dan tidak diseleksi untuk hidup dalam organ limfoid. 2) kematian limfosit (atau sel

lain) yang tidak bertemu dengan antigen pasangannya dan 3) kematian fraksi limfosit-teraktivasi yang tidak terpapar antigen secara kontinyu, atau kurangnya konsentrasi *growth factor*. Sistem imun menggunakan jalur lain dari apoptosis, yaitu dipicu bukan oleh kurangnya stimulasi *growth factor* melainkan oleh karena aktivasi sistem imun yang berulang-ulang (Abbas *et al.*, 1997).

Morfologi sel apoptosis adalah khas, berupa agregasi khromatin, kondensasi nukleus dan sitoplasma, sitoplasma dan nukleus tersekat-sekat, munculnya *apoptotic bodies* yang berisi ribosom, mitokhondria yang intak dan material nukleus. *In vivo*, *apoptotic bodies* ini segera dikenali dan dimakan oleh makrofag dan sel epitelial di sekitarnya. Maka di sini tidak terjadi respon inflamatorik. *In vitro*, *apoptotic bodies* dan fragmen sel yang masih tersisa segera membengkak dan akhirnya lisis. Fase terminal kematian sel *in vitro* ini disebut 'nekrosis sekunder' (Gusev & Skvortsova, 2003; Lockshin & Zakeri, 1986).

Apoptosis dapat ditimbulkan oleh stimulasi berbagai reseptor permukaan sel, berkaitan dengan aktivasi caspase. Sebagai contoh, sistem *ligand* reseptor *Fas* (CD95, APO-1) merupakan mediator utama dari beberapa proses fisiologis dan patofisiologis, termasuk homeostasis dari kompartemen limfoid perifer dan kematian sel. Reseptor *Fas* memulai kaskade transduksi sinyal yang mengawali kematian sel terprogram. Pada fase awal apoptosis, perubahan terlihat pada permukaan sel dan membran plasma. Perubahan pada membran plasma berupa translokasi *phosphatidylserine* (*PS*) dari lapisan dalam membran plasma pindah ke lapisan luar, sehingga *PS* menjadi terpapar di permukaan sel (Gusev & Skvortsova, 2003; Simpson & Russell, 1998).

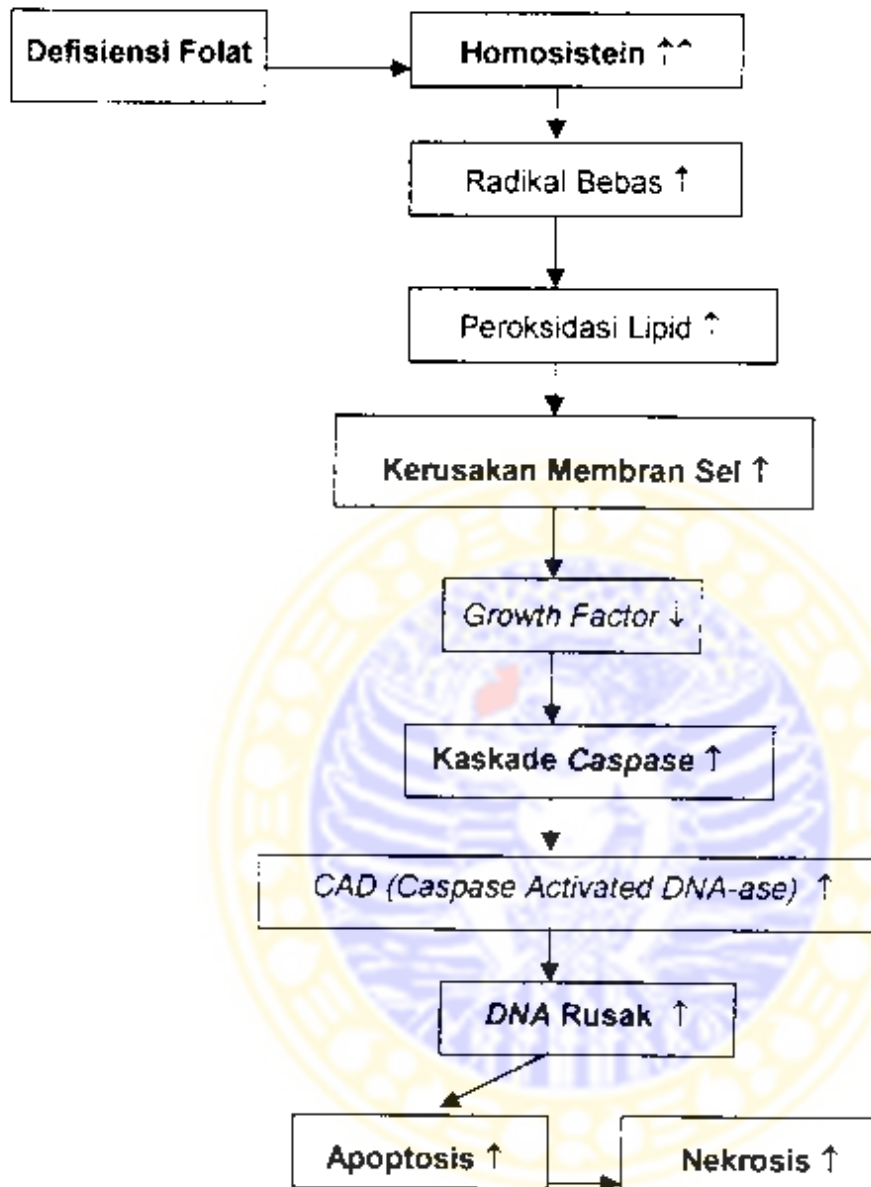
Sinyal yang mengawali aktivasi dari famili 'protease cysteine intraseluler' (disebut Caspase, *Cysteinyl-aspartate-specific proteinases*) memegang peranan sangat penting dalam inisiasi dan eksekusi apoptosis. Sinyal tersebut dipicu oleh berbagai stimulus. Paling tidak terdapat sebelas macam caspase yang sudah teridentifikasi dalam sel mamalia (Lockshin & Zakeri, 1996; Milligan & Schwartz, 1996).

Pada apoptosis dan nekrosis terjadi gangguan pada fisiologi mitokhondria. Selama apoptosis permeabilitas mitokhondria mengalami perubahan dan berbagai macam 'aktivator protease spesifik apoptosis' dikeluarkan dari mitokhondria. Adanya diskontinuitas lapisan luar membran mitokhondria menyebabkan terjadinya redistribusi *cytochrome C* ke *cytosol* diikuti depolarisasi membran mitokhondria lapisan dalam. Selanjutnya, *cytochrome C* (*Apaf-2*) memacu aktivasi caspase dengan melekat pada *Apaf-1*, dengan demikian mengaktifasi *Apaf-3* (caspase 9). Akhirnya *AIF* (*apoptosis inducing factor*), yang dikeluarkan ke dalam sitoplasma, mempunyai aktivitas proteolitik sehingga dia sendiri sudah cukup untuk menimbulkan apoptosis (Gusev & Skvortsova, 2003).

Tanda biokimiawi apoptosis adalah fragmentasi *DNA* genomik, suatu komitmen ireversibel yang merencanakan kematian sel, munculnya sebelum adanya perubahan permeabilitas membran plasma (*prelytic DNA fragmentation*). Di dalam banyak sistem, fragmentasi *DNA* ini merupakan akibat dari aktivasi Ca^{2+} dan Mg^{2+} -dependent nuclear endonuclease. Enzim ini secara selektif membelah *DNA* di antara unit nukleosomal (*linker DNA*) dan fragmen oligonukleosomal (Donosepoetro, 2003; Simpson & Russel, 1998).

Nekrosis terjadi bila sel terpapar kondisi tidak normal (misalnya: hipotermia, hipoksia, serta cedera fisik dan khemis). Proses nekrosis diawali oleh ketidakmampuan sel untuk menjaga homeostasis, diikuti *reflux* air dan berbagai ion ekstrasel. Organel intrasel, terutama mitokhondna, serta seluruh sel membengkak dan ruptur (lisis sel). Akibat kerusakan membran plasma, isi sitoplasma termasuk enzim lisosomal ditumpahkkan ke dalam cairan ekstrasel. Maka secara *in vivo*, kematian sel nekrotik sering disertai kerusakan jaringan yang ekstensif sebagai respon inflamatorik yang intens (Milligan & Schwartz, 1996).

Keadaan hiperhomosisteinemia dapat menimbulkan gangguan dalam homeostasis sel normal (bersifat sitotoksik) dan menyebabkan kondisi yang disebut *accelerated cell death programe*, berupa percepatan timbulnya apoptosis atau kerusakan sel. Di sini terjadi perubahan ekspresi gen terhadap beberapa sitoken serta terbentuknya radikal bebas oksigen (stres oksidatif radikal bebas). Kedua hal tadi meningkatkan peroksidasi lipid dan menyebabkan kerusakan membran sel, sehingga menimbulkan perlangsungan kaskade apoptosis, yang kemudian melepaskan hambatan *CAD (Caspase Activated DNA-ase) inhibitor*. Selanjutnya *CAD* merusak *DNA*, terjadilah percepatan program apoptosis dan nekrosis sel (Hidayat, 2003; Stoian *et al.* 1996; White, *et al.*, 2000). Untuk jelasnya, dibuat skema hubungan antara hiperhomosisteinemia dengan kerusakan sel dalam Gambar 2.8.3.



Gambar 2.11 Hubungan Hiperhomosisteinemia dengan Kematian Sel (Stoian *et al.*, 1996. White *et al.*, 2000)

TABEL 2.11 PERBEDAAN NEKROSIS DAN APOPTOSIS

Feature	Necrosis	Apoptosis
1. Mode	Passive	Active
2. Energetic expences	Absent	Present
3. RNA demand	Absent	Present
4. Demand for protein synthesis	Absent	Present
5. DNA degradation	Nonspecific	Specific fragmentation
6. Morphological feature:		
- distribution	Large cell fields	Selective cell loss
- membranes	Destruction	Stay intact
- organelles	Swelling and fragmentation	Stay intact
- condensation of chromatin	In chaotic masses	In homogenous and dense mass
- cytosolic membrane-associated protrusions	Absent	Present
7. End-point	Edema and lysis	Cell shrinkage and formation apoptotic bodies
8. Efflux of intrasellular content into adjacent tissue	Present	Absent
9. Inflammatory reaction	Present	Absent
10. Phagocytosis	Intens	Moderate
11. Significance	Always pathological	Physiological (implicated in growth, development, homeostasis support); possibly pathological
12. Intensity of triggering influence	Prominent	Moderate

(Gusev & Skvortsova, 2003)

2.12 Landasan teori

Macam stimulus terhadap sel untuk memacu fungsi dan aktivitasnya adalah stimulus mekanik (fisik) dan stimulus kimiawi. Rangsang kimiawi berupa antigen, hormon dan *growth factor* telah diketahui berkaitan dengan reseptor pada permukaan sel serta dapat merangsang aktivitas sel.

TGF-β1 dan *IGF-I* adalah dua faktor pertumbuhan yang beraksi mitogen yang poten bagi osteoblas dan khondroblas, bahkan *TGF-β1* mampu menginduksi sel jaringan ikat mesenkhimal menjadi sel osteoprogenitor pembentuk tulang, yang disebut sebagai aksi osteoinduktif. Induksi tersebut berlangsung melalui proses granulasi, khondrogenesis dan atau osteogenesis, serta pembentukan osteoid dan kalsifikasi (Roth, *et al.*, 1997; Sirica, 1997). Kedua faktor pertumbuhan tersebut juga berperanan dalam proses fertilisasi, migrasi, implantasi dan embriogenesis. Rendahnya kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* akan menimbulkan berbagai masalah embriologis, seperti gangguan migrasi tropoblas (Lacey *et al.*, 2002), kesulitan implantasi embrio ke dalam lapisan desidua maternal (O'Neil, 1997; Gardner, 1999; Margawati, 1999) dan organogenesis (Martinasevic *et al.*, 1999; O'Neil, 1997).

Setelah disintesis oleh sel-sel induk (makrofag untuk *TGF-β1* dan hepatosit untuk *IGF-I*), kedua sitoken tersebut masuk sirkulasi darah dan kemudian tertimbun di dalam jaringan, terbanyak pada jaringan tulang sebagai matriks ekstraseluler. *TGF-β1* dan *IGF-I* juga dapat menembus jaringan plasenta lewat aliran umbilikal dan kemudian masuk sirkulasi janin dan sebagian akhirnya tertimbun dalam tulang kepala janin (Roth *et al.*, 1977; Sirica, 1976).

Terjadinya defek tulang kepala pada janin adalah bagian dari gangguan organogenesis, berupa kegagalan penutupan tabung saraf (*neural tube defect*). Gangguan pada tahap neurulasi berupa tetap melekatnya ektoderm neural dengan ektoderm epidermis pada garis tengah akan menyebabkan ketidakmampuan penutupan neuroporus rostral pada foramen caecum. Perlekatan itu menghambat migrasi sel-sel mesoderm pembentuk tulang tengkorak ke ruang yang terletak di antara ektoderm neural dan ektoderm epidermis, sehingga terjadi celah (defek) di daerah tersebut. Adanya defek dan perbedaan tekanan antara kompartemen intrakranial dan cairan amnion akan menyebabkan penonjolan melalui defek dan terjadilah meningokel (Hoving, 1993).

Meskipun belum ada penjelasan tentang basis molekulernya, para peneliti telah menyimpulkan bahwa sekitar 70% kasus *NTD* (termasuk di dalamnya meningokel) dapat dicegah dengan pemberian suplementasi asam folat dengan dosis 4 mg perhari, sebelum terjadi kehamilan sampai usai kehamilan trimester pertama. Suplementasi asam folat juga dapat mencegah infark dan pelepasan dini plasenta (abortus), persalinan preterm dan retardasi pertumbuhan intrauterin (Margawati, 1999; O'Neil, 1997).

Asam folat memiliki tiga efek fisiologis: pertama, sebagai ko-faktor pada enzim yang mensintesis *DNA* dan *RNA*; kedua, diperlukan untuk konversi homosistein menjadi metionin, dan ketiga, diperlukan untuk proses metilasi dalam pembentukan protein. Sewaktu awal pertumbuhan fetus, sintesis asam nukleat dan protein berada dalam kondisi puncak dan selama masa ini kebutuhan folat maternal meningkat tajam. Bila folat tidak mencukupi, asam nukleat terhambat

dan sel tidak mampu memfasilitasi *DNA* untuk mitosis. Terhambatnya siklus metilasi juga mengakibatkan ketidakmampuan *DNA* dan *m-RNA* sel untuk mensintesis asam amino dan protein (Acuna, *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2001). termasuk *TGF-β1* dan *IGF-I*.

Defisiensi asam folat menyebabkan hiperhomosisteinemia yang dapat mengganggu homeostasis sel normal. Di sini terjadi peningkatan kadar radikal bebas oksigen, meningkatkan peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel, apoptosis dan nekrosis, yang mungkin didahului oleh (atau diikuti) penurunan kadar faktor pertumbuhan tertentu (Stoian *et al.*, 1996; White *et al.*, 2000).

2.13 Penelitian defisiensi nutrisi dengan hewan-coba

Batasan hewan-coba adalah sekelompok hewan homogen yang mempunyai persamaan biologis, dapat diperlakukan untuk terjadinya proses biologis secara coba-coba, dapat dipakai untuk penelitian ilmiah, yang dengan segala keterbatasannya dapat menyerupai kondisi pada manusia. Untuk berbagai penelitian yang berkaitan dengan nutrisi, toksikologi, *behavioral* dan onkologi, tikus merupakan hewan-coba yang paling sesuai (oleh karena itu paling sering digunakan) karena sedikit kedekatannya dengan manusia, antara lain : mamalia, pemakan sembarang (omnivora), mudah berkembang-biak dan mudah dilakukan perlakuan (Setokoesoemo, 1986). Ada dua sifat yang membedakan tikus dengan hewan-coba yang lain, yaitu tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomis yang tidak lazim di tempat esofagus bermuara ke dalam lambung dan tikus tidak mempunyai kandung empedu (Arrington, 1981)

Berat badan tikus laboratorium umumnya lebih ringan daripada tikus liar. Pada umur 4 minggu, beratnya 35-40 gram dan berat dewasa rata-rata 200-250 gram, tergantung pada galur (spesies). Tikus jantan tua dapat mencapai berat 500 gram sedangkan tikus betina jarang lebih dari 350 gram. Spesies Sprague-Dawley adalah galur yang paling besar, sebesar tikus liar (Hume, 1972; Roe, 1988).

Tabel 2.13.1

Data Biologis Tikus

Lama hidup	2-4 tahun
Lama bunting	20-22 hari
Kawin sesudah beranak	sampai 24 jam
Umur dewasa	40-60 hari
Umur dikawinkan	10 minggu (jantan dan betina)
Fertilisasi	7-10 jam sesudah kawin
Berat badan dewasa	350-500 g. jantan ; 250-350 g. betina
Berat lahir	5-8 gram
Jumlah anak	rata-rata 9, dapat mencapai 20.
Perkawinan kelompok	3 betina dengan 1 jantan
Aktivitas	nokturnal (malam hari)

(Hume, 1972)

Kebutuhan nutrisi pada hewan-coba pada garis besarnya dibagi dalam lima kelompok, yaitu:

- * Karbohidrat
- * Lemak atau lipid
- * Protein
- * Mineral atau elemen-elemen anorganik
- * Vitamin-vitamin

Diet eksperimental membutuhkan bahan ramuan yang betul-betul murni (*purified diets*). Pada diet yang demikian, karbohidrat diberikan dalam bentuk campuran gula murni dan tepung tapioka; untuk lemak digunakan minyak nabati murni atau lemak hewani. Protein diberikan dalam bentuk terpisah (bukan campuran) atau asam-asam amino tertentu. Kasein dari susu adalah protein kualitas tinggi yang sering digunakan, di samping protein dari kedelai. Selulose ditambahkan untuk unsur serat. Mineral diberikan dalam bentuknya masing-masing ataupun bentuk campuran. Beberapa vitamin, seperti halnya mineral, dapat dipasok dalam bentuk mikstur (campuran) atau tersendiri (Arrington, 1981; Van Wouwe, 1991)

Vitamin adalah senyawa organik yang dibutuhkan dalam jumlah kecil pada diet beberapa spesies hewan-coba. Berdasarkan kelarutannya, vitamin dibagi menjadi: vitamin larut-lemak (*fat-soluble*) dan vitamin larut-air (*water-soluble*). Termasuk vitamin larut-lemak adalah Vitamin-A, D, E (*α-tocopherol*) dan Vitamin-K, sedangkan vitamin larut-air adalah: Thiamin, Riboflavin, Niasin,

Piridoksin, Asam Pantotenat, Asam Folat, Sianokobalamin, Biotin, Kolin dan Asam Askorbat (Arrington, 1981).

Kebutuhan tikus akan asam folat dalam makanan adalah sekitar 7.5 (7.0-8.0) $\mu\text{g}/100 \text{ gr/hari}$ (Arrington, 1981; Durand *et al.*, 1997). Kadar asam folat dalam eritrosit tikus adalah 900-1200 ng/ml, sedangkan dalam serum 15-30 ng/ml (Arrington, 1981). Asam folat untuk keperluan diet eksperimental tersedia dalam bentuk tablet ataupun serbuk asam folat murni. Untuk mencegah terjadinya sintesis alami asam folat oleh flora usus tikus, ke dalam *purified diet* yang digunakan, perlu ditambahkan 1% Suksinilsulfatiazol (SST) yang merupakan derivat dari Sulfanilamide (Arrington, 1981; Durand *et al.*, 1997; Johnson, 1972).



Tabel 2.13.2
Contoh Purified Diets

Nutrien	Bahan	Tikus	Kelinci
		% Bahan	
Karbohidrat	Glukose/Sukrose	29	18
	Tapioka	30	40
Lemak	Minyak nabati	5	3
Protein	Kasein non-vitamin	26	22
	Protein mumi		
	Campuran asam amino		
Bahan kasar	Celulose	5	12
Mineral	Campuran mineral	5	5
Vitamin	Campuran vitamin	1	1
		100	100

(Arrington, 1981)

Komposisi lain sebagai alternatif *purified diet* untuk studi eksperimental hewan-coba dikemukakan oleh Van Wouwe (1991) seperti tercantum dalam tabel berikut.

Tabel 2.13.3

Komposisi *Purified Diet* semisintetis untuk hewan-coba

Bahan	% Berat	Trace elements	Berat (μmol)
Glukose	50	As 1	I 2
Tepung jagung	15	B 10	Mn 900
Ovalbumin	20	Co 2	Mo 2
Sunflower Oil	4	Cr 40	Ni 40
Selulose	5	Cu 150	Se 2
Choline-Cl	1	F 130	Sn 20
Mineral	4	Fe 1000	V 2
Vitamin mix	1	Zn 260	
Trace elements	0.1		

(Van Wouwe, 1991)

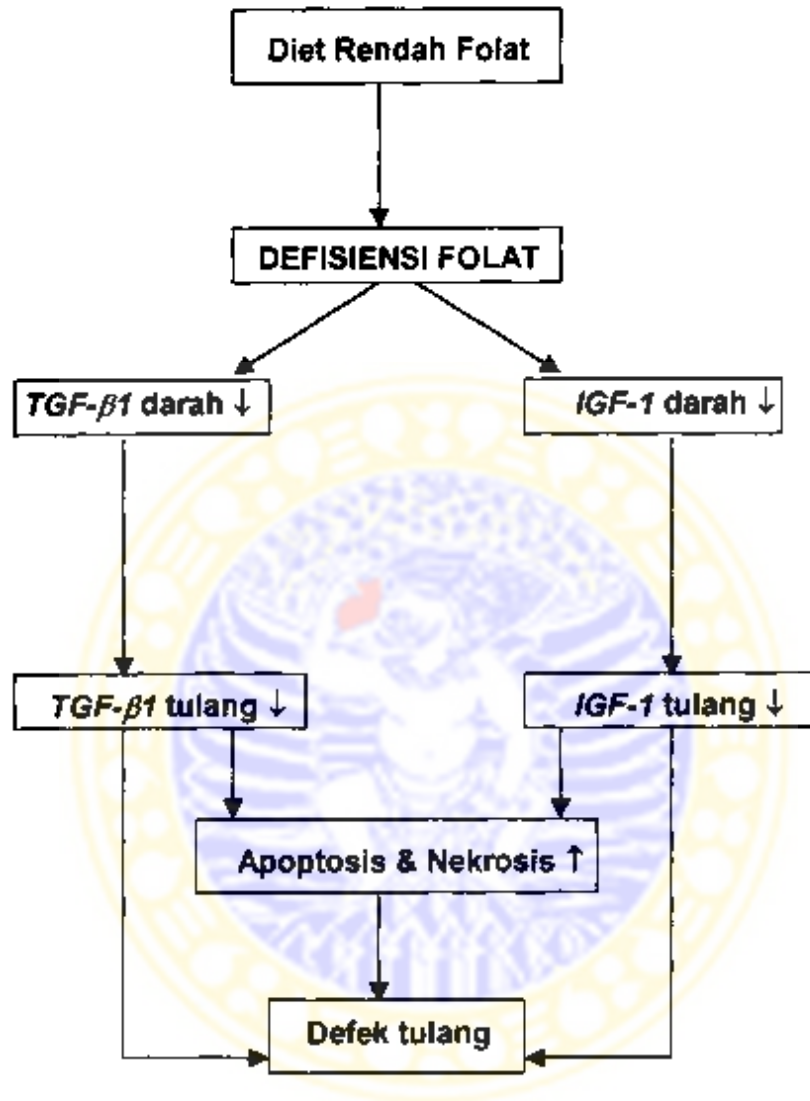
BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

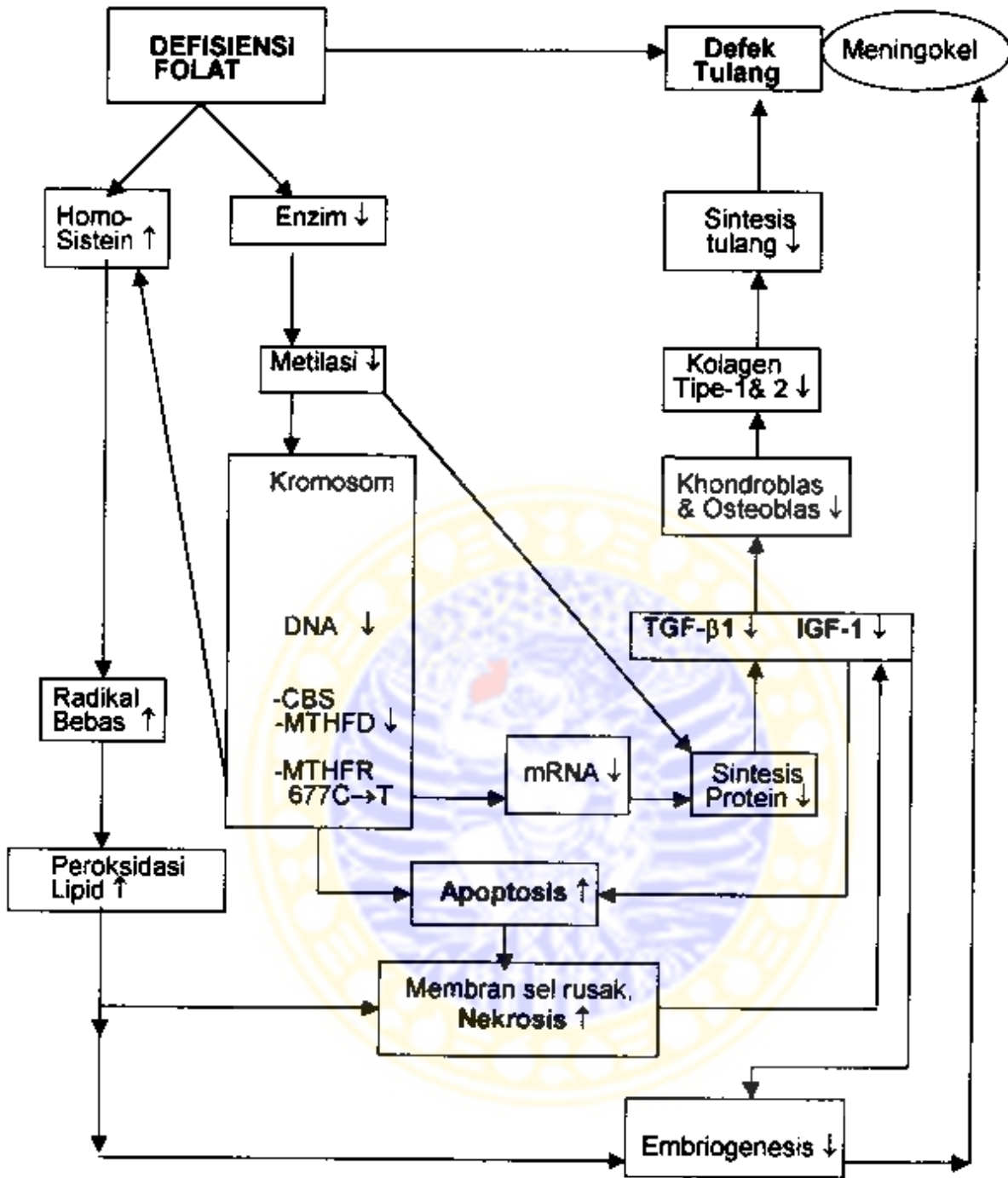
3.1. Kerangka konsep penelitian

Mekanisme terbentuknya lubang pada tulang kepala penderita meningokel belum diketahui, meskipun sudah terungkap ada kaitan antara defisiensi asam folat pada ibu saat awal kehamilan dengan kejadian *NTD* termasuk meningokel, yaitu pemberian suplementasi asam folat perikonsepsional dapat mencegah prevalensi dan rekurensi sekitar 70%. Para peneliti yang mencari basis molekuler dari perubahan gen akibat defisiensi asam folat, menyimpulkan terdapat defek gen *MTHFR* (metilentetrahidrofolat reduktase) dan terjadi mutasi gen $677C \rightarrow T$ pada kasus-kasus meningokel non-familier (Copp, 1998; Eskes *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 1998; Zittoun *et al.*, 1998). Mutasi gen menyebabkan sintesis asam amino dan polipeptida (protein) yang disandi oleh gen tersebut mengalami perubahan. Pada kasus meningokel, belum diketahui jenis polipeptida yang tidak terbentuk dengan baik.

Secara embriologis, tulang kepala tersusun atas matriks yang terdiri atas kolagen tipe-1 dan tipe-2, pembentuk jaringan kartilago dan jaringan tulang. Kolagen tipe-1 dan 2 adalah suatu protein matriks ekstrasel yang disintesis oleh osteoblas dan khondroblas. Kedua sel muda tersebut fungsinya masing-masing dipacu oleh dua faktor pertumbuhan yang merupakan ikatan dari beberapa rantai peptida, yaitu *TGF- β 1* dan *IGF-1*.



Gambar 3.1.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1.2 Kerangka Teori

Sudah banyak penelitian yang mengungkap aktivitas *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam memacu pertumbuhan dan pembentukan tulang baru (Beck *et al.*, 1991; Cheifetz *et al.*, 1999; Massague *et al.*, 1998). Pada kasus akromegali yang antara lain berupa pertumbuhan tulang yang lebih panjang dari normal, didapatkan kenaikan kadar *IGF-I* (Steed, 1997). Pada kraniosinostosis, yaitu sutura tulang kepala bayi sudah menutup sebelum waktunya yang sekitar usia 2 tahun, terjadi kenaikan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* pada tulang sutura (Roth *et al.*, 1997).

Dengan menggunakan analogi: karena defek pada meningokel disebabkan tidak sempurnanya fusi tulang kepala, logikanya adalah pada saat terjadi proses fusi tulang, yaitu pada sepertiga pertama kehidupan embrio, kemungkinan terdapat kekurangan kadar kedua macam faktor pertumbuhan yang berfungsi untuk memacu sintesis tulang tersebut, yaitu *TGF- β 1* dan atau *IGF-I* dalam serum induk dan tulang kepala janin, serta lebih banyak sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Karena meningokel ada kaitannya dengan defisiensi asam folat perikonsepsional, maka besar kemungkinan terdapat korelasi antara kadar asam folat dalam darah induk dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk dan tulang kepala janin serta dengan jumlah sel apoptosis dan nekrosis.

TGF- β 1 adalah molekul 2 rantai polipeptida yang disandi oleh satu atau lebih gen sewaktu tahap pre dan post-transkripsi serta tahap replikasi. Faktor pertumbuhan ini merupakan molekul yang mempunyai banyak fungsi, dapat menstimulasi atau menghambat pertumbuhan dan diferensiasi sel yang berbeda, yang mempunyai reseptor untuk molekul ini. *TGF- β 1* adalah stimulator sintesis kolagen, proteoglikan, elastin dan fibronektin (Steed, 1997), juga merupakan

mitogen yang poten bagi makrofag, sel otot polos dan osteoblas untuk mensintesis matriks ekstrasel; tetapi faktor pertumbuhan itu dapat juga secara langsung mengatur sintesis bermacam-macam molekul dalam matriks ekstrasel, termasuk kolagen, fibronektin, elastin dan glikosaminoglikan. Di dalam tubuh, keberadaan *TGF- β 1* dipengaruhi usia, jenis kelamin dan status gizi, termasuk kadar beberapa mikronutrien dan vitamin tertentu, yaitu : *zink*, vitamin C, vitamin A dan vitamin D (Sirica, 1996; Steed, 1997).

IGF-1 beredar dalam keadaan inaktif, terikat pada protein pengangkutnya. Aktivitas faktor pertumbuhan ini adalah menstimulasi: a) sintesis glikogen, protein, glikosaminoglikan; b) transport glukosa dan asam amino menembus membran sel; c) sintesis kolagen. Kadar *IGF-1* tergantung pada banyak faktor, yaitu : usia, jenis kelamin, kadar hormonal dan status gizi. Hormon-hormon yang mengatur kadar *IGF-1* adalah prolaktin, hormon tiroid dan hormon seks (Cheng *et al.*, 2000; Cohick & Clemmons, 1995).

Defisiensi folat menyebabkan gangguan siklus metilasi-enzim yang diikuti dengan hiperhomosisteinemia, kerusakan *DNA*, gangguan sintesis protein dan penurunan kadar beberapa faktor pertumbuhan. Kesemuanya dapat mengganggu kondisi homeostasis, yang akhirnya juga melibatkan proses fisiologis apoptosis dan nekrosis. Gangguan itu mengakibatkan terjadinya kondisi yang disebut 'kematian sel terprogram yang dipercepat' (*accelerated program cell death*), yang akan meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Abbas *et al.*, 1997; Stoian *et al.*, 1996)

3.2. HIPOTESIS PENELITIAN

Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

- 3.2.1 Ada korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* di dalam serum induk tikus.
- 3.2.2 Ada korelasi diet rendah asam folat dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus melalui rendahnya kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus.
- 3.2.3 Ada korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus.
- 3.2.4 Ada korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis.
- 3.2.5 Ada korelasi tidak langsung kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel.
- 3.2.6 Ada korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala di tepi defek dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel.

BAB 4

METODE PENELITIAN

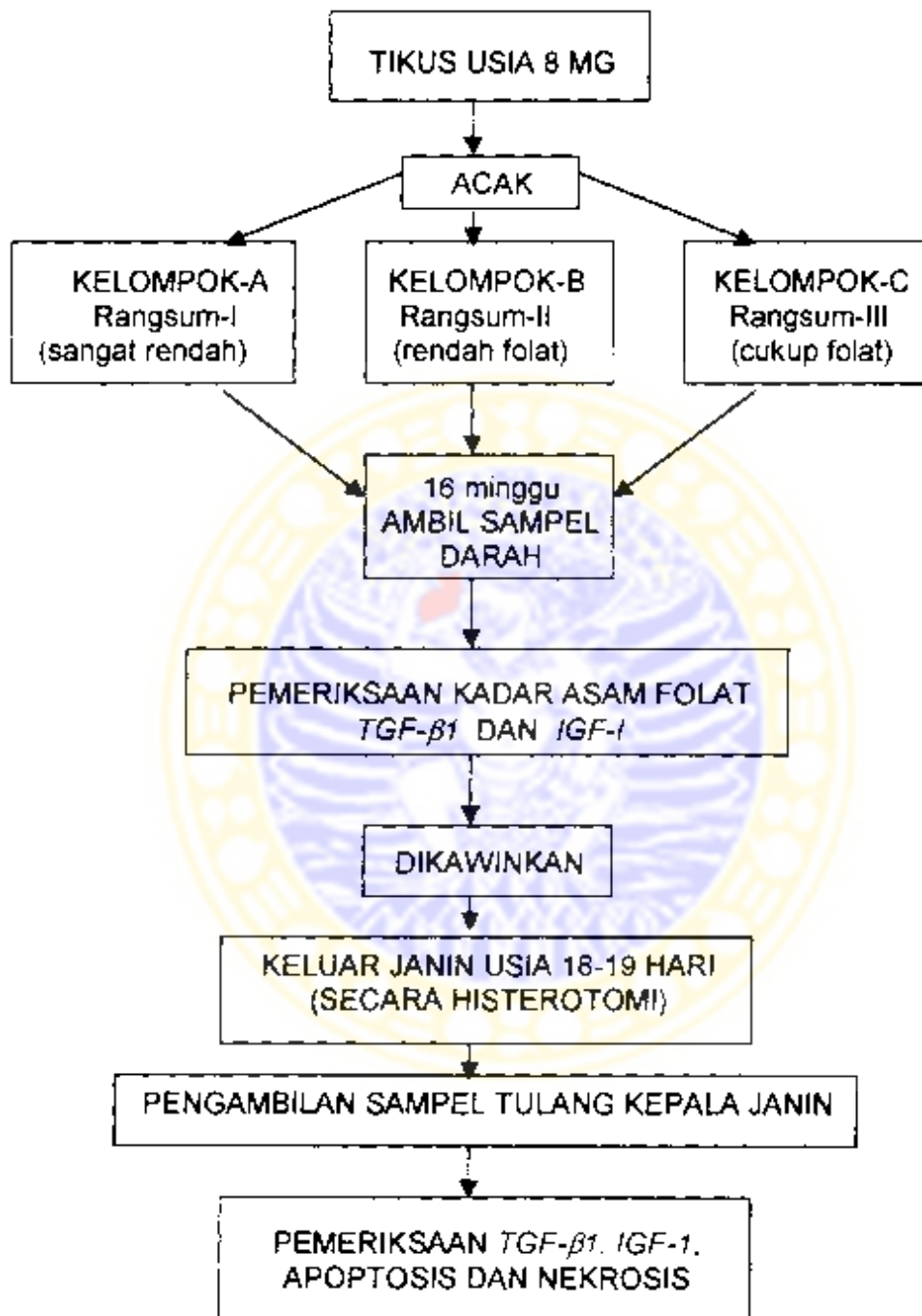
4.1. Penelitian untuk menguji hipotesis pertama sampai dengan kelima

4.1.1 Rancangan penelitian

Macam penelitian yang digunakan untuk menguji hipotesis pertama sampai dengan kelima adalah Penelitian Eksperimental Laboratoris dengan rancangan : *Randomized Control Group Posttest Design* (Tjokroprawiro dkk., 1996), menggunakan tikus betina jenis *60 Sprague-Dawley Rats* sebagai hewan-coba. Perlakuan berupa pemberian diet (rangsum) dengan kadar asam folat yang sangat rendah dan rendah, dengan tujuan mendapatkan tikus yang mengalami defisiensi asam folat dengan derajat berat dan sedang. Hewan-coba dibagi dalam tiga kelompok, yaitu Kelompok-A, perlakuan defisiensi folat berat, diberikan rangsum dengan asam folat yang sangat rendah (rangsum-I); Kelompok-B, perlakuan defisiensi folat sedang, diberikan rangsum dengan asam folat takaran rendah (rangsum-II); dan Kelompok-C, pemberian rangsum dengan takaran asam folat yang cukup (rangsum III), sebagai kontrol.

Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode Rancangan acak lengkap (RAL) atau *Randomized completely design (RCD)*. mengingat hewan coba, bahan rangsum dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Dengan rancangan ini dimungkinkan setiap hewan-coba berpeluang sama untuk memperoleh kesempatan menjadi hewan kelompok perlakuan atau kelompok kontrol.

Dipilihnya hewan-coba tikus olehkarena merupakan salah satu hewan yang baku bagi percobaan perlakuan pemberian rangsum (Arington, 1981; Hume, 1972).



Gambar 4.1.1 Rancangan Penelitian

4.1.2 Subyek dan replikasi

Subyek penelitian adalah hewan coba tikus spesies *Sprague-Dawley Rats* jenis kelamin betina, dengan usia dan berat badan tidak jauh berbeda. Tikus ditentukan berusia sekitar 8 minggu sehingga diharapkan saat akhir perlakuan sudah dapat dikawinkan, hamil dan melahirkan (sekitar usia 24 minggu).

Besar replikasi dihitung dengan rumus . $n \geq \frac{15 + p}{p}$

n : jumlah replikasi tiap kelompok perlakuan

p : jumlah perlakuan = 3, maka $n \geq 6$ (digunakan 10 ekor tikus)

(Sudigdo & Sofyan, 1995).

Dengan demikian untuk perlakuan sebanyak tiga macam, agar diperoleh data yang teliti, diperlukan ulangan paling sedikit 6 kali untuk masing-masing perlakuan. Maka diperlukan minimal 3×6 ekor = 18 ekor tikus betina. Penempatan obyek penelitian ke dalam perlakuan dilakukan secara acak bagi seluruh satuan tikus. Teknik randomisasi adalah sebagai berikut : (1) Membuat nomor untuk setiap anggota kelompok perlakuan, misalnya A1,A2 dan seterusnya sampai dengan A10 untuk perlakuan rangsum rendah folat; B1,B2 sampai dengan B10 untuk perlakuan rangsum sedang. C1,C2 sampai dengan C10 untuk perlakuan rangsum kontrol. (2) Melakukan undian terhadap nomor tersebut, untuk urutan randomisasi perlakuan dan ulangan. kemudian dibuat tabel (3) Membuat nomor tikus 1 sampai dengan 30, kemudian nomer tersebut diundi seperti cara 2, dan dibuat tabel (4) Dengan demikian akan diperoleh pasangan antara nomer tikus dengan nomer perlakuan.

4 1.3 Perlakuan terhadap subyek penelitian

Hewan-coba Kelompok-A diberi diet sangat rendah asam folat dan diberi pejantan normal untuk dikawinkan, setelah bunting ditunggu sampai usia kebuntingan 18-19 hari, kemudian dilakukan histerotomi untuk mengeluarkan janin. Dua kelompok lain, masing-masing 10 ekor tikus dengan jenis, umur dan berat yang sama dengan Kelompok-A. diberi diet rendah asam folat (Kelompok-B) dan diet cukup asam folat (Kelompok-C), selanjutnya diperlakukan sama dengan Kelompok-A

Cara mendapatkan rangsum hewan-coba dengan asam folat yang sangat rendah, rendah dan cukup yaitu dengan *pellet* yang dibuat sendiri, menggunakan acuan dari buku standar kandungan nutrisi dan mikronutrien di dalam bahan pakan mentah seperti yang dikemukakan oleh Arrington (1981) dan Van Wouwe (1991). dan dengan memperhatikan kebutuhan normal tikus terhadap asam folat. Kebutuhan tikus akan asam folat adalah 7.0-8.0 ug/100 gr/hari, atau sekitar 7.5 ug/100 gr/hari (Arrington, 1981; Durand *et al.*, 1997; Koentjoko, 2000).

Komposisi bahan baku dasar dengan kandungan folat yang sangat rendah, rendah dan cukup perhari adalah sebagai berikut

Glukosa	350 gram
Casein	100 gram
Cellulosa	: 70 gram
Suksnilsulfatiazol	5 gram
Choline-Cl	. 5 gram
Sunflower oil	15 ml

Mineral	:	100 ml
Trace element		20 ml
Vitamin mix. (tanpa folat)	:	0.6 ml
Asam Folat (per-sonde oral)	:	0.1 ml (I); 0.3 ml (II); 0.6 ml (III).

Kandungan mineral yang diberikan dalam setiap menu diet adalah sebagai berikut.

KCl		0.7 gram
Na ₂ HPO ₄	:	1.5 gram
CaCO ₃	:	1.0 gram
MgSO ₄	:	0.5 gram

Keempat zat tersebut di atas dilarutkan dalam 300 ml H₂O dan dibagikan pada setiap kelompok masing-masing 100 ml.

Campuran vitamin yang digunakan adalah Abdec drop® (Parke-Davis) yang setiap 0.6 ml obat tetes mengandung : Vit-A 5000 UI, Vit-D 400 UI, Vit-B1 1 mg, B6 1 mg, Na-pantotenat 5 mg, B12 2 mcg, nikotinamid 10 mg, Vit-C 50 mg.

Bahan untuk *Trace element* yang ditambahkan adalah campuran terdiri dari Disodium Hidrogen Arsenat Heptahidrat (Na₂HAS304.7H₂O), Sodium Boraks Decahidrat (Na₂B307 10H₂O), Cobalt Sulfat Heptahidrat (CoS04.7H₂O), Crom Chloride Hexahidrat (CrCl3.6H₂O), Cuper Sulfat Pentahidrat (CuS04.5H₂O), Sodium Fluorida (NaF), Feri Sulfat Pentahidrat (FeS04.7H₂O), Potasium Iodat (KI03), Mangan Sulfat Hidrat (MnS04.H₂O), Sodium Molibdat Dihidrat (Na₂Mo04 2H₂O), Nikel Chloride Hexahidrat (NiCl2.6H₂O), Sodium Selenit

Pentahidrat ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Stanum Chloride Dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Amonium Vanadat (NH_4VO_3), Zincum Okside (ZnO). Setiap bahan mempunyai berat 1.2 mg/1000 ml, atau 1.2 mg dalam 1000 gram pakan.

Untuk Kelompok-A diberikan asam folat sejumlah 0,1 ml/hari/ekor (rangsum I). Kelompok-B ditambahkan asam folat 0,3 ml/hari/ekor (rangsum II), sedangkan untuk Kelompok-C ditambahkan 0,6 ml/hari/ekor (rangsum III). Satu ml larutan mengandung asam folat berupa serbuk murni sebanyak 50 μg . Larutan asam folat diberikan secara oral dengan sonde. Pemberian sonde larutan asam folat selanjutnya disesuaikan dengan berat badan hewan-coba. Dengan cara demikian didapatkan kelompok A adalah tikus dengan diet asam folat yang sangat rendah, kelompok B adalah tikus dengan diet rendah folat dan kelompok C adalah tikus dengan diet cukup asam folat.

4.1.4 Variabel penelitian

Karena hipotesis yang hendak diuji dalam penelitian ini adalah adanya hubungan antara diet rendah folat dan kadar asam folat dalam darah dengan kadar *TGF- β 1* & *IGF-1* di dalam serum induk (penelitian pertama dan kedua), serta kadar *TGF- β 1* & *IGF-1* dan jumlah sel apoptosis & nekrosis dalam tulang kepala janin yang dilahirkan secara histerotomi pada hari ke 18-19 kebuntingan (penelitian ketiga dan keempat), maka variabel yang akan diperiksa adalah kadar dari ketiga zat biokimiawi tersebut dan jumlah sel yang mengalami apoptosis atau nekrosis.

- **Variabel bebas**

Dalam penelitian eksperimental, variabel bebas adalah perlakuan, sehingga variabel bebas pada penelitian ini adalah diet asam folat. Tigapuluh hewan-coba tikus dalam kondisi homogen mengenai jenis kelamin, umur dan berat badan, dibagi dalam tiga kelompok berdasarkan macam perlakuan, yaitu :

- a. Kelompok pertama terdiri dari 10 ekor tikus, diperlakukan dengan pemberian rangsum sangat rendah asam folat sehingga diharapkan akan mengalami defisiensi asam folat derajat berat.
- b. Kelompok kedua terdiri dari 10 ekor tikus, diperlakukan dengan pemberian rangsum rendah asam folat, diharapkan mengalami defisiensi asam folat derajat sedang.
- c. Kelompok ketiga terdiri dari 10 ekor tikus yang diberi rangsum dengan asam folat cukup, sebagai kontrol.

- **Variabel antara**

Variabel antara dalam penelitian eksperimental adalah respons subyek penelitian terhadap perlakuan, yang berlaku sebagai penghubung antara variabel bebas dengan variabel tergantung. Dalam penelitian ini yang dimaksud dengan variabel antara adalah kadar asam folat dalam eritrosit dan serum induk tikus, sampel darah diambil 16 minggu setelah diberikan perlakuan, diperiksa dengan metode *Folateimmunoassay (Fia)*.

- **Variabel tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian eksperimental merupakan respons subyek penelitian terhadap perlakuan yang diberikan. Dalam penelitian ini respon

yang diamati setelah 16 minggu pemberian perlakuan adalah kadar *TGF- β 1* dan kadar *IGF-I* dalam serum induk yang diperiksa dengan metode *Enzyme-linked immunosorbent Assay (Elisa)* dan kadar kedua *growth factor* tersebut dalam tulang kepala janin tikus yang diperiksa dengan metode imunohistokimia. Termasuk dalam variabel tergantung adalah jumlah sel yang mengalami apoptosis atau nekrosis dalam tulang kepala janin tikus yang dilahirkan secara histerotomi, diperiksa dengan metode imunohistokimia.

• **Variabel kendali**

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan oleh peneliti agar subyek penelitian berupa hewan-coba tikus dalam keadaan homogen. Pengendalian yang dilakukan adalah dengan cara inklusi dan eksklusif, yaitu hewan-coba yang memenuhi syarat dimasukkan (inklusi) dalam sampel penelitian, sedangkan yang tidak memenuhi syarat dikeluarkan (eksklusi) dari penelitian. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

- (a) Tikus spesies Sprague-Dawley
- (b) Jenis kelamin, dipilih tikus berkelamin betina
- (c) Umur, pemilihan umur tikus adalah tikus masa produktif, yaitu umur 6 minggu sampai 8 minggu.
- (d) Berat badan tikus, dipilih dalam keadaan seragam, yaitu sekitar 250 gram dengan standar deviasi 10%.
- (e) Tikus dalam keadaan sehat.
- (f) Kandang, pemeliharaan, cara memberikan perlakuan dan metode pemeriksaan, dibuat dalam keadaan seragam.

4.1.5 Definisi operasional variabel

1. **Diet rendah folat** adalah pemberian *purified diet* pada tikus sesuai komposisi van Wouwe (1991), ditambahkan larutan asam folat dengan kadar sangat rendah lewat sonde oral sebanyak 0.1 ml/hari (setara 5 µg asam folat).

2. **Asam folat** adalah bentuk komponen vitamin-B kompleks dengan aktivitas biologis sebagai asam pteroilmonoglutamat (FAO, 1988), kadarnya dalam serum dan sel darah merah (eritrosit) induk, diperiksa menggunakan metode *Competitive Binding Folate-immunoassay (Fia)*. 16 minggu setelah hewan coba diberi diet. Darah tikus diambil lewat vena di ekor pada sore hari sekitar pukul 14.00, setelah dipuasakan 8 jam. Untuk memudahkan pengambilan sampel darah, tikus diinjeksi Ketalar@ 0,1 mg/KgBB.

3. **TGF-β1** adalah faktor pertumbuhan yang beraksi mitogen bagi osteoblas dan khondroblas serta menstimulasi sintesis kolagen tipe-1 dan tipe-2 yang merupakan matriks penyusun tulang. Kadarnya diperiksa dalam serum induk dengan teknik *Quantitive Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa)*, 16 minggu setelah diberi diet. Juga diperiksa kadarnya di dalam tulang kepala janin dengan teknik imunohistokimia.

4. **IGF-I** adalah faktor pertumbuhan yang beraksi menstimulasi osteoblas dan pembentukan matriks tulang, dipenksa kadarnya dalam serum induk 16 minggu setelah pemberian diet, menggunakan metode *Elisa*. Juga diperiksa kadarnya di dalam tulang kepala janin dengan teknik imunohistokimia.

5. **Apoptosis** adalah kematian sel yang sudah diprogram agar dapat dicapai keadaan homeostatis. Prosesnya dapat dipercepat dan diperbanyak oleh karena fragmentasi *DNA* dan *growth factor*. Nekrosis adalah kematian sel akibat hipoksia, hipotermi, cedera khemis atau cedera mekanis. Jumlah sel apoptosis dan nekrosis diperiksa dengan metode imunohistokimia

4.1.6 Bahan penelitian

- (a) Bahan penelitian untuk menguji hipotesis pertama adalah serum dan eritrosit dalam darah induk tikus sebanyak 1 ml., yang diambil menggunakan *sprit* jarum kecil dari pembuluh darah vena di ekor hewan coba tikus dengan cara aseptis sewaktu tikus sedang dalam masa inaktif (sekitar pukul 14.00).
- (b) Bahan penelitian untuk menguji hipotesis kedua adalah ketiga macam *purified diet* (diet-I, diet-II dan diet-III) yang diberikan pada tikus-uji dengan komposisi dan takaran seperti dalam Subbab 4.1.3, dan darah induk tikus dengan cara pengambilan seperti Subbab 4.1.6 a
- (c) Bahan penelitian untuk menguji hipotesis ketiga adalah serum induk tikus dengan cara pengambilan seperti Subbab 4.1.6 a. dan tulang kepala janin tikus yang diambil dengan pisau dan tang tulang. Spesimen tulang kepala janin tikus kemudian dibagi dua, yaitu segmen anterior (frontal) dan segmen posterior (oksipital) masing-masing seluas $5 \times 5 \text{ mm}^2$.
- (d) Bahan penelitian untuk menguji hipotesis keempat adalah tulang kepala janin tikus, yang diambil seperti Subbab 4.1.6 c.

(e) Bahan penelitian untuk menguji hipotesis kelima adalah serum induk tikus dengan cara pengambilan seperti Subbab 4.1.6a, dan lebar defek pasien meningokel yang diukur seperti Subbab 4.2.3.

4.1.7 Cara pengukuran

1. Pengukuran Asam Folat

Untuk mengukur kadar asam folat dalam serum dan sel darah merah (eritrosit), bahan adalah darah hewan-coba, dilakukan pengukuran dengan cara radioassay pengikatan-kompetitif (*Folate-immunoassay = Fia*). Pemeriksaan *IMx Folate Assay* berdasarkan teknologi pengikatan ion. Pada teknologi ini matriks *glass-fiber* dari sel reaksi pengikatan ion pada *Imx* sebelumnya dilapisi dengan senyawa amonium yang mempunyai berat molekul besar. Pemberian suatu muatan positif ke dalam matriks yang mampu mengikat kompleks analit yang telah dilakukan pengisian secara negatif. Selama pemeriksaan terbentuk kompleks *polyanion-analyte* yang dimuati negatif. Berbagai kompleks tersebut diikat melalui interaksi elektrostatik dengan matriks yang diberi muatan positif.

IMx folate assay menggunakan larutan reagen yang berisi *Folate Binding Protein (FBP)* beserta antibodi monoklonal dalam bentuk kovalen berpasangan dengan karboksimetilamilose (*polianion*). Selama *IMx folate assay* terbentuk kompleks analit bermuatan negatif melalui reaksi pengikatan antara folat dengan reagen yang terlarut. Beberapa kompleks analit bermuatan negatif yang dihasilkan kemudian ditangkap dengan mekanisme interaksi elektrostatik oleh matriks yang bermuatan positif. Kadar folat ditentukan dengan mengukur *FBP* yang tak terikat pada matriks, menggunakan konjugat dari asam pterolat (analog

folat) dan alkali fosfatase sebagai molekul pembentuk sinyal. Rincian langkah-langkah pemeriksaan disajikan dalam Lampiran 20.

2. Pengukuran *TGF-β1* serum

Untuk mengukur kadar *TGF-β1* dalam serum, bahan adalah darah hewan-coba, dilakukan pengukuran dengan cara *enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)*. Teknik yang digunakan adalah *quantitative sandwich enzyme immunoassay*. Reseptor *TGF-β* tipe II terlarut yang mengikat *TGF-β1* diletakkan pada *microplate*. Standar dan sampel dengan pipet dimasukkan ke dalam cekungan (*wells*) dan setiap reseptor *TGF-β1* yang ada akan terikat oleh reseptor yang *immobile*. Setelah zat yang tidak terikat dicuci, antibodi poliklonal *enzyme-linked* khusus untuk *TGF-β1* ditambahkan ke dalam cekungan untuk melapisi (*sandwich*) *TGF-β1* yang tidak diubah selama inkubasi pertama. Setelah dilakukan pencucian untuk membuang setiap reagen antibodi dan enzim yang tidak terikat, cairan substrat ditambahkan ke dalam cekungan sehingga terbentuk warna yang menandai kadar *TGF-β1* yang terikat pada langkah yang pertama. Perkembangan warna dihentikan dan intensitas warna diukur. Rincian sejumlah langkah pemeriksaan disajikan dalam Lampiran 21

3. Pengukuran *IGF-I* serum

Untuk mengukur kadar *IGF-I* dalam serum, bahan adalah darah hewan-coba, dilakukan pengukuran dengan cara *Elisa*. *Elisa IGF-I* merupakan *immunoassay* enzimatik tipe *sandwich* satu langkah. Pemeriksaan ini mencakup langkah ekstraksi sederhana, yaitu *IGF-I* dipisahkan dari protein pengikatnya di dalam serum. Langkah ini penting untuk memperoleh determinasi akurat dari

IGF-I. Dalam assay, standar, kontrol dan benda asing lain yang diekstraksi, diinkubasi dengan antibodi anti *IGF-I*, dicampur dengan enzim *horseradish* (tanaman lobak) peroksidase (*HRP*) dalam cekungan (*wells*), mikrotitrasi bersama-sama dengan antibodi anti *IGF-I*. Setelah inkubasi dan pencucian, cekungan diinkubasi dengan substrat tetrametilbenzidin (*TMB*) kemudian ditambahkan larutan *acidic stopping*, dan derajat perubahan enzim dari substrat ditentukan dengan pengukuran dua *wavelength absorbance* pada 450 dan 620 nm. Absorbansi yang diukur secara langsung proporsional dengan konsentrasi *IGF-I* yang ada. Satu set standar *IGF-I* digunakan untuk merencanakan kurve-baku absorben *versus* konsentrasi *IGF-I*. Dengan demikian konsentrasi *IGF-I* dari substansi asing dapat dihitung. Rincian beberapa langkah pemeriksaan disajikan dalam Lampiran 21.

4. Pengukuran *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang

Untuk mengukur kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang janin, bahan adalah tulang kepala janin di bagian yang ada defeknya, yaitu os frontalis bagian basis dan os oksipitalis di garis tengah. Sediaan kemudian diperiksa dengan cara imunohistokimia.

Setelah diambil, sediaan kemudian difiksasi dengan formalin *phosphate-buffered* 10% dalam suhu 4 derajat Celcius selama 48 jam, diteruskan dengan fiksatif Bouin dalam suhu dan waktu yang sama. Sediaan kemudian dicuci dengan air yang disuling dan didekalsifikasi dalam asam asetat 10%, formaldehid 10% dan salin 0.45% selama 2 sampai 7 hari, sebelum dilakukan dehidrasi dalam etanol dan parafin. Kemudian dilakukan irisan serial setebal 4µm dan diletakkan

di dalam *slide TESP*A-coated untuk dicat dengan hematoksin dan eosin serta untuk imunolokalisasi dari faktor pertumbuhan tulang.

Irisan jaringan kemudian dideparafinasi dalam *xylene*, rehidrasi dan diinkubasi dalam salin *TRIS-buffered* dan Triton X-100 0,3% di dalam suhu ruangan selama 15 menit, dilanjutkan dengan salin *TRIS-buffered* dan metanol absolut. Aktivitas peroksidase endogen dicampur dengan hidrogen peroksida 0,6% dalam metanol, dilanjutkan dengan pencucian dalam salin *TRIS-buffered* dan albumin serum *bovine* 0,1% selama 5 menit. Semua irisan kemudian direndam dalam hialuronidase (1 mg/ml dalam 100 mM natrium asetat, NaCl 0,85%, dengan pH 5.5) pada suhu 37 derajat Celsius untuk *TGF- β 1* : dan dengan tripsin 0,125% dalam salin *phosphate-buffered* selama 15 menit, dibilas dalam salin *TRIS-buffered* dan albumin serum bovin 0,1%, kemudian diblok dengan serum kambing 1,5% dalam normal- salin, *TRIS-buffered* dan albumin serum bovinum pada suhu 37 derajat Celsius selama 20 menit. Irisan kemudian ditetesi berturut-turut dengan :

- 1) antisera primer untuk setiap isoform *TGF- β 1* yang diencerkan dalam cairan *blocking* dengan konsentrasi akhir 2.5 ug/ml. untuk *IGF-I* diencerkan dalam cairan *blocking* 1:2500.
- 2) antibodi sekunder dari domba yang dilakukan biotinisasi.
- 3) kompleks peroksidase avidin-biotin.
- 4) dilanjutkan dengan identifikasi peroksidase dalam irisan jaringan dengan cat Cromogen 3,3'-diaminobenzidine. Sebagai kontrol negatif digunakan IgG kelinci dengan konsentrasi 5,0 μ g/ml.

Irisan kemudian di *counterstain* dengan hematoksin-eosin dari Mayer-Harris. Pengecatan hematoksin-eosin dimaksudkan untuk mengidentifikasi dan mencari karakteristik dari interpretasi pengecatan imunologis *growth factor*. Pengecatan imunohistokimia dianalisis pada fotomikroskop Zeiss, *slide* dibaca oleh dua peneliti, dan pengecatan merah-kecokelatan hasil dari kromogen DAB dihitung. Fotomikrograf diletakkan diatas mikroskop riset Olympus. Data yang diperoleh merupakan data kualitatif, yang kemudian dihitung secara semi-kuantitatif. Pada sediaan ditentukan dulu daerah yang akan dihitung (*counting area*) berdasarkan pewarnaan yang paling banyak, pada pembesaran 100X. Daerah yang akan dihitung dibagi 5 wilayah lapangan pandang dan masing-masing wilayah dihitung setiap wilayahnya dengan 5 kotak kamar hitung. Kadar *growth factor* ditentukan dengan menghitung jumlah kotak imunoperoxidase positif (berwarna merah-kecokelatan), baik yang terletak di intrasel maupun matriks, perlapang-pandang secara *double blind* oleh dua orang pengamat yang hasil pengamatannya tidak berbeda bermakna. Rincian langkah-langkah metode pemeriksaan disajikan dalam Lampiran 22 dan 23.

5. Penghitungan jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam tulang kepala janin

Untuk menentukan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis, prosedurnya sama dengan pemeriksaan imunohistokimia *TGF- β 1* dan *IGF-1*, tetapi yang dipakai sebagai antibodi adalah antibodi anti *rat* Caspase-3. Sediaan (*slide*) dicat dengan metode imunohistokimia, memakai bahan antibodi anti *rat* Caspase-3 dan *counterstaining* Mayer-Harris Hematoksin. Kemudian jumlah sel-

sel apoptosis dan nekrosis setiap sediaan dihitung per-lapang pandang, menggunakan mikroskop cahaya yang pada sisi okulernya terdapat bilik hitung.. Rincian langkah-langkah metode penghitungan disajikan dalam Lampiran 24.

4.1.8 Instrumen penelitian

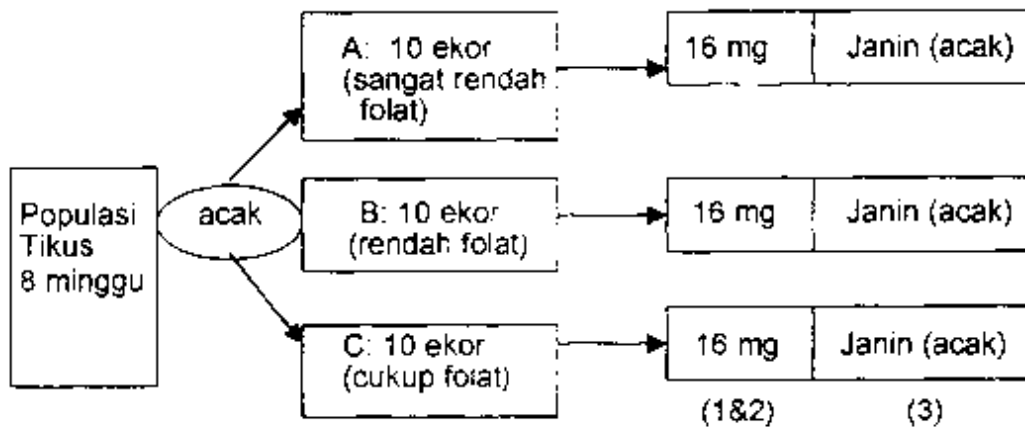
1. Kandang untuk hewan-coba, adalah kandang standar yang biasa digunakan untuk memelihara tikus, dipesan dari seseorang yang ahli dalam pembuatan kandang hewan coba.
2. Timbangan tikus merk Sartorius Metier, timbangan analitik merk Metler dan pipet transfer Pette merk Brand, produksi Jerman.
3. Alat pengambil darah hewan-coba (tabung dan jarum suntik steril).
4. Alat pengambil tulang kepala janin (pisau bedah, pemotong tulang dan penjepit).
5. Alat pemeriksaan asam folat, *TGF- β 1* dan *IGF-I* serum, meliputi: penggerus gigi *portable*, sentrifuse (Heraeus Sepatech Labofuge 200@), spektrofotometer (Hitachi U-2000@, *double beam*), pipet mikro dalam berbagai ukuran, *water bath* (Precistern@), *white and Yellow tips* (Biorad@), neraca analitik (O Haus @), pH meter (Jerway pH meter 3310@) dan vorteks.
6. Alat pemeriksaan imunohistokimia, adalah : mikroskop opiphot-2 (Nikon@) , mikroskop riset (Olympus @), *epicopic-fluorescence*, gelas *slide*, pipet mikro (0.1- 20 μ l) dan (200-1000 μ l), *blue & white tips* dan inkubator 37°C (Edelstahl-Rosfrei@).



4.1.9 Prosedur pengambilan dan pengumpulan sampel

Hewan-coba (tikus betina) yang sesuai dengan kriteria inklusi diambil secara random untuk dimasukkan ke dalam kelompok perlakuan dan kelompok-kelompok kontrol. Kriteria inklusi adalah: 1) tikus Sprague Dawley, 2) jenis kelamin betina, 3) usia sekitar 8 minggu dan 4) sehat; sedangkan kriteria eksklusi adalah: 1) terdapat perlukaan pada tubuh, 2) mata berwarna merah, 3) kecepatan pernafasan $\geq 50X$ /menit dan suhu rektal $\geq 40^{\circ}\text{C}$ (Hume, 1972; Arrington, 1981). Anggota masing-masing kelompok diambil darahnya lewat vena di ekor untuk dilakukan pemeriksaan kadar asam folat. Pengambilan darah dilakukan sore hari sekitar pukul 14.00, saat tikus tidak aktif. Kelompok perlakuan A diberi diet sangat rendah asam folat, kelompok perlakuan B diberi diet rendah, sedangkan kelompok kontrol (C) diberi diet cukup asam folat. Setelah 16 minggu, hewan-coba dikawinkan dengan pejantan, selanjutnya ditunggu sampai hamil 18-19 hari dan janin dilahirkan secara histerotomi. Setelah janin tikus keluar, diambil tulang kepala di bagian anterior (frontal basis) dan bagian posterior (oksipital) untuk diperiksa kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I*.

Prosedur histerotomi adalah sebagai berikut ini. Setelah induk tikus dibius dengan suntikan I.M. Ketalar@ 0.1 mg/Kg. BB. dalam posisi telentang kemudian kulit perut serta uterus diinsisi menggunakan pisau dan gunting, selanjutnya janin-janin tikus dikeluarkan. Induk kemudian dieksekusi (dimatikan).



Gambar 4.1.2 Pelaksanaan Penelitian

Keterangan:

- 1) diperiksa kadar folat dalam serum dan eritrosit
- 2) diperiksa kadar *TGF-β1* dan *IGF-1* dalam serum
- 3) diperiksa kadar *TGF-β1* dan *IGF-1* dalam tulang kepala serta jumlah sel apoptosis dan nekrosis (janin yang diperiksa diambil secara acak).

4.1.10 Lokasi dan waktu penelitian

1. Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Ilmu Farmakologi Klinik dan Laboratorium Ilmu Biomedik Fak. Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- 3 Waktu penelitian : 12 bulan

4.1.11 Cara analisis data

Data penelitian diolah dengan komputer program *SPSS* dan *AMOS*.

Uji statistik dan analisis data meliputi

- 1 Uji homogenitas sampel : untuk menilai homogenitas sampel dengan variabel umur dan berat hewan coba, digunakan uji statistik *Anova*.
- 2 Untuk menguji kemaknaan perbedaan hasil kelompok perlakuan dan kelompok kontrol digunakan uji *Anova*.

3. Untuk menguji hubungan antar variabel, digunakan analisis SEM (*Structural Equation Modeling*) dan uji Regresi.

4.2. Peneftian kedua untuk menguji hipotesis keenam

4.2.1 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian untuk menguji hipotesis keenam adalah : penelitian observasional *cross-sectional* (Sudigdo & Sofyan, 1995).

4.2.2 Populasi dan sampel penelitian

1. Populasi adalah pasien meningokel
2. Sampel penelitian adalah pasien meningokel yang dilakukan pembedahan di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang selama setahun. Kriteria inklusi: usia maksimal tiga tahun dengan status gizi cukup baik, sedangkan kriteria eksklusi adalah: pasien meningokel disertai hidrosefalus, kadar hemoglobin <10 gr%, usia lebih dari tiga tahun, dan meningokel yang pecah.
3. Untuk menentukan jumlah sampel digunakan rumus : $n \geq \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \delta^2}{S}$

(Sudigdo & Sofyan, 1995).

Keterangan : $\alpha = 0.05$; $\beta = 0.10$; $\delta = \text{maksimum} - \text{minimum} / 4 = 16$;

$S = \text{standar deviasi } TGF-\beta 1 + IGF-I = 2.56 + 2.41$.

Diperoleh hasil $n > 8$.

- 4 Dimintakan *Informed Consent* dari keluarga penderita dan *Ethical Clearance* dari Panitia Etik Penelitian Kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang

4.2.3 Bahan penelitian dan cara pengukuran

Bahan penelitian adalah tulang di tepi defek penderita meningokel yang diambil sedikit ($\pm 2\text{mm} \times 2\text{mm}$) sewaktu dilakukan pembedahan dengan metode standar. Sampel tulang kemudian dibagi dua yang dari setiap bagian diambil satu irisan, yaitu irisan yang paling dekat dengan defek dan irisan yang paling jauh dengan defek. Terhadap bahan penelitian (irisan) tersebut dilakukan pengukuran kadar *TGF- β* dan *IGF-I* dengan metode yang sama dengan Subbab. 4.1.7. Juga dilakukan pengukuran lebar defek menggunakan *anthropometer* dari Martin dengan metode kaliper gesek (*sliding caliper*). Karena bentuk defek tidak beraturan, maka diukur beberapa jarak tertentu sehingga dapat dimungkinkan untuk mengukur luas (lebar) defek tersebut. Lebar defek tulang ditentukan dengan bantuan komputer program *Adobe Photoshop*. Sebagai kontrol, digunakan specimen tulang kepala pasien cedera kepala yang dilakukan trepanasi.

4.2.4 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel

1. Identifikasi variabel

Variabel bebas : kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang yang di tepi defek dan yang jauh dari defek

Variabel tergantung : lebar defek tulang

Variabel kendali : Usia, jenis kelamin, status gizi

2. Definisi operasional variabel

- a. Tulang tepi defek adalah irisan tulang yang paling dekat dengan defek, sedangkan tulang luar defek adalah irisan tulang yang paling jauh dari defek.

- b. *TGF- β 1* adalah faktor pertumbuhan yang bersumber terutama dari makrofag, beraksi mitogen bagi osteoblas dan khondroblas, serta menstimulasi sintesis matriks tulang kolagen tipe-1 dan tipe-2. Kadarnya di dalam tulang defek penderita meningokel diukur seperti dalam subbab 4.1.6.
- c. *IGF-I* adalah faktor pertumbuhan yang diproduksi terutama oleh sel-sel hepar, mempunyai aktivitas menstimulasi pembentukan matriks tulang. Kadarnya diukur seperti tercantum dalam subbab 4.1.7.
- d. Status gizi ditentukan secara klinis dan laboratoris (kadar hemoglobin).

4.2.5 Instrumen penelitian

1. Instrumen dan bahan-bahan standar untuk operasi eksisi meningokel di kamar operasi
2. Antropometer Martin untuk mengukur lebar defek tulang
3. Tang pemotong tulang untuk mengambil spesimen tulang

4.2.6 Lokasi dan waktu penelitian

1. Lokasi penelitian adalah RSU Dr. Saiful Anwar dan Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya, Malang
2. Waktu penelitian : 12 bulan

4.2.7 Cara analisis data

Data dianalisis dengan Anacova, analisis *SEM (Structural Equation Modeling)*, dan analisis Regresi.

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

Bab ini memuat data hasil penelitian dan analisis data penelitian sesuai dengan hipotesis penelitian. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan gambar yang disusun sesuai dengan analisis data penelitian.

Variabel kadar asam folat di dalam serum dan eritrosit diukur dengan metode *Competitive Binding Folate-immunoassay (Fia)*, variabel kadar *TGF- β 1* dalam serum diukur dengan teknik *Quantitive Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa)* dan kadar *IGF-1* di dalam serum juga diukur dengan teknik *Elisa*. Kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1*, serta jumlah sel apoptosis dan nekrosis di dalam tulang kepala janin tikus ditentukan dengan pemeriksaan imunohistokimia (semikuantitatif). Kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* tulang tepi defek pasien meningokel juga ditentukan dengan pemeriksaan imunohistokimia.

Data penelitian tersebut diperoleh sesuai dengan jadwal penelitian yang dibuat agar seluruh kegiatan penelitian sesuai dengan yang direncanakan. Secara umum, jadwal tersebut mencakup waktu pengadaan tikus dan kandangnya, pemberian perlakuan, pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan *Fia* dan *Elisa*, mengawinkan, menunggu kehamilan dan kelahiran (secara hysterotomi pada hari ke 18-19 kehamilan), pengambilan janin secara acak dan pengambilan sampel tulang kepala yang dilanjutkan dengan pemeriksaan imunohistokimia.

Pada penelitian yang pengamatan dilakukan oleh dua orang, yaitu peneliti dan pembimbing dari Laboratorium Biomedik FK-UNIBRAW, perlu diuji konsis-

tensi (keajegan) hasil pemeriksaan. Uji konsistensi yang dilakukan dengan *Anova*, hasilnya menunjukkan bahwa antara dua pengamat memberikan penilaian yang sama untuk *TGF- β 1* dan *IGF-1* baik dalam serum maupun dalam jaringan tulang, serta jumlah sel apoptosis dan nekrosis (nilai *p* masing-masing adalah antara 0.284 dan 0.602, tidak berbeda secara bermakna). Perhitungan selengkapnya disajikan dalam Lampiran 4. Maka hasil penilaian dari dua pengamat bersifat konsisten, sehingga ketelitian data penelitian dapat dijamin.

5.1 Analisis deskriptif data hasil penelitian

5.1.1 Pengamatan terhadap hewan-coba tikus

Dari Tabel-1 dapat diketahui berat badan tikus betina selama masa penelitian yang sekitar satu tahun, tidak berbeda bermakna (uji *Anova*, *p* berkisar antara 0.184-0.903). Dengan demikian dari segi usia dan berat badan tikus pada setiap kelompok dapat dikatakan homogen sepanjang waktu penelitian.

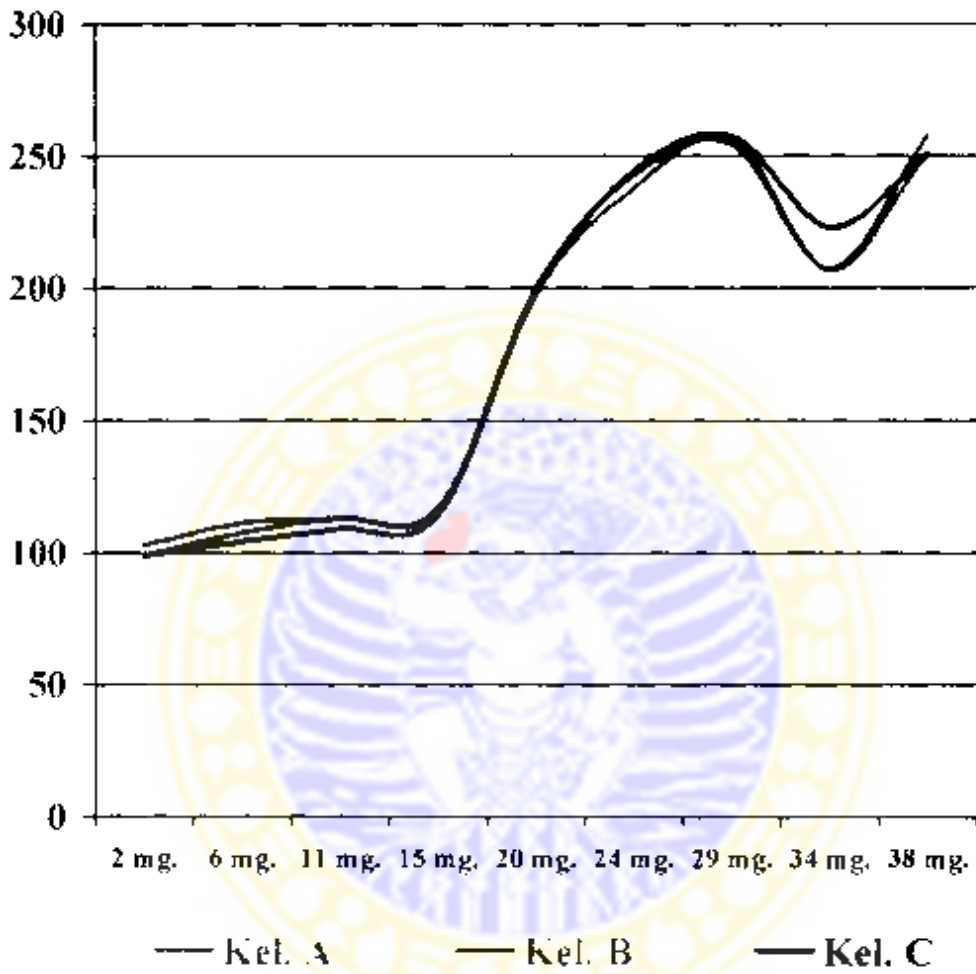
Setelah dilakukan perlakuan pada usia 8 minggu dengan pemberian rangsum sesuai dengan Subbab 4., didapatkan beberapa penyulit, yaitu diare dan penurunan berat badan selama lebih kurang dua minggu. Hal tersebut kemungkinan disebabkan perubahan menu/komposisi rangsum, yang menyebabkan iritasi dan hiperperistaltik. Setelah mencapai fase adaptasi, beberapa penyulit tadi dapat diatasi. Selama masa penelitian, lima ekor tikus mati, satu dari Kelompok-A dan masing-masing dua ekor dari Kelompok-B dan C. Sebagai gantinya dilakukan substitusi dengan tikus lain dengan usia dan berat badan yang sama.

TABEL 5.1.1
BERAT BADAN TIKUS TIAP KELOMPOK
BERDASAR UMUR

Tgl.	Usia	Kelompok			Keterangan
		A	B	C	
3/2/03	2 mg.	58.7 ± 1.2	62.9 ± 4.4	48.8 ± 1.4	p =0.184 (n.s)
3/3/03	6 mg.	107.5 ± 3.3	111.1 ± 4.0	104.1 ± 3.7	p =0.144 (n.s)
7/4/03	11 mg.	113.0 ± 3.2	113.2 ± 4.0	108.8 ± 1.9	p =0.462(n.s)
5/5/03	15 mg.	117.0 ± 2.5	116.7 ± 2.5	114.2 ± 5.4	p =0.624(n.s)
4/6/03	20 mg.	198.4 ± 11.3	200.4 ± 2.4	197.7 ± 6.0	p =0.903(n.s)
1/7/03	24 mg.	237.6 ± 7.4	242.6 ± 6.3	244.0 ± 4.0	p =0.447(n.s)
5/8/03	29 mg.	256.7 ± 4.0	254.3 ± 1.5	257.4 ± 3.6	p =0.507(n.s)
7/9/03	34 mg.	306.6 ± 7.9	307.3 ± 6.8	322.9 (5.5	p =0.711(n.s)
8/10/03	38 mg.	350.8 ± 5.2	357.7 ± 3.3	350.6 ± 16.5	p =0.631(n.s)

Keterangan : - Satuan dalam gram - n s = non significant (tak bermakna)

GRAFIK 5.1.1
BERAT BADAN TIKUS TIAP KELOMPOK
BERDASAR UMUR



TABEL 5.1.2
KADAR ASAM FOLAT DALAM ERITROSIT
TIAP KELOMPOK TIKUS

NO.	KELOMPOK A	KELOMPOK B	KELOMPOK C
1	741.2	867.2	905.2
2	554.8	----	----
3	549.6	816.4	1,311.3
4	665.0	923.0	824.0
5	515.2	656.9	964.5
6	629.1	----	656.3
7	675.8	----	----
8	----	878.8	1,202.4
9	616.1	1,176.7	954.0
10	742.5	778.1	880.0
RERATA	632.1 ± 65.8	871.0 ± 104.4	962.2 ± 147.9
<i>p-value</i>	0.001		

Keterangan : - ---- = Sampel rusak (lisis, beku)

- Satuan yang dipakai: ng/ml

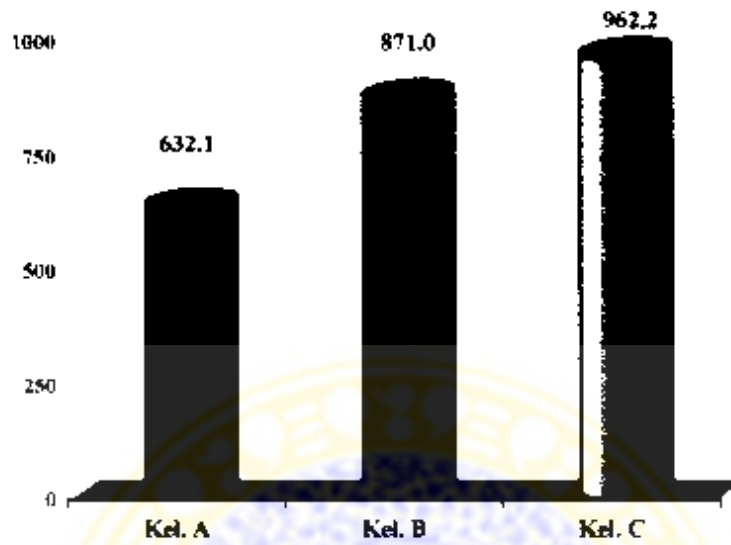
TABEL 5.1.3
KADAR ASAM FOLAT DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS

NO.	KELOMPOK A	KELOMPOK B	KELOMPOK C
1	7.4	14.3	15.2
2	6.8	13.0	18.8
3	8.8	13.1	15.3
4	5.2	15.3	14.8
5	8.4	12.1	15.3
6	5.7	12.4	15.0
7	8.4	14.4	15.1
8	3.1	14.7	15.3
9	5.8	11.1	15.6
10	3.8	14.4	16.0
Rerata	6.34 ± 1.62	13.48 ± 1.14	15.64 ± 0.7
<i>p-value</i>	0.000		

Keterangan : Satuan dalam ng/ml.

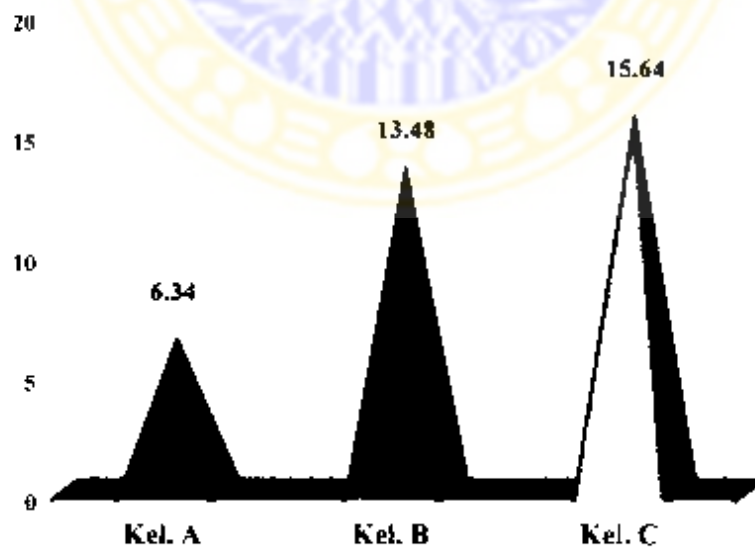
GRAFIK 5.1.2

**KADAR ASAM FOLAT DALAM ERITROSIT
TIAP KELOMPOK TIKUS**



GRAFIK 5.1.3

**KADAR ASAM FOLAT DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**



5.1.2 Kadar asam folat dalam eritrosit dan serum induk tikus

Dalam Tabel 5.1.2 diperoleh data bahwa rerata kadar asam folat di dalam eritrosit tiap kelompok tikus adalah berbeda sangat bermakna (uji *Anova*, $p=0.001$), demikian halnya dari Tabel 5.1.3 diperoleh data bahwa rerata kadar asam folat di dalam serum tikus di setiap kelompok adalah berbeda sangat bermakna (uji *Anova*, $p=0.000$). Dengan demikian diperoleh kadar asam folat dalam darah tikus Kelompok-A lebih rendah secara sangat bermakna dibandingkan dua kelompok lain.



TABEL 5.1.4

ABSORBANSI *TGF-β1* DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS

NO	KELOMPOK - A	KELOMPOK - B	KELOMPOK - C
1	0.137	0.139	0.247
2	0.241	0.189	0.270
3	0.138	0.248	0.344
4	0.234	0.224	0.203
5	0.180	0.245	0.293
6	0.237	0.208	0.296
7	0.201	0.250	0.302
8	0.179	0.260	0.221
9	0.178	0.224	0.202
10	0.185	0.234	0.206
Rerata	0.191 ± 0.03	0.223 ± 0.03	0.258 ± 0.04
<i>P-value</i>	0.005		

Keterangan : Satuan dalam ng/ml.

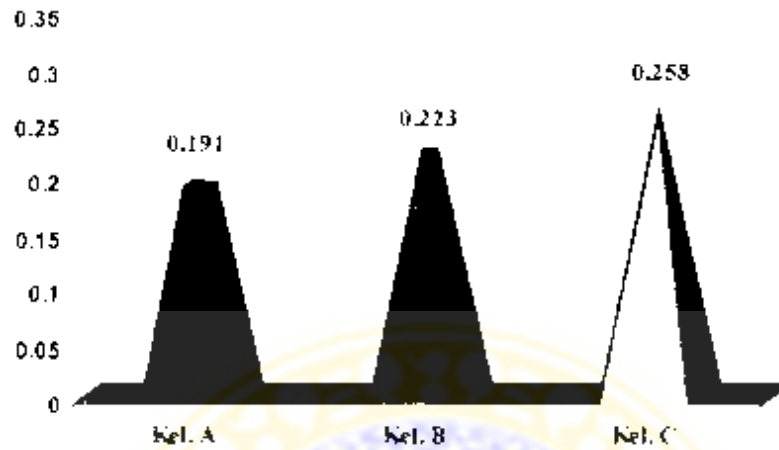
TABEL 5.1.5**KONSENTRASI TGF- β 1 DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**

NO	KELOMPOK - A	KELOMPOK - B	KELOMPOK - C
1	547.0	801.0	765.0
2	739.0	533.0	857.0
3	721.0	769.0	1153.0
4	713.0	1073.0	589.0
5	497.0	757.0	949.0
6	725.0	609.0	561.0
7	581.0	777.0	985.0
8	493.0	817.0	661.0
9	489.0	673.0	985.0
10	515.0	713.0	601.0
Rerata	602.0 \pm 98.0	752.2 \pm 96.2	810.6 \pm 175.2
<i>p-value</i>	0.000		

Keterangan : Satuan dalam ng/ml.

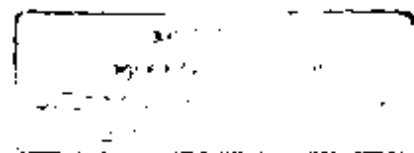
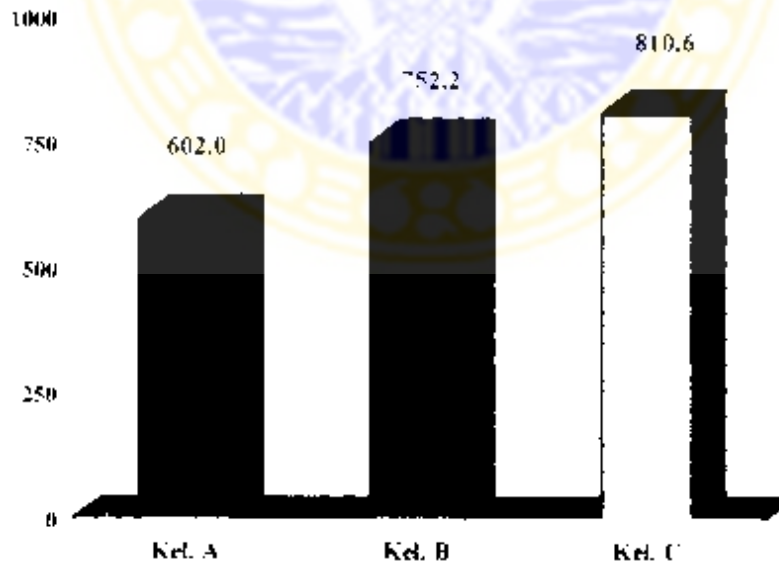
GRAFIK 5.1.4

ABSORBANSI $TGF-\beta 1$ DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS



GRAFIK 5.1.5

KONSENTRASI $TGF-\beta 1$ DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS



TABEL 5.1.6**ABSORBANSI IGF-I DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**

NO	KELOMPOK - A	KELOMPOK - B	KELOMPOK - C
1	0.308	0.294	0.245
2	0.293	0.229	0.228
3	0.370	0.309	0.218
4	0.280	0.205	0.187
5	0.354	0.194	0.208
6	0.304	0.218	0.227
7	0.267	0.253	0.225
8	0.260	0.201	0.176
9	0.251	0.216	0.203
10	0.242	0.241	0.211
Rerata	0.293 ± 0.033	0.236 ± 0.030	0.213 ± 0.016
<i>p-value</i>	0.000		

Keterangan : Satuan dalam ng / ml

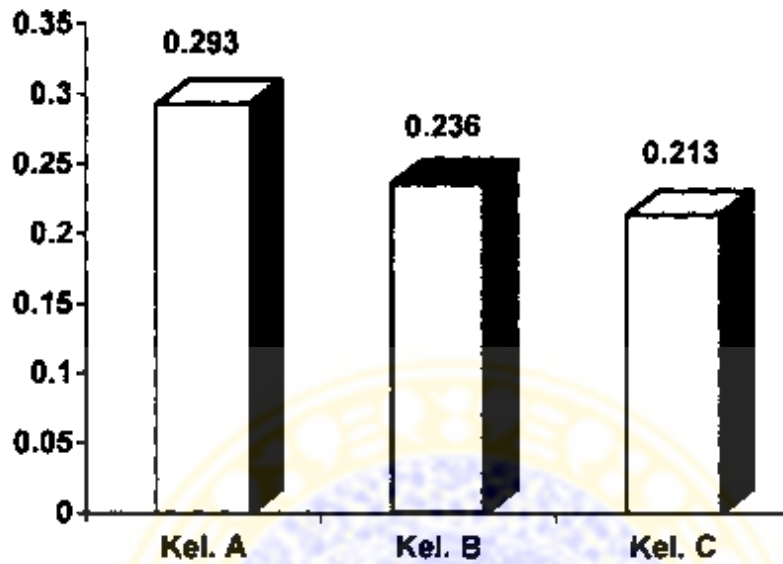
TABEL 5.1.7**KONSENTRASI IGF-I DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**

NO	KELOMPOK - A	KELOMPOK - B	KELOMPOK - C
1	3875.5	3978.0	4115.5
2	3893.0	4045.0	3930.5
3	3658.0	3675.5	4088.0
4	3908.5	4050.5	4180.5
5	3680.5	4149.0	4113.0
6	3875.5	4089.0	4066.5
7	3966.5	4000.5	4071.5
8	3955.5	4130.5	4198.0
9	4048.0	4180.5	4127.0
10	4029.0	4030.5	4105.5
Rerata	3888.0 ± 93.5	4038.0 ± 88.4	4109.0 ± 47.2
<i>p-value</i>	0.011		

Keterangan : Satuan dalam ng/ml.

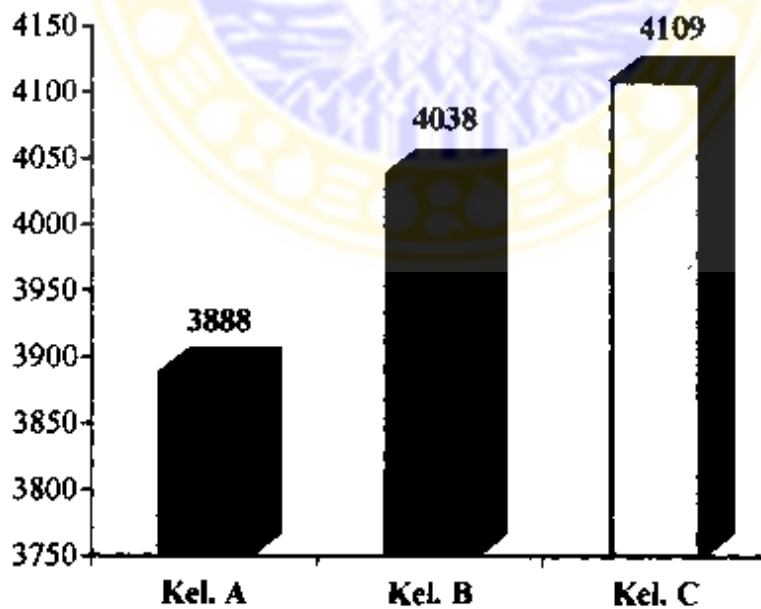
GRAFIK 5.1.6

**ABSORBANSI /GF-/ DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**



GRAFIK 5.1.7

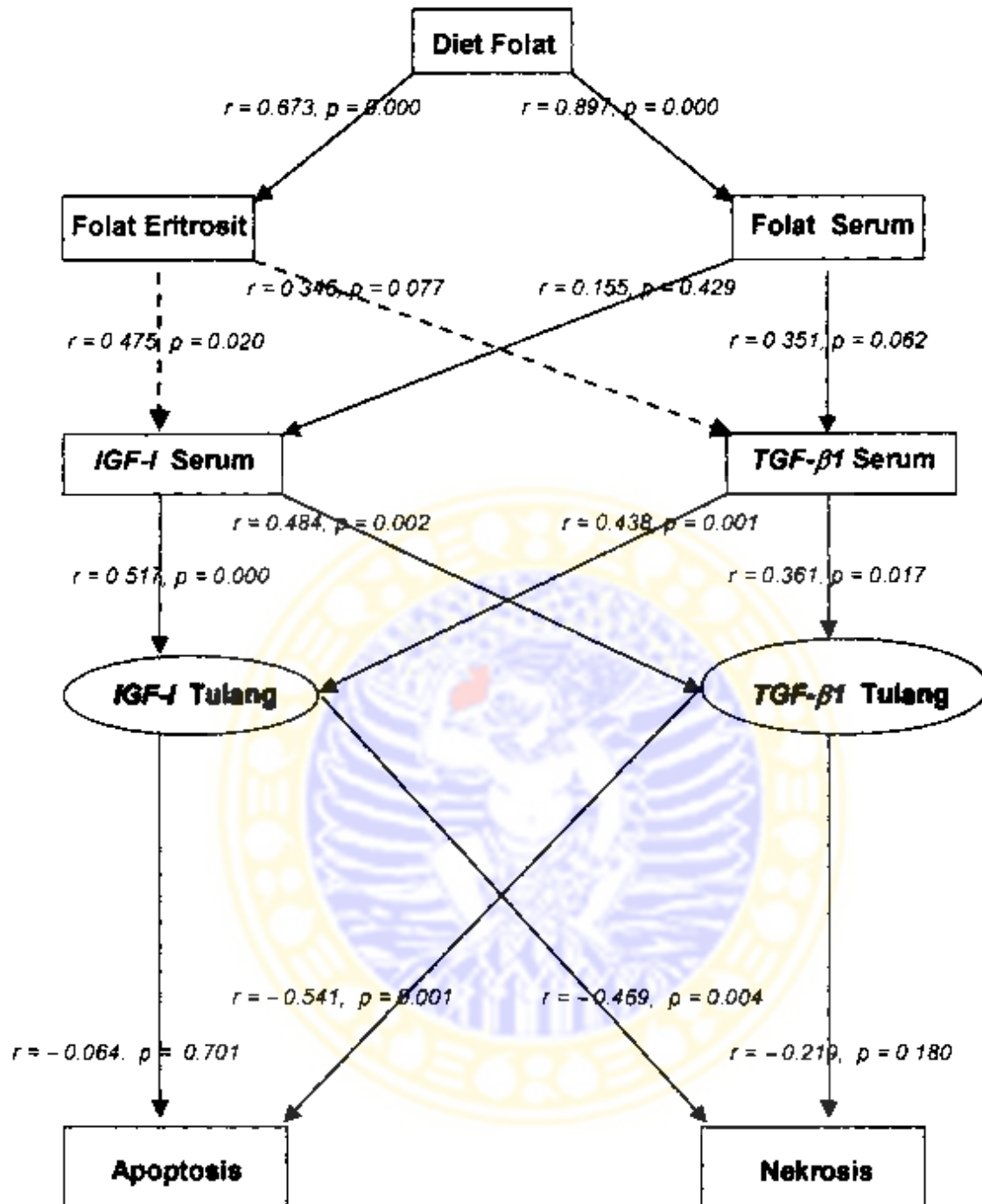
**KONSENTRASI /GF-/ DALAM SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS**



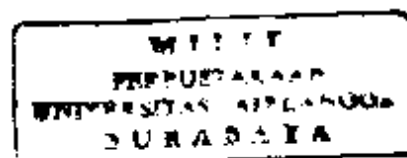
5.1.3 Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus

Seperti tercantum dalam Tabel 5.1.4 dan Tabel 5.1.5, rerata nilai absorbansi dan konsentrasi *TGF-β1* dalam serum setiap kelompok tikus adalah berbeda sangat bermakna, yaitu antara Kelompok-A dengan Kelompok-B dan C (uji *Anova*, $p = 0.000$), sedangkan antara Kelompok-B dan C, walaupun tidak bermakna, tetapi terlihat ada perbedaan. Analisis statistik antar-kelompok (A, B dan C) terdapat perbedaan yang sangat bermakna (*Anova*, $p = 0.005$)

Dari Tabel 5.1.6 dan Tabel 5.1.7 diperoleh data bahwa rerata nilai absorbansi dan nilai konsentrasi *IGF-I* dalam serum Kelompok-A juga berbeda secara sangat bermakna dengan Kelompok-B dan Kelompok-C (*Anova*, $p = 0.000$), sedangkan perbedaan antara Kelompok-B dan Kelompok-C adalah kurang bermakna ($p = 0.112$). Meskipun demikian, secara keseluruhan terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar-kelompok ($p = 0.002$). Rincian uji *Anova* untuk menghitung perbedaan konsentrasi *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum setiap kelompok tikus, seluruhnya disajikan dalam Lampiran 8 dan Lampiran 10.



Gambar 5.1.1 Hubungan Antar Variabel Penelitian Hasil Analisis SEM



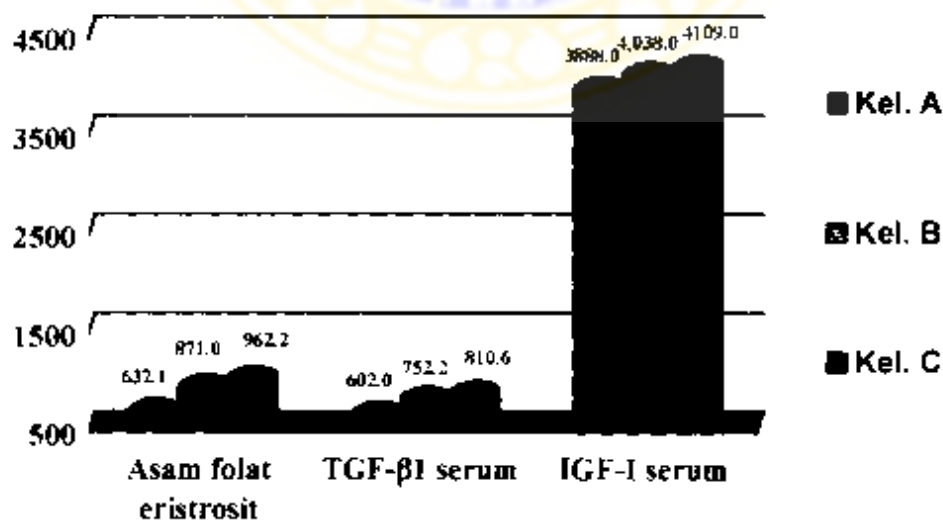
TABEL 5.1.8

KADAR ASAM FOLAT DALAM ERITROSIT, *TGF-β1* SERUM DAN *IGF-1* SERUM PADA TIAP KELOMPOK TIKUS

Kelompok Perlakuan	Variabel (Mean ± SD)		
	FOLAT ERITROSIT	<i>TGF-β1</i> SERUM	<i>IGF-1</i> SERUM
A	632.1 ± 65.8	602.0 ± 98.0	3888.0 ± 93.5
B	871.0 ± 104.4	752.2 ± 96.2	4038.0 ± 88.4
C	962.2 ± 147.9	810.6 ± 175.2	4109.0 ± 47.0

GRAFIK 5.1.8

KADAR ASAM FOLAT DALAM ERITROSIT SERTA KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-1* DALAM SERUM TIAP KELOMPOK TIKUS



5.1.4 Korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit dengan kadar

TGF-β1 dan *IGF-1* serum induk tikus

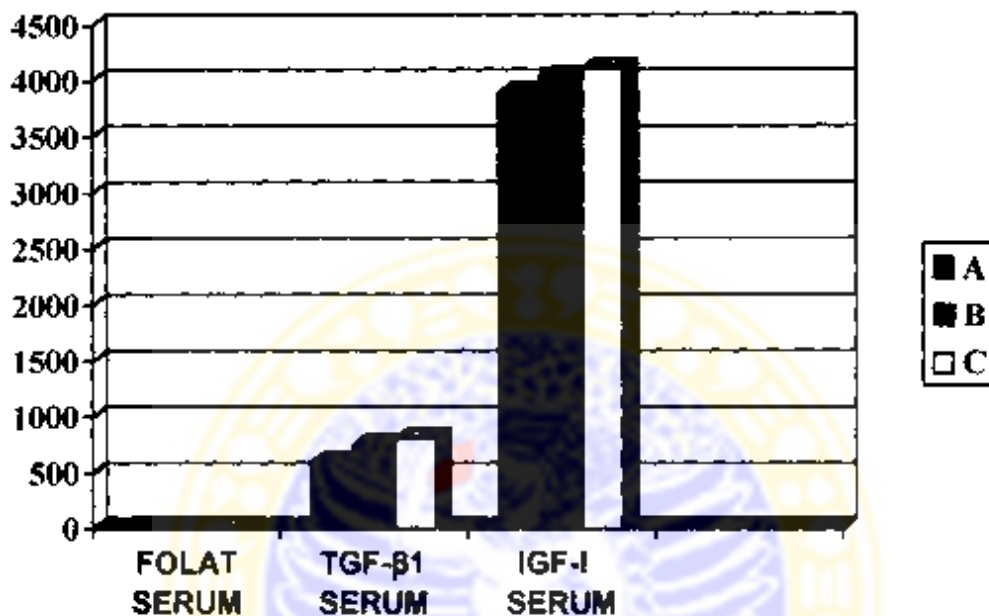
Data dalam Gambar 5.1.1 dan Tabel 5.1.8 memperlihatkan adanya korelasi yang cukup kuat kadar asam folat dalam eritrosit dengan konsentrasi *TGF-β1* serum (analisis *SEM*, $r = 0.346$; $p = 0.077$) dan *IGF-1* (analisis *SEM*, $r = 0.475$; $p = 0.020$). Korelasi kadar asam folat eritrosit dengan kadar *TGF-β1* serum induk lebih lemah dibandingkan terhadap kadar *IGF-1*. Perhitungan data menggunakan analisis *SEM* disajikan dalam Lampiran 18.

TABEL 5.1.9
KADAR ASAM FOLAT SERUM, *TGF-β1* DAN *IGF-1* SERUM
TIAP KELOMPOK TIKUS

Kelompok	Variabel (Mean ± SD)		
	FOLAT SERUM	<i>TGF-β1</i>	<i>IGF-1</i>
A	6.34 ± 1.62	602.0 ± 98.0	3888.0 ± 93.5
B	13.48 ± 1.14	752.2 ± 96.2	4038.0 ± 88.4
C	15.64 ± 0.70	810.6 ± 175.2	4109.0 ± 47.0

GRAFIK 5.1.9

KADAR ASAM FOLAT DALAM SERUM SERTA KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* DALAM SERUM TIAP KELOMPOK TIKUS



Data dalam Tabel 5.1.9, Grafik 5.1.9 dan Gambar 5.1.1 menunjukkan korelasi yang cukup kuat kadar asam folat dalam serum dengan konsentrasi *TGF-β1* serum ($r = 0.351$, $p = 0.062$), tetapi dengan konsentrasi *IGF-1* dalam serum, korelasinya lemah ($r = 0.155$, $p = 0.429$).

Dari Tabel 5.1.8 dan 5.1.9 serta Grafik 5.1.8 dan 5.1.9 dapat disimpulkan bahwa semakin rendah kadar asam folat, semakin rendah pula kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum tikus induk. Dengan demikian, meskipun korelasi kadar asam folat serum dengan kadar *IGF-I* serum kurang bermakna, kadar asam folat

dalam darah secara keseluruhan, khususnya dalam eritrosit, berkorelasi positif dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum. Korelasi terkuat adalah kadar folat eritrosit dengan kadar *IGF-I* serum ($r = 0.475$, $p = 0.020$), berikutnya kadar folat serum dengan kadar *TGF-β1* serum ($r = 0.351$, $p = 0.062$), kadar folat eritrosit dengan kadar *TGF-β1* serum ($r = 0.346$, $p = 0.077$), dan yang terlemah adalah korelasi kadar folat serum dengan kadar *IGF-I* serum ($r = 0.155$, $p = 0.429$). Dengan demikian hipotesis pertama terbukti dan dapat diterima.

5.1.5 Korelasi diet rendah folat dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum induk tikus

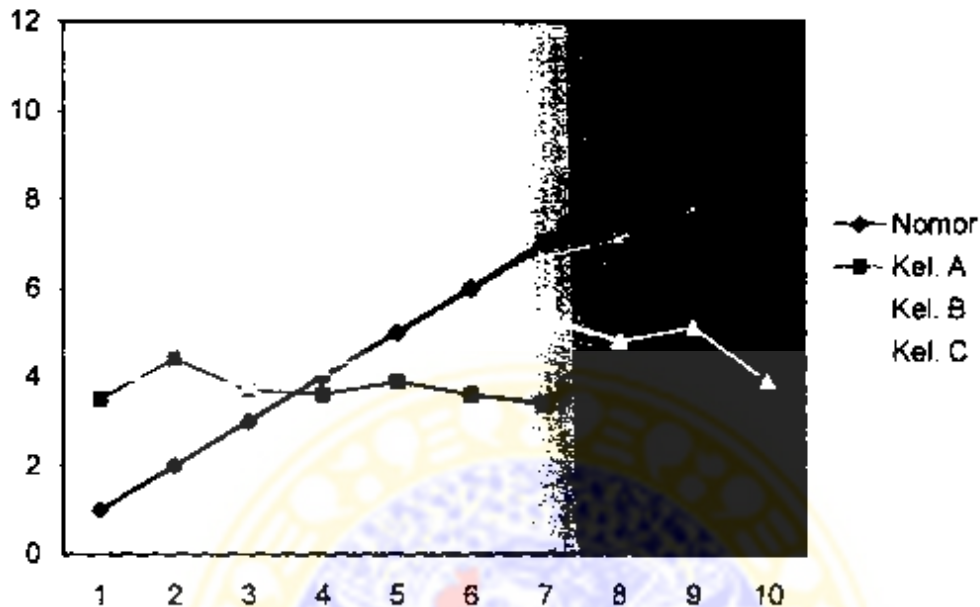
Dari Tabel 5.1.2, Tabel 5.1.3 dan Gambar 5.1.1 dapat dianalisis bahwa terdapat korelasi yang sangat bermakna (sangat kuat) diet asam folat dengan kadar asam folat, baik dalam eritrosit ($r = 0.673$, $p = 0.000$) maupun dalam serum ($r = 0.897$, $p = 0.000$). Oleh karena kadar asam folat dalam eritrosit dan serum secara umum berkorelasi dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum, dapat disimpulkan bahwa diet folat berkorelasi-positif dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum. Semakin rendah kandungan asam folat dalam diet, semakin rendah kadar kedua *growth factor* tersebut dalam serum, khususnya kadar *TGF-β1*. Dengan demikian hipotesis kedua dapat dibuktikan dan diterima.

TABEL 5.1.10
BERAT BADAN JANIN
TIAP KELOMPOK TIKUS

NO	KELOMPOK-A	KELOMPOK-B	KELOMPOK-C	<i>p-value</i>
1	3.5 ± 1.2	3.9 ± 2.1	7.7 ± 2.6*	
2	4.4 ± 1.4*	4.0 ± 1.5	7.3 ± 1.2	
3	3.7 ± 2.0	3.8 ± 1.6	7.6 ± 1.7	
4	3.6 ± 1.1	4.2 ± 2.3	7.7 ± 1.5	
5	3.9 ± 1.4	4.6 ± 2.1	7.4 ± 2.1	
6	3.6 ± 1.9	4.1 ± 0.9	7.5 ± 2.4*	
7	3.4 ± 2.5	5.3 ± 1.1*	6.7 ± 2.2	
8	4.2 ± 1.7*	4.8 ± 1.5*	7.1 ± 1.8	
9	3.6 ± 0.9	5.1 ± 2.0*	7.8 ± 2.7*	
10	4.1 ± 1.8*	3.9 ± 1.6	6.8 ± 1.9	
Rerata	3.8 ± 1.6	4.4 ± 1.7	7.4 ± 2.0	0.000

Keterangan : - Satuan dalam gram.
 - *) Berat badan lahir spontan

GRAFIK 5.1.10
BERAT BADAN JANIN TIAP KELOMPOK TIKUS



5.1.6 Pengamatan terhadap janin tikus yang dilahirkan

Setelah dikawinkan, kebuntingan yang diharapkan tidak segera dapat terjadi. Seluruh tikus Kelompok-A baru dapat bunting setelah empat bulan, jauh lebih lama dibandingkan terjadinya kebuntingan pada tikus Kelompok-B dan Kelompok-C yang sudah dapat bunting seluruhnya dalam bulan kedua perkawinan. Di Kelompok-A tidak ada seekor tikus pun yang bunting dalam masa 21 hari pertama perkawinan, sementara pada masa yang sama terdapat 5 kebuntingan pada Kelompok-B dan 6 kebuntingan pada Kelompok-C. Tikus-tikus Kelompok-A baru bisa bunting setelah masa lebih dari 4x21 hari sedangkan pada Kelompok-B

dan C dalam masa 2x21 hari (duapuluh satu hari adalah masa kebuntingan induk tikus).

Dalam Tabel 5.1.10 ditunjukkan berat badan janin Kelompok-A secara sangat bermakna lebih ringan dibandingkan Kelompok-B dan Kelompok-C (uji *Anova*, $p= 0.000$). Data tersebut diperkuat dengan penampilan janin dari masing-masing kelompok, seperti disajikan dalam Gambar 5.1.5, yaitu janin tikus Kelompok-A lebih kecil dibanding janin tikus dua kelompok lain. Didapat pula tujuh ekor janin Kelompok-A yang ekornya tidak tumbuh, sedangkan pada kelompok lain seluruh janin dalam keadaan normal. Dari seluruh janin yang dilahirkan, tidak dapat ditemukan adanya cacat berupa meningokel.

Untuk mengamati perilaku induk tikus terhadap janinnya, tiap kelompok disisa-kan 3 ekor induk yang tidak dilakukan histerotomi sehingga saat janin lahir, induk masih hidup. Ternyata semua janin Kelompok-A dimakan habis oleh induknya pada hari pertama pasca-lahir sehingga tidak dapat dideteksi adanya meningokel atau cacat bawaan yang lain, sedangkan kebanyakan janin Kelompok-B dan C tetap hidup dan tidak cacat.

TABEL 5.1.11

KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* TULANG KEPALA JANIN
(SEGMENT BELAKANG DAN DEPAN)
TIAP KELOMPOK TIKUS

	KELOMPOK-A		KELOMPOK-B		KELOMPOK-C		<i>p-value</i>
Bik	TGF-β1	IGF-I	TGF-β1	IGF-I	TGF-β1	IGF-I	Anova
1	10	4	21	12	31	29	<i>TGF-β1</i> = 0.002
2	11	7	21	25	18	29	
3	5	8	26	13	30	30	
4	6	7	15	9	32	29	
5	18	6	10	16	26	32	
6	9	6	29	11	21	19	
7	6	9	23	12	29	28	
8	14	5	28	18	24	26	
9	12	3	25	27	28	22	
10	9	5	22	29	27	18	
Rerata	10.00 ±3.79	6.00 ±1.73	22.00 ±5.53	17.20 ±6.89	26.60 ±4.24	26.20 ±4.60	
Depan	TGFβ1	IGF-I	TGF-β1	IGF-I	TGF-β1	IGF-I	
1	6	3	19	20	48	21	<i>TGF-β1</i> = 0.000
2	2	8	22	19	29	27	
3	9	2	21	16	38	31	
4	8	6	19	18	29	21	
5	11	5	17	13	28	17	
6	10	5	27	17	21	14	
7	8	3	21	15	25	21	
8	10	7	24	16	23	24	
9	10	9	22	23	24	19	
10	6	9	26	21	28	15	
Rerata	8.00 ±2.56	5.70 ±2.41	21.80 ±2.99	17.80 ±2.85	29.30 ±7.64	21.00 ±5.00	<i>IGF-I</i> = 0.000

Keterangan : - data perhitungan adalah jumlah kotak imunoperoxidase positif per-lapang pandang

5.1.7 Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus

Dari perhitungan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin setiap kelompok tikus didapatkan data adanya perbedaan yang sangat bermakna antar-kelompok, baik untuk segmen belakang (uji *Anova* untuk *TGF-β1* : $p = 0.002$, *IGF-I* : $p = 0.000$) maupun segmen depan (*TGF-β1* : $p = 0.000$, *IGF-I* : $p = 0.000$). Hasil ini menunjukkan bahwa kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut pada tulang kepala janin Kelompok-A lebih rendah dibandingkan kelompok-B maupun Kelompok-C dan Kelompok-B lebih rendah dibanding Kelompok-C. Maka semakin rendah kadar asam folat dalam serum dan dalam eritrosit induk, semakin rendah kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk maupun dalam tulang kepala janin tikus. Rincian perhitungan dapat diperiksa pada Tabel 5.1.11, Grafik 5.1.11 dan Lampiran 13.

TABEL 5.1.12

**KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* DALAM SERUM DAN DALAM TULANG
TIAP KELOMPOK TIKUS**

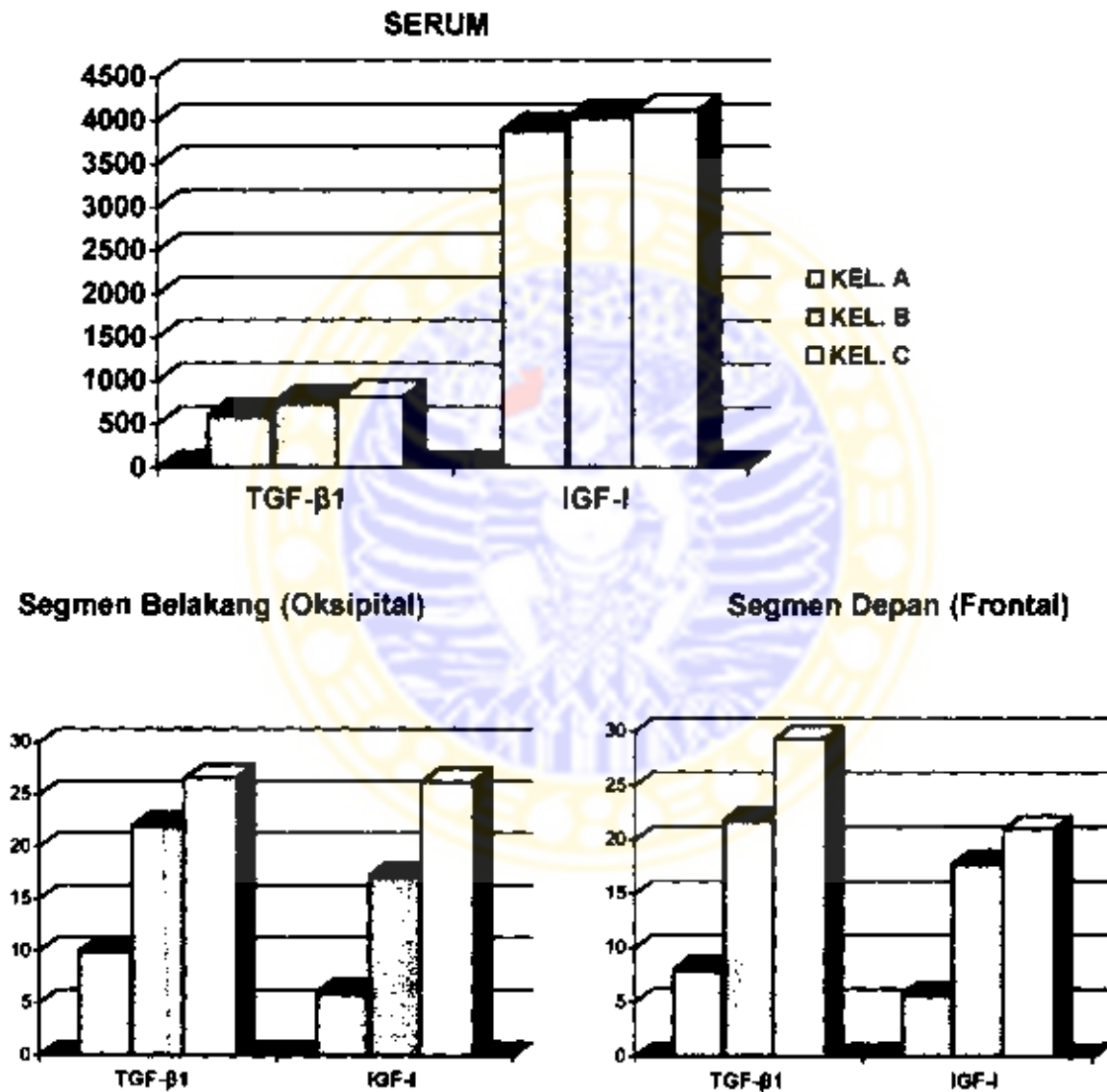
Kelompok	SERUM		TULANG	
	<i>TGF-β1</i>	<i>IGF-I</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>IGF-I</i>
A	602.0 ± 98.0	3888.0 ± 93.5	*10.00±3.79 **8.00±2.56	6.00±1.73 5.70±2.41
B	752.2 ± 96.2	4038.0 ± 88.4	*22.00 ± 5.53 **21.80±2.99	17.20±6.89 17.80±2.85
C	810.6 ± 75.2	4109.2 ± 47.0	*26.60 ± 4.24 **29.3±7.64	26.20±4.60 21.00±5.00
			segmen: *belakang, **depan	

5.1.8 Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-1* dalam serum induk tikus dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus

Dari Tabel 5.1.12, Grafik 5.1.12 dan Gambar 5.1.1 terlihat ada korelasi yang sangat kuat kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum dengan kadarnya dalam tulang kepala janin, baik pada segmen posterior (*TGF-β1*: $r = 0.361$, $p = 0.017$; *IGF-I*: $r = 0.517$, $p = 0.000$) maupun segmen anterior (*TGF-β1*: $r = 0.977$, $p =$

0.000; *IGF-I*: $r = 0.969$, $p = 0.000$). Dengan demikian hipotesis ketiga terbukti dan dapat diterima. Rincian perhitungan statistik disajikan dalam Lampiran 18.

GRAFIK 5.1.12 KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* DALAM SERUM DAN TULANG TIAP KELOMPOK TIKUS



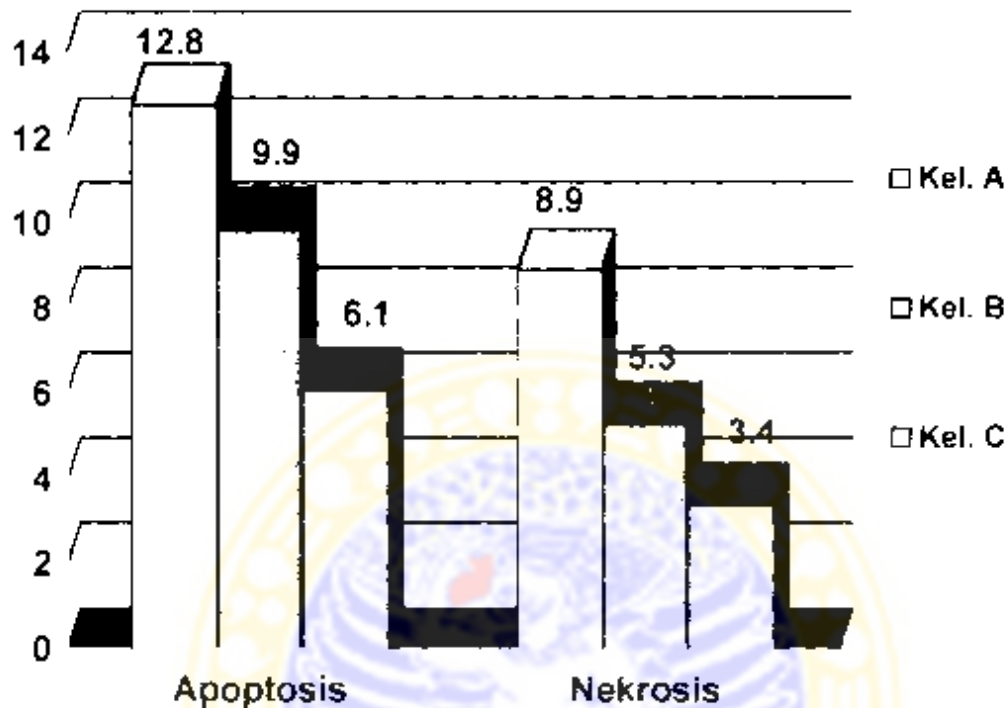
TABEL 5.1.13**JUMLAH SEL APOPTOSIS DAN NEKROSIS PADA TULANG KEPALA JANIN TIKUS TIAP KELOMPOK**

No.	APOPTOSIS			NEKROSIS		
	Kel. A	Kel. B	Kel. C	Kel. A	Kel. B	Kel. C
1	10	11	2	9	9	1
2	15	9	1	11	2	5
3	12	5	6	5	8	3
4	13	18	9	13	6	4
5	9	15	8	9	4	9
6	17	3	6	12	8	2
7	21	8	7	7	2	2
8	12	17	3	10	4	4
9	7	8	8	8	7	3
10	12	5	11	5	3	1
Rerata	12.80	9.90	6.10	8.90	5.30	3.40
	±3.84	±4.96	±3.04	±2.58	±2.49	±2.24
<i>pvalue</i>	0.006			0.000		

Keterangan : Data adalah jumlah sel perlapang-pandang

GRAFIK 5.1.13

JUMLAH SEL APOPTOSIS DAN NEKROSIS PADA TULANG KEPALA JANIN TIKUS TIAP KELOMPOK



5.1.9 Jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis pada tulang kepala janin tikus

Tabel 5.1.13 memperlihatkan perbedaan jumlah sel yang mengalami kematian (apoptosis dan nekrosis) pada sediaan tulang kepala janin tikus. Terdapat perbedaan yang sangat bermakna jumlah sel apoptosis (uji *Anova*, $p = 0.006$) dan jumlah sel nekrosis ($p = 0.000$) pada setiap kelompok tikus. Jumlah sel apoptosis secara bermakna lebih banyak dibandingkan jumlah sel nekrosis ($p = 0.020$). Rincian perhitungan statistik *Anova* disajikan dalam Lampiran 15.

5.1.10 Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam tulang kepala janin tikus

Tabel 5.1.14

KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* TULANG KEPALA JANIN SERTA JUMLAH SEL APOPTOSIS DAN NEKROSIS TIAP KELOMPOK TIKUS

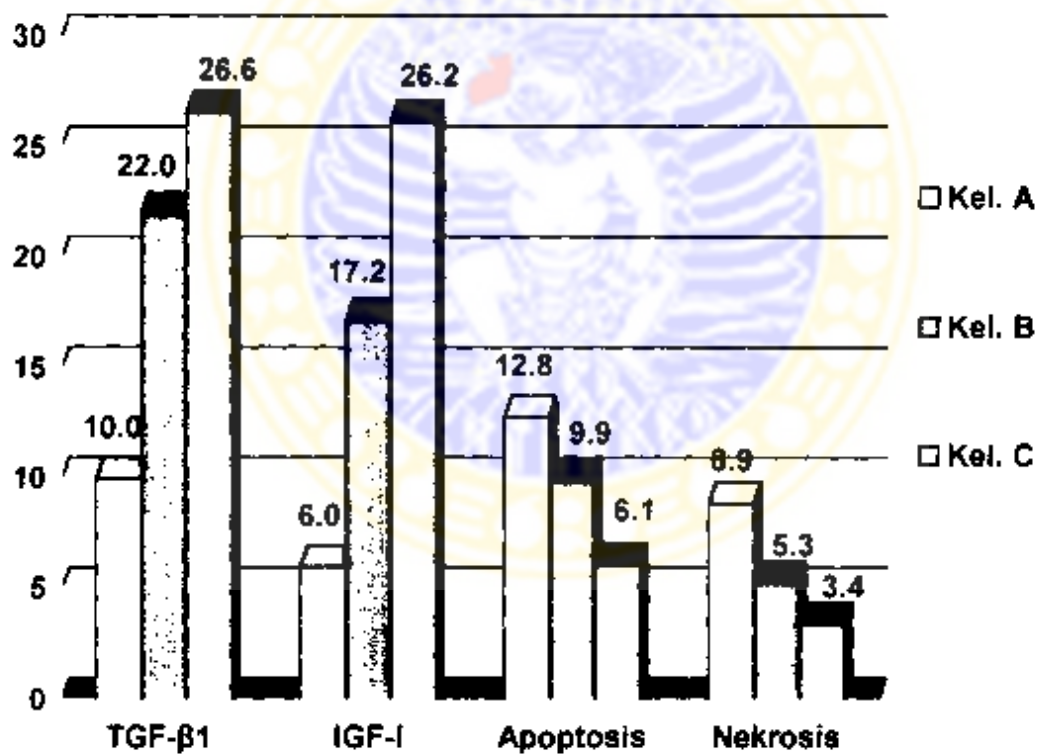
	<i>TGF-β1</i>	<i>IGF-I</i>	APOPTOSIS	NEKROSIS
Kel. A	10.00 ± 3.79	6.00 ± 1.73	12.8 ± 3.84	8.90 ± 2.58
Kel. B	22.00 ± 5.53	17.20 ± 6.89	9.90 ± 4.96	5.30 ± 2.49
Kel. C	26.60 ± 4.24	26.20 ± 4.60	6.10 ± 3.04	3.40 ± 2.24

Tabel 5.1.14, Grafik 5.1.14 dan Gambar 5.1.1 memperlihatkan korelasi-negatif yang sangat kuat antara kadar *TGF-β1* tulang kepala janin dengan jumlah sel apoptosis ($r = -0.541$, $p = 0.001$), sedangkan korelasi-negatif antara kadar *TGF-β1* dengan jumlah sel nekrosis tidak kuat ($r = -0.219$, $p = 0.180$). Kadar *IGF-I* tulang kepala janin juga berkorelasi-negatif yang tidak kuat dengan jumlah sel apoptosis ($r = -0.064$, $p = 0.701$), tetapi korelasi-negatifnya dengan jumlah sel nekrosis sangat kuat ($r = -0.469$, $p = 0.004$). Artinya, semakin rendah kadar *growth factor TGF-β1* dalam tulang kepala janin, secara sangat bermakna

semakin banyak sel yang mengalami apoptosis, tetapi tidak disertai peningkatan jumlah sel yang mengalami nekrosis. Sebaliknya, semakin rendah kadar *IGF-I* dalam tulang kepala janin, secara bermakna semakin banyak sel nekrosis, tetapi tidak disertai kenaikan jumlah sel apoptosis. Dengan demikian sebagian hipotesis keempat terbukti dan dapat diterima, sebagian yang lain tidak terbukti. Rincian perhitungan statistik disajikan dalam Lampiran 18.

GRAFIK 5.1.14

KADAR *TGF-β1* DAN *IGF-I* DALAM TULANG KEPALA SERTA JUMLAH SEL APOPTOSIS DAN NEKROSIS TIAP KELOMPOK TIKUS



5.1.11 Korelasi tidak langsung kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum induk tikus dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel

Korelasi tidak langsung kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum induk dengan lebar defek tulang kepala meningokel dijelaskan sebagai berikut. Dari Tabel 5.1.12 dan Gambar 5.1.1 dapat dianalisis bahwa terdapat korelasi-positif yang sangat kuat antara kadar kedua *growth factor* dalam serum dengan kadarnya dalam tulang kepala janin tikus (*TGF-β1*: $r = 0.361$, $p = 0.017$; *IGF-I*: $r = 0.517$, $p = 0.000$), sedangkan dari Tabel 5.2.1 dan Gambar 5.2.1 dapat dianalisis adanya korelasi-negatif yang kuat antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan lebar defek tulang kepala (*TGF-β1*: $r = -0.648$, $p = 0.009$; *IGF-I*: $r = -0.426$, $p = 0.025$).

Dari kombinasi dua analisis data tadi, dapat disimpulkan terdapat korelasi-negatif yang kuat antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel. Secara tidak langsung, semakin rendah kadar kedua *growth factor* dalam serum induk tikus, semakin lebar defek tulang kepala pasien meningokel. Dengan demikian hipotesis kelima telah dibuktikan dan dapat diterima. Rincian perhitungan statistik disajikan dalam Lampiran 18.

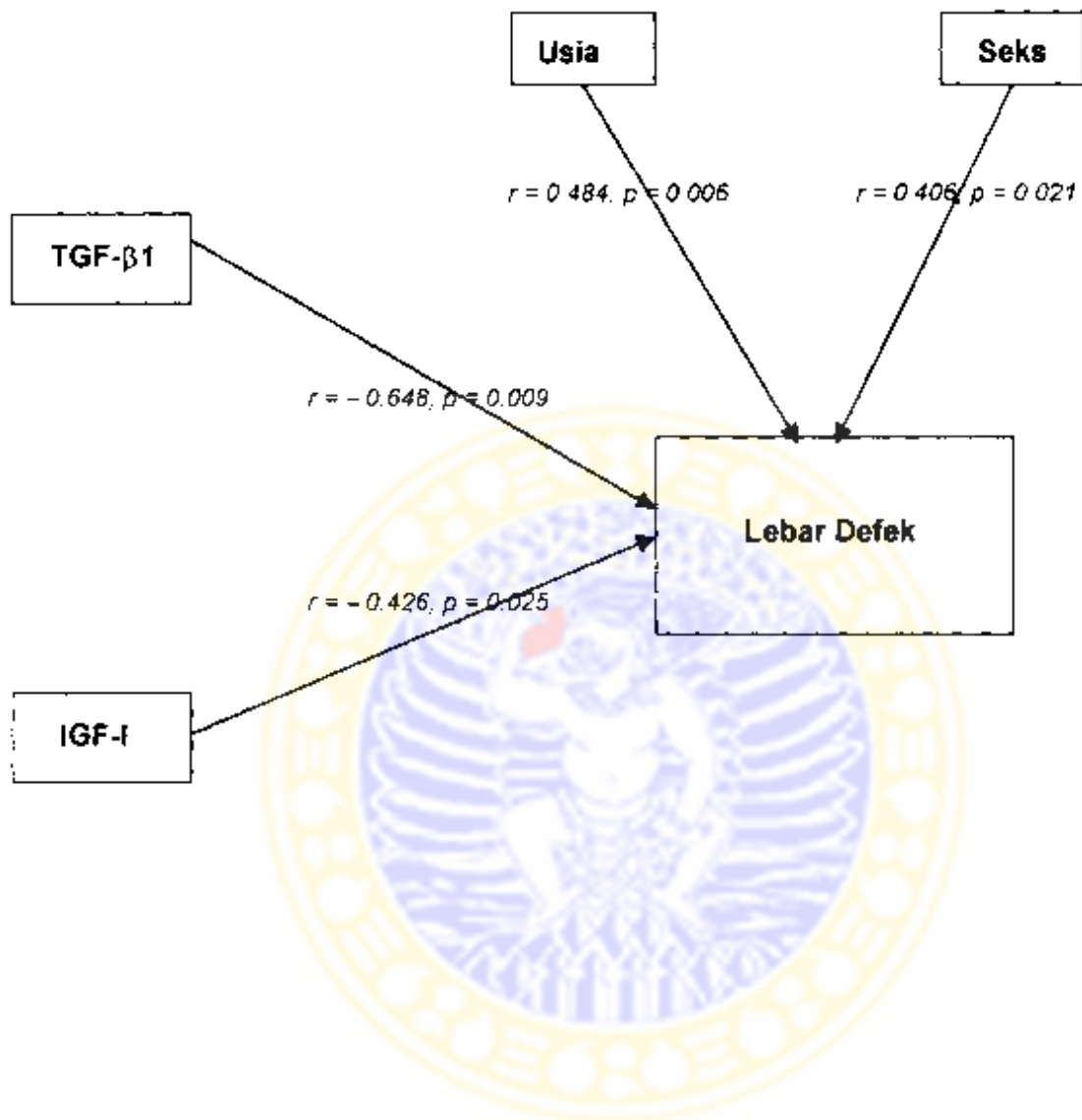
TABEL 5.2.1
KADAR TGF- β 1 DAN IGF-1 DALAM TULANG
SERTA LEBAR DEFEK PADA PASIEN MENINGOKEL

Tulang				Kadar				Lebardefek (mm ²)
				Luar defek		Tepi defek		
Identitas				TGF- β 1	IGF-1	TGF- β 1	IGF-1	
Nm	Usia (bl)	Seks	Hb (gr%)					
Alx	18	L	10.1	8	9	6	9	16.7466
Sof	12	L	10.6	7	6	4	3	68.4000
Dwi	4	P	13.1	7	7	4	3	56.2600
Aff	20	P	11.5	3	2	2	1	270.9210
Ger	48	L	11.2	2	3	1	2	835.7880
Ant	6	P	11.0	4	4	2	4	155.6456
Gal	36	L	12.1	8	7	5	8	39.5732
Avi	11	P	11.9	5	6	4	3	75.2640
Rerata \pm SD				5.5 \pm 2.2	5.4 \pm 2.1	3.5 \pm 1.6	4.1 \pm 2.7	

Keterangan : - Data adalah jumlah kotak imunoperoxidase positif (warna merah-cokelat) per-lapang pandang

-Lebar defek dihitung dengan program komputer *Adobe Photoshop*





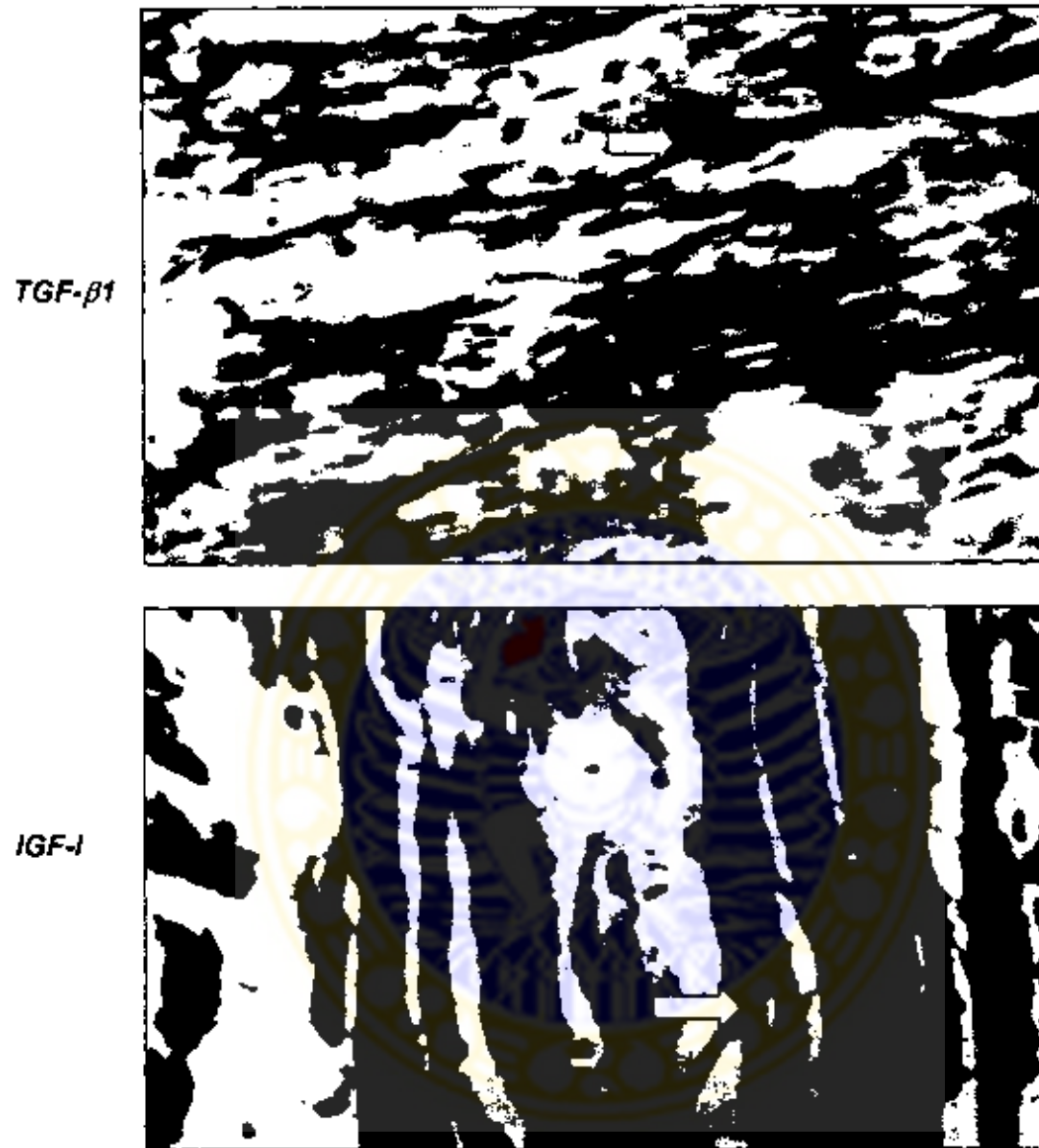
Gambar 5.1.3 Hubungan Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* Tulang dengan Lebar Defek Pasien Meningokel (Hasil Analisis SEM)

5.1.12 Korelasi kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang dengan lebar defek tulang kepala pasien meningokel

Dengan memperhitungkan variabel perancu usia dan jenis kelamin, terlihat pengaruh yang sangat kuat kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang di defek terhadap lebar defek tulang kepala pada meningokel. Juga terlihat bahwa pengaruh *TGF- β 1* lebih kuat dibanding pengaruh *IGF-I* (*Anacova*, *TGF- β 1* : $p = 0.009$, $r = -0.648$; *IGF-I* : $p = 0.025$, $r = -0.426$). Dengan demikian hipotesis keenam terbukti dan dapat diterima.

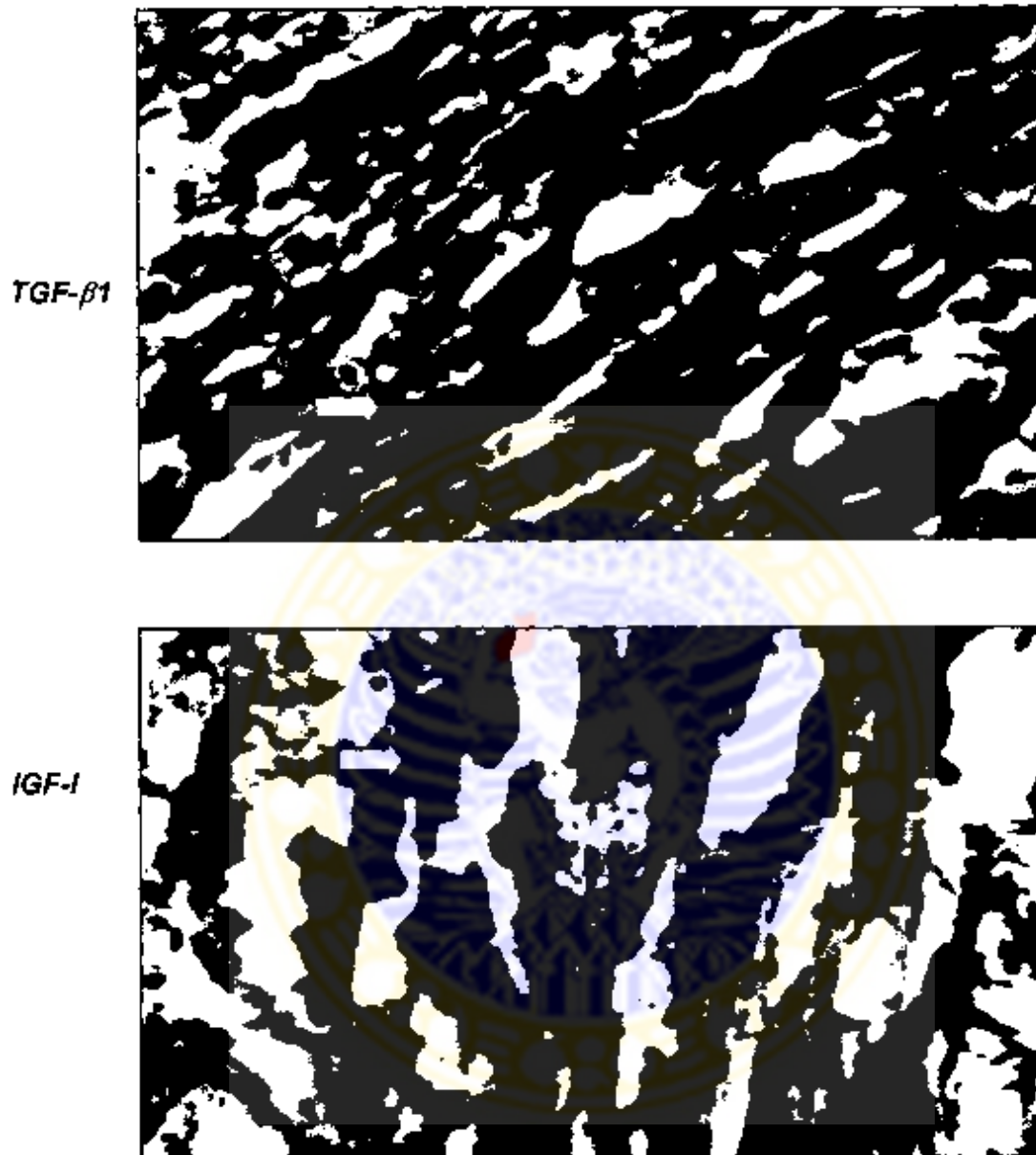
Kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* di dalam tulang tepi defek secara bermakna lebih tinggi dibanding kadarnya dalam tulang normal (*Anova*, *TGF- β 1* : $p = 0.007$; *IGF-I* : $p = 0.011$). Terlihat perbedaan yang tidak bermakna antara kadar *TGF- β 1* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya di luar defek (*Anova*, $p = 0.138$), demikian juga antara kadar *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya di luar defek berbeda tidak bermakna (*Anova*, $p = 0.215$). Rincian perhitungan statistik disajikan pada Tabel 5.2.1, Gambar 5.2.1, Lampiran 16, Lampiran 17 dan Lampiran 18.

5.2 Analisis histologik dan histopatologik



Gambar 5.2.1 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-A

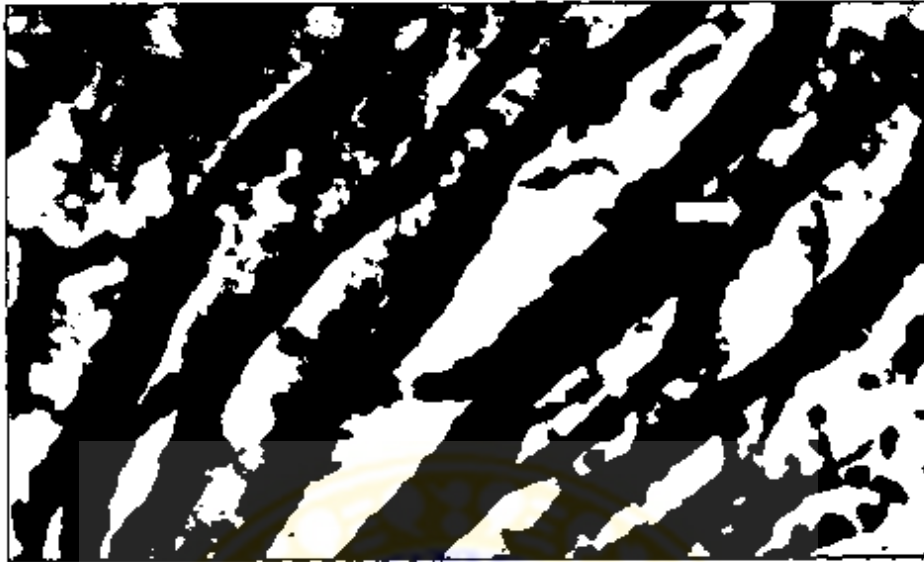
Keterangan : Pengecatan imunohistokimia metoda peroksidase dengan *counterstaining* Mayer hematoxylin Antibodi anti *TGF-β1* dan anti *IGF-I*, pembesaran 100x..Tampak sedikit sekali ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* (berwarna merah-kecokelatan . \Rightarrow), baik dalam sel maupun matriks ekstrasel.



Gambar 5.2.2 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-B

Keterangan : Pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan *counterstaining* Mauyer-hematoxylene Antibodi anti *TGF-β1* dan *IGF-I* pembesaran 100x. Terlihat ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* (berwarna merah-kecokelatan ⇒) yang lebih banyak dibanding Kelompok-A

TGF- β 1



IGF-I



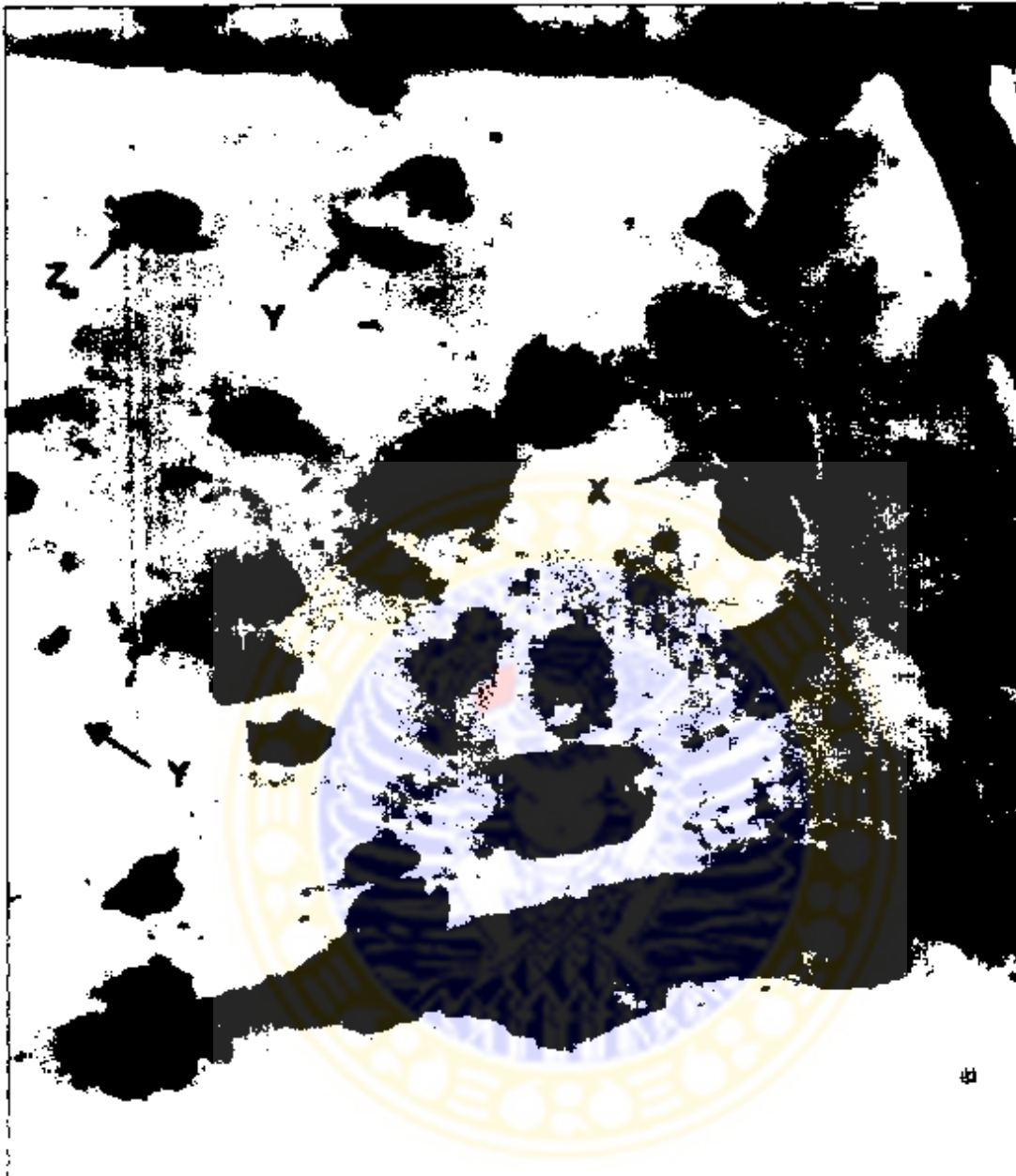
Gambar 5.2.3 Sediaan tulang kepala janin Kelompok-C

Keterangan : Pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan *counterstaining* Mayer-hematoxyline Antibodi anti TGF- β 1 dan IGF-I pembesaran 100x. Terlihat ekspresi TGF- β 1 dan IGF-I (warna merah kecokelatan : \Rightarrow) yang jauh lebih banyak dibanding Kelompok-A dan B

5.2.1 Ekspresi *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus

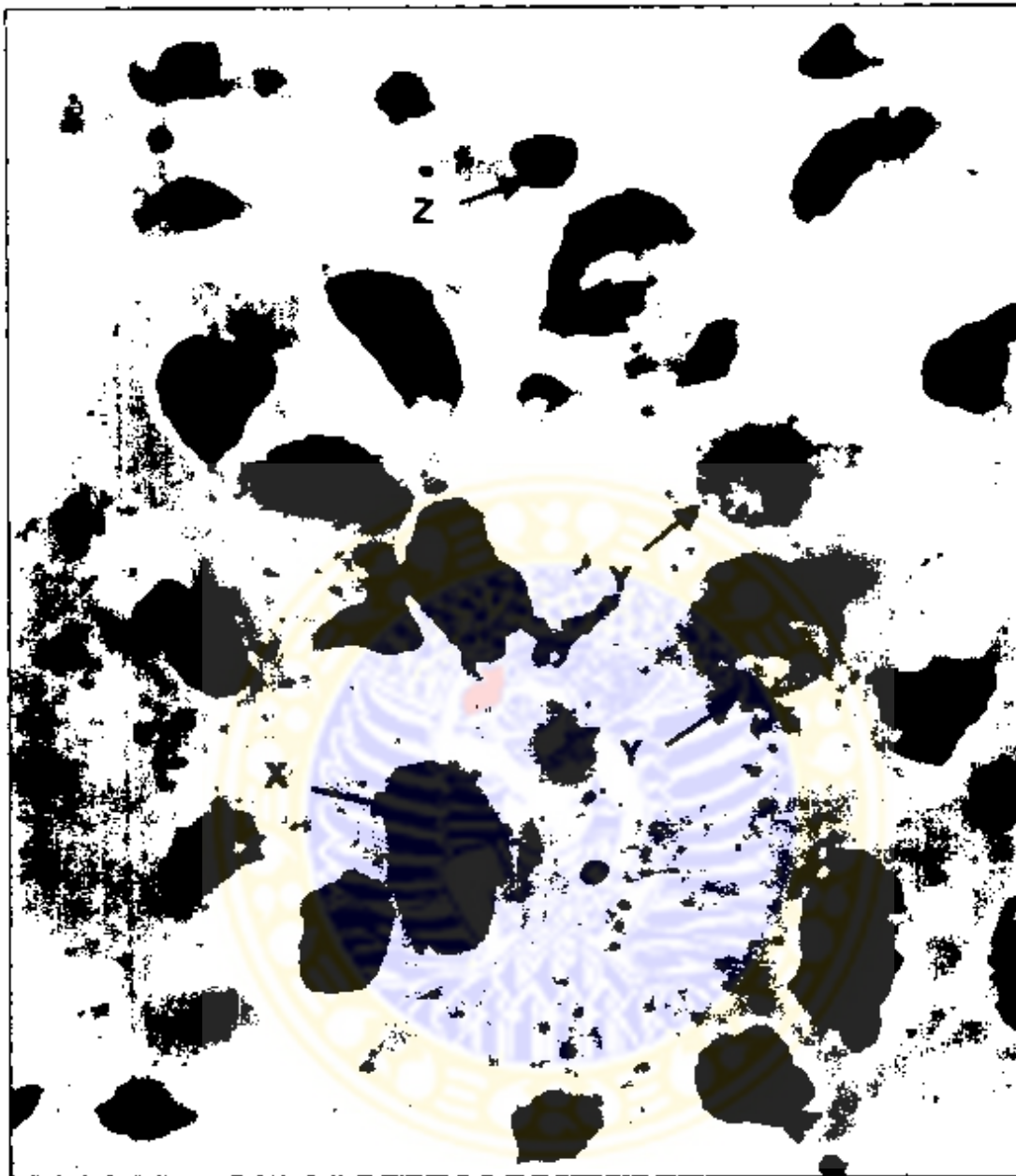
Dengan pengecatan khusus imunohistokimia metode peroksidase diikuti *counterstaining* Mayer-Harris hematoxyline monoklonal Antibodi anti *TGF- β 1/IGF-I* terlihat timbulnya warna merah-kecokelatan. Itu merupakan tanda khas ekspresi kedua faktor pertumbuhan tersebut, yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Semakin intens dan luas warna merah-kecokelatan yang timbul, secara kualitatif semakin tinggi kadar *TGF- β 1* atau *IGF-I*. Dari Gambar 5.2.1, 5.2.2 dan 5.2.3 terlihat urutan perbedaan intensitas dan luas area yang berwarna merah-kecokelatan di dalam matriks ekstrasel (jaringan tulang). Sediaan di Gambar 5.2.1 yang merupakan representasi sediaan tulang kepala janin tikus Kelompok-A (defisiensi folat berat) mempunyai intensitas warna yang paling rendah, sedangkan Gambar 5.2.3 (Kelompok-C, folat normal) mempunyai intensitas yang paling tinggi. Gambar 5.2.4, 5.2.5 dan 5.2.6 memperlihatkan urutan perbedaan ekspresi *growth factor* intraseluler (sel berwarna merah-kecokelatan).

Untuk mendapatkan data semikuantitatif ekspresi (kadar) *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus, sediaan itu diperiksa dengan mikroskop yang memiliki bilik hitung di sisi okulemya, sehingga didapatkan jumlah kotak perlapang-pandang dari area yang berwarna merah-kecokelatan, seperti yang telah dijelaskan dalam Bab 4 dan hasilnya tercantum dalam Subbab 5.1.



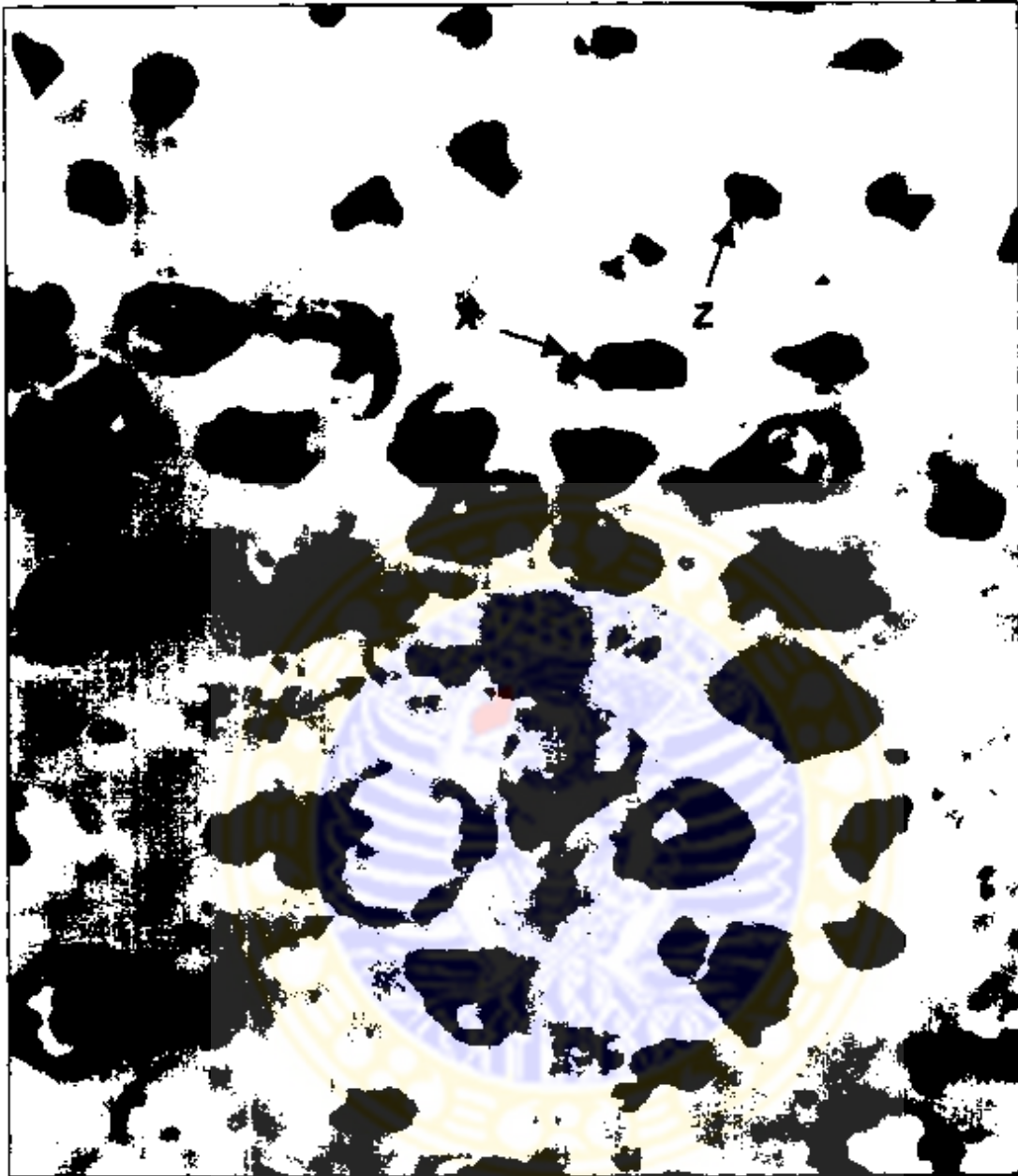
Gambar 5.2.4 Sediaan-A dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti *TGF- β 1*, pembesaran 400x

Keterangan : X - Ekspresi *TGF β 1* intrasel. kadar rendah
Y - Sel nekrosis
Z - Sel normal



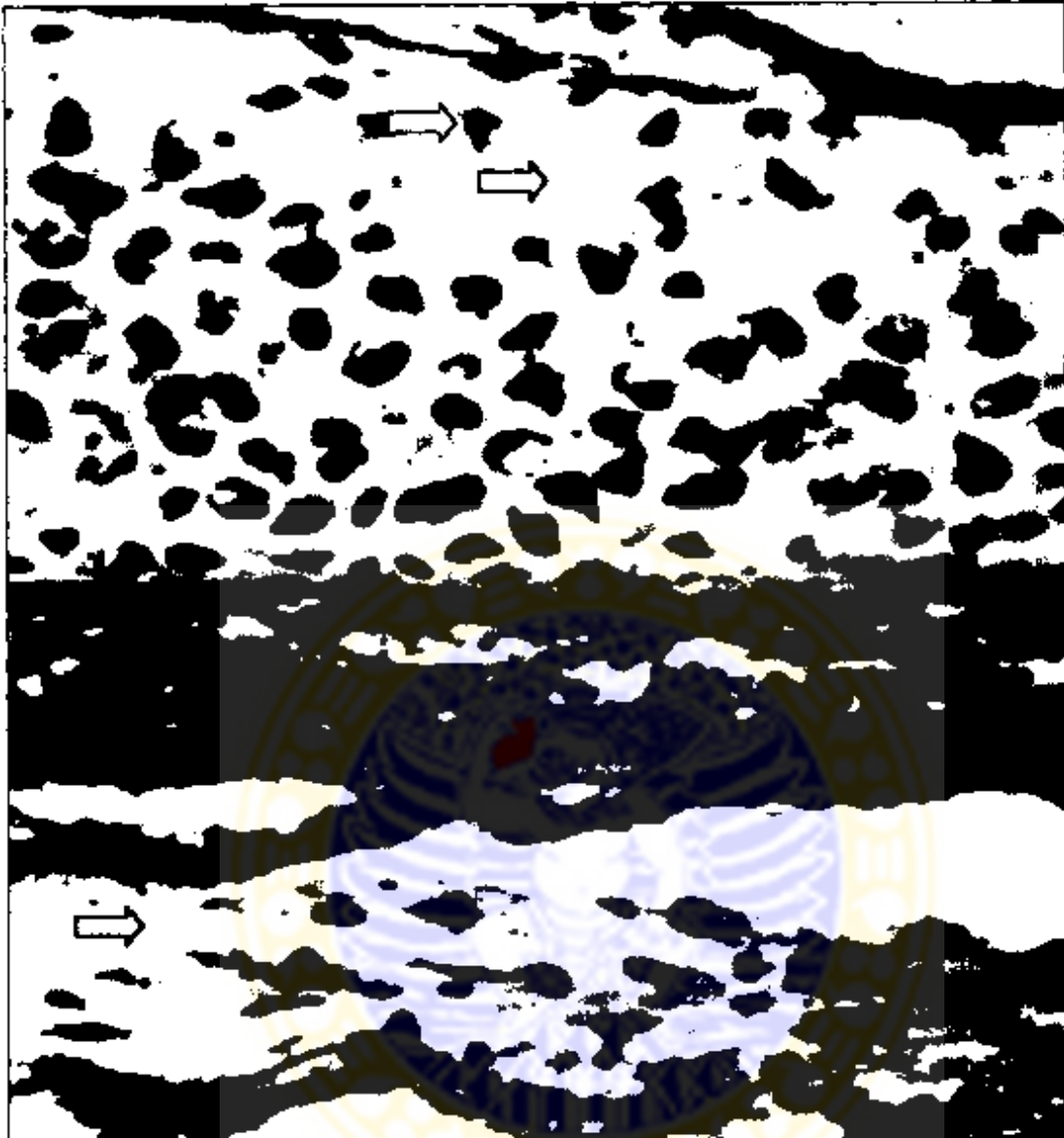
Gambar 5.2.5 Sediaan-B dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti *TGF-β1*, pembesaran 400x

Keterangan : X – menunjukkan ekspresi *TGF-β1* intrasel, kadar sedang
Y – menunjukkan sel nekrosis
Z – menunjukkan sel normal



Gambar 5.2.6 Sediaan-C dengan pengecatan imunohistokimia, metode peroksidase poliklonal antibodi anti *TGF- β 1*, pembesaran 400x

Keterangan : X – menunjukkan ekspresi *TGF- β 1* intrasel, kadar tinggi
Y – menunjukkan sel nekrosis
Z – menunjukkan sel normal



Gambar 5.2.7 Sediaan irisan melintang tulang kepala janin tikus

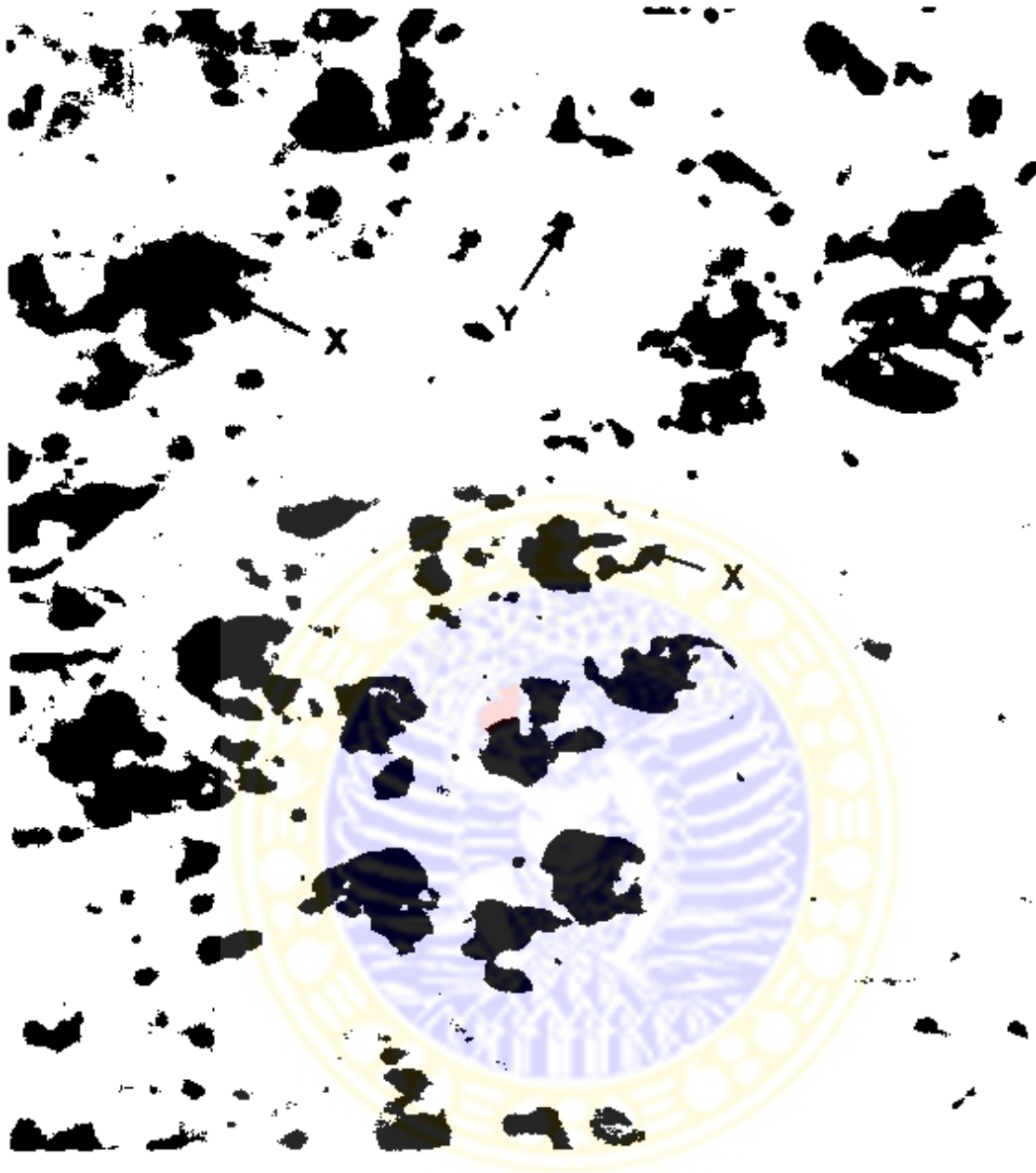
Keterangan : Pengecatan Imunohistokimia metode peroksidase dengan *counterstaining* Mayer Hematoxylin Antibodi anti *TGF-β1*, pembesaran 200x, terlihat : khondrosit (⇨), osteosit (⇨), kartilago (⇨), kolagen (⇨) dan lamela tulang/matriks-ekstrasel (⇨).

Terlihat pula ekspresi *TGF-β1* intrasel dan matriks ekstrasel (berwarna merah-kecokelatan).

5.2.2 Penampang melintang tulang kepala janin tikus normal

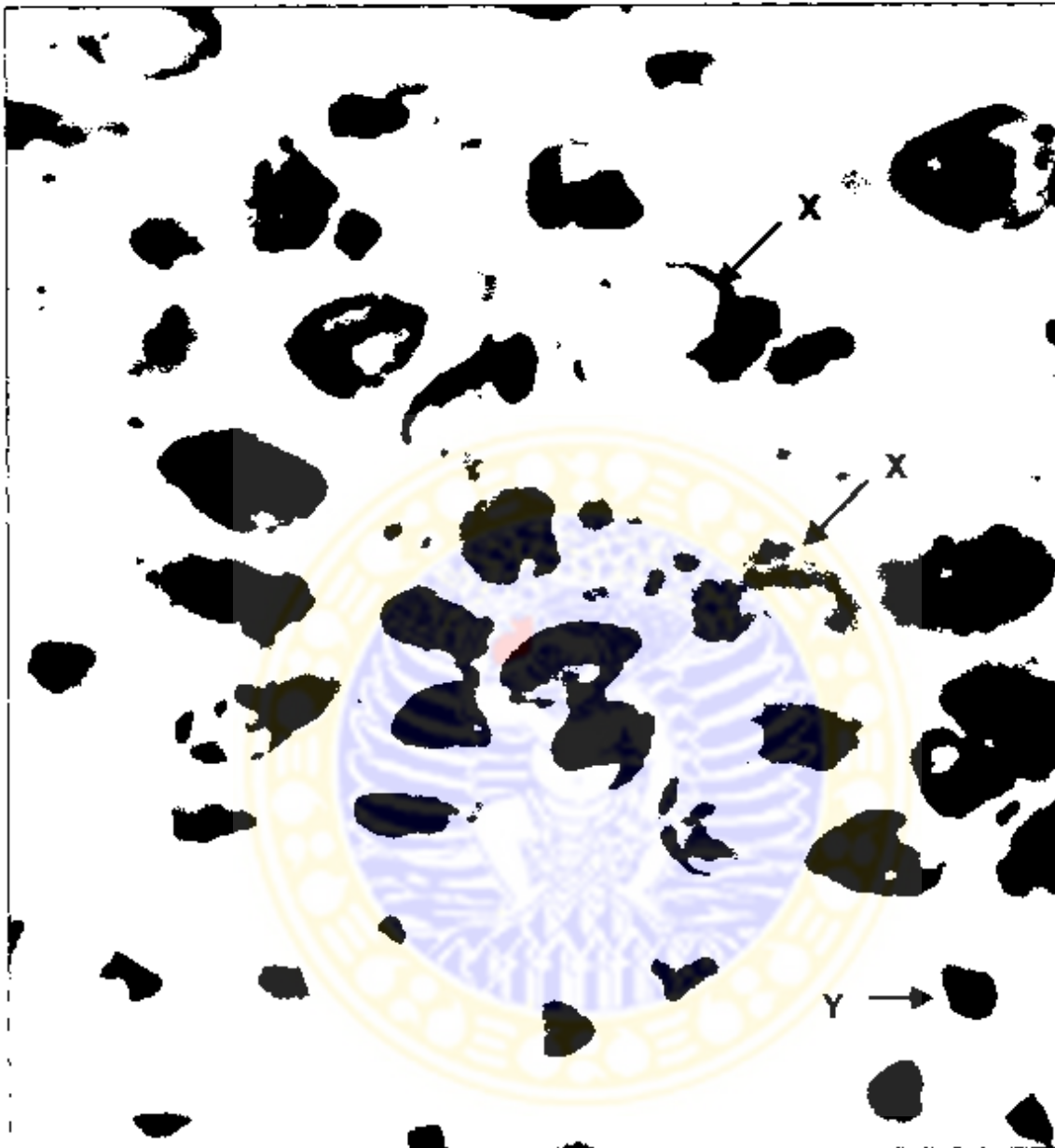
Gambar 5.2.7 memperlihatkan lapisan tulang kepala janin tikus yang terdiri dari sel khondrosit dan osteosit, serta matriks jaringan kolagen, kartilago-hialin dan lamela tulang. Tampak pula ekspresi *TGF- β 1* di dalam sel maupun matriks ekstrasel. Lamela tulang terlihat jauh lebih longgar bila dibandingkan dengan struktur lamela pada tulang pasien meningokel (Gambar 5.2.10). Dari kedua sediaan ini tidak berhasil ditemukan sel muda (khondroblas dan osteoblas), yang untuk itu memang diperlukan pengecatan lain.





Gambar 5.2.8 Sediaan dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti rat Caspase3, pembesaran 200x

Keterangan : X : - menunjukkan osteosit apoptosis
Y : - menunjukkan osteosit normal

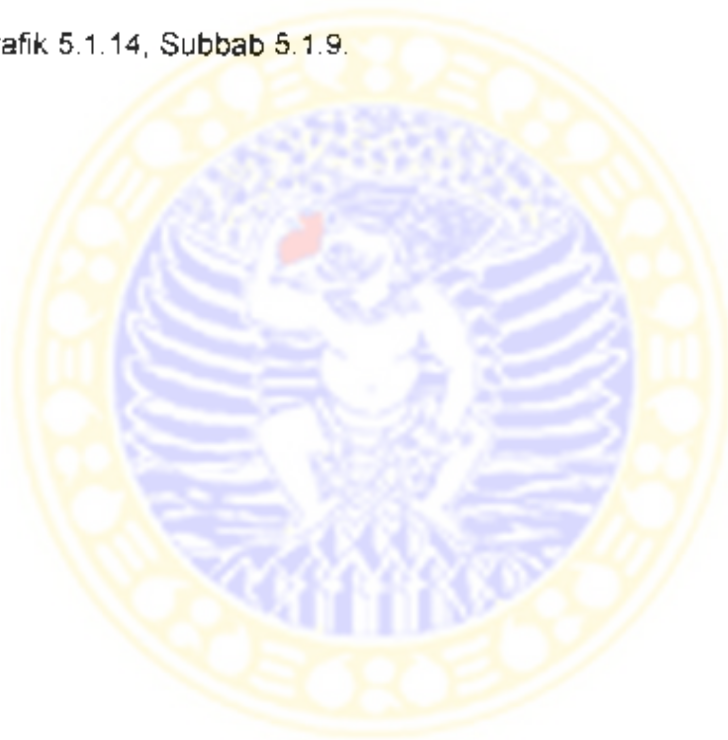


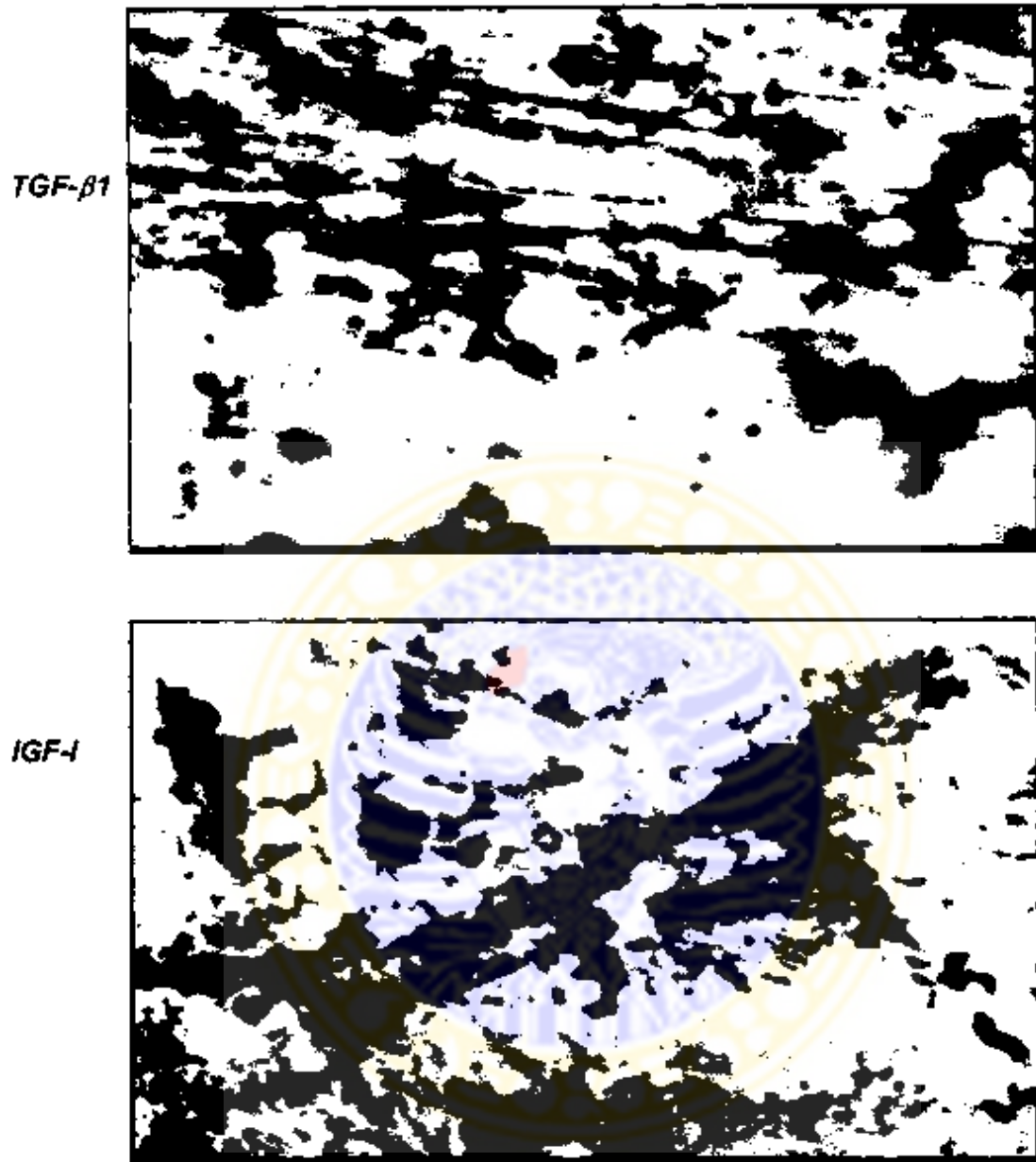
Gambar 5.2.9 Sediaan dengan pengecatan imunohistokimia metode peroksidase poliklonal antibodi anti *TGF- β 1*, pembesaran 400x

Keterangan : X - menunjukkan osteosit nekrosis
Y - menunjukkan osteosit normal

5.2.3 Apoptosis dan nekrosis sel-sel tulang kepala janin tikus

Gambar 5.2.8 dan 5.2.9 memperlihatkan gambaran sel osteosit yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Tanda sel yang mengalami apoptosis adalah: kondensasi kromatin, peningkatan densitas dan pengkerutan (*shrinkage*) nukleus, resorpsi lakunar yang menyebabkan lakuna tampak kosong. Nekrosis sel ditandai penggembungan dan lisis dan sel yang bersangkutan, sehingga dinding sel menjadi kabur. Analisis data perhitungan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis pada setiap kelompok tikus telah disajikan dalam Tabel 5.1.14 dan Grafik 5.1.14, Subbab 5.1.9.

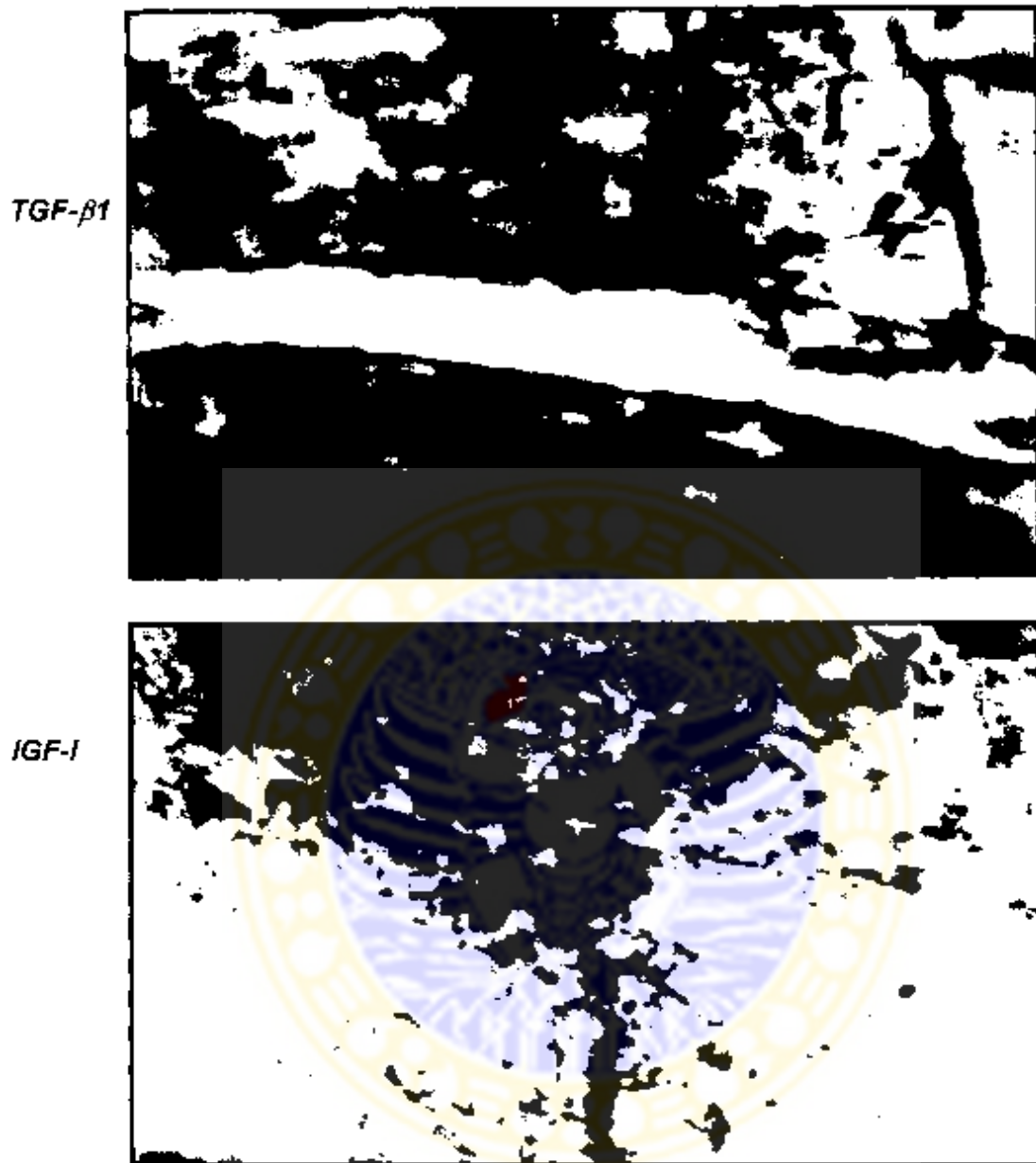




Gambar 5.2.10 Sediaan-I tulang pasien meningokel

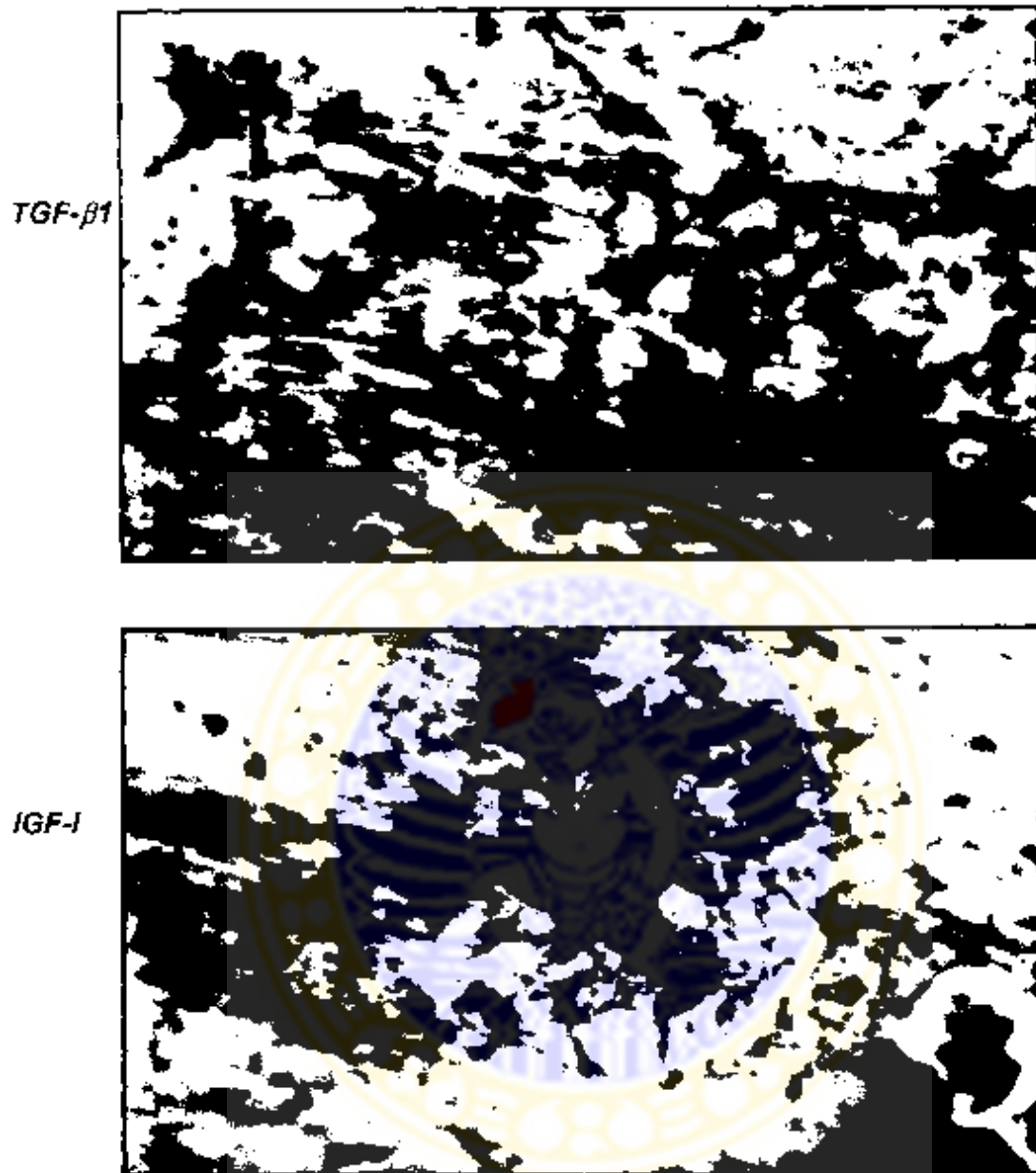
Keterangan : - pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan *counterstaining* Mayer-hematoxylin Human Antibody anti TGF-β1 atau IGF-I, pembesaran 200X

- terlihat ekspresi TGF-β1 dan IGF-I (warna merah-kecokelatan) kadar rendah



Gambar 5.2.11 Sediaan-II tulang pasien meningokel

- Keterangan :**
- pengecatan imunohistokimia metode peroksidase, dengan *counterstaining Mayer-hematoxylin Human Antibody anti TGF-β1* atau *IGF-I*, pembesaran 200X
 - terlihat ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* (warna merah-kecokelatan) lebih tinggi dibanding sedraan-I



Gambar 5.2.12 Sediaan-III tulang pasien meningokel

- Keterangan** :
- pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan counterstaining Mayer-hematoxylin Human Antibody anti *TGF-β1* atau *IGF-I*, pembesaran 200X
 - terlihat ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* (warna merah-kecokelatan) lebih tinggi dibanding sediaan-I dan sediaan-II

5.2.4 Ekspresi *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala pasien meningokel

Untuk memperlihatkan gradasi *growth factor TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala pasien meningokel, disajikan Gambar 5.2.10, 5.2.11, dan 5.2.12 yang secara berurutan merupakan representasi intensitas ekspresi kedua *growth factor* tersebut (area berwarna merah-kecokelatan) dari yang terendah sampai yang tertinggi. Data deskriptif semikuantitatif telah disampaikan dalam Tabel 5.2.1 dan Subbab 5.2.1.

Perbedaan histologis tulang kepala pasien dibanding tulang kepala janin tikus (Gambar 5.2.1, 5.2.2 dan 5.2.3) adalah:

- struktur lamela matriks tulang lebih padat dan kompak
- tidak ditemukan kondrosit
- tidak ditemukan jaringan kolagen maupun kartilago
- ekspresi *TGF- β 1* dan *IGF-I* lebih rendah

BAB 6

PEMBAHASAN

Pembahasan berikut ini disajikan berdasar analisis hasil penelitian yang dikaitkan dengan konsep atau teori yang telah ada. Sistematika pembahasan dilatarbelakangi mulai dari rumusan masalah sampai dengan jawaban hipotesis seperti tertera dalam beberapa bab sebelumnya.

6.1 Kadar asam folat dalam eritrosit dan serum induk tikus

Untuk memperoleh kondisi kadar asam folat yang berbeda (sangat rendah, rendah dan cukup), hewan-coba tikus diberi rangsum dengan formula seperti tercantum dalam metodologi penelitian. Formula tersebut diadopsi dan dimodifikasi dari rangsum yang digunakan oleh Arington (1981), Johnson (1972) dan Van Wouwe (1991).

Pemeriksaan kadar asam folat 16 minggu setelah pemberian rangsum terdapat perbedaan yang sangat bermakna kadar asam folat antar Kelompok-A, B dan C secara keseluruhan, baik di dalam eritrosit (uji *Anova*, $p= 0.001$) maupun dalam serum ($p= 0.000$), meskipun perbedaan antara Kelompok-B dan Kelompok-C kurang bermakna. Rerata kadar asam folat dalam eritrosit (Tabel 5.1.2) pada sepuluh tikus kelompok perlakuan adalah 632.1 ng/ml, lebih rendah daripada kadar normal yang 900-1200 ng/ml. Sedangkan rerata kadar asam folat dalam serum (Tabel 5.1.3) adalah 6.34 ng, lebih rendah daripada kadar normal yang 15-30 ng/ml. Dengan demikian diperoleh sekelompok tikus (Kelompok-A) yang mengalami defisiensi asam folat.

Komposisi *purified diet* yang diadopsi dan dimodifikasi dari komposisi yang dianjurkan oleh Arrington (1981), Johnson (1972) dan Van Wouwe (1991) seperti disajikan dalam Tabel 2.10.3 dan Subbab.4.1.3, telah dapat menghasilkan sekelompok tikus (10 ekor) yang mengalami defisiensi asam folat, suatu pra-kondisi yang harus dihasilkan agar penelitian ini dapat mencapai sasaran sesuai dengan tujuan penelitian.

Untuk mendapatkan kondisi defisiensi asam folat, ada beberapa kendala yang ditemui yaitu diare dan kematian beberapa ekor tikus. Kendala itu kemungkinan disebabkan perubahan komposisi rangsum dari rangsum yang biasa dikonsumsi sehari-hari menjadi rangsum diet murni (*purified diet*), sehingga terjadi iritasi dan hiperperistaltik usus yang menyebabkan seluruh tikus menderita diare selama kurang lebih dua minggu dan mengakibatkan lima ekor tikus mati. Karena kendala itu, terjadi penundaan pengambilan sampel darah, dan tikus yang mati terpaksa diganti dengan tikus lain dengan berat badan dan usia yang sama. Akhirnya diperoleh sekelompok tikus dengan defisiensi folat tingkat berat, sekelompok defisiensi folat tingkat ringan dan sekelompok tikus lainnya dengan kadar asam folat yang normal.

Seperti diketahui, pada manusia defisiensi asam folat diduga kuat merupakan faktor pemicu terjadinya meningokel. Sekitar 70 % *NTD* (termasuk meningokel) dapat dicegah dengan suplementasi asam folat pada ibu sebelum terjadinya kehamilan (Hall & Solehdin, 1998; Martinasevic *et al.*, 1999; Martinez-Lage *et al.*, 1996). Sudah ada bukti kuat bahwa suplementasi asam folat selama periode kritis pembentukan organ (trimester pertama kehamilan) dapat menurunkan

insidensi dan prevalensi beberapa penyakit kongenital, di antaranya *NTD*, *CHD* (*Congenital Heart Defect*), serta sumbing bibir dan langit-langit (Botto & Mastroiacovo, 1998; Copp, 1998; Corcoran, 1998; Fleming & Copp, 1998; Rasmussen *et al.*, 1998). Suplementasi asam folat juga dapat mencegah persalinan pre-term, retardasi pertumbuhan intrauterin serta infark dan pelepasan dini plasenta atau abortus (Gross *et al.*, 2001; Margawati, 1999; Martinasevic *et al.*, 1999).

Adanya mutasi gen *methionine-synthetase* (*MS*) dan *5,10 methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) yang berubah menjadi *MTHFR 677C→T*, merupakan faktor risiko timbulnya *NTD* pada janin dan penyakit kardiovaskuler orang dewasa. Asam folat beraksi meningkatkan aktivitas *MTHFR*, dengan demikian menurunkan kadar homosistein plasma (Fowler *et al.*, 1998; Hol, 1998).

Kenaikan kadar homosistein terdeteksi dalam darah dan cairan amnion para ibu yang mengandung bayi dengan *NTD*. Untuk mengendalikan hiperhomosisteinemi ada beberapa cara, antara lain menggunakan *methionine-synthetase* (*MS*), suatu enzim yang berkaitan dengan vitamin B12, berfungsi mengkatalisasi konversi *5-methyltetrahydrofolate* dan homosistein menjadi metionin dan tetrahidrofolat (Acuna *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 1996; Vohra *et al.*, 2002).

Enzim yang telah diteliti secara mendalam adalah *MTHFR* (*5,10 methylenetetrahydrofolate reductase*). Penurunan aktivitas *MTHFR* menyebabkan kenaikan kadar homosistein dan ini mengganggu pasokan donasi grup metil ke makromolekul lewat siklus folat-homosistein. Metaanalisis terakhir menyebutkan bahwa varian termolabil dan *MTHFR* secara bermakna mempunyai korelasi dengan berbagai kasus *NTD* dan anggota keluarganya (Vohra *et al.*, 2002; Wilcken, 1998).

Seperti telah diuraikan, penelitian ini hendak mencari korelasi antara defisiensi asam folat dengan kadar faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-1* dalam serum induk tikus maupun dalam tulang kepala janin tikus, sebagai upaya menjelaskan terbentuknya defek tulang kepala pada pasien meningokel. Dihasilkannya sekelompok tikus dengan defisiensi asam folat berat, sekelompok lagi dengan defisiensi folat ringan dan sekelompok lain dengan kadar asam folat yang cukup, merupakan langkah awal penelitian ini untuk menguji enam hipotesis yang telah disusun berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka teori.

6.2 Korelasi kadar asam folat dalam serum dan eritrosit induk tikus dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* serum induk tikus

Pemeriksaan kadar faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-1* dalam waktu 16 minggu setelah pemberian diet didapat hasil :

- *TGF- β 1* dalam serum tikus Kelompok-A (diet sangat rendah folat) lebih rendah secara sangat bermakna dibanding Kelompok-B (diet rendah folat) dan Kelompok-C (diet cukup folat). Dengan uji *Anova*, didapatkan nilai $p = 0.000$ (Tabel 5.1.4 dan 5.1.5).
- *IGF-1* dalam serum tikus Kelompok-A juga lebih rendah sangat bermakna dibanding Kelompok-B dan Kelompok-C (uji *Anova*, $p= 0.011$)(Tabel 5.1.6 dan 5.1.7).

Kadar kedua *growth factor* di dalam serum induk Kelompok-B dibanding Kelompok-C, meskipun ada perbedaan tetapi kurang bermakna.

Dari data di atas, meskipun tidak seluruhnya bermakna, terlihat ada korelasi yang cukup kuat kadar asam folat dalam eritrosit dengan kadar *TGF- β 1*

serum (analisis *SEM*, $r = 0.346$; $p = 0.077$) dan *IGF-1* serum ($r = 0.475$; $p = 0.020$). Juga didapat korelasi cukup kuat kadar folat dalam serum dengan kadar *TGF- β 1* serum (analisis *SEM*, $r = 0.351$; $p = 0.062$), sedangkan korelasi kadar asam folat serum dengan kadar *IGF-1* serum kurang kuat ($r = 0.155$; $p = 0.429$) (Tabel 5.1.8, 5.1.9 dan Gambar 5.1.1).

Korelasi kadar asam folat dengan faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-1* sepengetahuan peneliti belum pernah diungkap oleh para peneliti lain, sehingga sulit dilakukan komparasi dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya. Meskipun demikian, keterkaitan ketiga variabel itu dapat dijelaskan sebagai berikut.

Seperti yang sudah diuraikan, defisiensi asam folat dapat menimbulkan proses patologis melalui satu atau lebih dari tiga mekanisme metabolik akibat gangguan pada siklus metilasi, yaitu: perubahan genetik, hiperhomosisteinemia dan gangguan sintesis protein (Donosepoetro, 1998; Brouwer, 1999; O'Neil, 1997; Vohra *et al.*, 2002). Asam folat dengan bentuk aktifnya asam tetrahidrofolat memiliki tiga efek fisiologis, pertama sebagai kofaktor pada enzim yang mensintesis *DNA* dan *RNA*, kedua diperlukan untuk konversi homosistein menjadi metionine dan ketiga untuk proses metilasi dalam pembentukan protein (Acuna *et al.*, 2000; Brouwer *et al.*, 1998; Vohra *et al.*, 2002). Faktor pertumbuhan, termasuk *TGF- β 1* dan *IGF-1*, adalah suatu jenis protein dua rantai polipeptida yang keberadaan dan kadarnya dipengaruhi oleh satu atau lebih dari tiga efek fisiologis asam folat seperti yang telah dikemukakan tadi.

Secara empirik juga telah dibuktikan bahwa berbagai akibat dari defisiensi asam folat, khususnya hiperhomosisteinemia dapat mengganggu proses em-

riogenesis, bahkan mengakibatkan abortus karena kegagalan proses migrasi dan implantasi embrio, kelahiran preterm, solusio (pelepasan-dini) plasenta dan rendahnya berat badan bayi (Gardner *et al.*, 1999; Margawati, 1999; Scholl & Johnson, 2000). Sewaktu masa awal pertumbuhan fetus, sintesis asam nukleat dan protein berada pada kondisi puncak dan selama masa ini kebutuhan folat maternal meningkat tajam. Bila folat tidak mencukupi, asam nukleat terhambat dan sel-sel tidak mampu memfasilitasi *DNA* untuk mitosis. Terhambatnya siklus metilasi mengakibatkan ketidakmampuan *DNA* untuk mensintesis protein, lipid dan myelin (Fleming & Copp, 1998; Martinasevic *et al.*, 1999; Vohra *et al.*, 2002).

Faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-1* adalah juga berupa protein, maka keberadaan kedua *growth factor* tersebut juga dipengaruhi oleh aktivitas gen, kecukupan enzim dan lingkungan homeostasis yang kondusif, termasuk tercukupinya asam amino esensial dan non-esensial.

Keberadaan faktor pertumbuhan seperti *EGF* (*Epidermal Growth Factor*), *IGF*, *TGF* dan *PAF* (*Platelet Activating Factor*) diperlukan pada perkembangan embrio sebagai faktor pemacu bagi perkembangan zigot ke tahap pre-implantasi embrio. Faktor pertumbuhan autokrin berperan pada perkembangan embrio *in-vitro* dan parakrin berhubungan dengan kondisi lingkungan mikro dan uterus untuk perkembangan embrio ke tahap pre-implantasi. Pengimbuhan *IGF-1* pada media pembiakan embrio domba dapat meningkatkan prosentase blastosis, sedangkan pengimbuhan *TGF- β 1* atau kombinasinya pada biakan tunggal dapat meningkatkan perkembangan embrio ke tahap embrio pre-implantasi. *IGF* dan

TGF diketahui berpengaruh terhadap jumlah sel trophoectoderm pada embrio pre-implantasi (Garder *et al.*, 1999; Margawati, 1999).

IGF merupakan senyawa peptida yang berperan untuk implantasi embrio pada manusia (Murphy, 1994). *IGF-I* menunjukkan peranannya dalam pengaturan komposisi embrio, jaringan embrionik bagian luar, dan bersama trophoectoderm mengendalikan volume cairan ekstraseluler embrio (Gardner *et al.*, 1999). O'Neal (1997) memperlihatkan bahwa *PAF* (*Platelet Activating Factor*), *IGF-I* dan *IGF-II* menunjang perkembangan embrio dan membuktikan bahwa faktor-faktor tersebut bertindak sebagai 'faktor embriotropik autokrin'

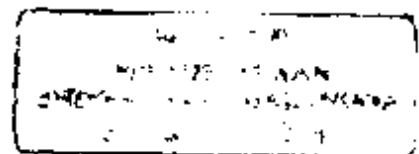
Dari beberapa uraian yang telah dikemukakan, terlihat ada hubungan antara asam folat dengan faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I* serta hubungan antara defisiensi asam folat dan *TGF-β1/IGF-I* dengan gangguan dalam proses migrasi, implantasi, embriogenesis dan organogenesis janin pasca-konsepsi. Ketiga faktor tersebut (asam folat, *TGF-β1* dan *IGF-I*) bila kadarnya tidak cukup akan berakibat buruk bagi pertumbuhan dan perkembangan janin. Hasil penelitian ini memperjelas adanya korelasi-positif kadar asam folat darah dengan kadar faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum, yaitu semakin rendah kadar asam folat, semakin rendah pula kadar *TGF-β1* dan *IGF-I*.

Yang masih memerlukan penjelasan lebih lanjut karena belum pernah diungkap, adalah bahwa faktor pertumbuhan yang berhubungan dengan metabolisme asam folat dan proses embriogenesis bukan hanya *TGF-β1* dan *IGF-I* saja. Masih banyak faktor pertumbuhan yang terlibat, misalnya: *TGF-α*, *EGF*, *PDGF* dan sebagainya serta sitoken seperti *TNF-α* dan berbagai macam

Interleukin. Dengan penelitian yang lebih lengkap dan komprehensif, mungkin dapat diungkap secara mendalam satu atau lebih faktor pertumbuhan dan sitoken yang hubungannya paling kuat dengan metabolisme asam folat, dan juga dengan proses embriogenesis.

Dari penelitian ini, adanya perbedaan kekuatan korelasi kadar asam folat eritrosit dibandingkan kadar folat serum dengan kedua *growth factor*, terutama lemahnya korelasi kadar folat serum dengan kadar *IGF-I* serum ($r = 0.155$; $p = 0.429$) (Gambar 5.1.1), dapat dijelaskan sebagai berikut.

Serum adalah tempat penyimpanan (*deposit*) yang kurang stabil bagi asam folat dibandingkan eritrosit. Kadar asam folat normal dalam serum juga jauh lebih rendah puluhan kali dibandingkan kadar asam folat dalam eritrosit. Kadar asam folat dalam serum berfluktuasi mengikuti aktivitas, waktu terakhir makan rangsum, kondisi kesehatan dan sebagainya. Mungkin saat pengambilan sampel darah, tikus yang bersangkutan sedang dalam kondisi tidak sehat, sehingga kadar asam folat menyimpang dari kadar asam folat serum tikus yang sehat. Karena berbagai alasan tersebut, Arrington (1981) berpendapat bahwa kadar asam folat dalam eritrosit-lah yang seharusnya dipakai sebagai acuan dalam penelitian-penelitian tentang defisiensi kronis asam folat pada hewan-coba tikus. Pada sejumlah penelitian dengan subyek manusia pun, para peneliti menggunakan sampel eritrosit sebagai representasi kadar asam folat di dalam darah (Bailey, 2000; Brown *et al.*, 1997; Mc Nulty *et al.*, 2000; Oakley *et al.*, 1996). Hasil penelitian ini paralel dengan pendapat dan metodologi yang digunakan beberapa peneliti tersebut.



6.3 Korelasi diet rendah folat dengan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* serum induk tikus

Diet rendah folat tidak selalu menghasilkan kadar asam folat dalam serum yang rendah. Supaya diet rendah folat dapat menghasilkan kadar folat dan kadar *TGF-β1* serta *IGF-I* serum tikus yang rendah, diperlukan banyak syarat, yaitu :

- rangsum dibuat secara benar dalam hal : macam dan komposisi bahan baku, kelengkapan, kebersihan dan keajegan (konsistensi),
- tikus berselera untuk memakan rangsum yang dibuat,
- tikus tidak mengalami diare akibat iritasi oleh rangsum,
- bahan kimia yang hendak diteliti tidak disintesis sendiri oleh tubuh tikus,
- pengambilan sampel darah tikus dilakukan secara benar agar sampel tidak rusak (liisis, beku) dan waktu yang ajeg agar hasilnya tidak bias,
- penyimpanan dan pemeriksaan sampel darah dilakukan secara benar sesuai dengan prosedur baku,
- instrumen yang digunakan untuk pemeriksaan sudah ditera.

Segala sesuatu yang berkaitan dengan macam bahan baku dan komposisinya, penelitian ini mengacu pada Arrington (1981) dan Van Wouwe (1991). Untuk mencegah kemungkinan sintesis asam folat oleh flora usus tikus, ke dalam rangsum ditambahkan derivat sulfonamid, dalam hal ini suksinil-sulfatiazole (SST), sesuai yang dianjurkan Johnson (1972). Sewaktu tikus sedang mengalami diare akibat perubahan rangsum, pengambilan sampel darah ditunggu sampai 16 minggu dari saat tikus berhenti diare, sesuai dengan rancangan penelitian. Tikus yang mati (5 ekor) diganti dengan tikus lain dengan berat dan usia yang sama.

Darah tikus diambil saat tikus dalam keadaan puasa 8-10 jam dan dalam fase tidak aktif (sekitar pukul 14.00 – 16.00). Kualitas reagen dan instrumen adalah baku dan telah ditera, melekat pada spesifikasi *kit* dan laboratorium tempat penelitian ini dilakukan. Hal-hal itu telah disampaikan dalam Bab 4.

Pada manusia, kecukupan asam folat diperoleh dari diet sehari-hari. Korelasi diet folat dengan kadar asam folat dalam darah, khususnya eritrosit, dipengaruhi oleh banyak hal, yaitu: kandungan asam folat dalam bahan pangan, kualitas absorpsi usus (Boddie *et al.*, 2000), ada tidaknya mual, muntah dan diare (Hoving, 1993), kebutuhan relatif yang meningkat (hamil, menyusui, penyakit kronis), cara menyimpan, memasak dan menyajikan bahan pangan (McNulty *et al.*, 2000), kebiasaan (*habit*) individu dalam meramu komposisi bahan pangan, kecukupan vitamin lain (vitamin B12) untuk mengikat dan mengaktifkan aksi asam folat (Donosepoetro, 1998), serta kecukupan reseptor folat (*folate receptor- α* , *FR- α*) dalam membran plasma sel agar folat dapat masuk sel dalam jaringan (Barber *et al.*, 1997). Dengan demikian, kandungan asam folat yang cukup dalam menu makan harian tidak selalu diikuti dengan kecukupan asam folat dalam darah.

Ada tiga cara menambah asupan asam folat pada manusia, yaitu dengan: 1) memperbanyak konsumsi bahan-pangan alami yang tinggi kandungan asam folat, 2) suplementasi tablet asam folat 3-5 mg /hari dan 3) fortifikasi asam folat dalam bahan baku pangan (misalnya tepung gandum) dengan takaran 400-600 μ g/hari. Dari ketiga cara tersebut, fortifikasi merupakan pilihan paling baik. Kandungan asam folat dalam bahan pangan alami tidak stabil, dipengaruhi oleh

proses penyimpanan, cara memasak dan menyajikan. Suplementasi dengan tablet zat sintetik asam folat bersifat lebih stabil dan efektif, tetapi dari segi strategi kurang menguntungkan karena *compliance* (ketaatan) masyarakat yang rendah.

Konings *et al.* (2001); McNulty *et al.* (2000) serta Quinlivan & Gregory (2003) menganjurkan fortifikasi asam folat dalam tepung gandum sebagai pilihan utama penambah asupan asam folat bagi penduduk dalam upaya pencegahan cacat bawaan *NTD* dan *CHD*. Program fortifikasi asam folat di Indonesia, bila disetujui, menurut peneliti seyogyanya menggunakan garam dapur, karena bahan pangan ini sehari-hari dikonsumsi oleh masyarakat luas.

Dalam Gambar 5.1.1 dan Lampiran 18 disajikan analisis dan perhitungan statistik korelasi diet rendah folat dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* serum lewat korelasinya dengan kadar asam folat dalam eritrosit dan serum, dan hasilnya sebagaimana sudah disampaikan dalam Subbab 5.1.5, yaitu : terdapat korelasi-positif yang sangat kuat diet rendah folat dengan kadar folat eritrosit dan serum, yang keduanya juga berkorelasi-positif dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* dalam serum. Artinya, diet asam folat yang kurang atau cukup, akan diikuti kadar kedua *growth factor* dalam serum yang kurang atau cukup pula.

6.4 Morfologi janin tikus yang dilahirkan.

Berat badan janin Kelompok-A secara sangat bermakna lebih ringan dibandingkan Kelompok-B dan Kelompok-C ($p= 0.000$) (Gambar 5.1.5 dan Tabel 5.1.10). Selain itu didapat pula tujuh ekor janin Kelompok-A yang ekornya tidak tumbuh, sedangkan pada kelompok lain, seluruh janin dalam keadaan

normal. Temuan ini menunjukkan secara makroskopis adanya gangguan dalam proses tumbuh-kembang pada janin-janin yang induknya diberikan rangsum rendah asam folat. Patut disayangkan dari seluruh janin tidak berhasil ditemukan adanya cacat kraniofasial, termasuk defek pada tulang kepala dan meningokel, kelainan yang merupakan pusat perhatian penelitian ini.

Seperti yang telah diungkap dalam Subbab 1.5. mengenai keterbatasan penelitian, untuk mendapatkan janin tikus dengan meningokel atau bentuk *NTD* lain, mungkin akan berhasil jika dilibatkan tikus dalam jumlah yang banyak serta dengan macam rangsum yang bervariasi dalam hal komposisi dan dosis. Dengan hewan-coba mencit sejumlah 60 ekor, dan 4 variasi diet rendah folat, Copp *et al.*(1996) hanya mendapatkan kelainan berupa ekor kenting (*curly tail*) pada enam ekor mencit. Sepengetahuan peneliti, sampai saat ini belum pernah dilaporkan adanya tikus galur Sprague Dawley yang menyandang meningokel, baik di frontal, oksipital maupun di lumbosakral.

Meningokel adalah kelainan yang mungkin bersifat *species* atau *strain specific*, artinya hanya bisa terjadi pada jenis makhluk tertentu, dalam hal ini adalah manusia. Belum diketahui bahwa tikus galur Sprague-Dawley ataupun spesies hewan lain dapat timbul meningokel atau *NTD* pada janinnya. Bila demikian halnya, dengan variasi komposisi pakan dan variasi takaran yang bagaimana pun juga, tidak akan ditemukan janin tikus Sprague-Dawley yang mengalami cacat meningokel atau *NTD* bentuk lain.

Selama proses penelitian, didapatkan pula fakta bahwa induk tikus Kelompok-A lebih sulit bunting dan beranak dibandingkan Kelompok-B dan Kelompok-

C Tidak ada seekor induk pun di Kelompok-A yang bunting dan beranak pada masa 21 hari pertama perkawinan, sementara pada masa yang sama terdapat 5 persalinan pada induk Kelompok-B dan 6 persalinan pada induk Kelompok-C (semua janin dilahirkan dengan histerotomi).

Ada beberapa kemungkinan yang mendasari temuan tersebut. Pertama, akibat defisiensi asam folat maka tikus-tikus Kelompok-A menjadi subfertil sehingga sulit bunting. Kedua, sebenarnya sudah terjadi kebuntingan, tetapi karena kurangnya faktor yang mendukung proses embriogenesis dan implantasi, maka terjadilah abortus atau embrio diresorpsi oleh tubuh induk. Ketiga, telah terjadi persalinan preterm, tetapi setelah lahir semua janin langsung dimakan oleh induknya. Faktor pendukung proses embriogenesis secara teoritis berkaitan dengan defisiensi asam folat, yaitu kurangnya kadar faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-I* yang juga berperan dalam embriogenesis dan organogenesis, seperti yang diungkap oleh Gardner *et al.* (1999), Gross *et al.* (2001), Margawati (1999); O'Neil (1997) dan Scholl & Johnson (2000).

Terdapat hubungan antara kematian dini embrio (abortus) dengan cacat bawaan. Dari angka kelahiran hidup, 2.5-3% janin menunjukkan adanya cacat bawaan, sedangkan pada kasus abortus, 90% menunjukkan kelainan kongenital pada embrio. Jelas sekali bahwa embrio yang abnormal (cacat bawaan) sebagian besar akan mengalami kematian dini (abortus). Pada kasus abortus spontan, yang terjadi selama kebuntingan trimester pertama, sekitar 60% menunjukkan adanya kelainan kromosom, yaitu trisomi, monosomi atau tripodi. Embrio yang sedang tumbuh dan berkembang sensitif terhadap bahan toksik selama periode

tertentu yang berkaitan dengan perkembangan sistem organ tertentu atau kelompok sel tertentu. Tahap kritis terjadinya kecacatan adalah selama periode organogenesis (proses pembentukan organ). Pada tikus, periode kritis tersebut adalah antara hari ke-6 sampai ke-15 masa kebuntingan yang 21 hari lamanya (Setokoesoemo, 1986).

Pada manusia, asupan cukup folat harus tetap dipertahankan tidak hanya sampai sepenuhnya penutupan *neural tube* (trimester pertama kehamilan) tetapi juga dalam fase kehamilan sesudahnya, dengan maksud untuk mengurangi risiko cacat bawaan lain. Masalah pokok dalam perkembangan embrio dan fetus adalah pemerataan pembelahan sel. Dalam masalah ini, asam folat mempunyai posisi sentral yang sangat penting karena peranannya dalam sintesis asam nukleat. Asupan asam folat yang rendah selama kehamilan akan mengganggu pertumbuhan dan replikasi sel dalam fetus atau plasenta. Selama kehamilan, rendahnya kadar asam folat dalam diet dan dalam sirkulasi darah berkaitan dengan tingginya risiko persalinan preterm, bayi yang ringan atau kecil dan retardasi pertumbuhan fetal. Salah satu efek metabolik dari defisiensi asam folat adalah hiperhomosisteinemia, yang dapat mengakibatkan abortus spontan dan komplikasi kehamilan lain, misalnya pelepasan dini (*abruption*) plasenta dan pre-eklamsia, yang akan meningkatkan risiko buruknya *outcome* kehamilan.

Karena keingintahuan peneliti untuk mengamati perilaku induk tikus terhadap janin-janinnya, setiap kelompok tikus disisakan 3 ekor induk yang tidak dilakukan hysterotomi sehingga saat janin lahir induk masih hidup. Dalam pengamatan, ternyata semua janin tikus Kelompok-A dimakan habis oleh induknya

dalam sehari pasca-lahir meskipun kelihatannya tidak mengalami cacat, sedangkan kebanyakan janin tikus Kelompok-B dan C tetap hidup. Hume (1972) dan Arrington(1981) mengungkapkan fenomena bahwa induk tikus akan memakan anaknya yang lahir cacat. Dalam kaitan ini, berarti ada masalah dengan janin-janin tikus di Kelompok-A, meskipun tidak kelihatan cacat. Secara makroskopis, yang terlihat ada kelainan pada janin-janin tersebut adalah ukurannya yang lebih kecil dan berat badannya yang lebih ringan dibanding rerata berat janin dua kelompok lain; serta beberapa janin yang ekornya tidak tumbuh (7 ekor), sementara di dua kelompok lain semua janin lahir normal.

Berat badan waktu lahir mudah dipengaruhi oleh faktor-faktor ekstrinsik, termasuk defisiensi nutrisi. Kelainan kongenital tertentu mempunyai hubungan dengan berat lahir yang rendah, sedangkan beberapa kelainan kongenital lainnya berhubungan dengan berat lahir yang tinggi (Setokoesoemo,1986; Margawati, 1999).

6.5 Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-1* serum induk tikus dengan kadarnya dalam tulang kepala janin tikus

Terdapat korelasi-positif yang sangat kuat antara konsentrasi *TGF-β1* dan *IGF-1* dalam serum janin dengan kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut di dalam tulang kepala janin, baik tulang segmen posterior (*TGF-β1*: $r = 0.361$, $p = 0.017$; *IGF-1*: $r = 0.517$, $p = 0.000$), maupun segmen anterior (*TGF-β1*: $r = 0.977$, $p = 0.000$; *IGF-1*: $r = 0.969$, $p = 0.000$) Analisis hasil penelitian tentang korelasi tersebut telah disampaikan dalam Tabel 5.1.11, 5.1.12 dan Gambar 5.1.1.

TGF- β 1 dan *IGF-1* adalah *growth factor* yang sangat berperanan dalam sintesis kolagen tipe-1 & 2, serta jaringan tulang sebagai matriks ekstraseluler. Rendahnya konsentrasi *TGF- β 1* dan *atau IGF-1* dalam serum maupun tulang dapat menimbulkan berbagai masalah embriologis seperti : hambatan migrasi tropoblas (Lacey *et al.*,2002), gangguan implantasi embrio dan organogenesis (Gardner *et al.*,1999; Margawati,1999; Murphy,1994; O'Neil,1997). Defek tulang kepala merupakan bagian dari kelainan organogenesis.

TGF- β 1 adalah faktor pertumbuhan multipoten yang aktivitasnya tergantung pada dosis dan macam sel target. Molekul ini dihasilkan oleh sejumlah sel dan jaringan seperti makrofag, trombosit, jaringan tulang, plasenta dan ginjal. Faktor pertumbuhan ini memacu perkembangan embrionik, pembentukan tulang, perkembangan mamma, penyembuhan luka, hematopoiesis dan produksi matriks ekstraseluler (Sirica,1977). *TGF- β* memiliki 5 isoforms (tidak ada hubungannya dengan *TGF- α*), masing-masing disandi oleh gen yang berbeda, baik macam maupun letaknya pada kromosom. Gen *TGF- β 1* pada manusia terletak di kromosom 19q13, *TGF- β 2* di kromosom 1q41, *TGF- β 3* di kromosom 14q24, sedangkan *TGF- β 4* dan *TGF- β 5* belum jelas letak kromosomnya (Nowak *et al.* , 1999).

Meskipun dari penelitian eksperimental ini telah dapat dibuktikan adanya korelasi-positif antara kadar asam folat dalam eritrosit dan serum induk dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-1* dalam serum induk dan tulang kepala janin, tetapi belum dapat diungkap secara nyata kaitannya dengan defek tulang kepala janin, olehkarena dari penelitian ini tidak berhasil ditemukan adanya janin tikus yang menderita meningokel

Seperti telah diuraikan, meningokel mungkin adalah kelainan yang bersifat *species* atau *strain spesific*, artinya cacat ini dapat terjadi pada manusia, tetapi tidak dapat timbul pada mahluk mamalia jenis lain. Bila demikian halnya, maka dengan komposisi yang bagaimana pun dan ukuran atau dosis asam folat yang seberapa pun, kecil sekali kemungkinan timbul meningokel pada makhluk selain manusia. Sepengetahuan peneliti, sejauh ini cacat bawaan yang berhasil didapat pada makhluk selain manusia secara *in vivo* yang berkaitan dengan defisiensi asam folat adalah mencit yang mempunyai ekor keriting (*curly tail*).

Oleh karena alasan tersebut, maka dengan penelitian pada pasien meningokel diharapkan dapat diungkap hubungan defisiensi asam folat serta kadar faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan terjadinya defek pada meningokel, meskipun secara tidak langsung.

6.6 Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam tulang kepala janin tikus.

Terdapat perbedaan yang sangat bermakna jumlah sel apoptosis dan nekrosis antara tulang kepala janin tikus Kelompok A, B dan C (uji *Anova*: apoptosis, $p = 0.006$; nekrosis, $p = 0.000$)(Tabel 5.1.13). Dengan demikian, pada keadaan defisiensi asam folat lebih banyak jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis dibandingkan dengan kondisi kadar asam folat yang normal.

Dari penelitian ini juga diperoleh data bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis lebih banyak secara bermakna daripada sel yang mengalami nekrosis (uji *Anova*, $p = 0.020$). Rincian perhitungan telah disajikan dalam Tabel 5.1.13 dan Lampiran 15. Juga diperoleh informasi terdapat korelasi-negatif yang kuat

kadar *TGF- β 1* dalam tulang kepala janin dengan jumlah sel apoptosis (analisis *SEM*, $r = -1.340$, $p = 0.001$), sedangkan korelasinya dengan sel nekrosis tidak kuat ($r = -0.219$; $p = 0.180$). Korelasi kadar *IGF-I* dalam tulang dengan jumlah sel apoptosis tidak kuat ($r = -0.064$, $p = 0.701$), sedangkan korelasinya dengan sel nekrosis sangat kuat ($r = -0.469$, $p = 0.004$). Perhitungan dengan analisis *SEM* disajikan dalam Gambar 5.1.1 dan Lampiran 18.

Hasil analisis *SEM* itu merupakan temuan yang unik dan menarik, karena korelasi kedua *growth factor* dengan jumlah apoptosis dan nekrosis saling bersilangan, yaitu: *TGF- β 1* berkorelasi sangat kuat dengan jumlah sel apoptosis tetapi lemah korelasinya dengan jumlah sel nekrosis, sedangkan *IGF-I* mempunyai korelasi kuat dengan jumlah sel nekrosis tetapi lemah korelasinya dengan jumlah sel apoptosis. Peneliti belum dapat memberikan justifikasi terhadap hasil analisis *SEM* ini. Hanya diperoleh satu penelitian dilaporkan oleh Khera & Chang (2003) yang menghubungkan *TGF- β 1* dengan apoptosis, lewat substansi disebut *TIAF-1* (*TGF- β 1-induced antiapoptotic factor 1*) yang melindungi fibroblas L929 terhadap sitotoksitas *TNF* (*tumor necrosing factor*). Untuk memperjelas itu diperlukan penelitian lanjutan yang lebih mendalam. Sejauh ini belum diperoleh informasi tentang hubungan langsung kadar *IGF-I* dengan jumlah sel nekrosis primer.

Untuk mengemukakan pembahasan, selanjutnya peneliti menggunakan hasil analisis dengan uji *Anova* yang menunjukkan bahwa secara sangat bermakna, semakin rendah kadar *growth factor* *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin, semakin banyak sel yang mengalami kematian apoptosis dan juga nekrosis (apoptosis, $p = 0.006$, nekrosis $p = 0.000$). Dari uji *Anova* ini dapat

diartikan bahwa terdapat korelasi-negatif yang sangat kuat antara kadar kedua *growth factor* dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan atau nekrosis. Data disajikan dalam Tabel 5.1.14 dan perhitungan uji *Anova* di Lampiran 15.

Seperti telah diuraikan, apoptosis (*programmed or normal cell death* atau *cellular suicide*) adalah kematian sel yang bersifat fisiologis untuk menjaga homeostasis, dengan tujuan eliminasi sejumlah sel yang tidak bermanfaat selama perkembangan atau proses biologis yang normal. Fenomena fisiologis ini terutama terjadi selama proses embriogenesis, pada induksi dan pemeliharaan toleransi imun, selama perkembangan sistem saraf serta pada atrofi jaringan *endocrine-dependent* (Abbas *et al.*, 1997; Milligan & Schwartz, 1996; Simpson & Russel, 1998).

Apoptosis dapat dipicu timbul lebih dini dan lebih masif oleh kondisi yang disebut 'kematian sel terprogram dipercepat' (*accelerated program cell death*). Pada keadaan ini terjadi perubahan ekspresi gen terhadap beberapa *growth factor* dan terbentuknya radikal bebas yang menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel, sehingga memunculkan perangsungan kaskade apoptosis yang kemudian melepaskan hambatan *CAD (Caspase Activated DNA-ase) inhibitor*. *Caspase (cysteine aspartyl-protease)* berfungsi memproses berbagai macam substrat dan inhibitoris dalam metabolisme. Selanjutnya *CAD* merusak *DNA*, dan terjadilah apoptosis (Abbas *et al.*, 1997; Hidayat, 2003; Simpson & Russel, 1997).

Nekrosis adalah proses patologis yang terjadi bila sejumlah sel terpapar oleh cedera kimia maupun fisik yang menyebabkan kerusakan membran plasma.

Proses nekrosis diawali oleh penurunan kemampuan sel untuk menjaga homeostasis, diikuti *influx* air dan bermacam ion ekstrasel. Organel intraseluler, khususnya mitokhondria dan seluruh isi sel membengkak dan ruptur (lisis sel). Oleh karena kerusakan membran plasma, isi sitoplasma termasuk bermacam enzim lisosomal dimuntahkan ke dalam cairan ekstraseluler. Dengan demikian, *in vivo*, kematian sel nekrotik sering disertai dengan kerusakan jaringan yang hebat sebagai akibat dari respon inflamatorik yang intens. Nekrosis primer disebabkan oleh cedera fisik/mekanik atau kimia, hipoksia dan hipotermia, sedangkan nekrosis sekunder merupakan kelanjutan dari apoptosis (Abbas *et al.*, 1997; Hidayat, 2003; Stoian *et al.*, 1996; White *et al.*, 2000).

Defisiensi asam folat dapat menyebabkan perubahan metabolik mengarah paling tidak pada tiga masalah, yaitu : hiperhomosisteinemia, mutasi genetik dan gangguan sintesis protein, yang ketiganya didasari oleh gangguan dalam siklus metilasi. Hiperhomosisteinemia menyebabkan peningkatan radikal bebas oksigen (RBO), kemudian kenaikan peroksidasi lipid, diikuti kerusakan membran sel, dan berakhir dengan kematian sel. Sintesis protein dan kerusakan DNA saling berkaitan dan saling mempengaruhi, keduanya dapat menimbulkan gangguan dalam sintesis *growth factor* dan akhirnya memicu 'kematian sel terprogram dipercepat', yaitu apoptosis yang terjadi lebih awal dan dengan jumlah yang lebih banyak.

Selain itu RBO akan bereaksi dengan NO• menimbulkan radikal bebas peroksinitrit yang berpotensi meningkatkan ekspresi JNK (*c-jun terminal protein kinase*), disebut juga SAPK (*stress activated protein kinase*), dan menurunkan

ekspresi *MAPK* (*mitogen activated protein kinase*), yang juga mengakibatkan sel mengarah ke apoptosis (Hidayat, 2003; Simpson & Russell, 1998). Khera & Chang (2003) telah mengisolasi *TIAF1* (*TGF- β 1-induced antiapoptotic factor 1*) yang melindungi fibroblas L929 dari sitotoksitas *TNF*. *TIAF* juga menginduksi hambatan pertumbuhan dan apoptosis monosit U937 dan beberapa jenis sel lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa *TIAF1* berperan dalam pengaturan pertumbuhan yang dimediasi oleh *TGF- β* .

Sepengetahuan peneliti, korelasi antara defisiensi asam folat dengan fenomena apoptosis dan nekrosis belum pernah diteliti. Meskipun demikian, berbagai uraian yang telah dikemukakan di atas adalah paralel dengan hasil penelitian ini, yaitu : 1) semakin rendah kadar asam folat serta kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum dan tulang, semakin banyak kematian sel apoptosis dan nekrosis, 2) jumlah sel apoptosis lebih banyak daripada sel nekrosis.

Defisiensi asam folat menyebabkan gangguan siklus metilasi dengan akibat hiperhomosisteinemia, degradasi enzim, gangguan sintesis protein, kerusakan *DNA* dan penurunan kadar *growth factor*. Berbagai kondisi tersebut merupakan faktor pemicu '*accelerated program cell death*' yang menyebabkan jumlah sel apoptosis menjadi jauh lebih banyak dibanding normal. Nekrosis pada defisiensi asam folat berupa nekrosis sekunder, berasal dari sel apoptosis. Maka wajar bila jumlah sel apoptosis secara bermakna lebih banyak dibanding sel nekrosis, karena tidak semua sel apoptosis akan menjadi sel nekrosis sekunder. Sebagian besar sel apoptosis segera difagosit oleh makrofag.

6.7 Korelasi tidak langsung kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek pasien meningokel

Dari penelitian ini diperoleh informasi terdapat korelasi-positif kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk dengan kadar kedua *growth factor* tersebut di dalam tulang kepala janin (pada Subbab. 5.1.8, Tabel 5.1.12 dan Gambar 5.1.1). Juga diperoleh informasi adanya korelasi-negatif kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan lebar defek. Artinya, semakin rendah kadar kedua *growth factor*, semakin lebar defek tulang kepala yang terjadi (data dan perhitungan statistik disajikan dalam Tabel 5.2.1, Gambar 5.1.2 dan Lampiran 18). Dengan demikian, secara tidak langsung terdapat pula korelasi-negatif antara kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus dengan lebar defek yang terjadi pada pasien meningokel. Artinya, semakin rendah kadar salah satu atau kedua *growth factor* tersebut, maka semakin lebar defek kepala yang mungkin akan terjadi.

Informasi ini bermanfaat bagi kepentingan klinis pada manusia. Bila pada pemeriksaan kadar kedua *growth factor* tersebut dalam serum ibu pra-hamil atau hamil muda didapat hasil yang rendah atau sangat rendah, maka dapat diprediksi bahwa ada kemungkinan besar janin yang dikandungnya akan mengalami cacat bawaan dari yang hanya berupa defek tulang kepala dengan meningokel, atau *NTD* yang berat, seperti anensefalus dan eksensefalus. Dalam hal demikian maka sejak dini ibu dianjurkan untuk mengonsumsi asam folat dosis 4 mg per-hari secara rutin agar kecacatan pada bayinya dapat dicegah.

Para ibu yang kadar asam folat atau kedua *growth factor* rendah maka pada saat dia hamil dianjurkan untuk pemeriksaa USG (ultrasonografi) secara serial. Begitu didapatkan adanya tanda defek tulang kepala, segera diberikan kombinasi *growth factor TGF- β 1* dan *IGF-I*, secara sistemik atau intraamniotik untuk memacu penutupan defek, sehingga saat bayi lahir kondisinya sudah normal.

6.8 Korelasi kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan lebar defek pada tulang kepala pasien meningokel

Bentuk defek tulang pada pasien meningokel bermacam-macam, umumnya tidak beraturan dan tidak berpola matematis seperti : bundar, elips, segitiga atau segiempat, sehingga sulit untuk mengukur luas/lebar defek secara tepat. Ukuran lebar defek yang tersaji dalam tabel 5.2.1 adalah ukuran yang dihitung dengan program komputer '*adobe photoshop*', diharapkan mendekati tepat. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna antara kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya dalam tulang yang jauh dari defek ($p = 0.000$ untuk *TGF- β 1*, dan $p = 0.065$ untuk *IGF-I*). Kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut juga mempunyai korelasi-negatif yang kuat dengan lebar defek; yaitu semakin rendah kadar, semakin lebar defek (analisis *SEM* untuk *TGF- β 1*: $r = -0.648$, $p = 0.009$; untuk *IGF-I*: $r = -0.426$, $p = 0.025$). Analisis hasil penelitian telah disajikan dalam Tabel 5.2.1 dan Gambar 5.1.3.

Sejauh ini peneliti belum menemukan penelitian yang menghubungkan dua variabel di atas. Boonvisut *et al.* (1997) hanya menemukan bahwa lebar defek pada meningokel tidak berhubungan dengan besarnya ukuran benjolan

meningokel. Tingginya tekanan intrakranial-lah yang mempengaruhi besarnya benjolan. Dengan bertambahnya usia pasien, umumnya lebar defek menjadi lebih sempit. Hal ini bisa disebabkan menyempitnya komponen tulang ataupun oleh jaringan fibrosa padat yang menutup defek tersebut, yang kemudian mengalami osifikasi. Pembentukan tulang dimulai dari tepi defek secara intramembranous dan endokondral karena aktivitas osteosit, khondrosit, osteoblas dan khondroblas (Agthong & Wuranithit, 2002; Boonvisut *et al.*, 1997).

TGF- β 1 dan *IGF-I* adalah dua faktor pertumbuhan yang terdapat dalam matriks tulang, termasuk tulang di tepi defek. Isoform *TGF- β 1* merupakan bagian dari superfamili "peptida pengatur pertumbuhan" yang di dalamnya terdapat *bone morphogenetic protein (BMP)*. Pada awalnya *IGF* ditemukan dan dapat dimurnikan dari tulang (Roth *et al.*, 1997; Steed, 1996). *TGF- β 1* dan *IGF-I* telah dibuktikan beraksi menstimulasi pertumbuhan tulang baru, baik secara endokondral maupun intramembran (Joyce *et al.*, 1990; Noda & Camilliere, 1989). Ditemukan pula adanya imunoreaktivitas *TGF- β 1* dalam kalus fraktur tulang (Joyce *et al.*, 1990) Aplikasi lokal *TGF- β 1* dan *IGF-I* menyebabkan percepatan penutupan defek kranium *in-vivo* (Beck, *et al.*, 1991). Pemberian rekombinan *TGF- β 1* dan *IGF-I* menyebabkan penutupan sutura tulang kepala tikus Dawley-Sprague (Thaller *et al.*, 1993).

Rendahnya kadar kedua faktor pertumbuhan di tepi defek tulang menyebabkan stimulasi sel-sel tulang (khondroblas, osteoblas, khondrosit dan osteosit) untuk mensintesis matriks ekstrasel (kolagen, kartilago-hialin, tulang) terhambat. sebaliknya hambatan aktivitas sel osteoklas untuk meresorpsi tulang menjadi

berkurang. Kondisi tersebut diperparah dengan bertambahnya jumlah sel yang mengalami kematian apoptosis dan nekrosis. Akibatnya adalah proses osifikasi dan fusi tulang di daerah tersebut menjadi tidak sempurna sehingga terjadi defek tulang. Dengan demikian, semakin rendah kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang menyebabkan defek tulang semakin lebar.

Dari uraian teoritik dan empirik di atas dan diperkuat dengan hasil penelitian ini, kiranya dapat dipahami bahwa adanya korelasi-negatif antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan lebar defek pada penderita meningokel adalah sesuatu yang wajar, sesuai dengan hipotesis penelitian. Temuan ini juga membuktikan adanya korelasi tidak langsung defisiensi asam folat dengan terjadinya defek tulang pada meningokel melalui korelasi dan pengaruhnya terhadap kadar faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I*.

Defisiensi asam folat berkorelasi-positif dengan penurunan kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut, baik dalam darah maupun dalam tulang kepala. Defek tulang kepala terjadi karena rendahnya kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala dan banyaknya sel pembentuk tulang yang mengalami kematian apoptosis dan nekrosis, sehingga sintesis matriks ekstrasel (kolagen tipe-1 dan 2, kartilago-hialin) mengalami hambatan untuk dapat menyusun jaringan tulang secara normal. Dengan demikian hasil penelitian ini dapat lebih memperjelas mekanisme terbentuknya defek tulang kepala pada pasien meningokel, dikaitkan dengan defisiensi asam folat, serta kadar *growth factor TGF-β1* dan *IGF-I*.

Yang masih memerlukan penjelasan adalah fenomena bahwa defek tulang pasien meningokel di kawasan Asia tenggara lebih banyak terletak di regio basis

kranii bagian frontal (nasofrontal, nasoetmoidal dan nasoorbital), sedangkan di kawasan lain terletak lebih banyak di regio oksipital. Peneliti mencoba menjelaskan patogenesis fenomena itu sebagai berikut. Seperti diketahui, regio basis kranii bagian frontal merupakan tempat fusi dari banyak macam tulang, yaitu : os frontalis, os nasalis, os etmoidalis, dan dinding orbita. Regio tersebut juga merupakan tempat fusi beberapa tulang yang berasal dari osifikasi secara endokondral (basis kranii) dan yang berasal dari osifikasi secara intramembranous (kalvaria). Tempat yang paling rawan untuk terjadinya defek adalah di daerah tempat fusi dari beberapa tulang yang berbeda struktur maupun asalnya, dalam hal ini adalah regio basis kranii bagian frontal. Menurut hemat peneliti, faktor gen memegang peranan sangat penting. Seperti yang sudah diuraikan, dalam pembentukan mesoderm kranial berperan berbagai macam gen, yaitu *Wnt-p3*, *T-box*, *Tlx-2* dan *SRF* (Larsen, 2001). Kemungkinan ada perbedaan satu atau lebih dari gen-gen tersebut antara ras Mongoloid (Asia Tenggara) dengan ras Negroid (Afrika) dan Kaukasoid (Eropa, Amerika, Australia). Perbedaan gen tersebut mungkin juga yang menyebabkan perbedaan bentuk kepala antara ras Mongoloid yang relatif bulat (brakhisefal) dengan ras Negroid maupun ras Kaukasoid yang lonjong (dolikhosefal), seperti yang diungkap oleh Loekito (1992). Di samping itu berperan pula faktor nutrisi, kebiasaan selama kehamilan muda yang bersifat tradisional lokal, iklim, bulan terjadinya konsepsi dan lain sebagainya. Semua hal itu sesuai dengan etiologi meningokel yang bersifat multifaktorial dan poligenik.

6.9 Gambaran histologis dan histopatologis

Pada Tabel 5.1.13, serta Gambar 5.2.1, 5.2.2 dan 5.2.3 diperlihatkan kadar ekspresi *growth factor TGF- β 1* atau *IGF-I* dalam matriks ekstrasel tulang kepala janin tikus dari tiga kelompok perlakuan (A, B dan C), sedangkan Gambar 5.2.4, 5.2.5, dan 5.2.6 memperlihatkan ekspresi kedua *growth factor* intrasel, serta Gambar 5.2.7 memperlihatkan ekspresi *TGF- β 1* dan *IGF-I* baik di intrasel maupun di matriks ekstrasel.

Dengan pengecatan imunohistokimia metode peroksidasi dan *counter-staining* Mayer-Harris hematoxylen pembesaran 200X, terlihat ekspresi kedua *growth factor* berwarna merah-kecoklatan. Dalam tiga sediaan tulang kepala janin tikus tersebut, terlihat nyata ada perbedaan gradasi intensitas dan luas ekspresi kedua faktor pertumbuhan antara kelompok A, B dan C, yang merupakan data kualitatif. Semua sediaan kemudian dimasukkan bilik-hitung dan dihitung jumlah kotak ekspresi kedua *growth factor* per-lapang pandang untuk memperoleh data semikuantitatif, sebagaimana telah disampaikan dalam Subbab 4.1.7.

Dengan metode serupa tetapi menggunakan pewarnaan lain, yaitu dengan *human monoclonal antibody anti TGF- β 1/IGF-I* dan *counterstaining* Mayer-Harris hematoxylen diperoleh data semikuantitatif kedua faktor pertumbuhan tersebut dalam tulang pasien meningokel, yang telah disajikan dalam gambar 5.2.8, 5.2.9 dan 5.2.10.

Untuk menghitung ekspresi *TGF- β 1,2,3* dan *IGF-I* dalam tulang pasien kraniosinsostosis, Roth, *et al.*(1997) menggunakan spektrofotometer dan mengukur intensitas warna yang muncul dan memperoleh data semikuantitatif : 0, +1,

+2, +3 dan +4. Peneliti tidak dapat mengikuti metode yang digunakan Roth *et al.* tersebut, karena beberapa masalah, yaitu . 1) kurang berfungsinya alat spektrofotometer, dan 2) secara teknis, pada kebanyakan *slide* yang diperiksa didapat tumpang-tindih intensitas kualitatif warna merah-kecokelatan yang muncul. yaitu dalam satu *slide* dapat muncul beberapa tingkatan intensitas warna, sehingga sulit menentukan nilai kualitatif sediaan tersebut. Maka diputuskan untuk menghitung tebaran warna merah-kecokelatan dengan berbagai intensitas menggunakan bilik hitung yang tersedia di bagian okuler mikroskop Zeiss@ produksi tahun 2002.

Dari Gambar 5.2.7, 5.2.8 dan 5.2.9 terlihat beberapa sel yang mengalami apoptosis atau nekrosis dalam sediaan tulang kepala janin. Tampak gambaran sel apoptosis yang berwarna merah kecokelatan, adanya kondensasi kromatin, peningkatan densitas nukleus dan pengkerutan sel. Di sampingnya terlihat sel normal dan sel nekrosis berupa penggembungan sitoplasma dan lisis membran.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari uraian analisis data hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan, dapat dibuat kesimpulan yang berkaitan dengan hipotesis penelitian sebagai berikut.

- 7.1.1 Defisiensi asam folat berkorelasi-positif dengan kadar faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-I*. Semakin berat derajat defisiensi asam folat di dalam darah induk tikus, semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan tadi di dalam serum induk tikus.
- 7.1.2 Diet rendah asam folat berkorelasi-positif dengan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk lewat rendahnya kadar asam folat dalam darah induk, khususnya dalam eritrosit. Semakin rendah kandungan asam folat dalam diet, semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan itu di dalam serum induk tikus.
- 7.1.3 Kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus berkorelasi-positif dengan kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut dalam tulang kepala janin tikus. Semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut di dalam serum induk tikus, kadarnya dalam tulang kepala janin tikus juga semakin rendah.
- 7.1.4 Kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala janin tikus berkorelasi-negatif dengan jumlah sel tulang kepala janin tikus yang mengalami

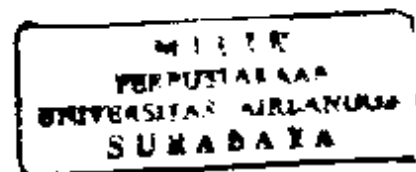
apoptosis dan nekrosis. Semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan tadi, semakin banyak sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis.

7.1.5 Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk tikus secara tidak langsung berkorelasi-negatif dengan lebar defek tulang kepala. Semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan tadi dalam serum induk tikus, semakin lebar defek tulang kepala pasien meningokel.

7.1.6 Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala meningokel di tepi defek berkorelasi-negatif dengan lebar defek tulang kepala. Semakin rendah kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut, semakin lebar defek tulang kepala pada pasien meningokel.

Di samping itu, dapat pula disampaikan kesimpulan tambahan: defisiensi asam folat menyebabkan berat badan janin tikus lebih ringan dibanding yang normal. Semakin berat derajat defisiensi asam folat semakin kecil dan semakin ringan janin yang dilahirkan. Defisiensi asam folat mungkin dapat menyebabkan induk tikus menjadi sulit bunting (infertil), mungkin juga tikus sudah bunting tetapi mengalami abortus karena gangguan dalam tahap embrio preimplantasi, atau mengalami kelahiran preterm. Dalam hal ini, dapat dikatakan bahwa defisiensi asam folat menyebabkan gangguan dalam embriogenesis janin tikus.

Dari beberapa kesimpulan di atas, pada hewan-coba tikus terlihat ada korelasi-positif antara defisiensi asam folat induk dengan faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum induk dan tulang kepala janin. Terlihat pula korelasi-negatif antara kadar kedua faktor pertumbuhan itu dalam tulang kepala janin dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Pada manusia,



terdapat korelasi-negatif kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut dalam tulang di tepi defek dengan lebar defek pada tulang kepala meningokel.

Dengan demikian seluruh hipotesis penelitian ini secara umum dapat dibuktikan dan diterima, meskipun ada beberapa korelasi antar-variabel yang secara statistik kurang kuat. Maka penelitian ini dapat menambah kejelasan tentang terjadinya defek tulang kepala pada meningokel, dikaitkan dengan korelasi defisiensi asam folat dengan kadar faktor pertumbuhan *TGF- β 1* dan *IGF-I* sebagai substansi mediator pembentukan tulang. Secara ekstrapolatif dapat dikatakan bahwa defisiensi asam folat dapat menyebabkan defek tulang kepala pada pasien meningokel melalui pengaruhnya terhadap penurunan kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam serum ibu dan tulang kepala bayi, serta penambahan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis.

7.2 Saran

- 7.2.1 Mengingat etiologi meningokel melibatkan banyak faktor dan saling keterkaitan di antara faktor tersebut, sedangkan penelitian ini hanya mengungkap sedikit aspek saja dari faktor etiologi, maka perlu dilakukan berbagai penelitian lanjutan secara menyeluruh yang melibatkan faktor genetik dan faktor lingkungan untuk semakin memperjelas teratogenesis meningokel.
- 7.2.2 Olehkarena meningokel adalah kelainan yang mungkin bersifat *species* atau *strain-specific*, yaitu kelainan ini dapat terjadi pada manusia tetapi mungkin tidak dapat terjadi pada tikus. Maka disarankan untuk dilakukan penelitian menggunakan hewan coba jenis lain (misalnya mencit, kelinci atau domba). Di samping itu, disarankan menggunakan *screening method*,

yaitu tidak hanya tulang kepala melainkan juga organ lain seperti tulang vertebra, ekor dan ekstremitas atau hepar yang dijadikan sampel pemeriksaan.

7.2.3 Terdapat paling tidak tiga hal yang merugikan akibat defisiensi asam folat, yaitu : 1) defek atau mutasi gen; 2) ketidakcukupan enzim; dan 3) hiperhomosisteinemia. Ketiganya mengarah kepada gangguan dalam proses pembentukan protein, mielin dan lipid yang berakibat tidak sempurnanya proses embriogenesis dan organogenesis, termasuk meningokel. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut untuk mengungkap bermacam gen lain yang mengalami defek atau mutasi, berbagai macam enzim yang mengalami degradasi akibat defisiensi asam folat serta peranan hiperhomosisteinemia dalam teratogenesis cacat bawaan selain *NTD* dan *CHD*.

7.2.4 Dengan kecanggihan teknologi diagnostik dewasa ini dan di saat mendatang, terbuka peluang untuk mendiagnosis adanya defek tulang kepala janin atau cacat bawaan lain secara dini, semasa janin masih di dalam kandungan usia muda. Dalam keadaan itu, disarankan pemberian ekstrak substansi *TGF- β 1* dan *IGF-I* secara sistemis ataupun intrauterin untuk mempercepat penutupan defek tulang atau memperbaiki cacat bawaan lain, sehingga bayi dapat dilahirkan sudah dalam keadaan normal.

7.2.5 Asam folat ternyata tidak saja penting untuk mencegah terjadinya cacat bawaan seperti *neural tube defect* dan *congenital heart disease*, tetapi juga bermanfaat bagi pencegahan beberapa penyakit pada orang dewasa yang mempunyai prevalensi tinggi seperti: penyakit jantung koroner,

stroke, demensia, Alzheimer dan beberapa macam gangguan jiwa. Untuk itu perlu diusulkan ke lembaga yang berwenang (Departemen Kesehatan R.I.) penambahan atau fortifikasi asam folat ke dalam komponen makanan yang dikonsumsi penduduk setiap hari (misalnya: garam dapur), dengan memperhitungkan jumlah minimal konsumsi garam dapur dan takaran minimal asam folat yang 4-5 mg perorang perhari. Usaha itu adalah program folatisasi garam dapur yang menghasilkan garam dapur berfolat, seperti halnya program iodisasi garam menghasilkan garam beryodium yang telah lebih dahulu sukses dimasyarakatkan.



- Boonvisut, S., Ladpli, S., Sujatanond, M., Tandha vadana, C., Tisavipat N., et al. 1998. Morphology Study of 120 Skull Base Defects in Frontoethmoidal Encephalomeningoceles. *J. Plast. Reconst. Surg.* 101: 1784-1795.
- Bosch, C; Melsen, B; Gibbon, and R; Vargevik, K. 1996. Human recombinant transforming growth factor beta-1 in healing of calvarial bone defects. *J. Craniofac. Surg.* 7(4) : 300-10.
- Botto, L.D. and Mastroiacovo, P., 1998. Exploring gen-gen interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin. Genet.* 53(6) : 456-459.
- Bound, J.P., Harvey, P.W., Francis, B.J., Awwad, F., Gatrell, A.C. 1996. Involvement of deprivation and environmental lead in neural tube defects : a matched case-control study. *Arch. Dis. Child.* 76 : 107-112.
- Brouwer, D.A.J., Welten, H.T.M., Reijngoud D.J., Van Doormal, J.J., Muskiet, F.A.J. 1998. Plasma folic acid cutoff value, derived from its relationship with homocyst(e)ine. *Clin. Chemistry* 44(7): 1545-1550.
- Brouwer, I.A., 1999. *Folic acid, folate and homocysteine : Human intervention studies*. Disertasi, Katholieke Universiteit Nijmegen.
- Brown, J.E., Jacobs, D.R., Hartman, T.J., Barrosso, G.M., et al. 1997. Predictor of Red Cell Folate Level in Women Attempting Pregnancy. *JAMA* 19 (277): 548-552.
- Buckwalter, M., Pepper, J-P., Gaertner, R.F., Von Euw, D., Lacombe, P. and Wyss-Coraya, T. 2002. Molecular and Functional Dissection of TGF- β 1-Induced Cerebrovascular Abnormalities in Transgenic Mice. *Ann. NY Acad. Sci.* 977: 87-95.
- Canalis, E., Mc Carthy, T., and Centrella, M. 1988. Isolation and Characterization of IGF-I (somatomedin-C) from Cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 122: 22-29.
- Charoonsmith, T. and Suwanwela, C. 1984. Frontoethmoidal Frontoethmoidal Encephalomeningocele with Special Reference to Plastic Reconstruction. *Clin. Plastic Surg* 1(1) 27-47.
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K.K., Massague, J., 1999. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *Biol. Chem.* 265 (33): 20533-538.

- Cheng, C.M., Reinhardt, R.R., Lee, W.H., Joncas, G., Patel, S.C. and Bondy, C.A. 2000. Insulin-like Growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *PNAS* 97(18): 10236-41.
- Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J. 1992. Wound Healing, Biochemical & Clinical Aspects. W.B. Saunders Co. Philadelphia-London-Tokyo.
- Cohick, W.S. and Clemmons, D.R., 1995. The Insulin-like Growth Factors. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 131-37.
- Comper, W.D. 1996. *Extracellular Matrix, Molecular Component Interaction*. Haarwood Academic Publ., Philadelphia.
- Copp, A.J., 1998. Prevention of neural tube defects : vitamins, enzymes, and genes. *Current Opinion in Neurol.* 11: 97-102.
- Corcoran, J. 1998. What are the molecular mechanisms of neural tube defects? *Bioessays* 20(1):6-8.
- Cotran R.S. et al. 1997. Cellular Growth and Differentiation : Normal Regulation and Adaptation in : R.S.Cotran (ed) : *Pathologic Basis of Diseases*. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- Daly, S., Mills, J.L., Molloy, A.M., Conley, M., Lee, Y.J. 1997. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet* 350: 1666-69.
- Davids, D.J., Sheffield, L., Simpson D., White, J. 1984. Fronto-ethmoidal meningoencephaloceles : morphology and treatment. *British J. Plastic Surg.* 37: 271-284.
- Di Fiore, M.S.H. 1975. *Atlas of Human Histology*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Donosepoetro, M. 1998. Folic Acid & Homocysteine : The Essential Biochemistry, A Synopsis. *J. Cardiovasc. Risk* 5: 233-227.
- Donosepoetro, M. 2003. Mitochondrial Research, A Bird's Eyeview, in: J. Sargowo et al.(eds.), *Basic Molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine*, Malang, pp. 1-6.
- Dradjat, R.S. 2002. *Pengaruh Gelombang Ultrasonik Intensitas Rendah terhadap Percepatan Fungsionalisasi Osteoblas*. Disertasi, Univ. Airlangga.

- Durand, P., Prost, M., Blache, D. 1997. Folic Acid Deficiency Enhances Oral Contraceptive-Induced Platelet Hyperactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1939-1946.
- Emery A.E.H.1992. *Dasar-dasar Genetika Kedokteran* (Penerjemah: Hartono, Editor: Soemiati A.M.). Churchill Livingstone Edinburg dan London, Yayasan Essentia Medica Yogyakarta.
- Eskes, T.K. et al., 1998. Neural Tube Defects, Vitamins and Homocysteine. *Eur. J. Pediatr.* 2 : 139-41.
- Fernstrom, J.D. 2000. Can nutrient supplements modify brain function? *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (suppl): 1669S-73S.
- Fleming, A and Copp,A.J. 1998. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 280 (5372) : 2107-9.
- Fowler, B. et al., 1998. Genetic Defects of Folate and Cobalamine Metabolism. *Eur.J. Pediatr.* 2 : 60-6.
- Gardner, R.L., Squire, S., Zaina, S., Hills, S. and Ham, C.F. 1999. Insulin-like Growth Factor Rgeulation Conceptus Composition : Effects of the Trophectoderm an Inner Cell Mass Genotypes in the Mouse. *Biol. Reprod.* 60: 190-195.
- Golden, M.H.N., Ramdath, D.D., and Golden, B.E. 1991. Free Radicals and Malnutrition, in: Dreosti, I.E.(ed.) *Trace Elements, Micronutrients, and Free Radicals*. Humana Press, New Jersey, pp.199-221.
- Gonias, S.L., Carmichael, A., Mettenburg, J.M., Roadeap, D.W. et al. 2000. Identical or Overlapping Sequences in the Primary Structure of Human α 2-Macroglobulin are Responsible for the Binding of Nerve Growth Factor- β , Platelet-derived Growth Factor-BB, and Transforming Growth Factor- β . *J. Biol. Chem.* 275 (8): 5826-31.
- Gross, S.M. Caufield, L.A., Kinsman, S.L. Ireys. H.T. 2001. Inaquate Folic Acid intake are prevalent among young woman with neural tube defects. *J. Am. Diet Assoc.* 3: 342-5.
- Gusev, E and Skvortsova, V. 2003. *Brain Ischaemia*. Kluwel Acad. Plen. Publ. New York-London-Moskow. Pp. 183-205.
- Hall.D J. and Solehdin, A.M. 1998. Folic Acid Deficiency as a Cause of Neural Tube Defects. *Biochem.Biophys. Res. Com.* 246(2) : 404-8.

- Hammersen, F. 1985. *Sobotta-Hammersen Histology, Color Atlas of Microscopic Anatomy* (Penerjemah: Petrus Adrianto). Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Harris, H. 1994. *Dasar-Dasar Genetika Biokemis Manusia, Edisi ketiga* (penerjemah: A.S.M. Sofro, penyunting: M. Ismadi). Gadjah Mada Univ. Press.
- Haryo, T.S. dan Istiadjid, M. 1999. Beberapa faktor etiologi meningokel nasofrontal. *MABI, Jakarta*.
- Hauschka, P.V. 1992. *Growth Factor Effects in Bone, The Osteoblast and Osteocyte* Telford Press, New Jersey, pp' 103-70.
- Hidayat, A. 1991. Insidens Kelainan Kongenital di Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang *MOGI, Jakarta*.
- Hidayat, M. 2003. *Stres Oksidatif sebagai Faktor penyebab dalam Patogenesis Kerusakan Tulang Rawan Sendi Osteoarthritis sekunder Akibat Gangguan Biomekanik Instabilitas. Penelitian Eksperimental Laboratoris*. Disertasi Univ Airlangga.
- Hol, F.A. et al., 1998. Molecular genetic analysis of the gen encoding the trifunctional enzyme MTHFD(methylenetetrahydrofolatedehydrogenase), methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase in patients with neural tube defects. *Clin. Genet.*, 53 : 119-25.
- Hoving, E.W., 1993. *Frontoethmoidal Encephalocele, a Study of Their Pathogenesis*. Disertasi, Rijk Universiteit. Groningen.
- Hoyle, C., Henderson, D.J., Matthews, D.J., Copp, A.J. 1996. Transferin and Its Receptor in the Development of Genetically Determined Neural Tube Defects in the Mouse Embryo. *Developmental Dynamics* 207 35-46.
- Hume, C.W. 1972. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Churchill Livingstone, Edinburgh-London. Pp. 204-11.
- Johnson, E.M. 1972. Nutritional Factors in Mammalian Teratology. In: J.G. Wilson & J. Warkany (eds.) *Teratology: Principles and Techniques*. Univ. Chicago Press pp. 113-130
- Joyce, M.E, Roberrrts, A.B. Sporn, M.B and Bolander M.E. 1990. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell. Biol.* 110:2195.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. 1995. *Basic Histology 8th ed.* Prentice-Hall Int'l, Inc.
- Juriloff, D.M. and Harris, M.J. 2000. Mouse models for neural tube closure defects. *Human Molecular Genetics* 9 (6): 993-1000.
- Khera, S. and Chang, N-S. 2003. TIAF1 Participates in the Transforming Growth Factor-B1-Mediated Growth Regulation. *Ann. NY Acad. Scie.* 995: 11-21.
- Kim.S.H., Lim, D.J., Chung, J.G. Cho. T.H., et al. 2002. Expression of TNF-A and TGF-B1 in the Rat Brain after a Single High-Dose Irradiation. *J.Korean Med.Sci.* 17: 242-8.
- Koentjoko. 1999. *Pemberian Rangsang pada Hewan Percobaan untuk Memperoleh Tikus Rendah Asam Folat.* Konsultasi Pribadi, Malang.
- Koento Wibisono, 1989. *Materi Pokok Dasar-dasar Filsafat.* Depdikbud Univ. Terbuka, Jakarta.
- Konings, E.J.M., Roomans, H.H.S., Dorant, E., Goldbohm, R.A., Saris, W.H.M., van den Brandt, P.A. 2001. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 765-76.
- Lacey, H., Haigh, T., Westwood, M., and Aplin, D., 2002. Mesenchymal-derived Insulin-like growth factor-1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration. *BMC Developmental Biology* 2: 5.
- Larsen, W.J. 2001. *Human Embryology, 3th.Ed.* Churchill Livingstone, New York-Edinburg-London.
- Lehninger, A.L. 1995. Principles of Biochemistry. Worth Publ. Inc., diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaja : *Dasar-Dasar Biokimia, Jilid 1.* Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Lipton, S.A., Kim, W-K., Choi, Y-B, Kumar, S., D,Emilia, D.M. et al. 1997. Neurotoxicity associated with dual action of hmcysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5923-5928.
- Lockshin, R.A. and Zaken, Z. 1996. The Biology of Cell Death and Its Relationship to Aging. In: N. Halbrook, G.L. Martin, and R.A. Lockshin (eds.) *Cellular Aging and Cell Death.* Wiley-Liss, Inc. New York, Toronto, Singapore, pp: 167-180.

- Loekito, R.M. 1992. *Hubungan Labiopalatoschisis dengan Konsanguinitas dan Beberapa Ukuran Kepala. Suatu studi kasus di Timor Tengah Selatan*. Disertasi, Univ. Airlangga.
- Lomaga, M.A., Henderson J.T., Elia A.J. Robertson, J. *et al.* 2000. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6) Deficiency Results in Exencephaly and Is Required for Apoptosis within the Developing CNS. *J. Neurosci.* 20(19): 7384-7393.
- Margawati, E.T. 1999. The Effectivity of Growth Factor on in vitro Embryo Development. *Media Veteriner* 6(3): 27-34.
- Martinasevic, M.K., Rios, G.R., Miller, M.W., Tephly, T.R. 1999. Folate and Folate-Dependent Enzymes Associated with Rat CNS Development. *Dev. Neurosci.* 21:29-35.
- Martinez-Lage, J.F., Poza, M., Sola, M., Soler, C.L., Montalvo, C.G. *et al.* 1996. The child with a cephalocele: etiology, neuroimaging, and outcome. *Child's Nerv. Syst.* 12: 540-550
- Massague, J. *et al.* 1998. The Transforming Growth Factor- β Family. *Ann. Rev. Cell Biology* 6: 597-641.
- McGilvery, R.W. and Goldstein G. 1996. *Biochemistry, a Functional Approach*. W.B. Saunders Co. Philadelphia
- McGinn, S., Poronnik, P., King, M., Gallery, E.D.M., and Pollock, C.A. 2003. High glucose and endothelial cell growth: novel effects independent of autocrine TGF- β 1 and hyperosmolarity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C1374-C1386.
- Milligan, C.E. and Schwartz, L.M. 1996. Programmed Cell Death During Developmental of Animals. *In: N. Halbrook, G.L. Martin, R.A. Lockshin (eds.) Cellular Aging and Cell Death*. Wiley-Liss, Inc. New York, Toronto, Singapore, pp: 181-208.
- Mitchell, L.E., Duffy, D.L., Duffy, P., Bellingham, G., and Martin, N.G. 1997. Genetic Effects on Variation in Red-Blood-Cell Folate in Adults: Implications for the Familial Aggregation of Neural Tube Defects. *Am. J. Hum. Genet.* 60:433-438.
- Moeliandari, F. 2003. Homosistein Sebagai Faktor Risiko Demensia dan Alzheimer. *Informasi Laborat.* 5 1-3
- Montagu, M.F.A. 1960 *An Introduction to Physical Anthropology*, 3rd ed. C C Thomas Publ., Springfield, Illinois, USA.

- Montgomery, R., Dryer, R.L., Conway, T.W., Spector, A.A. 1993. *Biokimia, Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus* (penerjemah : M. Ismadi, editor: S.D. Ismadi). Gadjah Mada Univ. Press.
- Moss, M.L. 1990. Inhibition and stimulation of sutural fusion in the rat calvaria. *Anat. Rec.* 136: 457.
- Murphy, L.J. 1994. Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins in the Endometrium. In: S.R. Glasser, J. Mulholland and A. Psychoyos (Eds.) *Endocrinology of Embryo-Endometrium*. Plenum Press. New York. Pp. 229-244.
- Mustafa, K., Woblewski, J., Silva Lopez, B., and Arvidson, K. 2002. Production of transforming growth factor B1 and prostaglandin E2 by osteoblast-like cells cultured on titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. *Histol and Cell Resp.* 1:45.
- Naim-Ur-Rahman, 1979. Nasal Encephalocele. Treatment by transcranial operation. *J. Neurol. Sci.* 42: 73-85.
- Nawaz Kahn, A., Turnbull, I., MacDonald, S., Sabih, D., et al. 2002. Encephalocele. *Medicine Spec.* 2: 11-23.
- Nowak, R.A., Haimovici, F., Biggers, J.D. and Erbach, G.T. 1999. Transforming Growth Factor B Stimulate Mouse Blastocyst Outgrowth through a Mechanism Involving Parathyroid Hormon-Protein. *Biol.Rep.* 60: 85- 93.
- Oakley, G.P., Adams, M.J., and Dickinson, C.M. More Folic Acid for Everyone, Now. 1996. *Am. Institute Nutr.* : 751S-755S.
- Oi, S. and Matsumoto, S. 1990. Morphological evaluation for neuronal maturation in anencephaly and encephalocele in human neonates. *Child's Nerv. Syst.* 6: 350-355.
- O'Neil, C., 1997. Evidence for the Requirement of Autocrine Growth Factor for Development of Mouse Preimplantation Embryos in vitro. *Biology of Reproduction* 56:229-37.
- O'Rahilly, R and Muller, F., 1992. *Human Embryology and Teratology*. Wiley-Liss Publ. New York.
- Quinlivan, E.P. and Gregory, J.F. 2003. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 221-5.

- Ray, J.G., Laskin, C.A. 1999. Folic Acid and homocysteine metabolic defect and the risk of abruption, pre-eclampsia, and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *J. Plac. Sep.* 20(7): 519-29.
- Reynolds, E.H. 2002. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 72: 567-71.
- Roe, F.J.C. 1988. Influence of Animal Species, Strain, Age, Hormonal and Nutritional Status. In: Anderson, D. & Conning, D.M. *Experimental Toxicology, The Basic Principles*. Burlington House Publ., London. pp.23-33.
- Rosenquist, T.H., Ratashak, S.A., and Seihub, J. 1996. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 15227-15232.
- Rotenstein, D. and Reigel, D.H. 1996. Growth hormone treatment of children with neural tube defects : Results from 6 months to 6 years. *J. Pediatrics* 128 (2): 184-89.
- Roth, D.A., Gold, L.I., Han, V.K.M., McCarthy, J.G., Sung, J.J. *et al.*, 1997. Immunolocalization of Transforming Growth Factor β 1, β 2 and β 3 and Insulin-like Growth Factor-1 in Prematur Cranial Suture Fusion. *Plast. Reconst. Surg.* 2(99) : 300-9.
- Saadeh, P.B., Mehrara, B.J., Steinbrech, D.S., Dudziak, M.E., Green wald, J.A., *et al.* 1999. Transforming growth factor- β 1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 277 (*Cell Physiol.* 46): C628-C637
- Sadler, T.W. 1995. *Langman's Medical Embryology*, 7th Ed. William & Wilkins, Baltimore-Philadelphia-Hongkong.
- Saiful B. dan Istiadjid M., 1999. Pola Etnik Penderita Meningokel di Malang. *MABI*, Jakarta.
- Scott, J.M. 1998. How does folic acid prevents neural tube defects? *Nature Medicine* 4(8): 895-96.
- Scholl, T.O. and Johnson, W.G. 2000. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(*supl*): 1295S-303S.
- Setokoesoemo, B.R.. 1986. *Masalah Pengaruh Lingkungan Pada Perkembangan Embrio*. Pidato Pengukuhan sebagai Guru Besar FK-Unair, Surabaya.

- Shimoaka, T., Kamekura, S., Chikuda, H., Hoshi, K., Chung, U. et al. 2004. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *Am. Soc. Biochem. Molec. Biol.* pp.: 1-5.
- Simpson, P.B, Russel, J.T. 1998. Role of mitochondrial Ca^{2+} regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Research Rev.* 26: 72-81.
- Sirca. A.E. 1996. *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Lippincott-Raven Publ. Philadelphia.
- Smitchells, R.W., Sheppard, S. and Schorah, C.J. 1982. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch. Dis. Child.* 31: 944-949.
- Smith. M.T., Wissinger, J.P., Huntington, H.W. 1981. Experimental dysraphism in the rat. *J. Neurosurg.* 49: 725-729.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1996. *Pengantar Biostatistika* (Terjemahan Nasrullah & Setyono S.), Gadjah Mada University Press, Jogjakarta.
- Steed. D.L. 1997. The Role of Growth Factors in wound healing, in : A.B. Barbul (ed.) *The Surg. Clin. North. Am.* 77(3) : 575-86. W.B. Saunders Publ., Philadelphia.
- Solary. E., Dubrez, L., Eymin, B., 1996. Yhe role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Eur. Respir. J.* 9: 1293-1305.
- Steller, H. 1995. Mechanism and Genes of Cellular Suicide. *Science*, 247: 1445-1448.
- Stoian, I., Oros, A., Moldoveanu, E. 1996. Apoptosis and Free Radical. *Biochemical and Molecular Medicine*, 59: 93-97.
- Sudigdo Sastroasmoro & Sofyan Ismaet 1995. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Binarupa Aksara, Jakarta.
- Suryo, 1997. *Genetika manusia*. Gadjah Mada Univ. Press.
- Thaller. S.R., Hoyt, J., Tesluk, H., and Holmes, R. 1993. The effect of insulin growth factor-1 on calvarial sutures in a Sprague-Dawley rat. *J Cranio-fac Surg* 4 :35.
- Tjokroprawiro, A., Pudjirahardjo, W.J., Taat Putra, S., 1996. *Pedoman Penelitian Kedokteran*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Van Wouwe, J.P., 1991. *Zinc Deficiency : Its Clinical and Laboratory Assesment*. N.K.B.Offset bv, Bleiswijk-Nederland

- Vohra, M., Gentili, A., Subir, V., Chen, D., Mosalem, A., Siddiqi, W. 2002 Folic Acid Deficiency. *Medicine*. Pp.1-12.
- Vinals, F. & Pouyssegur, J. 2001 Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Promotes Endothelial Cell Survival during In Vitro Angiogenesis via an Autocrine Mechanism Implicating TGF- β Signaling. *Molecul. Cell. Biol.* Nov.: 7218-30.
- Wald, D.S., Law, M., Morris, J.K. 2002. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on casualty from a meta-analysis. *BMJ* 325 (23):1-7
- Wells, R.G. 2000. Fibrogenesis, TGF- β Signaling Pathway. *Am. J. Physiol.* 279: G845-G850.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., et al. 2000. Brain ischemia and reperfusion : molecular mechanism of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179 : 1-33.
- Wilcken, D.E. 1997. MTHFR 677C \rightarrow T mutation, folate intake, neural-tube defect, and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 350: 603-604.
- Wilkie, A.O.M. and Morris-Kay, G.M. 2001. Genetics of Craniofacial Development and Malformation. *J. Genetics* 2: 458-468.
- Wilson, J.G. 1972. Embryological Considerations in Teratology. In: J.G. Wilson and J. Warkany (eds.) *Teratology, Principles and Techniques*. Univ. Chicago Press, Chicago and London, pp.. 251-279.
- Wuyts, W., Cleiren, E., Homfray, T., Rasore-Quartino, A., Vanhoenacker, F., Van Hul, W. 2000. Haploinsufficiency of the human homeobox gene ALX4 causes skull ossification defects. *J. Med. Genet.* 37: 916-920.
- Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* 110 (6): 771-781)
- Zittoun, J. et al., 1998. Plasma homocysteine levels related to interactions between folate status and methylenetetrahydrofolate reductase : a study in 52 healthy subjects *Metabolism* 47(11) : 1413-8.

Lampiran 1 *Ethical Clearance* untuk Penelitian Tikus



**PANITIA ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RSUD DR. SAIFUL ANWAR MALANG**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No:02/PEPK / X / 2023

PANITIA ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA – RSUD DR. SAIFUL ANWAR MALANG, SETELAH
MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN
JUDUL: Peranan Asam Folat, Transforming Growth Factor
β1 dan Insulin-like Growth Factor-1 Terhadap
Timbulnya Defek Tulang; Kepala Perempuan Meningo-

kel.
PENELITI UTAMA:

Dr. Moch. Istiadjid SS, SpS, SpRS

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN:

Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran
Unibraw/RSUD Dr. Saiful Anwar Malang

DINYATAKAN LAIK ETIK.

MALANG, 29 Oktober 2023

KETUA

Prof. DR. dr. Mulyohadi Ali

6. Masalah etik (Nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin akan dihadapi):

- Pada pasien : mengambil sedikit jar. tulang sewaktu operasi.
- Pada hewan : mengambil darah induk dari tulang kepala jamin.

7. Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk memulai penelitian ini langsung pada manusia.

Judah.

8. Prosedur Eksperimen (Frekuensi, interval, dan jumlah total segala tindakan invasive yang akan dilakukan, dosis dan cara pemberian obat, isotop, radiasi, dan tindakan lain)

- Pada pasien : waktu dilakukan operasi meningkat dengan prosedur standard, tulang tepi defek diambil sedikit.
- Pada hewan : tidak diberi diet rendah asam folat selama 8 minggu diambil darahnya.

9. Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung, segera atau kemudian dan cara-cara untuk mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain).

Tidak ada bahaya.

10. Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dari tindakan yang hendak diterapkan: Pengalaman dokter peneliti dalam pengambilan sampel biologis dalam penelitian ini.

Judah sering dilakukan, terutama pada pasien-pasien dengan pembusukan tulang tepi defek.

11. Bila peneliti ini menggunakan orang sakit dan dapat memberi manfaat untuk subjek yang bersangkutan, uraikan manfaat itu:

Secara kosmetik akan lebih baik.

12. Bagaimana cara memilih pasien/ sukarelawan sehat?

Tidak ada pemilihan, dilakukan terhadap seluruh pasien yang beroperasi selama 1 tahun.

13. Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, jelaskan hubungan antara peneliti utama dengan subjek yang diteliti.

Dokter-pasien Guri-murid Majikan-anak buah Lainnya

14. Bila penelitian ini menggunakan orang sakit, jelaskan diagnosis dan nama dokter yang bertanggungjawab merawatnya. Bila menggunakan orang sehat, jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya.

Diagnosa : Meningotul

Panggungjawab : Dr. Moch Istiadjid E.S., SpS, Sp.BS.

15. Jelaskan cara pencatatan selama penelitian, termasuk efek samping dan komplikasi bila ada.

Dicatat : usia, jenis kelamin, berat badan, pendidikan dan pekerjaan orangtua serta alamatnya.

Komplikasi : Subocoran cairan cerebrospinal (sangat jarang terjadi).

16. Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, jelaskan bagaimana cara memberitahu dan mengajak subjek (lampiran contoh surat persetujuan subjek). Bila pemberitahuan dan kesediaan subjek bersifat lisan, atau bila karena sesuatu hal subjek tidak dapat atau tidak perlu dimintakan persetujuan, berilah alasan yang kuat untuk itu.

Kepada orang tua pasien dijelaskan mengenai rencana, manfaat dan tujuan penelitian.
Dimintakan surat persetujuan secara tertulis.

17. Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah subjek dapat ganti rugi bila ada gejala efek samping? Berapa banyak?

Atas biaya peneliti, dilakukan operasi ulang untuk mencegah timbul komplikasi.

Telah dipertimbangkan apakah penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah subjek diasuransikan

Ya

Tidak

Malang, 6 Oktober 2003
Kepala Laboratorium

Peneliti Utama

Dr. Moch. Istiadjid E.S. Sp.S. Sp.PS.
Jl. Pahlawan Lingsar 40-10000

Dr. dr. Moh. Hidayat Sp.B. Sp.150.

Telah Dipertimbangkan dan Disetujui pada Tanggal

Kepua
Pablitia Etik Penelitian Kedokteran

Prof DR Ir. Mulihsadi Ali, MS, SpFK

Lampiran 3 Contoh *Informed Consent*

SURAT PERSETUJUAN
PENGAMBILAN SAMPEL PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Tn. Sudarto
Umur : 55 71
Alamat : Ds. Jbr. Kocak RT 02/12. Penataran
Legok Blitar
Sebagai : Orang tua / saudara / lain-lain (coret yang tidak perlu)

Dan :

Nama : Alex
Umur : 18 6
Alamat : Ds. Jbr. Kocak RT 02/12. Penataran
Legok Blitar

Dengan ini menyatakan setuju untuk dilakukan tindakan medik pengambilan seritkit tulang (ukuran: ± 3 milimeter), sebagai sampel penelitian.

Mafang 19 10 2003

Yang memberikan persetujuan

(tanda tangan)
(nama terang : SUDARTO)

Lampiran 4 : Anova Uji Konsistensi Hasil Pengamatan Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I*

	TGF-β1		IGF-I	
	Peneliti	Supervisor	Peneliti	Supervisor
Supervisor				
Serum induk tikus	602.0 ±98.0	610.8 ±81.2	3888.0 ±93.5	3862.0 ±89.0
<i>p-value</i>	0.602		0.462	
Tulang janin tikus	9.35 ±2.99	8.75 ±2.45	5.85 ±2.10	5.10 ±2.15
<i>p-value</i>	0.571		0.284	
Tulang pasien	3.50 ±1.6	3.25 ±1.7	4.1 ±2.7	4.5 ±2.5
<i>p-value</i>	0.447		0.507	

Lampiran 5 Data Mentah Kadar Asam Folat dalam Eritrosit Tikus



MALANG 65112
 Jl. Merbau No. 10
 Telp. (0341) 366.047
 Fax. (0341) 324.530

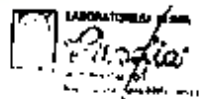
Penanggung Jawab
 Dr. D. Brendani H. Sp.PA

0341-366047

REKAP HASIL PENELITIAN FOLIC ACID

NO. LAB	NAMA PEMERIKSAAN	KODE	HASIL	BAHAN
04080044	FOLIC ACID	TIKUS (5A)	7,853	RBC
04080047	FOLIC ACID	TIKUS (5B)	856,9	RBC
04080048	FOLIC ACID	TIKUS (5C)	984,5	RBC
04100018	FOLIC ACID	TIKUS (4A)	865	RBC
04100019	FOLIC ACID	TIKUS (4D)	923	RBC
04100020	FOLIC ACID	TIKUS (4C)	824	RBC
05010011	FOLIC ACID	TIKUS (A6)	829,1	RBC
05010012	FOLIC ACID	TIKUS (C6)	856,3	RBC
05010013	FOLIC ACID	TIKUS (A3)	549,6	RBC
05010014	FOLIC ACID	TIKUS (C3)	837,5	RBC
05010015	FOLIC ACID	TIKUS (B3)	642,4	RBC
05080063	FOLIC ACID	TIKUS (B-3)	816,4	RBC
05080064	FOLIC ACID	TIKUS (H-8)	878,8	RBC
05080065	FOLIC ACID	TIKUS (B-9)	1.178,7	RBC
05080066	FOLIC ACID	TIKUS (B-10)	778,1	RBC
05080067	FOLIC ACID	TIKUS (C-3)	1.311,3	RBC
05080068	FOLIC ACID	TIKUS (C-8)	1.202,4	RBC
05080069	FOLIC ACID	TIKUS (C-9)	954	RBC
05080070	FOLIC ACID	TIKUS (C-10)	880,0	RBC
05100035	FOLIC ACID	TIKUS (C1)	905,2	RBC
05100036	FOLIC ACID	TIKUS (B1)	867,2	RBC
05120068	FOLIC ACID	TIKUS (A1)	741,2	RBC
05120068	FOLIC ACID	TIKUS (A2)	554,8	RBC
05120070	FOLIC ACID	TIKUS (A3)	747,6	RBC
05130054	FOLIC ACID	TIKUS (A7)	975,0	RBC
05130056	FOLIC ACID	TIKUS (A9)	816,1	RBC
05130057	FOLIC ACID	TIKUS (A10)	742,0	RBC

Catatan: Tanda koma menunjukkan hasil dalam ribuan
 Satuan yang dipakai ng/mL



0341-366047



Lampiran 6 Data Mentah Kadar Asam Folat dalam Serum Tikus



MALANG 65117
J. Mestika 11, 12
Telp: 0341-864211
Fax: 0341-324133

...
D. H. ...

REKAP HASIL PENELITIAN FOLIC ACID

NO. LAB	NAMA PEMERIKSAAN	KODE	HASIL	BAHAN
06050022	FOLIC ACID	TIKUS (A-1)	7.4	SERUM
06050023	FOLIC ACID	TIKUS (A-2)	8.8	SERUM
06050024	FOLIC ACID	TIKUS (A-3)	8.8	SERUM
06050025	FOLIC ACID	TIKUS (A-4)	6.2	SERUM
06050026	FOLIC ACID	TIKUS (A-5)	8.4	SERUM
06050027	FOLIC ACID	TIKUS (A-6)	5.7	SERUM
06050028	FOLIC ACID	TIKUS (A-7)	8.4	SERUM
06080041	FOLIC ACID	TIKUS (A-8)	3.1	SERUM
06080042	FOLIC ACID	TIKUS (A-10)	0.8	SERUM
06080043	FOLIC ACID	TIKUS (A-9)	7.8	SERUM
06180043	FOLIC ACID	TIKUS (B-2)	15	SERUM
06180044	FOLIC ACID	TIKUS (B-1)	14.3	SERUM
06180045	FOLIC ACID	TIKUS (B-5)	18.1	SERUM
06180046	FOLIC ACID	TIKUS (B-6)	15.4	SERUM
06180047	FOLIC ACID	TIKUS (B-3)	18.1	SERUM
06180048	FOLIC ACID	TIKUS (B-4)	15.3	SERUM
06180049	FOLIC ACID	TIKUS (B-7)	14.4	SERUM
06180050	FOLIC ACID	TIKUS (B-8)	14.7	SERUM
06180051	FOLIC ACID	TIKUS (B-9)	14.1	SERUM
06180052	FOLIC ACID	TIKUS (B-10)	14.4	SERUM
06180053	FOLIC ACID	TIKUS (C-1)	15.2	SERUM
06180054	FOLIC ACID	TIKUS (C-2)	18.8	SERUM
06180055	FOLIC ACID	TIKUS (C-3)	15.3	SERUM
06180056	FOLIC ACID	TIKUS (C-4)	14.8	SERUM
06180058	FOLIC ACID	TIKUS (C-5)	15.3	SERUM
06180059	FOLIC ACID	TIKUS (C-6)	15	SERUM
06180060	FOLIC ACID	TIKUS (C-7)	15.1	SERUM
06180061	FOLIC ACID	TIKUS (C-8)	15.3	SERUM
06180062	FOLIC ACID	TIKUS (C-9)	15.6	SERUM
06180063	FOLIC ACID	TIKUS (C-10)	15	SERUM

Catatan: Satuan yang dipakai ng/mL



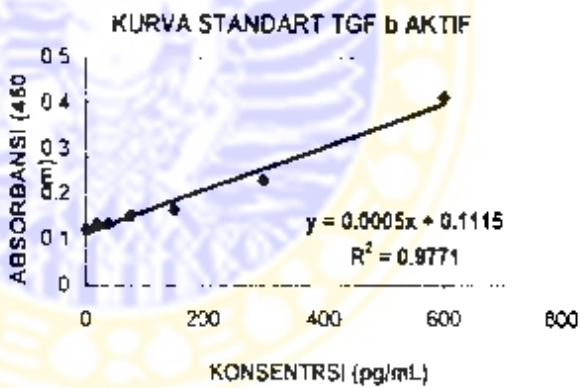
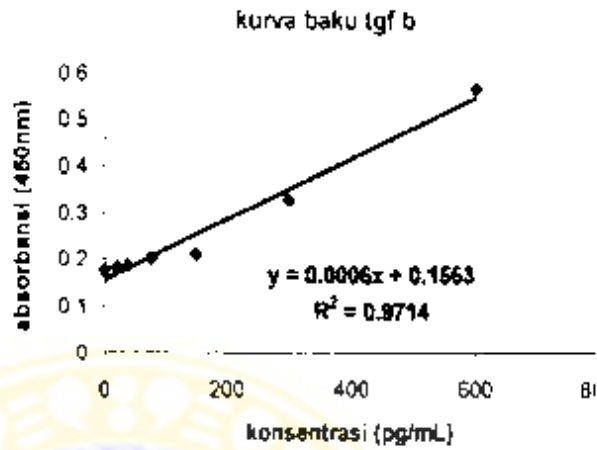
Lampiran 7 Data Mentah Konsentrasi TGF- β 1 Serum Induk dan Kurva Baku

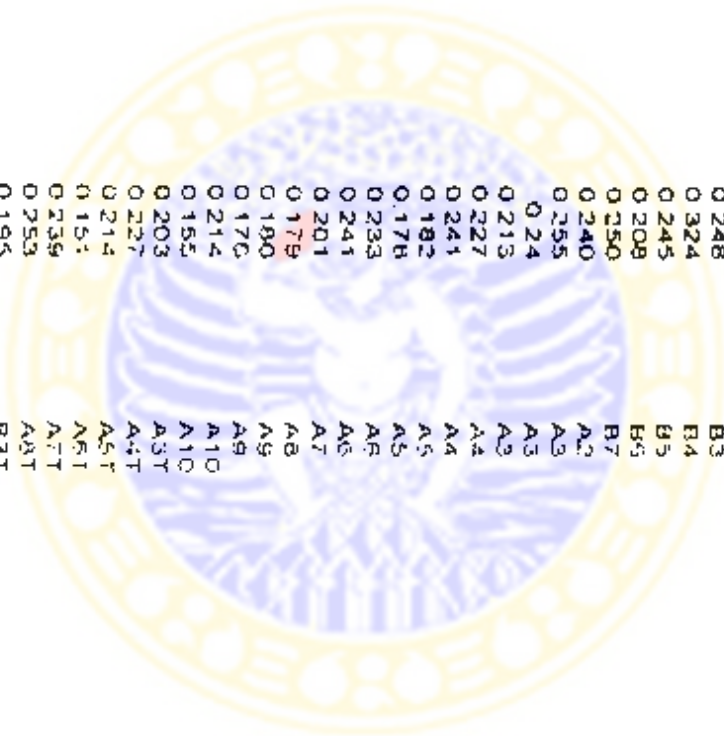
PERHITUNGAN KONSENTRASI TGF β 1					
TOTAL			AKTIF		
Kelompok	Absorbansi	Konsentrasi	Kelompok	Absorbansi	Konsentrasi
A8.2	0.752	2246.167	A8.2	0.119	253.000
A3.2	0.917	2796.167	A3.1	0.138	329.000
A2.1t	0.979	3002.833	A1.3	0.137	325.000
A3.1t	0.958	2932.833	B1.1	0.139	333.000
A1.3t	0.951	2909.500	B10.1	0.143	349.000
A10.3t	0.951	2909.500	B2.2	0.170	457.000
B1.1t	0.783	2349.500	C9.1	0.155	397.000
B10.1t	0.813	2449.500	C1.2	0.144	353.000
B2.2t	0.830	2506.167	C2.2	0.110	217.000
B10.2t	1.002	3079.500	C7	0.260	817.000
C1.1t	0.865	2622.833	A1	0.190	537.000
C9.1t	0.878	2666.167	C10	0.206	601.000
C1.2t	0.935	2856.167	C9	0.202	585.000
C2.2t	0.893	2716.167	C8	0.221	661.000
A2.1t	1.133	3516.167	C7	0.302	985.000
B1.1t	0.688	2032.833	C6	0.196	561.000
C1.1t	0.644	1886.167	C5	0.293	949.000
A3T	0.203	416.167	A1	0.195	557.000
A4T	0.227	496.167	B8	0.260	817.000
A5T	0.214	452.833	B9	0.224	673.000
A6T	0.151	242.833	B10	0.234	713.000
A7T	0.239	536.167	C1	0.247	765.000
A8T	0.253	582.833	C2	0.270	857.000
B3T	0.195	389.500	C3	0.344	1153.000
B4T	0.173	316.167	C4	0.203	589.000
B6T	0.211	442.833	A2	0.241	741.000
B8T	0.169	302.833	B1	0.256	801.000
B9T	0.244	552.833	B2	0.189	533.000
C3T	0.200	406.167	B3	0.248	769.000
C4T	0.237	529.500	B4	0.324	1073.000
C5T	0.206	426.167	B5	0.245	757.000
C6T	0.214	452.833	B6	0.208	609.000
C7T	0.185	356.167	B7	0.250	777.000
			A2	0.240	737.000
			A3	0.256	797.000

	A3	0.24	737.000
	A3	0.213	629.000
	A4	0.227	685.000
	A4	0.241	741.000
	A5	0.182	505.000
	A5	0.178	489.000
	A6	0.233	709.000
	A6	0.241	741.000
	A7	0.201	581.000
	A8	0.179	493.000
	A9	0.180	497.000
	A9	0.176	481.000
	A10	0.214	633.000
	A10	0.155	397.000

TABELE OF ABSORBANCE VALUES

Absorbansi	Kelompok
0.179	0
0.184	19
0.188	38
0.202	75
0.211	150
0.329	300
0.564	600
0.752	A8.2
0.917	A3.2
0.979	A2.11
0.958	A3.11
0.851	A1.31
0.951	A10.31
0.783	B1.11
0.813	B10.11
0.830	B2.21
1.002	B10.21
0.865	C1.11
0.878	C9.11
0.935	C1.21
0.893	C2.21
1.133	A2.11
0.888	B1.11
0.644	C1.11
0.121	0
0.132	19
0.133	38
0.151	75
0.163	150
0.230	300
0.413	600
0.119	A8.2
0.136	A3.1
0.137	A1.3
0.139	B1.1
0.143	B10.1
0.170	B2.2
0.155	C9.1
0.144	C1.2
0.110	C2.2
0.260	C7
0.190	A1
0.205	C10
0.207	C9
0.221	C8
0.302	C7
0.192	C6
0.292	C5





0.195	A.1
0.260	B.1
0.224	B.5
0.234	B.10
0.247	C.1
0.270	C.2
0.344	C.3
0.203	C.4
0.241	A.2
0.256	B.1
0.189	B.7
0.248	B.3
0.324	B.4
0.245	B.5
0.208	B.6
0.250	B.7
0.240	A.2
0.255	A.2
0.224	A.3
0.213	A.2
0.227	A.4
0.241	A.4
0.182	A.5
0.178	A.5
0.233	A.6
0.241	A.6
0.201	A.7
0.179	A.8
0.190	A.9
0.170	A.9
0.214	A.10
0.165	A.10
0.203	A.3
0.227	A.4
0.214	A.5
0.154	A.6
0.239	A.7
0.259	A.8
0.195	B.3
0.173	B.4
0.211	B.5
0.169	B.6
0.244	B.7
0.200	C.3
0.237	C.4
0.206	C.5
0.214	C.6
0.185	C.7

Lampiran 8 ANOVA IGF-I Serum Induk Tikus

Oneway_ANOVA TGF|11 AKTIF

ANOVA

TGF B1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	550820.0	2	275409.977	17.742	.000
Within Groups	481205.6	31	15522.761		
Total	1032026	33			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TGF B1

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-240.06061*	52.00696	.000	-388.06012	-112.06109
	C	-286.78788*	52.00696	.000	-414.78740	-158.78836
B	A	240.06061*	52.00696	.000	112.06109	368.06012
	C	-46.72727	53.12551	.657	-177.47978	84.02524
C	A	286.78788*	52.00696	.000	158.78836	414.78740
	B	46.72727	53.12551	.657	-84.02524	177.47978

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

TGF B1

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
A	12	453.66667	
B	11		693.72727
C	11		740.45455
Sig.		1.000	.649

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.314.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type III sums of squares are not quantified.

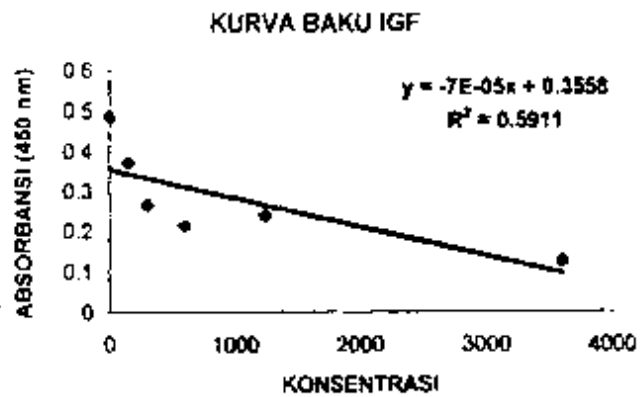
Lampiran 9 Data Mentah Konsentrasi IGF-I Serum Induk dan Kurva Baku

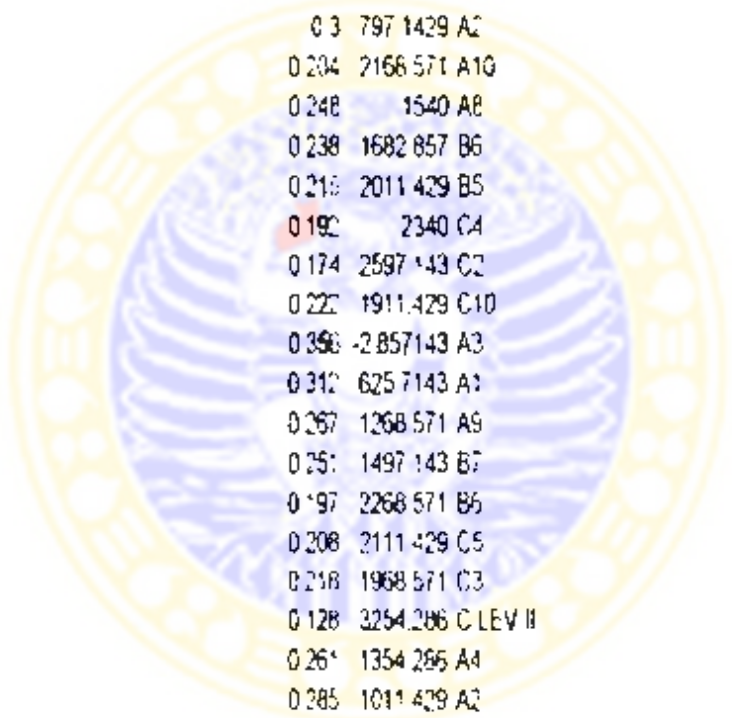
PERHITUNGAN KONSENTRASI IGF I		
KONSENTRSI	ABSORBANSI	KOLOMPOK
0 259	1382 857	C. LEV.I
0 206	2140 000	C. LEV.II
0 181	2497 143	C4
0 296	854 286	A2
0 33	368 571	A5
0 39	-488 571	A3
0 262	1340 000	B1
0 281	1068 571	B10
0 201	2211 429	B8
0 226	1854 286	C7
0 208	2111 429	C5
0 363	-102 857	A3
0 331	354 286	A6
0 29	940 000	A4
0 223	1897 143	B2
0 325	440 000	B1
0 181	2497 143	B9
0 177	2554 286	C8
0 218	1968 571	C6
0 289	954 286	A4
0 283	1040 000	A7
0 35	82 857	A5
0 383	-388 571	B3
0 235	1725 714	B2
0 201	2211 429	B10
0 229	1811 429	C9
0 223	1897 143	C7
0 381	-360 000	A5
0 271	1211 429	AB
0 276	1140 000	A6
0 233	1754 286	B4
0 235	1725 714	B3
0 282	1054 286	C1
0 2	2225 714	C10
0 174	2597 143	C8
0 303	754 286	A1
0 234	1740 000	A9
0 25	1511 429	A7
0 112	2625 714	B5
0 177	2554 286	B4
0 281	1068 571	C2
0 207	2125 714	C1

0 176	2568 571	C9
0 3	797 143	A2
0 204	2168 571	A10
0 248	1540 000	A8
0 236	1682 857	B6
0 215	2011 429	B5
0 192	2340 000	C4
0 174	2597 143	C2
0 222	1911 429	C10
0 356	-2 857	A3
0 312	625 714	A1
0 267	1268 571	A9
0 251	1497 143	B7
0 197	2268 571	B6
0 208	2111 429	C5
0 218	1968 571	C3
0 126	3254 286	C.LEV II
0 261	1354 286	A4
0 285	1011 429	A2
0 279	1097 143	A10
0 25	1511 429	B9
0 255	1440 000	B7
0 235	1725 714	C6
0 183	2325 714	C.LEV I

TABLE OF ABSORBANCE VALUES

0.557	BLANK	
0.523	0	0.480
0.41	150	0.374
0.296	300	0.2585
0.244	600	0.2145
0.217	1250	0.2405
0.133	3600	0.125
0.259	1362	857 C LEV I
0.206	2140	C LEV II
0.449	0	
0.338	150	
0.239	300	
0.185	600	
0.264	1250	
0.117	3600	
0.181	2497	143 C4
0.296	854	2857 A2
0.33	368	5714 A5
0.39	488	5714 A3
0.262	1340	B1
0.281	1068	571 B10
0.201	2211	429 B8
0.226	1854	286 C7
0.208	2111	429 C5
0.363	102	857 A3
0.331	354	2857 A6
0.29	940	A4
0.223	1897	143 B2
0.325	440	B1
0.181	2497	143 B9
0.177	2554	286 C8
0.218	1968	571 C6
0.289	954	2857 A4
0.203	1040	A7
0.35	82	85714 A5
0.383	368	5714 B3
0.235	1725	714 B2
0.201	2211	429 B10
0.229	1811	428 C9
0.223	1897	143 C7
0.381	-360	A5
0.271	1211	429 A8
0.276	1140	A6
0.233	1754	286 B4
0.235	1735	714 B3
0.282	1054	286 C1
0.2	2225	714 C10
0.174	2597	143 C6





0303 254 2857 A1
0234 1740 A9
025 1511 429 A7
0177 2625 714 B5
0177 2554 285 B4
0281 1068 571 C2
0207 2125 714 C1
0176 2558 571 C9
03 797 1429 A2
0204 2166 571 A10
0248 1540 A8
0238 1682 857 B6
0218 2011 429 B5
0192 2340 C4
0174 2597 143 C2
0222 1911 429 C10
0356 2857 143 A3
0312 625 7143 A1
0267 1268 571 A9
0251 1497 143 B7
0197 2268 571 B6
0208 2111 429 C5
0218 1968 571 C3
0128 3254 286 C LEV II
0261 1354 285 A4
0285 1011 429 A2
0279 1097 143 A10
025 1511 429 B9
0255 1440 B7
0235 1725 714 C6
0135 2325 714 C LEV I

Lampiran 10 ANOVA IGF-I Serum Induk Tikus

Oneway_IGF I

ANOVA

IGF1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.467	2	34.233	5.343	.011
Within Groups	173.000	27	6.407		
Total	241.467	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IGF1

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.20	1.13	.983	-2.61	3.01
	3	3.30*	1.13	.018	.49	6.11
2	1	-.20	1.13	.983	-3.01	2.61
	3	3.10*	1.13	.028	.29	5.91
3	1	-3.30*	1.13	.018	-6.11	-.49
	2	-3.10*	1.13	.028	-5.91	-.29

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

IGF1

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	10	2.00	
2	10		5.10
1	10		5.30
Sig.		1.000	.863

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000

Lampiran 11 Data Mentah Berat Badan Tikus Selama Penelitian

3 Februari 2003

	A	B	C
1	59.8	60.0	59.8
2	58.1	61.0	57.6
3	59.4	60.2	59.7
4	60.0	60.4	57.7
5	58.1	59.9	60.1
6	57.2	60.6	60.0
7	59.4	61.8	59.8
8	56.2	62.4	56.4
9	59.6	71.1	57.2
10	59.2	62.1	59.8

1 Juli 2003

	A	B	C
1	230.6	239.8	238.8
2	230.7	241.2	243.6
3	229.4	232.2	239.2
4	250.8	242.6	238.7
5	242.2	242.4	243.4
6	241.0	250.1	246.6
7	239.9	249.2	249.9
8	238.1	248.8	249.8
9	248.2	247.6	244.4
10	230.0	232.9	245.6

7 April 2003

	A	B	C
1	115.2	110.5	109.3
2	107.1	112.6	107.6
3	116.6	109.3	105.5
4	114.5	108.1	108.3
5	113.6	110.6	110.5
6	114.5	111.2	112.3
7	112.2	114.1	110.5
8	110.1	116.5	109.3
9	108.2	119.1	109.6
10	107.6	120.3	106.3

5 Agustus 2003

	A	B	C
1	255.1	255.0	260.1
2	256.4	256.2	260.4
3	266.4	255.0	252.2
4	257.7	251.9	254.2
5	255.1	255.0	252.4
6	250.0	256.0	262.1
7	254.9	255.4	255.4
8	259.6	253.3	255.7
9	257.2	252.2	260.0
10	255.0	252.5	261.2

4 Juni 2003

	A	B	C
1	190.6	199.9	199.9
2	192.9	200.0	196.8
3	188.8	198.9	199.7
4	185.6	200.8	188.6
5	189.9	200.4	192.2
6	201.2	200.8	190.0
7	200.0	200.2	198.5
8	197.5	201.6	200.9
9	219.0	205.1	200.6
10	218.2	200.9	210.1

8 Oktober 2003

	A	B	C
1	354.7	350.5	358.2
2	358.1	362.4	350.1
3	350.4	352.2	353.2
4	352.6	351.3	354.2
5	351.2	350.0	355.7
6	350.6	353.4	350.0
7	342.4	357.8	351.0
8	348.7	356.4	342.0
9	340.4	350.1	344.0
10	346.6	298.9	321.0

Berat badan dalam satuan gram

Lampiran 12 Data Mentah Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* Tulang Kepala Janin

DATA PERHITUNGAN IGF I DAN TGF b1		
KELOMPOK	IGF I	TGF b1
A1.1	4	10
A1.2	3	6
A2.1	7	11
A2.2	8	9
A3.1	8	5
A3.2	2	9
A4.1	7	6
A4.2	6	8
A5.1	6	18
A5.2	5	11
A6.1	6	9
A6.2	5	10
A7.1	9	6
A7.2	3	8
A8.1	5	14
A8.2	7	10
A9.1	3	12
A9.2	9	10
A10.1	5	9
A10.2	9	6
KELOMPOK	IGF I	TGF b1
B1.1	12	21
B1.2	20	19
B2.1	25	21
B2.2	19	22
B3.1	13	26
B3.2	16	21
B4.1	21	15
B4.2	18	19
B5.1	16	28
B5.2	13	17
B6.1	11	29
B6.2	17	27
B7.1	12	23
B7.2	15	21
B8.1	18	28

B8.2	16	24
B9.1	27	25
B9.2	23	22
B10.1	29	22
B10.2	21	26
KELOMPOK	IGF I	TGF b1
C1.1	29	31
C1.2	21	48
C2.1	29	18
C2.2	27	29
C3.1	30	30
C3.2	31	38
C4.1	29	32
C4.2	21	29
C5.1	32	26
C5.2	17	28
C6.1	19	21
C6.2	14	21
C7.1	28	29
C7.2	21	25
C8.1	26	24
C8.2	24	23
C9.1	22	28
C9.2	19	24
C10.1	18	27
C10.2	15	28

Lampiran 13 ANOVA TGF- β 1 dan IGF-1 Tulang Kepala Janin TikusOneway_TGF β 1

ANOVA

TGF β 1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3689,233	2	1844,617	83,799	,000
Within Groups	1264,700	57	22,012		
Total	4953,933	59			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TGF β 1

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-13,4500*	1,4837	,000	-17,0203	-8,8797
	3	-18,6000*	1,4837	,000	-22,1703	-15,0297
2	1	13,4500*	1,4837	,000	9,8797	17,0203
	3	-5,1500*	1,4837	,003	-8,7203	-1,5797
3	1	18,6000*	1,4837	,000	15,0297	22,1703
	2	5,1500*	1,4837	,003	1,5797	8,7203

*. The mean difference is significant at the .05 level.

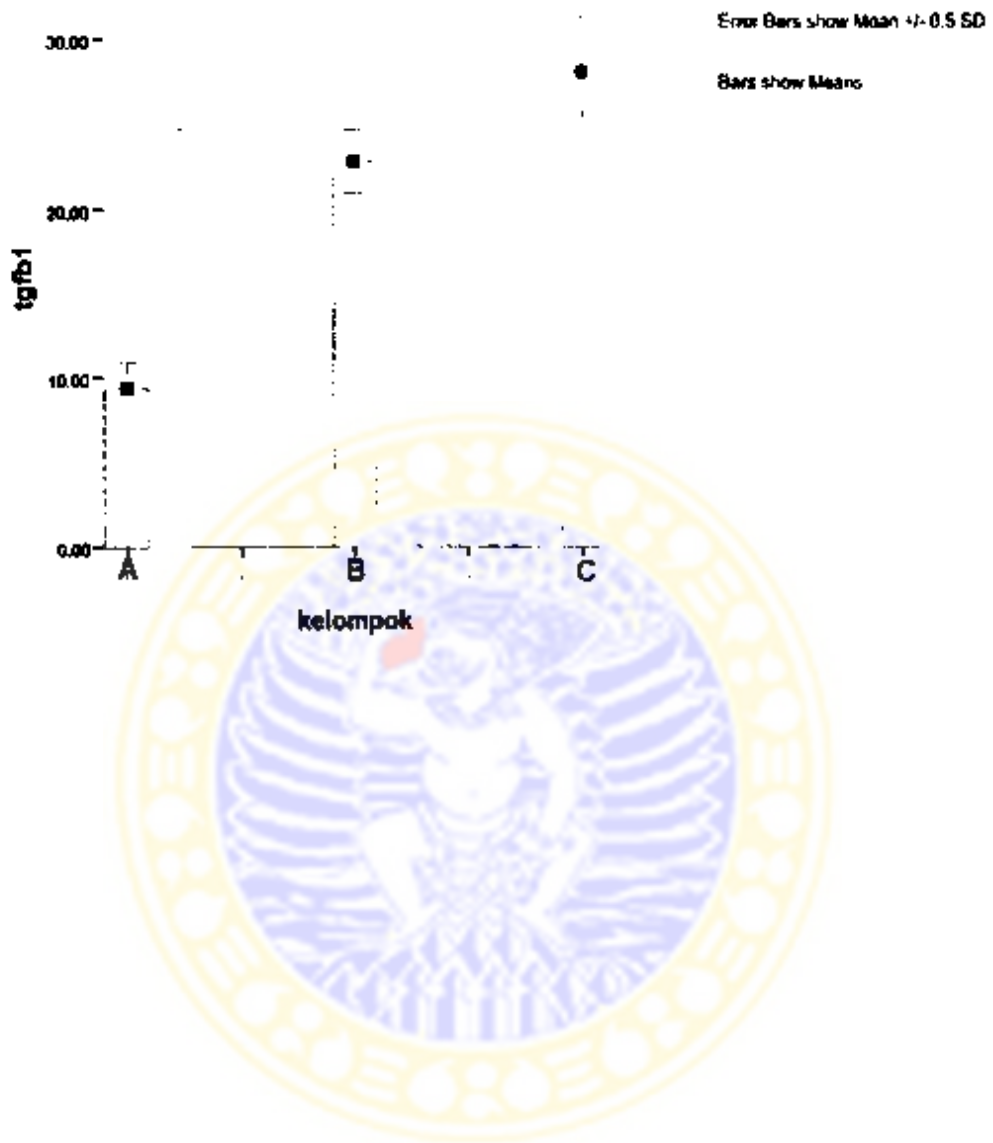
Homogeneous Subsets

TGF β 1Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	20	9,3500		
2	20		22,8000	
3	20			27,9500
Sig.		1,000	1,000	: 000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20,000.



Oneway_IGF I

ANOVA

IGF1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3302.500	2	1651.250	79.957	.000
Within Groups	1177.150	57	20.652		
Total	4479.650	59			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IGF1

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-12.2500*	1.4371	.000	-15.7082	-8.7918
	C	-17.7500*	1.4371	.000	-21.2082	-14.2918
B	A	12.2500*	1.4371	.000	8.7918	15.7082
	C	-5.5000*	1.4371	.001	-8.9582	-2.0418
C	A	17.7500*	1.4371	.000	14.2918	21.2082
	B	5.5000*	1.4371	.001	2.0418	8.9582

*. The mean difference is significant at the .05 level

Homogeneous Subsets

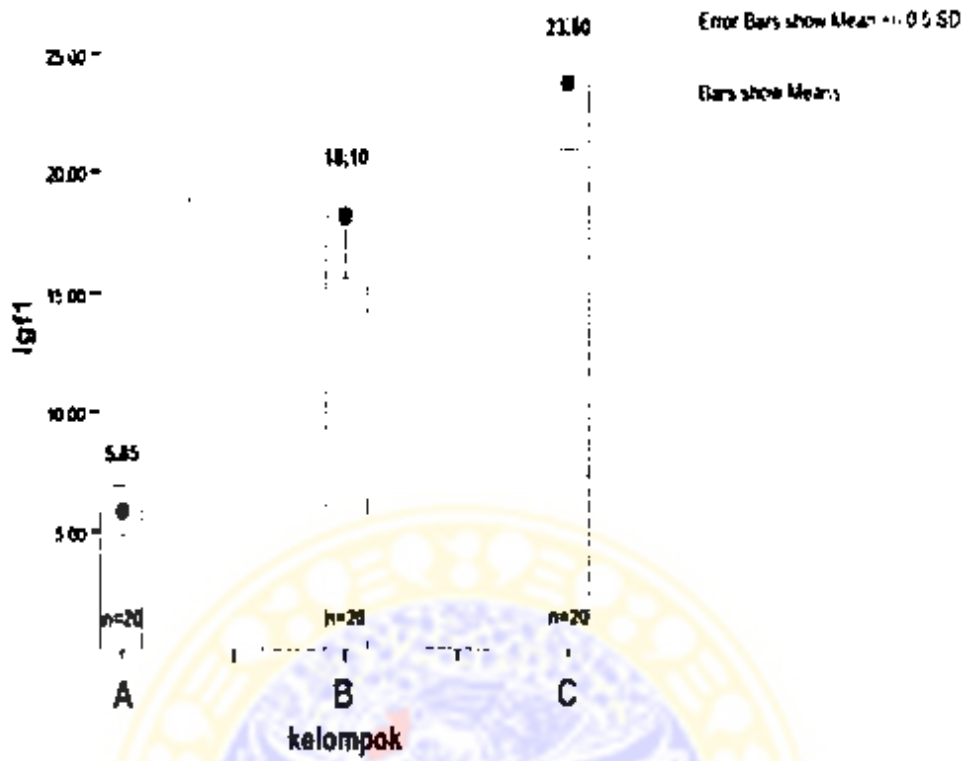
IGF1

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
A	20	5.8500		
B	20		18.1000	
C	20			23.6000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000



Lampiran 14 Jumlah Apoptosis dan Nekrosis Tulang Kepala Janin Tikus

DATA PERHITUNGAN APOPTOSIS DAN NECROSIS JARANGAN						
NO. SAMPEL	APOPTOSIS			NECROSIS		
	KELOMPOK-A	KELOMPOK-B	KELOMPOK-C	KELOMPOK-A	KELOMPOK-B	KELOMPOK-C
1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30



Lampiran 15 ANOVA Apoptosis dan Nekrosis

Onway_Anova sel condrosit yang necrosis

ANOVA

NECROSIS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	156,067 ^a	2	78,033	11,744	,000
Within Groups	179,400	27	6,644		
Total	335,467	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NECROSIS

Tukey HSD

KEL. OMPOR	KEL. NELLUMADK	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
		Upper	Lower		Lower Bound	Upper Bound
A	B	3,4000 ^a	3,1128 ^b	,013	2,418	4,482
	C	5,0000 ^a	3,1128 ^b	,000	2,1418	8,2582
B	A	3,4000 ^a	3,1128 ^b	,013	4,482	2,418
	C	1,9000 ^a	3,1128 ^b	,243	3,562	4,782
C	A	1,5000 ^a	3,1128 ^b	,000	5,382	2,618
	B	1,9000 ^a	3,1128 ^b	,243	4,782	3,562

^a The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

NECROSIS

Tukey HSD^a

KEL. OMPOR	N	Subset for alpha = .05
C	10	3,4000
B	10	5,0000
A	10	3,9000
Sig		243

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,00.

Oneway_Anova sel condrosit yang apoptosis

ANOVA

APOP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	725.600 ^a	2	362.800	0.254	.776
Within Groups	4877.400	15	325.160		
Total	5603.000	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: APOP

Tukey HSD

KELompok	Jumlah APOP	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	10	1.9000*	.14071	.000	1.6193	2.1807
2	10	1.1000*	.14071	.000	.8193	1.3807
3	10	1.6000*	.14071	.000	1.3193	1.8807
4	10	1.1000*	.14071	.000	.8193	1.3807
5	10	1.6000*	.14071	.000	1.3193	1.8807

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

APOP

Tukey HSD

KELompok	N	Subsets for groups	
		1	2
1	10	1.9000	
2	10	1.1000	1.9000
3	10	1.6000	1.1000
4	10	1.1000	1.6000
5	10	1.6000	1.1000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Homkey. Mean Sample Size = 10.00

Lampiran 16 Data Perhitungan TGF- β 1 dan IGF-1 Sampel PasienHASIL PERHITUNGAN SAMPEL PASIEN TGF β 1 DAN IGF-1

Identitas	Tulang			Kadar						
	Nama	Usia (bl)	Sexs	Hb (gr%)	Luar defek		Tepi defek		Kontrol	
					TGF- β 1	IGF-1	TGF- β 1	IGF-1	TGF- β 1	IGF-1
Aiz	18	L	12.1	7	9	6	9	3	1	
Sof	12	L	10.6	8	6	4	3	1	1	
Dwr	4	L	15.1	7	7	4	3	4	1	
Alf	20	P	11.5	3	7	2	1	1	2	
Ger	48	L	11.2	2	3	1	2	2	1	
Ant	6	P	11.0	4	4	2	4	2	2	
Gal	36	L	12.1	6	7	5	6	3	4	
Am	11	P	11.9	5	6	4	3	4	4	

Lampiran 17 Anova TGF-β1 dan IGF-1 Sampel Pasien Meningekel

Oneway_ANOVA TGF β1

ANOVA

TGFB1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.667	2	20.833	6.101	.007
Within Groups	82.200	27	3.415		
Total	133.867	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TGFB1

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.00	.83	1.000	-2.05	2.05
	3	2.50*	.83	.014	.45	4.55
2	1	.00	.83	1.000	-2.05	2.05
	3	2.50*	.83	.014	.45	4.55
3	1	-2.50*	.83	.014	-4.55	-.45
	2	-2.50*	.83	.014	-4.55	-.45

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

TGFB1

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	10	2.60	
1	10		5.10
2	10		5.10
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000

Oneway_IGF I

ANOVA

IGF I

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.467	2	34.233	5.343	.011
Within Groups	173.000	27	6.407		
Total	241.467	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IGF I

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.20	1.13	.983	-2.61	3.01
	3	3.30*	1.13	.019	.49	6.11
2	1	-.20	1.13	.983	-3.01	2.61
	3	3.10*	1.13	.028	.29	5.91
3	1	-3.30*	1.13	.019	-6.11	-.49
	2	-3.10*	1.13	.028	-5.91	-.29

* The mean difference is significant at the .05 level

Homogeneous Subsets

IGF I

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	10	2.00	
2	10		5.10
1	10		5.30
Sig.		1.000	.983

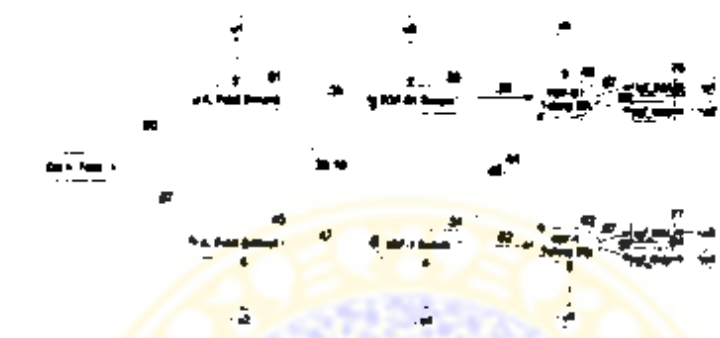
Means for groups in homogeneous subsets are displayed

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000

Lampiran 18 Hasil Analisis SEM (Structural Equation Modeling)

HASIL ANALISIS SEM

A. Pada Tahap : Hipotesis 1 dan 2



Regression Weights

		Estimate	S.F.	C.R.	P
Folat_Er	<-- Dist_III	0.233	0.021	10.95	0.000
Folat_Er	<-- Dist_III	4.168	1.822	4.494	0.000
TGFBI_K	<-- Folat_Er	0.303	0.171	1.771	0.077
IGF1_K	<-- Folat_Er	0.342	0.146	2.335	0.020
TGFBI_K	<-- Folat_Er	14.42	7.733	1.865	0.062
IGF1_K	<-- Folat_Er	5.257	6.441	0.791	0.429
TGF-BI_Tulang_Blk	<-- TGFBI_K	0.022	0.009	2.368	0.017
IGF-1_Tulang_Blk	<-- IGF1_K	0.028	0.007	3.931	0.000
TGF-RI_Tulang_Blk	<-- IGF1_K	0.034	0.011	3.067	0.002
TGF-RI_Tulang_Blk	<-- TGFBI_K	0.020	0.006	3.337	0.001
IGF-1_Tulang_Rik	<-- IGF-1_Tulang_Blk	1.111	0.160	6.957	0.000
IGF-1_Tulang_Blk	<-- IGF-1_Tulang_Blk	0.970	0.109	8.950	0.000
IGF-1_Tulang_Rik	<-- TGF-RI_Tulang_Blk	0.712	0.119	6.009	0.000
IGF-1_Tulang_Blk	<-- TGF-RI_Tulang_Blk	0.900	0.199	6.009	0.000

Standardized Regression Weights

	Estimate
Folat_Er <-- Dist_III	0.233
Folat_Er <-- Dist_III	0.571
TGFBI_K <-- Folat_Er	0.346
IGF1_K <-- Folat_Er	0.475
TGFBI_K <-- Folat_Er	0.25
IGF1_K <-- Folat_Er	0.155
TGF-BI_Tulang_Blk <-- TGFBI_K	0.161
IGF-1_Tulang_Blk <-- IGF1_K	0.157
TGF-RI_Tulang_Blk <-- IGF1_K	0.444
IGF-1_Tulang_Blk <-- TGFBI_K	0.418
IGF-1_Tulang_Rik <-- IGF-1_Tulang_Blk	0.975
IGF-1_Tulang_Blk <-- IGF-1_Tulang_Blk	0.969
IGF-1_Tulang_Rik <-- TGF-RI_Tulang_Blk	0.869
IGF-1_Tulang_Blk <-- TGF-RI_Tulang_Blk	0.977



FOLAT_B1
 FOLAT_B2
 FOLAT_B3
 FOLAT_B4
 FOLAT_B5
 FOLAT_B6
 FOLAT_B7
 FOLAT_B8
 FOLAT_B9
 FOLAT_B10
 FOLAT_B11
 FOLAT_B12
 FOLAT_B13
 FOLAT_B14
 FOLAT_B15
 FOLAT_B16
 FOLAT_B17
 FOLAT_B18
 FOLAT_B19
 FOLAT_B20

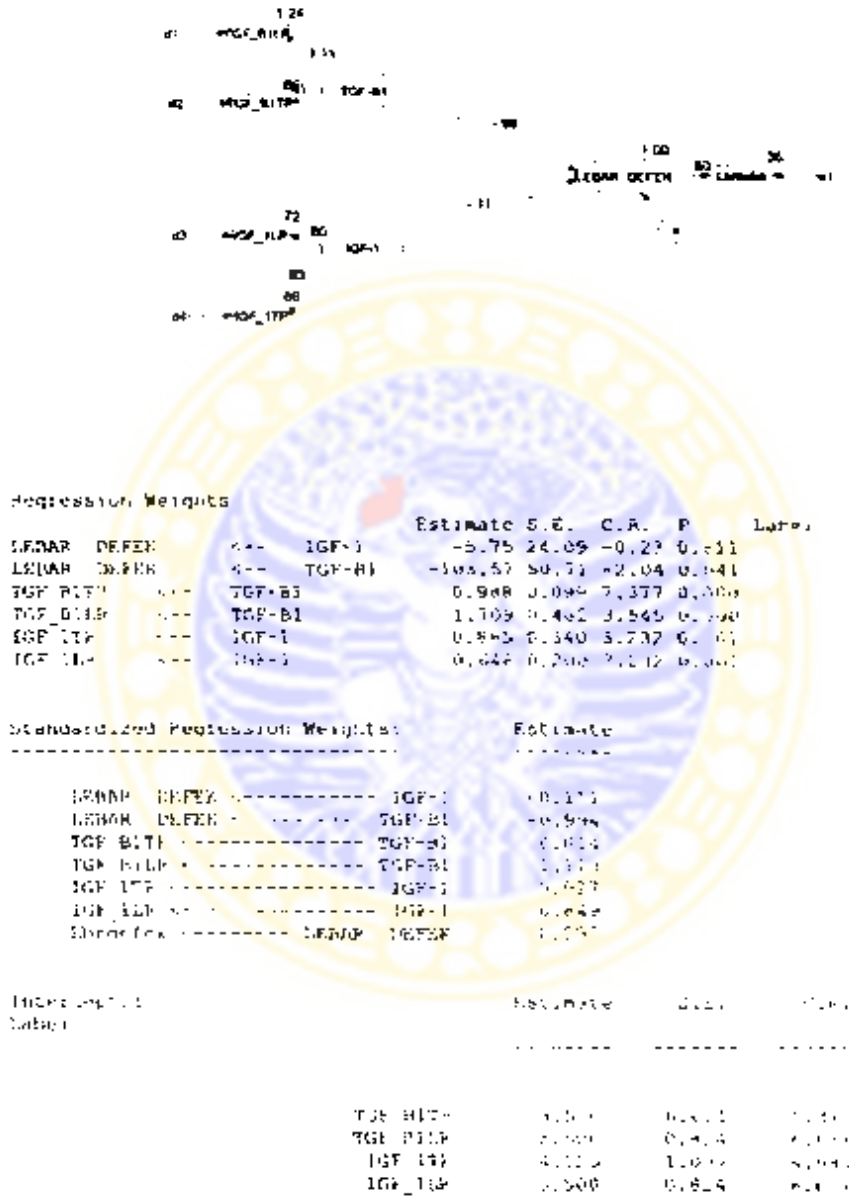
22

Square Multiple Correlations: FOLAT_B1 FOLAT_B2 FOLAT_B3 FOLAT_B4 FOLAT_B5 FOLAT_B6 FOLAT_B7 FOLAT_B8 FOLAT_B9 FOLAT_B10 FOLAT_B11 FOLAT_B12 FOLAT_B13 FOLAT_B14 FOLAT_B15 FOLAT_B16 FOLAT_B17 FOLAT_B18 FOLAT_B19 FOLAT_B20

Variable	FOLAT_B1	FOLAT_B2	FOLAT_B3	FOLAT_B4	FOLAT_B5	FOLAT_B6	FOLAT_B7	FOLAT_B8	FOLAT_B9	FOLAT_B10	FOLAT_B11	FOLAT_B12	FOLAT_B13	FOLAT_B14	FOLAT_B15	FOLAT_B16	FOLAT_B17	FOLAT_B18	FOLAT_B19	FOLAT_B20
FOLAT_B1	1																			
FOLAT_B2		1																		
FOLAT_B3			1																	
FOLAT_B4				1																
FOLAT_B5					1															
FOLAT_B6						1														
FOLAT_B7							1													
FOLAT_B8								1												
FOLAT_B9									1											
FOLAT_B10										1										
FOLAT_B11											1									
FOLAT_B12												1								
FOLAT_B13													1							
FOLAT_B14														1						
FOLAT_B15															1					
FOLAT_B16																1				
FOLAT_B17																	1			
FOLAT_B18																		1		
FOLAT_B19																			1	
FOLAT_B20																				1

B. Pada Pasien : Hipotesis 3

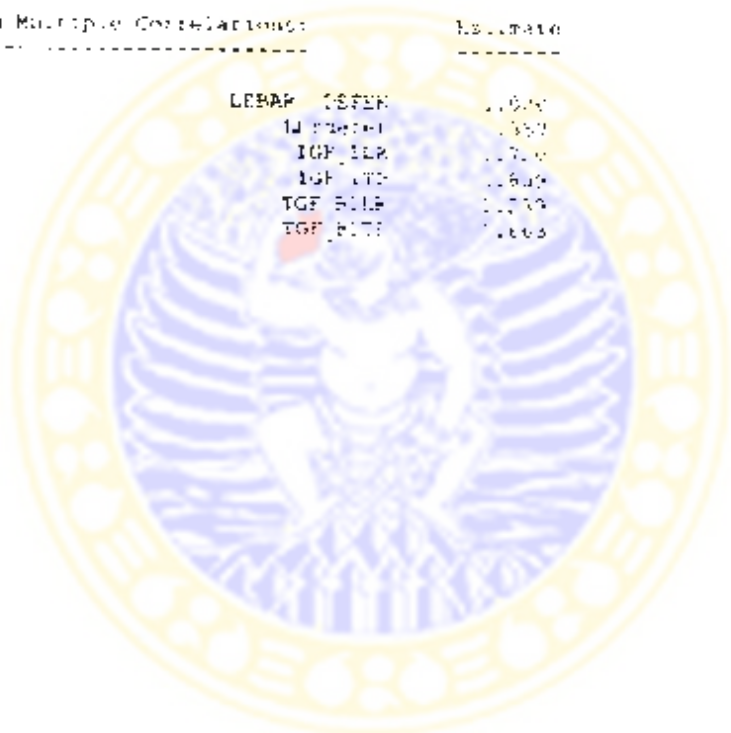
B.1 Pada Pasien : Variabel TGF-B1 dan IGF-1 tanpa Perancu



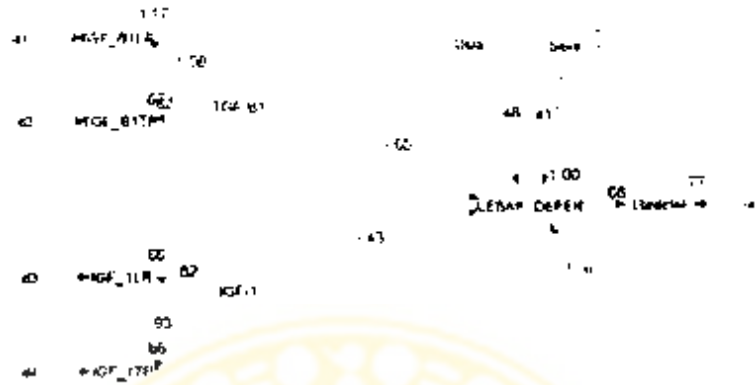
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Total	300,449 ^a	312			
Corrected Model	11,577	6	1,929	6,357	,000 [*]
Corrected Total	288,872	306			
Corrected Model	11,577	6	1,929	6,357	,000 [*]
Corrected Total	277,295	300			
Corrected Model	11,577	6	1,929	6,357	,000 [*]
Corrected Total	265,718	294			
Corrected Model	11,577	6	1,929	6,357	,000 [*]

Squared Multiple Correlations

	Estimate
LEBAP	,107 [*]
IGF1 [beta]	,133 [*]
IGF1LR	,171 [*]
IGF1IG	,160 [*]
IGF1LR	,153 [*]
IGF1IG	,166 [*]



B.2 Pada Pasien : Variabel TGF-B1 dan TGF-I dengan Perancu



Regression Weights

	Estimate	S.E.	C.R.	P	
LEBAR DEFEK <--	TGF-I	-27.802	12.436	-2.236	0.025
LEBAR DEFEK <--	TGF-B1	-81.608	31.969	-2.555	0.009
LEBAR DEFEK <--	Usia	6.352	2.300	2.761	0.006
LEBAR DEFEK <--	Sexs	152.513	65.827	2.317	0.021
TGF_B1TP <--	TGF-B1	0.988	0.154	6.470	0.000
TGF_B1LR <--	TGF-B1	1.618	0.471	3.435	0.000
TGF_I <--	TGF-I	0.865	0.405	2.134	0.037
TGF_I <--	TGF-I	0.623	0.264	2.356	0.012

Unstandardized Regression Weights

	Estimate
LEBAR DEFEK <--	0.000
LEBAR DEFEK <--	0.000
LEBAR DEFEK <--	0.000
LEBAR DEFEK <--	0.000
TGF_B1TP <--	0.000
TGF_B1LR <--	0.000
TGF_I <--	0.000
TGF_I <--	0.000

Model Summary

Model	R	Adjusted R	Delta R	Adjusted Delta R
1	.712 ^a	.673		
2	.750 ^a	.711	.038	.038
3	.763 ^a	.721	.013	.013
4	.767 ^a	.724	.004	.004
5	.768 ^a	.725	.001	.001

Interkorelasi

	LEBAR DAFTAR	LEBAR KOPAK	LEBAR KOPAK	LEBAR KOPAK
LEBAR DAFTAR	1	0,307	0,307	0,307
LEBAR KOPAK	0,307	1	0,307	0,307
LEBAR KOPAK	0,307	0,307	1	0,307
LEBAR KOPAK	0,307	0,307	0,307	1

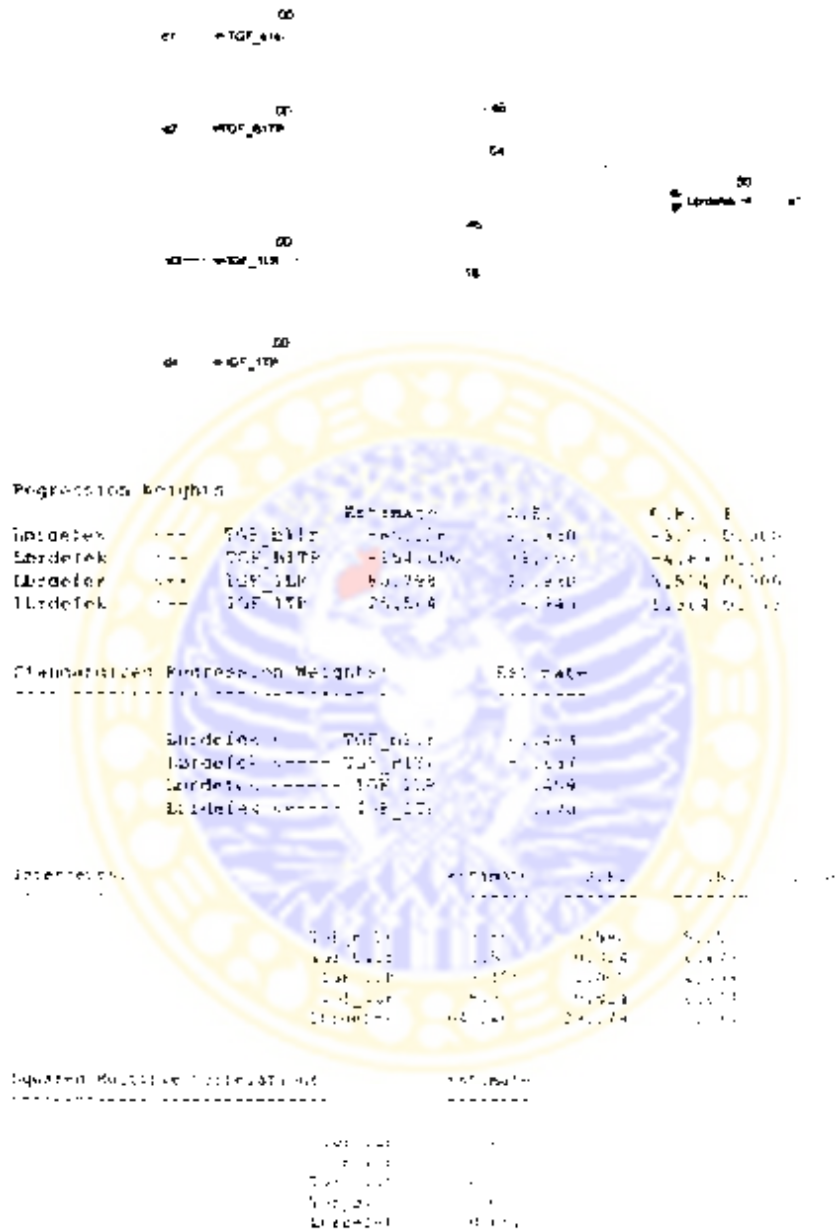
Squared Multiple Correlations:

Dependent	Independent	R Square
LEBAR DAFTAR	LEBAR KOPAK	0,094
LEBAR KOPAK	LEBAR DAFTAR	0,094
LEBAR KOPAK	LEBAR KOPAK	0,094
LEBAR DAFTAR	LEBAR DAFTAR	0,094
LEBAR DAFTAR	LEBAR KOPAK	0,094



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUKRA BAYA

B.3 Pada Pasien : Variabel TGF-B1 dan IGF-I (depan dan belakang) tanpa Perancu



Res Pada Pasien : Variabel TG, F-BI dan IGF-1 (depan dan belakang) dengan Peranan

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1. Model	100,000 ^a	1	100,000	22,14	,000
2. Model	100,000 ^a	2	50,000	11,15	,000
3. Model	100,000 ^a	3	33,333	7,42	,000
4. Model	100,000 ^a	4	25,000	5,57	,000

a. R Squared = .999

Regressikan Berganda

Model	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	T	Sig.
1. (Constant)	174,379		1,13	,259
1. (IGF_b11r)	-119,113	-.7624	-11,626	,000
1. (IGF_b11P)	100,654	.551	10,169	,000
1. (IGF_b11R)	120,659	.4521	15,277	,000
1. (Sex)	305,193	.24111	4,197	,000
1. (usia)	-8,014	-.043	-.511	,608

Adjusted R Square: .999

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1. Model	100,000	1	100,000	22,14	,000
2. Model	100,000	2	50,000	11,15	,000
3. Model	100,000	3	33,333	7,42	,000
4. Model	100,000	4	25,000	5,57	,000
5. Model	100,000	5	20,000	4,46	,000

Adjusted R Square: .999

Adjusted R Square: .999

Squaring Principle	Estimated Value	Estimated Value
100 - 118	-0,1800	-0,1800
100 - 100	-0,0000	-0,0000
100 - 82	-0,1800	-0,1800
100 - 82	-0,1800	-0,1800
100 - 82	-0,1800	-0,1800



A. Analisis Deskriptif

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Usia	8	4	48	19.38	15.30
Hb	8	10.5	15.1	11.938	1.387
TGF-B1 Luar Defek	8	2	8	5.50	2.33
IGF-1 Luar Defek	8	2	9	5.50	2.33
TGF-B1 Tepi Defek	8	1	6	3.50	1.69
IGF-1 Tepi Defek	8	1	9	4.13	2.85
Lebar Defek	8	15.7486	835.7880	189.824800	273.405139
Valid N (listwise)	8				

Report Asam Folat di Entrosa					
Perlakuan: Dili Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	9	515.2	742.5	82.002	632.144
B	7	656.9	1176.7	160.043	871.014
C	8	656.3	1311.3	207.818	952.213
Total	24	515.2	1311.3	209.120	811.638

Report Asam Folat di Serum					
Perlakuan: Dili Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	3.7	8.8	1.957	6.340
B	10	11.1	15.3	1.345	13.480
C	10	14.8	18.8	1.158	15.640
Total	30	3.7	18.8	4.303	11.820

Report Konsentrasi 13d-13l					
Perlakuan: Dili Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	489	739	109.08	602.00
B	10	533	1073	144.06	752.20
C	10	561	1153	205.26	810.60
Total	30	489	1153	176.62	721.60

Report Konsentrasi 10d-10l					
Perlakuan: Dili Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	3658.0	4048.0	130.343	3889.000
B	10	3675.5	4180.5	141.490	4031.900
C	10	3930.5	4198.0	73.075	4099.600
Total	30	3658.0	4198.0	145.372	4037.167

Report
Kadar IGI-BI Tulang Kepala Belakang

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	5	16	4.00	10.00
B	10	10	29	5.83	22.00
C	10	18	32	4.38	20.50
Total	30	5	32	8.46	19.50

Report
Kadar IGI-I Tulang Kepala Belakang

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	3	9	1.83	6.00
B	10	9	29	7.27	17.20
C	10	18	32	4.85	26.20
Total	30	3	32	9.77	16.47

Report
Kadar IGI-BI Tulang Kepala Depan

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	2	11	2.71	8.00
B	10	17	27	3.16	21.80
C	10	21	48	8.06	29.30
Total	30	2	49	10.30	15.70

Report
Kadar IGI-I Tulang Kepala Depan

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Mean
A	10	2	9	2.64	5.70
B	10	13	23	3.01	17.60
C	10	14	31	5.27	21.00
Total	30	2	31	7.64	14.63

II. MANOVA

General Linear Model

Between-Subjects Factor			
		Value Label	N
Perlakuan: Dint Asam Folat	1	A	9
	2	B	9
	3	C	9

Multivariate Test(s)						
Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	
Intercept	Pillai's Trace	1.000	3842.775(a)	8.000	14.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	3842.775(a)	8.000	14.000	.000
	Hotelling's Trace	2195.672	3842.775(a)	8.000	14.000	.000
	Roy's Largest Root	2195.672	3842.775(a)	8.000	14.000	.000
TREATMEN	Pillai's Trace	1.254	3.154	16.000	30.000	.003
	Wilks' Lambda	.029	8.592(a)	16.000	26.000	.000
	Hotelling's Trace	24.038	19.531	16.000	26.000	.000
	Roy's Largest Root	23.620	44.287(b)	8.000	15.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level

c. Desgn. Intercept+TREATMEN

Tests of Between-Subjects Effects						
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TREATMEN	Asam Folat di Eritrosit	496020.717	2	248010.358	10.216	.001
	Asam Folat di Serum	359.542	2	179.771	57.527	.000
	Konsentrasi TGF-B1	177403.857	2	88701.928	3.477	.050
	Konsentrasi IGF-1	254401.808	2	127200.904	7.516	.003
	Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Belakang	1374.236	2	687.118	31.117	.000
	Kadar IGF-1 Tulang Kepala Belakang	1641.678	2	820.904	30.023	.000
	Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Depan	2111.671	2	1055.835	32.450	.000
	Kadar IGF-1 Tulang Kepala Depan	1074.046	2	537.023	33.506	.000
	Error	Asam Folat di Eritrosit	509796.620	21	24276.030	
Asam Folat di Serum		38.061	21	1.813		
Konsentrasi TGF-B1		535720.603	21	25510.791		
Konsentrasi IGF-1		307476.217	21	14607.917		
Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Belakang		433.122	21	20.625		
Kadar IGF-1 Tulang Kepala Belakang		574.190	21	27.342		

	Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Depan	4912107	24	3915.09
	Kadar IGF-1 Tulang Kepala Depan	3365479	24	16.030
	Asam Folat di Eritrosit	16823740.370	24	
	Asam Folat di Serum	3407149	24	
	Konsentrasi TGF-B1	13319402.000	24	
	Konsentrasi IGF-1	385576528.500	24	
Total	Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Belakang	10313.000	24	
	Kadar IGF-1 Tulang Kepala Belakang	8.920.000	24	
	Kadar TGF-B1 Tulang Kepala Depan	11457.000	24	
	Kadar IGF-1 Tulang Kepala Depan	6199.000	24	

- a. R Squared = 413 (Adjusted R Squared = 445)
- b. R Squared = 503 (Adjusted R Squared = 894)
- c. R Squared = 249 (Adjusted R Squared = 177)
- d. R Squared = 430 (Adjusted R Squared = 376)
- e. R Squared = 748 (Adjusted R Squared = 724)
- f. R Squared = 741 (Adjusted R Squared = 716)
- g. R Squared = 756 (Adjusted R Squared = 732)
- h. R Squared = 761 (Adjusted R Squared = 730)

Multiple Comparisons
Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan: Dilut Asam Folat	(J) Perlakuan: Dilut Asam Folat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Asam Folat di Eritrosit	A	B	238.870(*)	78.520	.016
		C	330.058(*)	75.769	.001
		B	238.870(*)	78.520	.016
	B	A	-91.198	80.638	.506
		C	330.058(*)	75.769	.001
		B	91.198	80.638	.506
Asam Folat di Serum	A	B	-6.871(*)	97.6	.000
		C	8.612(*)	97.6	.000
		A	6.871(*)	97.6	.000
	B	C	7.741	99.7	.052
		A	8.612(*)	97.6	.000
		B	7.741	99.7	.052
Konsentrasi TGF-B1	A	B	185.107	18.419	.026
		C	168.89	17.61	.039
		A	186.32	18.419	.026
	B	A	17.43	81.66	.985
		C	159.185	17.61	.022
		B	17.43	81.66	.985
Konsentrasi IGF-1	A	B	146.175	63.886	.040
		C	242.836(*)	63.886	.002
		A	146.175	63.886	.040
	B	A	146.175	63.886	.040
		C	18.664	12.128	.325
		B	146.175	63.886	.040

Kadar TGF-β1 Tulang Kepala Belakang	C	A	242.639(*)	61.599	.002
		B	96.464	65.609	.375
	A	B	-11.44(*)	2.37	.000
		C	-17.69(*)	2.28	.000
	B	A	11.44(*)	2.37	.000
		C	-5.25(*)	2.43	.045
Kadar IGF-1 Tulang Kepala Belakang	C	A	17.69(*)	2.28	.000
		B	6.25(*)	2.43	.045
	A	B	-11.60(*)	2.64	.001
		C	-19.51(*)	2.54	.000
	B	A	11.60(*)	2.64	.001
		C	-7.91(*)	2.71	.021
Kadar TGF-β1 Tulang Kepala Depan	C	A	19.51(*)	2.54	.000
		B	7.91(*)	2.71	.021
	A	B	-13.37(*)	2.87	.000
		C	-22.10(*)	2.77	.000
	B	A	13.37(*)	2.87	.000
		C	-8.73(*)	2.95	.020
Kadar IGF-1 Tulang Kepala Depan	C	A	22.10(*)	2.77	.000
		B	8.73(*)	2.95	.020
	A	B	-12.59(*)	2.02	.000
		C	-14.69(*)	1.95	.000
	B	A	12.59(*)	2.02	.000
		C	-2.11	2.07	.575
	A	14.69(*)	1.95	.000	
	B	2.11	2.07	.575	

Used on observed means
 * The mean difference is significant at the .05 level.

Asam Folat di Eritrosit
Tukey HSD

Perlakuan: Dtit Asam Folat	N	Subset	
		1	2
A	9	632.141	
B	7		871.014
C	8		952.213
Sig.		1.000	.487

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on Type III Sum of Squares.
 The error term is Mean Square(Error) = 24276.030.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916.
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
 c. Alpha = .05.

Kadar IGF-III Tulang Kepala Belakang
Tukey HSD

Perlakuan: Dirit Asam Folat	N	Subset		
		1	2	3
A	9	9.56		
B	7		21.00	
C	8			27.25
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 22.082.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916.
b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c Alpha = .05.

Kadar IGF-I Tulang Kepala Belakang
Tukey HSD

Perlakuan: Dirit Asam Folat	N	Subset		
		1	2	3
A	9	6.11		
B	7		17.71	
C	8			25.63
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 27.342.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916.
b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c Alpha = .05.

Asam Folat di Serum
Tukey HSD

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Subset		
		1	2	3
A	9	6.700		
B	7		13.571	
C	8			15.313
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 1.013
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c. Alpha = .05.

Konentrasi UGF-HI
Tukey HSD

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Subset
		1
A	9	614.11
C	8	783.00
B	7	800.43
Sig.		.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 25510.791
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c. Alpha = .05.

Konentrasi UGF-I
Tukey HSD

Perlakuan: Diit Asam Folat	N	Subset	
		1	2
A	9	3851.511	
B	7	4027.786	4027.786
C	8		4124.250
Sig.		.079	.306

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 16070.301
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.916
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c. Alpha = .05.

Kadar TGF-III Tulang Kepala Depan
Tukey HSD

Perlakuan: Dilt Asam Folat	N	Subset		
		1	2	3
A	9	7,78		
B	7		21,14	
C	6			29,86
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 32,538

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7,916

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = 05

Kadar IGF-I Tulang Kepala Depan
Tukey HSD

Perlakuan: Dilt Asam Folat	N	Subset	
		1	2
A	9	5,56	
B	7		18,14
C	8		20,25
Sig.		1,000	556

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 16,028

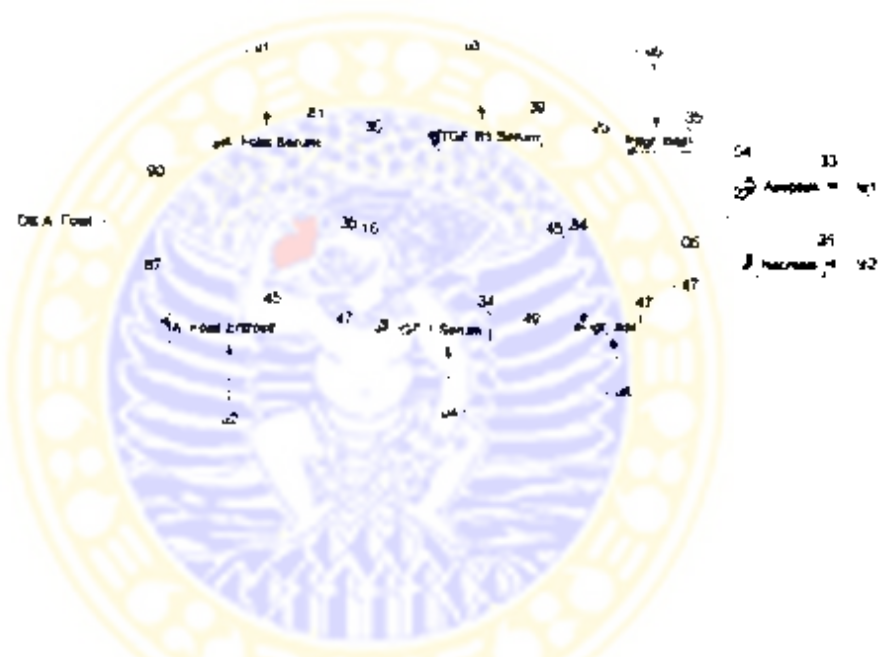
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7,916.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = 05

Squared Multiple Correlations	Estimate
IGF1	0,000
IGFBP1	0,000
IGFBP2	0,000
IGFBP3	0,000
IGFBP4	0,990

C. Pada Tikus : Apoptosis dan Necrosis



Regression Weights						
		Estimate	S.E.	C.H.	P	Label
Folikel_Sr	Dua_Fol	0,233	0,071	3,305	0,000	
Folikel_Fr	Dua_Fol	0,166	1,822	4,494	0,000	
IGFBP1	Folikel_La	0,303	0,071	4,271	0,000	
IGFBP1	Folikel_Ya	0,342	0,146	2,335	0,020	
IGFBP1	Folikel_Sr	14,422	7,733	1,865	0,062	
IGFBP1	Folikel_Sr	5,257	0,647	8,121	0,000	
igf1_kkbl	IGFBP1	0,012	0,008	1,509	0,112	
igf1_kkbl	IGFBP1	0,034	0,010	3,425	0,000	
igf1_kkbl	IGFBP1	0,027	0,009	2,885	0,004	
igf1_kkbl	IGFBP1	0,009	0,008	1,125	0,258	
Necrosis	igf1_kkbl	-0,155	0,054	-2,865	0,004	
Apoptosis	igf1_kkbl	-0,132	0,083	-1,585	0,112	
Apoptosis	igf1_kkbl	-0,111	0,096	-1,130	0,258	
Necrosis	igf1_kkbl	-0,185	0,065	-2,840	0,004	



Standardized Regression Weights

	Estimate
Folat_Sr	0.897
Folat_Er	0.673
TGFB1	0.346
IGF1	0.475
TGFB1_K	0.351
igf_ikb1	0.175
igf_ikb1	0.254
igf_ikb1	0.492
igf_ikb1	0.454
Necrosis	0.339
Apopusis	-0.469
Apopusis	-0.064
Necrosis	-0.541
Necrosis	-0.219

Squared Multiple Correlations

	Estimate
Folat_Er	0.453
Folat_Sr	0.805
IGF1	0.339
TGFB1	0.390
igf_ikb1	0.475
igf_ikb1	0.352
Apopusis	0.325
Necrosis	0.352

Lampiran 19 Surat Telah Melakukan Penelitian di Lab. Biomedik

SURAT TELAH MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertandatangan dibawah ini

Nama Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK
Jabatan Kepala Laboratorium Sentral BIOMEDIK
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

menerangkan bahwa

Nama Moch Istiadjid E S
NIM 099813103 - D
Pekerjaan Mahasiswa Program S3 Lulusan Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

telah melakukan pemeriksaan

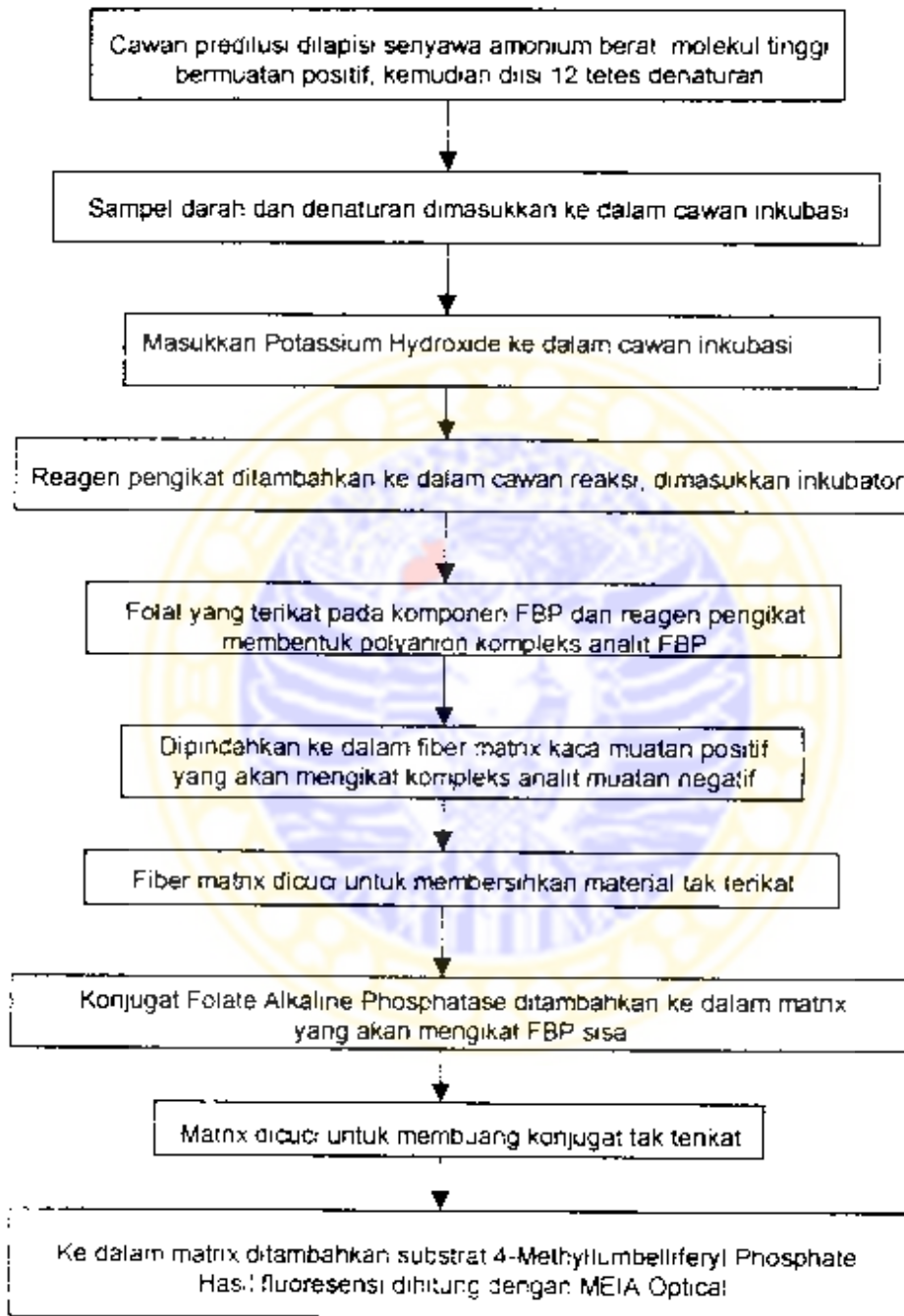
IGF I dan TGF β 1 pada sample serum darah dengan metode ELISA dan pada jaringan kepala tikus *Rattus norvegicus* Wistar serta pada pasien meningokel dengan metode immunohistokimia.

Demikian surat ini dibuat untuk digunakan sebagai mana mestinya

Malang 11 Februari 2004
Ka Lab Sentral BIOMEDIK

Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK
NIP. 130 808 130

Lampiran 20 Bagan Pemeriksaan Kadar Asam Folat dalam Darah Tikus (RIA)



Lampiran 21 Prosedur Pemeriksaan *TGF- β 1* / *IGF-I* Darah Tikus (*Elisa*)

1. Penyiapan Reagen

Encerkkan isi vial (10x conc.) dg 90 ml aquadest, diperoleh 100 ml Working Assay Buffer

Encerkkan 100 ml cairan pembersih dg 900 ml aquaset, simpan dalam 2-8°C selama 6 minggu

Encerkkan Stock Standard (600 pg/ml), simpan 2-8°C selama 8 minggu. Untuk penyimpanan lebih lama, bekukan dalam -20°C

2. Penyiapan Sampel

Sampel (eritrosit, serum) diencerkan 1:50 dengan Assay Buffer (dengan demikian hasil pemeriksaan harus dikalikan 50)

Asidifikasi dan Netralisasi Sampel dan Standard

- Tambahkan 200 μ l Sampel encer ke dalam tabung reaksi (Eppendorf)
- Tambahkan 20 μ l 1 N HCL ke dalam seluruh tabung
- Campur dan diamkan selama 15'
- Tambahkan 20 μ l 1N NaOH untuk netralisasi
- Setelah netralisasi, pH sampel dipertahankan antara 7 – 8

3. Prosedur Pemeriksaan

1. Pastikan jumlah cekungan mikrotiter dalam rak, kemudian tutup rapat
2. Masukkan dengan pipet 100 μ l Standard yg telah disiapkan (asidifikasi dan netralisasi) dan Sampel (pengenceran 1:50) ke dalam cekungan
3. Inkubasi 8-16 jam, suhu 4°C
4. Isi cekungan dikocok dengan cepat. Bilas 3X dengan cairan pembilas encer, 350 ul per-cekungan. Buang sisa tetesan dengan kertas penghisap
5. Teteskan 100 ul Spec. Antibody ke dalam seluruh cekungan
6. Inkubasi selama 2 jam dalam suhu kamar

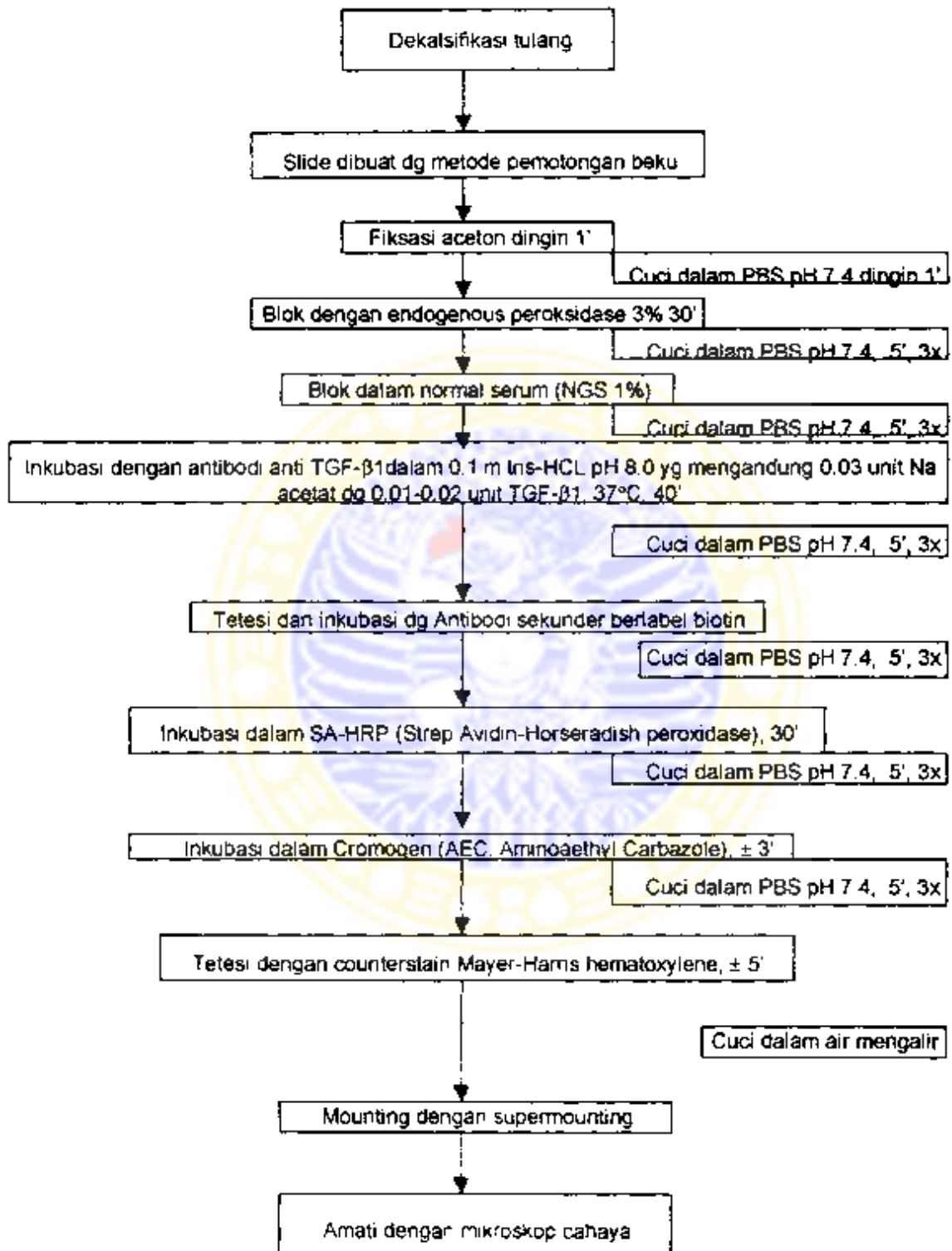
7. Kocok cepat, bilas 3X, buang sisa tetesan dengan kertas hisap
8. Teteskan 100 μ l konjugat (Anti Mouse Biotin ke dalam tiap cekungan
9. Inkubasi 45' dalam suhu kamar
10. Kocok cepat, bilas 3X, buang sisa tetesan dengan kertas hisap
11. Teteskan 100 μ l Kompleks Enzim ke dalam setiap cekungan
13. Kocok cepat, bilas 3X, buang sisa tetesan dengan kertas hisap
14. Teteskan 100 μ l larutan Substrat (TMB) ke dalam tiap cekungan
15. Inkubasi 15' dalam suhu kamar
16. Tambahkan 50 μ l larutan *Stopp* ke dalam tiap cekungan dengan interval waktu sama dengan langkah 14
17. Tentukan absorbansi tiap cekungan pada 450 ± 10 nm, 10' setelah penambahan larutan *Stopp*.

4. Penghitungan Hasil

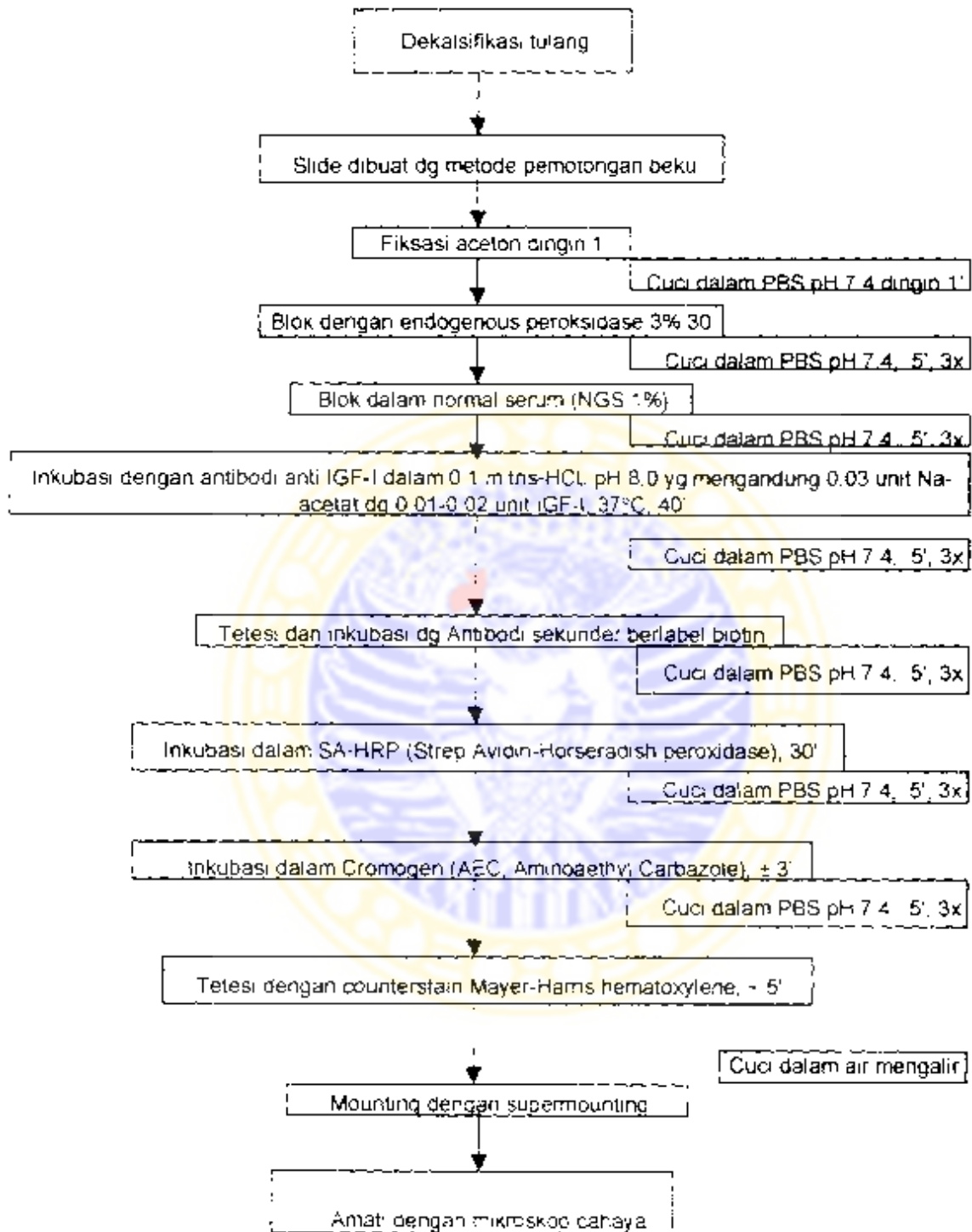
1. Menggunakan kertas linear-linear atau semi-log graph, susun kurva baku dengan meletakkan rerata absorbansi (Y) pada setiap tingkat acuan-baku rerata konsentrasi (X) *TGF- β 1/IGF-I*, dalam ng/ml. Untuk menyusun kurva baku dianjurkan memakai fungsi logistik *four parameter*
2. Gunakan nilai rerata absorbansi setiap sampel eritrosit/serum untuk menentukan kadar *TGF- β 1/IGF-I* dengan interpolasi sederhana dari kurva baku, dikalikan dengan derajat pengenceran

Digunakan program komputer : *DRG ELISA MAT 3000* dan *DRG Regression Programe*

Lampiran 22 Bagan Pemeriksaan TGF-β1 Tulang Metode Imunohistokimia



Lampiran 23 Bagan Pemeriksaan IGF-I Tulang Metode Imunohistokimia



Lampiran 24 Bagan Pemeriksaan Apoptosis/Nekrosis Metode Imunohistokimia

