

AMOUNT APOPTOTIC TROPHOBLAST CELLS IN PRE ECLAMPSIA/ ECLAMPSIA ARE HIGHER THAN THOSE IN NORMAL PREGNAN

JUMLAH SEL TROFOBLAS YANG MENGALAMI APOPTOSIS PADA PRE EKLAMPSIA/EKLAMPSIA LEBIH TINGGI DIBANDINGKAN KEHAMILAN NORMAL

Kusnarman Keman*, Nugrahanti Prasetyorini*, Madeline J. Langgar**

* Laboaratorium Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/ RS. Dr. Saiful Anwar

** Divisi Fetomaternal SMF / Lab Obstetri Ginekologi RS. Dr Saiful Anwar

ABSTRACT

Hypoxia exposed trophoblast cells will cause apoptotic process, that correlate with up-regulation of p53 and Bax protein expression; and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein. Apoptotic process and up-regulation of p52, and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2; also find both on trophoblastic sample from preeclampsia/ eclampsia complicated pregnancy, and normal pregnancy. The aim of this study is, to prove that the amount of apoptotic trophoblast cells on trophoblast tissue sample from preeclampsia/ eclampsia complicated pregnancy, were higher then those of normal pregnancy. This research was laboratory cross sectional study, that observed immunohistochemically, p53 and Bcl-2 protein expression; also the DNA-fragmented technically (TUNEL) to detect apoptotic cells on trophoblastic samples from preeclampsia/ eclampsia complicated pregnancy, compare by the normal pregnancy. On this study, we found that the amount of trophoblast cells that expressed of p53 protein (22.70 ± 2.90), were higher then those of normal pregnancy. (8.2 ± 4.99). The different was statistically significant. (t test; $p \leq 0.000$). We also found that an apoptotic process on trophoblast cells of preeclampsia/ eclampsia placenta ($15.3 \pm 3,56$) were higher then those of normal pregnancy (4.7 ± 1.89). The different was statistically significant. (t test; $p \leq 0.000$). While the amount of trophoblast cells expressed of Bcl-2 protein, were higher on trophoblast tissue sample from normal pregnancy (20.3 ± 5.77) then those of preeclampsia/ eclampsia (9.9 ± 1.91). The different was statistically significant. (t test; $p \leq 0.000$). This finding concluded, that the amount of trophoblast cells that were apoptotic on trophoblast tissue of preeclampsia/ eclampsia complicated pregnancy, were higher then those of normal pregnancy.

Keywords: trophoblast, apoptotic process, p53, Bcl-2, preeclampsia/ eclampsia

PENDAHULUAN

Preeklampsia terjadi pada 5-7 % kehamilan dan menjadi penyebab utama mortalitas dan morbiditas pada maternal. Frekuensi preeklampsia/eklampsia tiap negara berbeda. Di Indonesia dilaporkan berkisar 3-10 %. Di RS dr.Saiful Anwar Malang, pada tahun 2006 terdapat sekitar 321 kasus preeklampsia dan 72 kasus eklampsia, dari 2.588 persalinan (1,2,3).

Preeklampsia / eklampsia sampai saat ini masih merupakan *disease of theory*. Berbagai macam penelitian belum dapat menerangkan dengan jelas penyebab pasti preeklampsia/ eklampsia. Akibatnya, sampai saat ini belum ada pengobatan definitif pada kelainan ini (2,4). Banyak teori telah dikemukakan tentang terjadinya hipertensi dalam kehamilan, namun tidak satupun teori tersebut yang dianggap mutlak benar. Menurut Sibai, teori yang banyak dianut adalah: (1) teori kelainan vaskularisasi plasenta; (2) teori iskemia plasenta, radikal bebas dan disfungsi endotel; (3) teori intoleransi imunologik antara ibu dan

janin; (4) teori adaptasi kardiovaskuler; (5) teori defisiensi genetik; (6) teori defisiensi gizi; (7) teori inflamasi (1,4).

Menurut teori iskemia plasenta, patogenesis preeklampsia terdapat hubungan antara iskemia plasenta dan disfungsi sel endothel. Kerusakan endothel sistemik tampak menjadi faktor utama gejala dan tanda dari preeklampsia. Salah satu teori yang dikemukakan oleh Redman dan Sargent adalah kerusakan endothelial sistemik disebabkan oleh mikrodeposisi dari partikel membran mikrovili sinsitiotrofoblas (5). Peningkatan perpindahan sinsitiotrofoblas pada preeklampsia dapat disebabkan oleh apoptosis pada sinsitium, yang berefek pada integritas jaringan. Ditengarai apoptosis berperan penting pada proses pembaharuan sinsitium. Nukleus apoptotik ditemukan pada sekelompok sinsisial dan mungkin berperan pada proses pelepasan fragmen ke sirkulasi maternal. Proses ini berlangsung di sinsitium plasenta pada pasien preeklampsia. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa, proses apoptosis plasenta meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya usia kehamilan, kehamilan dengan komplikasi preeklampsia, dan IUGR (*Intra Uterine Growth Retardation*) (6,7,8). Peningkatan apoptosis

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No. 2, Agustus 2008 Korespondensi: Kusnarman Keman; Laboratorium Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSU. Dr. Saiful Anwar; Telp. (0341) 569117

yang dilaporkan terjadi pada preeklampsia berhubungan dengan mekanisme yang terkait dengan patogenesis preeklampsia/ eklampsia, dimana proses apoptosis distimulasi oleh berkurangnya oksigenasi plasenta yang menyertai penyakit ini (1,9).

Trofoblas yang terpapar hipoksia secara invitro menyebabkan ikatan apoptosis proses, yang berhubungan dengan peningkatan ekspresi protein p53 dan Bax, serta penurunan ekspresi anti apoptotic Bcl-2. Ikatan apoptosis dan regulasi ke atas dari p53 juga ditemukan di sampel plasenta yang diambil dari kehamilan dan komplikasi preeklampsia (1,5). Peneliti sebelumnya melaporkan adanya peningkatan index apoptosis (Bax/Bcl-2) pada plasenta tikus percobaan dengan preeklampsia (10). Peneliti lain melaporkan bahwa, pada kelompok kontrol dengan kondisi normal menunjukkan hampir tidak terjadi apoptosis; tetapi pada kelompok wanita dengan preeklampsia, sekitar 15%-50% sitotrofoblas pada dinding uterusnya positif mengalami apoptosis (11). Penelitian lain membuktikan bahwa, terjadi peningkatan apoptosis pada sinsitiotrofoblast plasenta pada preeklampsia dengan bayi kecil usia kehamilan (9). Hasil penelitian lain menunjukkan adanya ekspresi p53 yang meningkat pada plasenta dari kehamilan dengan komplikasi IUGR (8,12). Peneliti sebelumnya juga melaporkan terjadinya peningkatan kejadian apoptosis dihubungkan dengan ekspresi p53 pada plasenta preeklampsia (13).

Beberapa penelitian mengenai *marker* biokimia preeklampsia dan proses apoptosis telah banyak dilakukan untuk menggali patogenesis preeklampsia / eklampsia. Namun masih banyak juga kontroversi dalam hal ini. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk membandingkan proses apoptosis pada plasenta preeklampsia / eklampsia dan plasenta kehamilan normal dengan mengukur index apoptosis, dan melihat ekspresi p53, dan Bcl-2 pada sel trofoblas placenta.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi laboratorium secara potong lintang. Pengamatan ekspresi protein Bcl-2 dan p53, dikerjakan secara teknik imunohistokimia. Teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL) digunakan untuk menghitung index apoptosis. Sampel jaringan trofoblas berasal dari biopsi jaringan plasenta preeklampsia/ eklampsia (n= 10), dibandingkan dengan persalinan normal (n= 10). Penelitian ini dilakukan di Bagiam Obstetri dan Ginekologi RS Dr Saiful Anwar, dan Laboratorium Sentral Biomedik FKUB Malang.

Pembuatan Slide Jaringan

Jaringan trofoblas hasil biopsi difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit.

Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6um dengan rotary microtome. Dilakukan mounting pada gelas objek dengan gelatin 5%. gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH₂O selama 5 menit.

Imunohistokimia

Protein p53

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. *Blocking* endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti p53 (*wild-tipe*), selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan anti rabbit HRP conjugated selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Ditetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Dicuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water*. Dibilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan *cover glass*. Diamati pada mikroskop cahaya. Ekspresi p53 ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma.

Protein BCl-2

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti Bcl-2, selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan anti rabbit HRP conjugated selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Ditetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Dicuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water*. Dibilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan. *Mounting*

menggunakan entelan dan tutup dengan *cover glass*. Diamati pada mikroskop cahaya. Ekspresi Bcl-2 ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma.

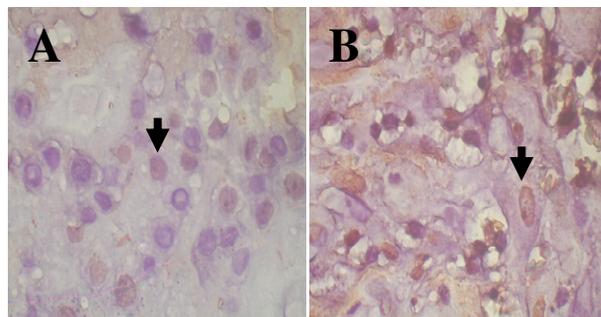
Teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL)

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inkubasi menggunakan 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi pada 3% H₂O₂ selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Dinkubasi dengan Tunel fragmented DNA labelling selama 60 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Dinkubasi dengan Peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB – Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan Counterstain dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH₂O. Dikeringkan dan tutup *cover glass*. Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel.

HASIL PENELITIAN

Pengamatan Sel Apoptosis dengan Teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL)

Beberapa aspek apoptosis pada sel, dapat dikarakterisasi melalui morfologi seluler, yang bisa diamati dengan menggunakan mikroskop, meliputi *shrinkage*, migrasi kromatin dan membran blebing, kondensasi inti serta kemudian segmentasi dan pemisahan menjadi *apoptotic bodies* (yang akan mengalami fagositosis). Fragmentasi DNA yang terjadi pada proses apoptosis akan berlangsung selama beberapa jam, sebelum akhirnya akan mengalami fagositosis. Dengan menggunakan teknik pelabelan terhadap DNA terfragmentasi (TUNEL). (gambar 1). Penghitungan sel menurut Soini et al, (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi untuk mengkuantifikasi indeks apoptosis jaringan trofoblast, diketahui bahwa terjadi peningkatan indeks apoptosis sel-sel trofoblast (4,13). Tampak bahwa, dengan menggunakan uji T-Test, menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel-sel trofoblast yang mengalami apoptosis pada kelompok Kontrol (rerata 4.70±1.829) terhadap kelompok preeklamsia (rerata 15.30±3.561) dengan nilai p≤0.000. (Tabel 1).



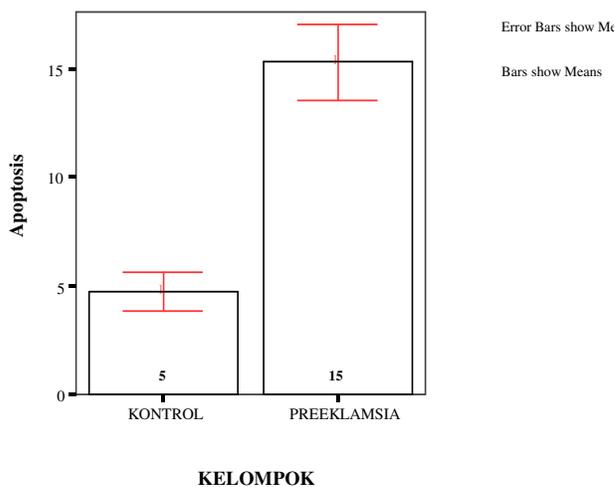
Gambar 1. Apoptosis Sel-sel Trofoblast Jaringan Plasenta yang dipulas menggunakan TUNEL.

Tampak bahwa sel-sel trofoblast yang mengalami apoptosis akan berwarna coklat pada inti sel [→]. (A). Plasenta Normal. (B). Plasenta Preeklamsia.

Rerata hasil perhitungan apoptosis pada kelompok Normal dan Preeklamsia, menunjukkan perbedaan rerata jumlah sel-sel trofoblast yang mengalami apoptosis yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklamsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai p≤0.000. (tabel 1).

Tabel 1. Rerata Hasil Perhitungan Apoptosis pada kelompok Normal dan Preeklamsia

Kelompok	Rerata Hasil	±SD	Notasi
Normal	4.70	1.829	a
Preeklamsia	15.30	3.561	b



Gambar 2. Rerata Indeks Apoptosis Sel-sel Trofoblast Jaringan Plasenta Kelompok Normal dan Kelompok Preeklamsia.

Terdapat perbedaan rerata jumlah sel-sel trofoblast yang mengalami apoptosis yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklamsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai p≤0.000.

Hasil uji statistik dengan uji t menunjukkan bahwa, nilai signifikansi (p) dari apoptosis (tunel) antara kelompok preeklampsia dan kontrol sebesar 0.000, yang lebih kecil dari alpha 0.05, dengan nilai -t hitung (-8.374), sehingga tolak Ho. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada apoptosis (tunel) dari kelompok

preeklampsia dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rerata apoptosis (TUNEL) kelas control dan preeklampsia tersebut, yaitu sebesar -10.6, sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata. (tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji t Tidak Berpasangan Antara rata-rata (\bar{X}) Apoptosis (Tunel) kelompok kontrol dan preeklampsia

	n	Statistics			
		mean	stdev	min	max
Kontrol	10	4.7	1.82878	2	7
Preeklampsia	10	15.3	3.56059	11	21
uji levene		Hasil uji t		Ada perbedaan yang signifikan	
F	5.629	t hitung	-8.374		
p	0.029	df	13.44		
		p	0.000		

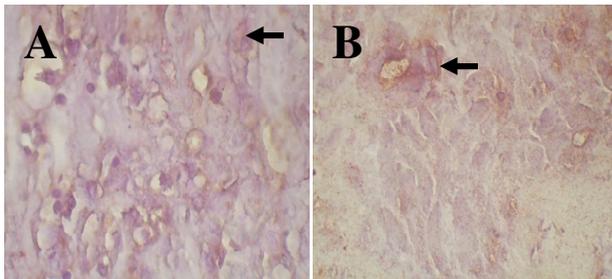
Pengamatan Ekspresi BCL-2

Pada penelitian ini juga diamati ekspresi BCL2, diketahui bahwa over ekspresi dari Bcl-2 dilaporkan akan melindungi sel-sel limfosit dari kejadian apoptosis, dengan memperhatikan fungsi Bcl-2, peneliti mengamati ekspresi Bcl-2 pada preeklampsia. Pada penelitian ini, dengan metode imunohistokimia telah berhasil dilakukan pemulasan terhadap ekspresi Bcl-2 intraseluler pada sel-sel trofoblast plasenta dengan kasus preeklampsia (Gambar 3).

Preeklampsia menunjukkan perbedaan rerata ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai $p \leq 0.000$. (tabel 3)

Tabel 3. Rerata Hasil Perhitungan BCL2 pada Kelompok Normal dan Preeklampsia

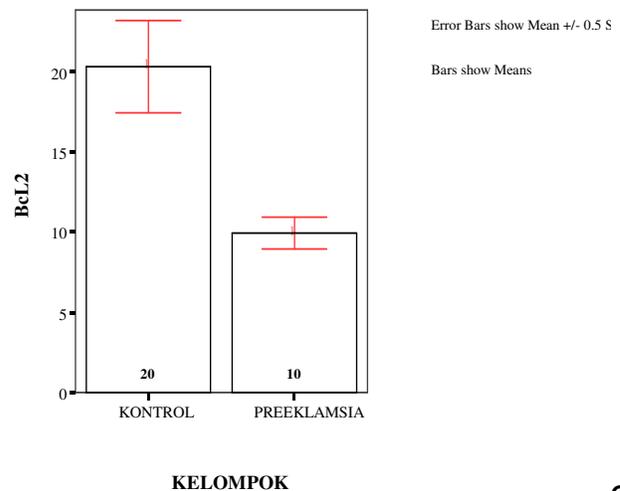
Kelompok	Rerata Hasil	\pm SD	Notasi
Normal	20.30	5.774	a
Preeklampsia	9.90	1.912	b



Gambar 3. Ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast jaringan Plasenta yang dipulas dengan anti Bcl-2 (imunohistokimia).

Tampak bahwa terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 pada sel-sel trofoblast yang mengalami Preeklampsia. Ekspresi Bcl-2 akan berwarna coklat pada sitoplasma sel [→]. (A).Plasenta Normal.(B).Plasenta Preeklampsia

Dengan menggunakan perhitungan menurut Soini (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi, untuk menghitung jumlah ekspresi Bcl-2 diketahui bahwa terjadi penurunan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast pada preeklampsia (4,13). Dari hasil analisis menunjukkan perbedaan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast kelompok normal (rerata 20.30 ± 5.774) dibandingkan kelompok plasenta preeklampsia (rerata 9.90 ± 1.912). Rerata hasil perhitungan BCL2 pada kelompok Normal dan



Gambar 4. Rerata Ekspresi Bcl-2 Intraseluler Sel-sel Trofoblast Jaringan Plasenta Kelompok Normal dan Kelompok Preeklampsia.

Terdapat perbedaan rerata ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai $p \leq 0.000$.

Berdasarkan uji statistik dengan uji t, menunjukkan bahwa nilai signifikansi (p) dari Bcl2 antara kelompok preeklampsia dan kontrol sebesar 0.000 yang lebih kecil dari alpha 0.05, dengan nilai -t hitung (5.407). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada Bcl-2

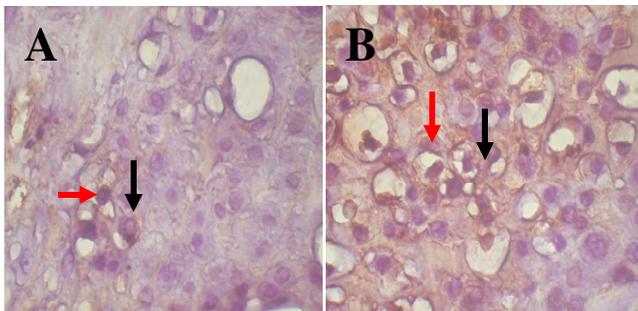
dari kelompok preeklampsia dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rata-rata Bcl-2 kelas kontrol dan preeklampsia tersebut yaitu sebesar 10.4, sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata. (tabel4).

Tabel 4. Hasil Uji t Tidak Berpasangan antara Rata-rata (\bar{X}) Bcl2 Kelompok Kontrol dan Preeklampsia.

	Statistics				
	n	mean	stdev	min	max
Kontrol	10	20.3	5.77446	11	31
Preeklampsia	10	9.9	1.91195	6	13
uji levene				Ada perbedaan yang signifikan	
F	6.059	t hitung	5.407		
p	0.024	df	10.95		
		p	0.000		

Pengamatan Ekspresi p53

Peningkatan indeks apoptosis pada plasenta dengan kasus preeklampsia memberikan dugaan bahwa terjadi peningkatan aktivasi dari p53. Pada penelitian ini, dengan metode imunohistokimia telah berhasil dilakukan pemulasan terhadap ekspresi dan aktivasi p53 pada jaringan trofoblast plasenta dengan kasus preeklampsia (Gambar 5). Tampak bahwa, dengan menggunakan perhitungan menurut Soini (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi, untuk menghitung jumlah ekspresi dan aktivasi p53, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi maupun aktivasi p53 kelompok plasenta normal (8.20 ± 2.898) dibandingkan dengan kelompok plasenta preeklampsia (22.70 ± 4.990) dengan signifikansi $p \leq 0.000$ (4,13).



Gambar 5. Ekspresi dan Aktivasi p53 Sel-sel Trofoblast Jaringan Plasenta yang Dipulas Menggunakan Anti p53 (Imunohistokimia).

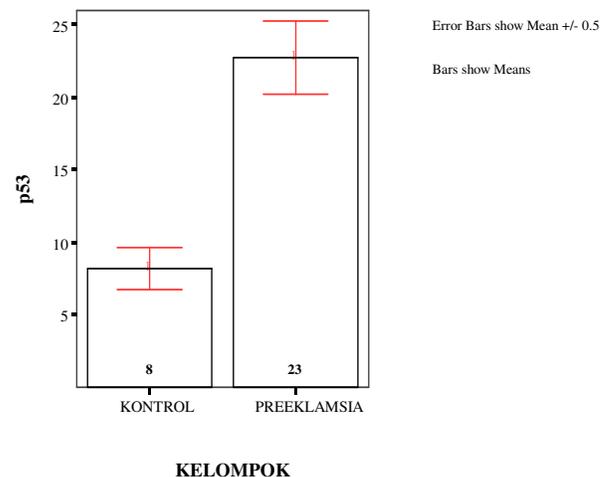
Tampak bahwa terjadi peningkatan ekspresi p53 pada sel-sel trofoblast yang mengalami Preeklampsia. Ekspresi p53 akan berwarna coklat pada sitoplasma [→], sedang aktivasi p53 ditunjukkan warna coklat pada inti sel [→]. (A). Plasenta Normal. (B). Plasenta Preeklampsia

Rerata hasil perhitungan ekspresi aktivasi p53 pada kelompok Normal dan Preeklampsia menunjukkan perbedaan rerata ekspresi maupun aktivasi jumlah sel-sel trofoblast yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia.

Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai $p \leq 0.000$. (tabel 5)

Tabel 5. Rerata Hasil Perhitungan Ekspresi Aktivasi P53 Pada Kelompok Normal dan Preeklampsia

Kelompok	Rerata Hasil	\pm SD	Notasi
Normal	8.20	2.898	a
Preklampsia	22.70	4.990	b



Gambar 6. Rerata ekspresi maupun aktivasi p53 sel-sel trofoblast jaringan plasenta kelompok Normal dan kelompok preeklampsia.

Terdapat perbedaan rerata ekspresi maupun aktivasi jumlah sel-sel trofoblast yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai $p \leq 0.000$.

Hasil pengujian dengan uji t menunjukkan bahwa, nilai signifikansi (p) dari P53 antara kelompok preeklampsia dan kontrol sebesar 0.000 yang lebih kecil dari alpha 0.05, dengan nilai -t hitung (-7.946). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada P53 dari kelompok

preeklampsia dan kelompok control. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rata-rata P53 kelas control dan preeklampsia tersebut, yaitu

sebesar (-14.5), sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata. (tabel 6).

Tabel 6. Hasil Uji t Tidak Berpasangan Antara Rata-rata (\bar{X}) P53 Kelompok Kontrol dan Preeklampsia

	Statistics				
	n	mean	stdev	min	max
Kontrol	10	8.2	2.89828	3	12
PEB	10	22.7	4.98999	11	28
uji levene		Hasil uji t		Ada perbedaan yang signifikan	
F	1.159	t hitung	-7.046		
p	0.296	df	18		
		p	0.000		

Tabel 7. Hasil Uji Korelasi Antara Ekspresi p53, Bcl-2 dan Apoptosis Sel-Sel Trofoblast Plasenta dengan Preeklampsia Berat.

		Correlations			
		BAX	p53	Apoptosis	bcl2
BAX	Pearson Correlation	1	.726*	.724*	-.799*
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000
	N	20	20	20	20
p53	Pearson Correlation	.726*	1	.874*	-.651*
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.002
	N	20	20	20	20
Apoptosis	Pearson Correlation	.724*	.874*	1	-.663*
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.001
	N	20	20	20	20
bcl2	Pearson Correlation	-.799*	-.651*	-.663*	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.002	.001	
	N	20	20	20	20

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

DISKUSI

Peningkatan apoptosis sel-sel trofoblast preeklampsia melibatkan peran mitokondria dalam meregulasi proses apoptosis. Diketahui bahwa, jalur apoptosis, menurut Husada (2004), salah satunya melibatkan protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam TNF Receptor family) beserta Fas ligand, yang disebut sebagai TRAIL (TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand) yang membentuk jalur menuju apoptosis dan disebut sebagai *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway* (13). Hal ini dibedakan dengan *Mitochondrial pathway* yang disebut juga sebagai *Intrinsic Pathway*.

Peningkatan ekspresi Bax intraseluler sel-sel trofoblast preeklampsia mendukung hal tersebut, bahwa jalur apoptosis melibatkan Bax (*Bcl2 family*) merupakan protein proapoptosis yang akan berinteraksi dengan Bcl-xL atau berikatan secara langsung dengan membran luar mitokondria sehingga terjadinya pelepasan sitokrom-c, yang akan bersama

dengan Apaf-1, procaspase-9 dan ATP membentuk apoptosome, yang akan mengaktifkan jalur apoptosis internal (13).

Protein Bax yang diaktifkan oleh Bid menyebabkan terjadinya *Permeability Transition Pore (PTP)* pada membran luar mitokondria menjadi terbuka sehingga sitokrom-c bisa bocor dengan akibat apoptosis. Protein (Bcl-2 dan Bcl-xL) mampu mencegah terjadinya PTP ini. Sehingga tampak bahwa peningkatan ekspresi BAX pada proses apoptosis oleh karena preeklampsia, memberikan bukti keterlibatan mitokondria dalam kejadian apoptosis tersebut (13).

Dengan menggunakan metode yang sama, dengan mengamati ekspresi Bcl-2, sebagai antiapoptotik, memberikan gambaran yang mendukung bahwa telah terjadi penurunan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblast jaringan plasenta preeklampsia. Protein (Bax) dapat bekerja dengan membuka saluran Ca²⁺ atau

menghambat Bcl-2 sehingga membuat efek anti-apoptotik Bcl-2 terhalang, demikian pula Bad menghambat Bcl-xL. Kerusakan DNA terjadi karena beberapa faktor, antara lain: AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) yang terletak di intermembran mitokondria, bocor keluar oleh karena pecahnya membran mitokondria kemudian memasuki nukleus dan menimbulkan kerusakan, aktifnya berbagai endonuclease, di antaranya Endonuclease G, PARP (*Poly-ADP Ribose Polimerase*) memicu kematian sel via apoptosis dengan menempuh berbagai jalur (pathways) (13).

Daniel (2004), mengilustrasikan bahwa jalur apoptosis melalui mitokondria yang dimediasi oleh BAX (*Bcl2 family*), yang mana bahwa BAX diaktivasi oleh protein Bid maupun Bad. Bad diaktivasi melalui jalur eksternal (*death receptor*) melalui caspase-8. BAX berinteraksi dengan membran luar mitokondria, yang akan menyebabkan pelapasan sitokrom-c yang akhirnya akan menyebabkan apoptosis sel.

Korelasi antara Ekspresi p53, BCL-2 dan Apoptosis Sel-sel Trofoblast Plasenta dengan Preeklampsia berat.

Hasil uji korelasi antara ekspresi p53, BCL-2 dan apoptosis sel-sel trofoblast plasenta dengan preeklampsia berat;. Menunjukkan hubungan positif (korelasi positif) yang signifikan antara peningkatan ekspresi dari p53 dengan ekspresi BCL-2 intraseluler dan juga apoptosis sel-sel trofoblast plasenta dengan preeklampsia. (tabel 7).

Penemuan ini sesuai dengan penemuan sebelumnya, bahwa p53 akan mengaktifkan BAX melalui jalur signal transduksi beberapa molekul, yang akan menyebabkan terjadinya *Permeability Transition Pore* (PTP) pada membran luar mitokondria menjadi terbuka sehingga sitokrom-c bisa bocor dengan akibat apoptosis (12).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan jumlah sel trofoblast penderita preeklampsia berat yang mengekspresikan p53, dan indeks apoptosis nya lebih tinggi dibandingkan dengan kehamilan normal. Sedangkan jumlah sel trofoblast yang mengekspresikan Bcl-2 lebih tinggi pada kehamilan normal dari pada penderita preeklampsia berat.yang mengalami proses apoptosis Berdasarkan hasil analisa statistik dengan menggunakan uji T didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi p53 dan Bcl-2 serta indeks apoptosis antara kedua kelompok ($p < 0,000$).

Dengan demikian dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa, jumlah sel trofoblast pada jaringan trofoblast kehamilan preeklampsia/ eklampsia lebih

tinggi, apabila dibandingkan dengan kehamilan normal.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Levi, R. MD. *The Role of Apoptosis in Preeclampsia*. IMAJ, 2005;7: 178-181.
2. Wibowo B, Rachimhadhi T. *Pre-eklampsia dan eklampsia*. Ilmu kebidanan. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 1999 : 281-301.
3. Buku Laporan Tahunan Instalasi IRNA 3, RSU Dr. Saiful Anwar Malang, 2007
4. Keman K. *Hubungan antara Interleukin-10 (IL-10) dan Interferon- γ (IFN- γ) pada jaringan Trofoblas dan Sel Sitotrofoblas; dengan Kegagalan Proses Diferensiasi, Invasi, dan Pseudovaskulogenesis Trofoblas pada Patogenesis Preeklampsia*. Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia; 31, 2, April 2007, 92-115.
5. Redman, C.W.G., Sargent, I.L. *The pathogenesis of pre-eclampsia*. *Gynecol.Obstet.Fertil.* 2001; 29, 518-522.
6. Smith, S.C., Baker,P.N., Symonds, E.M. *Placental apoptosis in normal human pregnancy*. *Am J.Obstet Gynecol.* 1997;177,57-65.
7. Huppertz, B., Hunt, J.S. *Trophoblast apoptosis and placental development-a workshop report*. *Placenta*, 2000; 21,S74-S76.
8. Levy, R., Nelson, D.M, To be, or not to be, that is the question. *Apoptosis in human trophoblast*. *Placenta*, 2000; 21,1-13.
9. Austgulen, R., Isaksen, C.V., Chedwick, L., Romundstad,P., Vatten, L., Craven, C. *Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age*. *Journal of Reproductive Immunology*; 2004 61: 39-50.
10. Beausejour, A.,Bibeau, K., Lavoie, J.-C., St-Louis, J., Brochu, M. *Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia*. 2007; *Placenta*: 28 52-58.
11. DiFederico, E., Genbacev, O., Fisher, S.J. *Pre-eclampsia is associated with widespread apoptosis in Cytotrophoblasts within the uterine wall*. *Am.J.Reprod.Immunol.*1999;155,293-301.
12. Levy, R., Smith, S.D., Yusuf, K., Huettner, P.C., Kraus, F.T., Sadovsky, Y., Nelson, D.M. *Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression*. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2002;186:1056-1061.
13. Riawan W., Keman K., Wibowati S., Ali M. *Peningkatan insiden apoptosis pada sel-sel trofoblast jaringan plasenta preeklampsia berkaitan dengan peningkatan ekspresi p53 dan penurunan PPAR γ teraktivasi*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2004;20(3):136-141