

**EFEK PEMBERIAN  
KOMBINASI VITAMIN E DAN VITAMIN C TERHADAP  
KADAR *NITRIC OXIDE* (NO)  
PADA PREEKLAMPSIA**

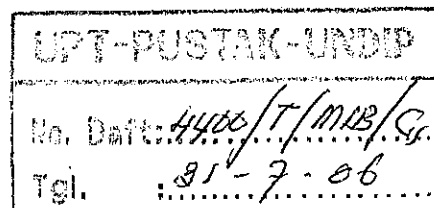


**Tesis**  
**Untuk memenuhi sebagian persyaratan**  
**Mencapai derajat Sarjana S-2**

**Magister Ilmu Biomedik**

**Deasy Samantha Ardini**  
**G4A002047**

**PROGRAM PASCASARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
OBSTETRI GINEKOLOGI  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
Desember  
2005**



# LEMBAR PENGESAHAN

## TESIS

### EFEK PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN E DAN VITAMIN C TERHADAP KADAR NITRIC OXIDE (NO) PADA PREEKLAMPSIA

Disusun oleh  
Deasy Samantha Ardini  
G4A002047

Telah dipertahankan di depan tim penguji ujian tesis  
Program Pascasarjana Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran UNDIP  
Pada tanggal 27 Desember 2005

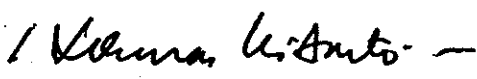
Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II



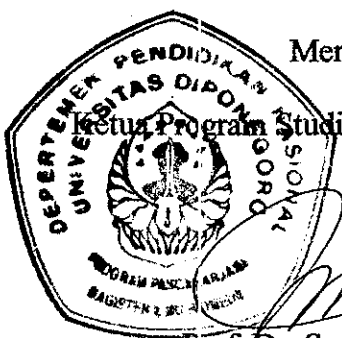
Dr. Hartono Hadisaputro, SpOG(K)  
NIP. 140 067 785



Dr. Herman Kristanto, MS, SpOG(K)  
NIP. 131 844 805

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Prof. Dr. Soebowo, SpPA(K)  
NIP. 130 352 549

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 27 Desember 2005



Deasy Samantha Ardini

## DATA RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Deasy Samantha Ardini  
NIM/NIP : G4A002047  
Tempat/Tanggal Lahir : Semarang, 9 Desember 1975  
Agama : Katolik  
Jenis kelamin : Perempuan  
Alamat : Jl. Mawar III/6 Taman Bukit Hijau Semarang  
Telp. Rumah/HP : 024-7629357 / 081325371725

### Riwayat Pendidikan

1. SD : Bernardus III Semarang, tamat 1987  
2. SMP : PL Domenico Savio Semarang, tamat 1990  
3. SMA : Negeri 3 Semarang, tamat 1993  
5. FK. : Universitas Diponegoro Semarang, tamat 1999  
6. PPDS I OBSGIN : Universitas Diponegoro Semarang, tamat 2005

### Riwayat Pekerjaan

Klinik Bina Sehat Semarang th 1999 - 2000

### Riwayat Keluarga

Nama suami : Iwan Syafrizal  
Nama Orang Tua ayah : Samekto SH (almarhum)  
Ibu : Prof. Dr. MI. Widiastuti, PAK, SpS (K), MKes  
Alamat orang tua : Jl. Tumpang 76 Semarang  
Nama anak : Kintan Maria Valentina Putri

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Efek pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C terhadap kadar NO pada preeklampsia”. Penelitian ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Pada kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. dr. Kabulrachman, SpKK sebagai Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP.
2. Prof. dr. Soebowo, SpPA(K) sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof. dr. Tjahjono, SpPA(K) sebagai Pengelola Program Magister PPDS I Fakultas Kedokteran UNDIP.
4. dr. Suharsono, SpOG(K) sebagai Ketua Bagian / SMF Obsgin FK UNDIP dan dr. Hartono Hadisaputro, SpOG(K) sebagai Ketua Program Studi PPDS I Obsgin FK UNDIP.
5. dr. Hartono Hadisaputro, SpOG(K) dan dr. Herman Kristanto, MS, SpOG(K) atas kesabarannya dalam membimbing penulisan tesis ini.
6. Prof. dr. Noor Pramono, MMedSc, SpOG (K) dan Prof. dr. Widiastuti Samekto, PAK, M.Kes, SpS(K) atas bimbingan dalam metodologi dan statistik pada penulisan tesis ini.

7. Prof.dr. Susilo Wibowo, MSMed, SpAnd, Prof.dr.Fatimah Moeis, dan dr. Hertanto sebagai narasumber dalam penyajian proposal dan seminar hasil penelitian tesis saya.
8. Prof. Dr. dr. I. Riwanto, SpB, dr.C. Suharti, dan dr.Pudjadi SU selaku penguji yang telah memberikan masukan dan arahan terhadap tesis ini.
9. Para Guru Besar dan Staf di Bagian Obstetri dan Ginekologi FK UNDIP / RS. Dr Kariadi, Bagian Patologi Anatomi, Bagian Anestesiologi, Bagian IKA, Bagian Ilmu Bedah, Bagian Radiologi, atas bimbingannya selama pendidikan saya.
10. Direktur RS dr Kariadi Semarang yang telah memberikan izin dan segala fasilitas yang diperlukan dalam rangka penelitian saya.
11. Kepala Puskesmas, Bidan dan karyawan/wati Puskesmas Halmahera dan Puskesmas Jatingaleh Semarang atas kerjasamanya selama penelitian ini.
12. Seluruh keluarga yang telah dengan sabar membantu dan memberi dukungan selama pendidikan saya..
13. Para pasien yang berada di poliklinik hamil RS. Dr. Kariadi Semarang, Puskesmas Halmahera, dan Puskesmas Jatingaleh Semarang yang telah bersedia mengikuti penelitian, dan semua pihak yang telah membantu.

Segala kritik dan saran yang disampaikan untuk tulisan ini sangat saya harapkan, karena saya sadar bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Saya berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk pengembangan pelayanan Obstetri dan Ginekologi di masa mendatang.

Semarang, Desember 2005

**Deasy Samantha Ardini**

## DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN .....	i
KATA PENGANTAR .....	ii
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GRAFIK .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang penelitian .....	1
1.2. Permasalahan penelitian .....	4
1.3. Keaslian penelitian .....	4
1.4. Tujuan penelitian .....	5
1.5. Manfaat penelitian .....	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Definisi preeklampsia .....	7
2.2. Faktor predisposisi preeklampsia .....	8
2.3. Etiologi dan patogenesis preeklampsia .....	9
2.3.1. Iskemia plasenta .....	9
2.3.2. Faktor imunologi .....	10
2.3.3. Disfungsi endotel .....	10
2.4. Stress oksidatif .....	13
2.5. Disfungsi NO pada preeklampsia .....	16
2.6. Antioksidan .....	22
2.6.1. Vitamin E .....	24
2.6.2. Vitamin C .....	28
2.7. Kerangka teori .....	31

2.8. Kerangka konsep .....	32
3. HIPOTESIS .....	33
4. METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan penelitian .....	34
4.2. Tempat dan waktu penelitian .....	34
4.3. Cara pengambilan sampel .....	34
4.4. Subyek penelitian .....	34
4.5. Perhitungan besar sampel .....	35
4.6. Variabel penelitian .....	36
4.7. Proses penelitian .....	37
4.8. Pengolahan dan analisis data .....	38
4.9. Alur penelitian .....	39
4.10. Definisi operasional .....	39
4.11. Etika penelitian .....	42
5. HASIL PENELITIAN	
5.1. Karakteristik penderita .....	43
5.2 Kadar NO .....	46
5.3. Tekanan darah .....	47
5.4. Asupan vitamin E dan vitamin C .....	50
6. PEMBAHASAN .....	52
7. SIMPULAN DAN SARAN .....	59
8. DAFTAR PUSTAKA .....	61
9. LAMPIRAN .....	65



**DAFTAR TABEL**

Nomor	halaman
1. Karakteristik subyek penelitian pada kelompok vitamin dan plasebo .....	45
2. Rerata kadar NO pada kelompok vitamin dan kelompok plasebo.....	46
3. Rerata tekanan darah sistolik dan diastolik sebelum dan sesudah .....	48
perlakuan pada setiap kelompok.	
4. Perkembangan penyakit antara kedua kelompok .....	50
5. Asupan vitamin E dan vitamin C pada kelompok vitamin dan plasebo.....	51

**DAFTAR GAMBAR**

Nomor	halaman
1. Relaksasi vaskular yang diperantarai oleh NO .....	18
2. Reaksi radikal bebas dengan NO .....	19
3. Struktur kimia vitamin E .....	25
4. Reaksi $\alpha$ -tocopherol dengan radikal bebas.....	27
5. Struktur kimia vitamin C .....	28
6. Peran vitamin C dalam proses daur ulang vitamin E .....	30

## DAFTAR GRAFIK

Nomor	halaman
1. Kadar NO pada kelompok vitamin dan kelompok plasebo .....	47
2. Tekanan darah sistolik pada kelompok vitamin dan plasebo .....	49
3. Tekanan darah diastolik pada kelompok vitamin dan plasebo .....	49

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	halaman
1. Surat persetujuan penelitian .....	68
2. Status penelitian .....	69
3. Survey diet .....	70
4. Prinsip pemeriksaan .....	74
5. Prosedur pemeriksaan NO .....	75
6. Analisis kadar NO dengan KC4 .....	77
7. Hasil analisis .....	81

# EFEK PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN E DAN VITAMIN C TERHADAP KADAR NITRIC OXIDE (NO) PADA PREEKLAMPSIA

## ABSTRAK

**Latar belakang:** Preeklampsia dan eklampsia masih merupakan masalah dalam pelayanan obstetri di Indonesia dan merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas ibu dan janin disamping perdarahan dan infeksi. Preeklampsia terjadi sekitar 3-10 % dari seluruh kehamilan, dengan angka yang bervariasi pada masing-masing negara.<sup>3</sup> Penyebab preeklampsia sampai saat ini belum diketahui secara pasti sehingga penyakit ini oleh Zweifel (1916) disebut "*the disease of theories*". Oleh karena itu berbagai penelitian terus dilakukan untuk mengetahui patogenesis preeklampsia, dengan hasil berbagai temuan baru yang terungkap. Hipotesis mengenai disfungsi endotel dan defisiensi NO tidak terlepas dari suatu kondisi yang disebut stress oksidatif. Vitamin E dan C merupakan antioksidan yang kuat. Pada preeklampsia vitamin E dan C diduga berperan dalam mencegah peningkatan proses stress oksidatif yang mengakibatkan turunnya kadar NO.

**Tujuan:** Membuktikan bahwa pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar NO serum dan menurunkan tekanan darah pada preeklampsia ringan.

**Rancangan penelitian:** Penelitian ini merupakan suatu uji kontrol acak (*randomized controlled trial*), *pre and post test design*. Penelitian dilakukan di Unit Rawat Jalan Ibu Hamil Rumah Sakit dr. Kariadi – Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Puskesmas Halmahera dan Jatingaleh mulai Agustus 2004 – Februari 2005.

**Hasil:** Rerata kadar NO keseluruhan subyek penelitian sebelum pemberian vitamin yaitu 22,3 (9,67)  $\mu\text{M}$ , dengan rerata umur kehamilan 29,31 (3,59) minggu. Pada kelompok vitamin terjadi peningkatan NO yang bermakna (9,8  $\mu\text{M}$ ) setelah pemberian vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu. Pada penelitian ini didapatkan penurunan rerata tekanan darah sistolik sebesar 10,56 mmHg pada kelompok yang diberi vitamin E dan C, sedangkan rerata tekanan darah diastolik turun sebesar 7,78 mmHg. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C mampu meningkatkan kadar NO.

**Kesimpulan:** Pemberian kombinasi vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg per hari selama 8 minggu meningkatkan kadar NO pada penderita preeklampsia. Terdapat penurunan tekanan darah sistolik maupun diastolik setelah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg per hari selama 8 minggu.

**Kata kunci:** preeklampsia, stress oksidatif, nitric oxide, vitamin E, vitamin C

**EFFECT COMBINATION OF VITAMIN E AND VITAMIN C  
SUPPLEMENTATION TO NITRIC OXIDE (NO) LEVEL  
IN PREECLAMPSIA**

**ABSTRACT**

**Back ground:** Preeclampsia and eclampsia still a big problem in obstetric health care in Indonesia, and a major cause of maternal fetal morbidity and mortality despite hemorrhage and infection. The incidence of preeclampsia is 3 -10%, with various numbers throughout the world. The etiology of preeclampsia is unknown, make the disease so called "*the disease of theories*". Various research have been carried out to solve the pathogenesis of preeclampsia, with several new results. One the hypothesis is endothelial dysfunction and NO deficiency, which have oxidative stress as an important background. Vitamin E and C are strong antioxidant, and in preeclampsia both vitamins have important role in preventing oxidative stress which decrease NO level.

**Objective:** To prove that a combination of vitamin E 400 IU/day and vitamin C 1000 mg/day for 8 weeks can increase NO level and decrease blood pressure in mild preeclampsia.

**Method:** This is a randomized controlled trial, pre and post design. Research was carried out at obstetric clinic Kariadi Hospital Semarang, Halmahera Primary Health Care and Jatingaleh Primary Health Care August 2004 until February 2005.

**Results:** The mean of NO level for all of the subject before vitamin supplementation is 22,3 (9,67)  $\mu\text{M}$ , with mean gestational age 29,31 (3,59) weeks. There was a difference of NO level before and after vitamin supplementation between two groups. In vitamin group there was increase in NO level Pada (9,8  $\mu\text{M}$ ) after a supplementation of vitamin E 400 IU/day and vitamin C 1000 mg/day for 8 weeks. In contrast, placebo group had a decrease of NO level. Systolic blood pressure decreased 10,56 mmHg and diastolic blood pressure 7,78 mmHg in vitamin group. The results were similar with previous studies.

**Conclusion:** A combination of vitamin E 400 IU and vitamin C 1000 mg per day for 8 weeks improve NO level in preeclamptic patients. The systolic and diastolic blood pressure both decreased after supplementation of vitamin E 400 IU and vitamin C 1000 mg per day for 8 weeks.

**Key words:** preeclampsia, oxidative stress, nitric oxide, vitamin E, vitamin C

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar belakang penelitian

Preeklampsia dan eklampsia masih merupakan masalah dalam pelayanan obstetri di Indonesia dan merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas ibu dan janin disamping perdarahan dan infeksi.<sup>1-2</sup> Preeklampsia terjadi sekitar 3-10 % dari seluruh kehamilan, dengan angka yang bervariasi pada masing-masing negara.<sup>3</sup> Di Amerika Serikat, hipertensi dalam kehamilan merupakan penyebab kedua kematian maternal, dan 15% dari kematian ibu karena kehamilan disebabkan oleh preeklampsia.<sup>4</sup> Di negara yang sedang berkembang seperti Indonesia angka kejadian preeklampsia berkisar 7 - 10 % dari seluruh kehamilan. Pada penelitian di RSUP Dr. Kariadi tahun 1993 didapatkan angka kejadian preeklampsia 2,45 % dan eklampsia 0,91%.<sup>5</sup> Pada tahun 1996 di RSUP Dr.Kariadi Semarang preklampsia dan eklampsia masih merupakan penyebab utama kematian maternal (40%) diikuti infeksi (26,6%) dan perdarahan (24,4%).<sup>6</sup> Sedangkan pada tahun 1999-2000, preeklampsia dan eklampsia juga merupakan penyebab utama kematian maternal (52,9%) diikuti perdarahan (26,5%) dan infeksi (14,7%).<sup>7</sup>

Penyebab preeklampsia sampai saat ini belum diketahui secara pasti sehingga penyakit ini oleh Zweifel (1916) disebut "*the disease of theories*".<sup>1</sup> Oleh karena itu berbagai penelitian terus dilakukan untuk mengetahui patogenesis preeklampsia, dengan hasil berbagai temuan baru yang terungkap. Penelitian membuktikan bahwa plasenta penderita preeklampsia ternyata mengalami iskemia

akibat menurunnya aliran darah ke plasenta yang disebabkan karena adanya perubahan pada arteri spiralis.<sup>8-10</sup> Pada plasenta yang mengalami iskemia, akan diproduksi peroksida lipid yang tidak terkendali karena tidak diimbangi dengan kenaikan antioksidan. Peroksida lipid selanjutnya akan masuk dalam sirkulasi darah dan terikat dengan lipoprotein. Kontak sel endotel dengan peroksida lipid akan menimbulkan kerusakan peroksidatif membran sel yang disebut dengan disfungsi endotel.<sup>11</sup> Disfungsi endotel mengakibatkan banyak hal, salah satunya yaitu terjadi penurunan *nitric oxide* (NO) atau *endothelial derived relaxing factor (EDRF)*, sehingga menimbulkan peningkatan tahanan perifer dan pada akhirnya akan terjadi hipertensi.<sup>12-13</sup>

Belakangan ini para ahli mengajukan hipotesis bahwa disfungsi primer dari preeklampsia adalah akibat defisiensi relatif dari NO yang tersedia, serta peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) yang berlebihan. Kombinasi dari defisiensi NO dan peningkatan ONOO<sup>-</sup> secara langsung maupun tidak langsung dapat memicu timbulnya perubahan fisiologis maupun serologis yang berkaitan dengan preeklampsia, misalnya tekanan darah, peningkatan laju filtrasi glomerulus, proteinuria, disfungsi platelet, peningkatan *thromboxane* (TXA) dan endotelin, serta penurunan *prostacyclin* (PGI<sub>2</sub>).<sup>13-14</sup> NO merupakan vasodilator endogen yang disintesis dari asam amino non essential *L-arginine* dengan perantaraan enzim yang disebut *nitric oxide synthase* (NOS). Ada 3 isoform dari NOS: neuronal (nNOS atau NOS1), *cytokineinducible* (iNOS atau NOS2), dan endotelial (eNOS atau NOS3). NO yang diproduksi dalam sel endotel, terutama melalui kerja eNOS, menyebabkan relaksasi otot vaskular melalui jalur yang tergantung pada *cyclic-Guanosine Monophosphate* (c-GMP).<sup>13</sup>



Hipotesis mengenai disfungsi endotel dan defisiensi NO tidak terlepas dari suatu kondisi yang disebut stress oksidatif. Stress oksidatif adalah ketidakseimbangan antara kekuatan oksidan dan antioksidan, dimana komponen oksidan mendominasi dan menghasilkan efek merugikan.<sup>12-13</sup> Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar justru berasal dari proses-proses biologis alami dan melibatkan apa yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif. Sebagian diantaranya berbentuk radikal bebas, seperti radikal hidroksil (OH), radikal peroksil (OOH) dan ion superoksida ( $O_2^-$ ), sebagian lain bukan radikal seperti oksigen tunggal ( $^1O_2$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan ion hipoklorit ( $ClO^-$ ).<sup>15</sup> Dampak negatif senyawa-senyawa tersebut timbul karena reaktivitasnya sehingga dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Peroksida lipid yang mengakibatkan disfungsi endotel merupakan hasil dari reaksi asam lemak tak jenuh dengan radikal bebas, terutama radikal hidroksil melalui suatu reaksi rantai yang dikenal sebagai peroksidasi lipid.<sup>11-12,16</sup> Maka NO akan berkurang sebagai akibat sekunder dari stress oksidatif. Peningkatan radikal bebas yang terjadi pada preeklampsia juga mengakibatkan penurunan *tetrahydrobiopterin* ( $BH_4$ ) sebagai kofaktor pembentukan NO dan berakibat peningkatan produksi  $O_2^-$ .  $O_2^-$  akan bereaksi dengan NO yang telah ada menghasilkan  $ONOO^-$ , sehingga NO yang siap pakai akan berkurang dengan semua akibatnya.<sup>13</sup>

Vitamin E dan C merupakan antioksidan yang kuat.<sup>15</sup> Pada preeklampsia vitamin E dan C diduga berperan dalam mencegah peningkatan proses stress oksidatif yang mengakibatkan turunnya kadar NO. Efek dari kombinasi keduanya dikatakan lebih nyata dibandingkan dengan bila diberikan sendiri-sendiri.<sup>17</sup> Sebuah

penelitian menemukan penurunan angka kejadian preeklampsia setelah pemberian antioksidan (vitamin C 1000 mg dan vitamin E 400 IU per hari) mulai umur kehamilan 22 minggu pada kelompok resiko tinggi.<sup>18</sup> Penelitian serupa dilakukan di Amerika Serikat, yaitu dengan memberikan vitamin C 500-1000 mg/hari selama 10 minggu kadar vitamin C dalam darah meningkat 55% dan parameter stress oksidatif berkurang 60%. Sebuah penelitian mendapatkan penurunan secara bermakna dari kadar peroksida lemak serum pada penderita preeklampsia ringan yang diberikan vitamin E.<sup>19</sup> Penelitian dengan memberikan vitamin E 400 IU/hari selama 8 minggu pada penderita dislipidemia memberikan hasil perbaikan terhadap disfungsi endotel.<sup>27</sup> Walaupun demikian efek dari antioksidan dalam mencegah kejadian preeklampsia masih menjadi kontroversi baik dalam hal dosis maupun lama pemberian, juga karena hasil dari berbagai penelitian yang berbeda karena perbedaan sampel, luaran, maupun metodologi yang digunakan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian antioksidan, yaitu vitamin E dan vitamin C terhadap kadar NO pada penderita preeklampsia ringan.

## **1.2. Permasalahan penelitian**

1. Apakah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar NO serum pada preeklampsia ringan ?
2. Apakah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu dapat menurunkan tekanan darah pada preeklampsia ringan ?

### 1.3. Keaslian penelitian

Beberapa penelitian tentang pemberian vitamin E dan vitamin C pada preeklampsia telah dilakukan baik di dalam maupun luar negeri, tetapi penelitian tentang efek vitamin E dan vitamin C terhadap kadar NO pada preeklampsia belum pernah dilakukan. Penelitian di Universitas Hasanudin mendapatkan penurunan secara bermakna dari kadar peroksida lemak serum pada penderita preeklampsia ringan yang diberikan vitamin E.<sup>19</sup> Di London telah diteliti efek suplementasi vitamin C 1000 mg/hari dan vitamin E 400 IU/hari sejak umur kehamilan 22 minggu dengan hasil penurunan kejadian preeklampsia dan peningkatan kadar vitamin E dan C plasma setelah pemberian vitamin.<sup>18</sup> Peneliti yang sama menemukan perbaikan disfungsi plasenta, disfungsi endotel, dan stress oksidatif pada preeklampsia (kadar asam askorbat, 8-epi-prostaglandin, leptin, dan rasio PAI-1/PAI-2) setelah pemberian vitamin E 400IU/hari dan vitamin C 1000mg/hari mulai umur kehamilan 20-22 minggu.<sup>20</sup> Beberapa penelitian di luar negeri yang membuktikan adanya penurunan kadar NO pada preeklampsia telah pula dilakukan,<sup>21-23</sup> tetapi mereka tidak melakukan intervensi berupa pemberian vitamin dan hanya melakukan studi observasional. Efek positif vitamin E maupun vitamin C terhadap NO dan endotel vaskular telah pula dibuktikan oleh beberapa peneliti pada penderita penyakit jantung dan dislipidemia,<sup>24-28</sup> tetapi belum pernah dilakukan pada penderita preeklampsia.

#### **1.4. Tujuan penelitian**

**Tujuan Umum** : Membuktikan bahwa pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar NO serum pada preeklampsia ringan.

**Tujuan Khusus** : Mengetahui apakah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu dapat menurunkan tekanan darah pada preeklampsia ringan.

#### **1.5. Manfaat penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran peranan antioksidan khususnya vitamin E dan vitamin C untuk mencegah bertambah beratnya preeklampsia sehingga pemberiannya secara tepat dapat diterapkan dalam praktek.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Definisi Preeklampsia

Preeklampsia adalah timbulnya hipertensi disertai dengan proteinuria pada umur kehamilan lebih dari 20 minggu dan masa nifas. Disebut hipertensi yaitu bila tekanan sistolik  $\geq 140$  mmHg atau tekanan darah diastolik  $\geq 90$  mmHg. Disebut dengan proteinuria bila terdapat protein dalam urin dengan kadar  $\geq 300$  mg dalam 24 jam, bila terdapat protein dalam urin dengan kadar  $\geq 300$  mg per liter, atau dengan pemeriksaan kualitatif  $\geq +1$  pada pengambilan urine secara acak.<sup>29-30</sup>

Edema sekarang tidak lagi menjadi tanda yang sah untuk menegakkan preeklampsia, oleh karena edema biasa dijumpai pada wanita hamil. Sepertiga wanita hamil timbul edema pada usia kehamilan 38 minggu dan tidak ada korelasi statistik antara edema dan hipertensi.<sup>1</sup>

Preeklampsia dibagi menjadi preeklampsia berat dan preeklampsia ringan. Preeklampsia berat adalah preeklampsia yang disertai dengan salah satu gejala atau tanda sebagai berikut:<sup>31</sup>

1. Tekanan darah sistolik  $\geq 160$  mmHg atau tekanan darah diastolik  $\geq 110$  mmHg.
2. Proteinuria  $\geq 5$  gr/24 jam atau  $\geq +4$  dengan analisis kualitatif.
3. Oliguria, yaitu produksi urin  $< 500$  ml per 24 jam yang disertai kenaikan kadar kreatinin plasma.
4. Gangguan visus dan serebral.

5. Nyeri epigastrium atau nyeri kudran kanan atas abdomen.
6. Edema paru-paru dan sianosis.
7. Pertumbuhan janin terhambat.
8. Adanya sindroma HELLP (*Hemolysis; Elevated liver enzymes; Low platelet*).

Disebut preklampsia ringan bila tekanan darah sistolik  $\geq 140$  mmHg atau tekanan darah diastolik  $\geq 90$  mmHg disertai dengan proteinuria tanpa salah satu gejala atau tanda dari preeklampsia berat.<sup>30-31</sup>

## **2.2. Faktor predisposisi preeklampsia**

Wanita hamil cenderung dan mudah mengalami preeklampsia bila mempunyai faktor-faktor predisposisi sebagai berikut:<sup>1,10,32</sup>

1. Primigravida.
2. Hiperplasentosis : Mola hidatidosa, kehamilan ganda, diabetes melitus, hidrops fetalis, bayi besar.
3. Umur yang ekstrem.
4. Riwayat preeklampsia-eklampsia pada kehamilan sebelumnya.
5. Riwayat dalam keluarga pernah preeklampsia atau eklampsia.
6. Penyakit ginjal dan hipertensi yang sudah ada sebelum kehamilan.
7. Obesitas.
8. *Thrombophilia*. Yaitu sindrom antifosfolipid, mutasi faktor V Leiden, resistensi protein C aktif, dan hiperhomosisteinemia.
9. Dislipidemia.

### 2.3. Etiologi dan patogenesis preeklampsia

Pada preeklampsia patogenesis dan patofisiologi serta perubahan-perubahan patologi fungsi organ-organ telah banyak dibicarakan, namun belum ada yang memuaskan. Oleh karena banyaknya teori yang diajukan untuk mencari etiologi dan patofisiologi maka penyakit ini disebut dengan *the disease of theories*.<sup>1</sup>

Patogenesis yang menerangkan terjadinya preeklampsia antara lain:

#### 2.3.1. Iskemia plasenta

Defek utama terjadi pada plasenta dimana terdapat invasi trofoblas yang tidak adekuat pada arteri spiralis yang menyebabkan hipoperfusi plasenta dengan akibat iskemia plasenta. Pada kehamilan normal, invasi trofoblas ke dalam sel desidua menghasilkan suatu perubahan fisiologis pada arteri spiralis. Hasil akhir dari perubahan tersebut adalah arteri spiralis yang tadinya tebal dan muskularis menjadi lebih lebar berupa pembuluh darah yang berdinding tipis, lemas dan berbentuk seperti kantong yang memungkinkan terjadinya dilatasi secara pasif untuk menyesuaikan dengan kebutuhan aliran darah yang meningkat.<sup>10-11</sup> Pada preeklampsia proses plasentasi tersebut tidak berjalan sebagaimana mestinya oleh karena tidak semua arteri spiralis mengalami invasi oleh sel-sel trofoblas.<sup>33</sup> Plasenta pada penderita preeklampsia menunjukkan ekspresi abnormal dari molekul integrin yang mengatur interaksi antar matriks sel sehingga perubahan hanya terjadi pada sebagian arteri spiralis segmen desidua, sementara arteri spiralis segmen miometrium masih diselubungi oleh sel-sel otot polos. Selain itu ditemukan juga adanya hiperplasia tunika media dan trombosis.<sup>34</sup> Garis tengah arteri spiralis 40%

lebih kecil dibandingkan dengan kehamilan normal, hal ini menyebabkan insufisiensi dan iskemia.<sup>10</sup> Teori tentang bagaimana sel-sel trofoblas gagal mengadakan invasi arteri spiralis sampai saat ini belum diketahui dengan jelas.<sup>12</sup>

### **2.3.2. Faktor imunologi**

Maladaptasi imun diduga memegang peranan pada patofisiologi terjadinya preeklampsia. Para ahli mengemukakan pendapat bahwa preeklampsia yang “murni” adalah terjadi pada kehamilan pertama kali. Ini didasarkan pada data bahwa angka kejadian preeklampsia lebih rendah pada wanita yang sebelumnya telah pernah mengalami kehamilan normal. Tetapi risiko akan meningkat bila wanita tersebut berganti pasangan seksual. Paparan berulang terhadap sperma dari individu yang sama juga merupakan faktor pencegah terjadinya preeklampsia.<sup>10</sup> Walaupun belum jelas dipahami, hipotesis yang mendasari efek protektif dari paparan sperma yaitu bahwa sel T dalam traktus genitalis dapat mengenali antigen tanpa adanya *human leucocyt antigen* (HLA) kelas I pada *antigen presenting cells* (APC), sehingga trofoblas yang mengandung sedikit HLA klasik dapat dikenali. Selain itu limfosit T kurang respon terhadap HLA kelas I paternal, yang mungkin berpengaruh terhadap reaksi imun.<sup>14</sup> Maladaptasi imun diduga mengakibatkan terjadinya kegagalan invasi trofoblas ke desidua, tetapi mekanisme yang mendasarinya belum diketahui dengan jelas.<sup>12</sup>

### **2.3.3. Disfungsi endotel**

Salah satu teori mengenai patogenesis preeklampsia yang saat ini dianggap penting



yaitu teori mengenai disfungsi endotel. Disfungsi endotel diduga menjadi dasar dari timbulnya manifestasi klinis pada preeklampsia.<sup>35</sup> Teori ini tidak bisa lepas dari teori patogenesis preeklampsia yang lain, salah satunya yaitu teori iskemia plasenta. Pada saat plasenta mengalami iskemia, maka plasenta akan menghasilkan peroksida lipid yang selanjutnya akan masuk dalam sirkulasi darah dan terikat dengan lipoprotein, khususnya *low density lipoprotein* (LDL).<sup>33</sup> Dalam kadar yang rendah peroksidasi lipid merupakan peristiwa normal dalam kehidupan sel ataupun jaringan. Pada preeklampsia berat dijumpai perubahan ultrastruktur mitokondria pada pembuluh darah arteri uterina dan jaringan plasenta. Mitokondria adalah sumber oksigen radikal dan diperkaya oleh asam lemak tak jenuh. Maka plasenta dapat merupakan sumber terbesar dari produksi peroksida lipid pada kehamilan. Proses peroksidasi lipid meningkat sesuai dengan meningkatnya umur kehamilan, bahkan pada akhir kehamilan aktivitas menjadi dua kali lipat.<sup>11-12</sup> Dalam keadaan normal peroksidasi lipid selalu dijaga dalam keadaan seimbang melalui peran antioksidan. Bila kadar antioksidan rendah maka peroksidasi lipid menjadi tidak terkendali dan timbullah keadaan yang disebut dengan stress oksidatif.<sup>15</sup> Hal tersebut ditunjukkan oleh beberapa penelitian, dimana pada preeklampsia terjadi penurunan kadar antioksidan dan peningkatan produk hasil peroksidasi lipid.<sup>12,19,36-37</sup>

Sekali terjadi peroksidasi lipid yang tidak terkendali, maka proses akan berlangsung terus. Karena lapisan sel endotel merupakan lapisan yang terpapar langsung dengan darah arterial, maka sel endotel menjadi sangat rentan terhadap proses peroksidasi lipid. Kontak sel endotel dengan peroksida lipid akan menimbulkan kerusakan peroksidatif membran sel endotel. Endotel diketahui berfungsi memelihara integritas dan patensi kompartemen vaskuler, memelihara

fluiditas darah, mengatur trombosis dan mencegah koagulasi intravaskuler, regulasi inflamasi, regulasi pertumbuhan sel, oksidasi LDL, dan menjaga tonus vaskuler serta mengatur permeabilitas dinding pembuluh darah terhadap berbagai sel dan molekul.<sup>38</sup> Kerusakan sel endotel menimbulkan diskontinuitas lapisan pembuluh darah sebelah dalam. Kerusakan sel endotel ini bila dibiarkan akan menimbulkan kebocoran, khususnya pada sistem vaskuler mikro. Secara alamiah, tubuh akan "menutup" tempat kerusakan endotel tersebut dengan agregasi trombosit. Dalam keadaan normal, sel endotel memproduksi PGI<sub>2</sub> yang relatif tinggi. Sedangkan trombosit akan memproduksi TXA. PGI<sub>2</sub> adalah bahan vasodilator kuat, sedang TXA merupakan bahan vasokonstriktor kuat. Akibat rasio PGI<sub>2</sub>/TXA yang menurun maka efek vasokonstriktif akan tinggi dan terjadilah hipertensi menyeluruh.<sup>11</sup> Selain itu terjadi penurunan NO atau EDRF, sehingga menimbulkan peningkatan tahanan perifer dan peningkatan kepekaan terhadap agonis vasopresor, sehingga terjadi hipertensi. Inilah yang disebut dengan disfungsi endotel, suatu keadaan dimana didapatkan adanya ketidakseimbangan antara faktor vasodilatasi dan vasokonstriksi.<sup>3,12-13</sup> Disfungsi endotel mengakibatkan keluarnya zat-zat mediator inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, dan fibronektin,<sup>40-41</sup> serta mikropartikel endotel yang terbukti meningkat pada preeklampsia.<sup>39</sup> Membran sel lain yang juga peka terjadi peroksidasi lipid yaitu membran sel eritrosit, sehingga akan terjadi hemolisis yang akan meningkatkan kadar zat besi serum pada preeklampsia sampai dua kali lipat. Zat besi bersama protein hematin merupakan katalis untuk proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang dipicu oleh zat besi serum, dipermudah oleh keadaan hiperlipidemia pada kehamilan.<sup>11</sup>

Peroksida lipid yang merusak sel endotel kapiler glomerulus meningkatkan permeabilitas kapiler terhadap protein sehingga menyebabkan proteinuria, sedangkan peningkatan permeabilitas sel endotel menyebabkan edema. Tampak bahwa tiga manifestasi utama dari preeklampsia, yaitu hipertensi, proteinuria, dan edema disebabkan oleh disfungsi endotel akibat peroksidasi lipid.<sup>10-12</sup>

#### 2.4. Stress oksidatif

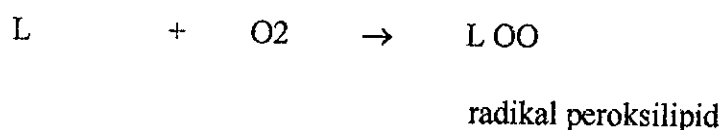
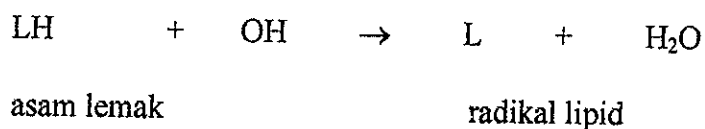
Sebelumnya kita harus mengetahui definisi dari oksidan dan radikal bebas. Dalam ilmu kedokteran keduanya sering dibaurkan, karena memiliki sifat-sifat yang mirip. Oksidan yaitu senyawa penerima elektron atau senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron. Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit terluarnya.<sup>15,38</sup>

Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar justru berasal dari proses-proses biologis alami dan melibatkan apa yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif. Sebagian diantaranya berbentuk radikal seperti OH, OOH, dan  $O_2^-$ , sebagian lain bukan radikal seperti  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ , dan  $ClO^-$ .<sup>15</sup> Walaupun oksigen sangat penting untuk metabolisme normal makhluk hidup, oksigen juga dapat meningkatkan jumlah radikal bebas. Senyawa oksigen reaktif berasal dari oksigen, yang sangat diperlukan oleh organisme aerobik untuk menghasilkan *adenosine triphosphate* (ATP), suatu senyawa yang merupakan sumber energi bagi kebanyakan makhluk hidup melalui proses fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria. Dalam proses fosforilasi oksidatif terjadi proses pengalihan elektron. Dalam keadaan tertentu misalnya stress oksidatif proses pengalihan elektron berjalan

kurang sempurna sehingga terjadi senyawa-senyawa oksigen yang sangat berbahaya, yang akan merusak sel apabila tak diredam.<sup>38</sup>

Senyawa oksigen reaktif yang berperan sebagai oksidan adalah  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OOH}$ ,  $\text{OH}$ , dan  $^1\text{O}_2$ .  $\text{OH}$  merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktivitasnya sangat tinggi kendati masa hidupnya singkat. Senyawa oksigen reaktif hampir semuanya merupakan oksidan yang kuat walaupun memiliki derajat kekuatan yang berbeda-beda. Kecenderungan untuk mendapatkan elektron dari substansi lain membuat radikal bebas sangat reaktif sehingga dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel.<sup>15-16,38</sup>

Efek radikal bebas terhadap membran sel terutama pada asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, dan arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan-serangan radikal, terutama  $\text{OH}$ .  $\text{OH}$  dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid, yaitu:



Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksis terhadap sel, antara lain aldehida-aldehida seperti malondialdehida, 9-hidroksi-nonanal, serta berbagai hidrokarbon seperti etana ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ) dan pentana ( $\text{C}_5\text{H}_{12}$ ).<sup>15,38</sup>

Selain pada membran sel, radikal bebas juga memberikan dampak pada DNA dan protein. Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA

yang antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tak terlalu parah maka masih bisa diperbaiki dengan sistem perbaikan DNA. Namun apabila kerusakan terlalu parah misalnya rantai DNA terputus di berbagai tempat, kerusakan tersebut tak dapat diperbaiki dan replikasi sel terganggu. Sistem perbaikan DNA itu sendiri sering mengakibatkan mutasi yang dapat menimbulkan kanker. Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino yang menyusun protein tersebut sehingga kehilangan fungsi biologisnya (misalnya: enzim menjadi kehilangan aktivitasnya).<sup>15</sup> Dengan demikian, sebagian besar struktur sel sangat rentan, termasuk membran, protein, dan DNA, yang dapat menyebabkan mutasi dan kematian sel.<sup>38</sup>

Stress oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara jumlah oksidan dan antioksidan. Dalam keadaan normal tubuh manusia dilengkapi dengan berbagai mekanisme untuk mempertahankan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Jika jumlah radikal bebas yang terbentuk melampaui batas kemampuan mekanisme pertahanan antioksidan yang dimiliki tubuh, maka rangkaian reaksi yang terjadi akan bersifat destruktif dan menyebabkan kerusakan sel.<sup>11,38</sup> Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan ini dijumpai dalam preeklampsia, dan diduga merupakan awal dari berbagai reaksi yang kompleks yang menimbulkan sindrom klinis dari preeklampsia.<sup>12</sup>

Maka pada preeklampsia timbul berbagai manifestasi klinik maupun laboratoris yang sebenarnya merupakan dampak dari keadaan stress oksidatif yang mengakibatkan disfungsi endotel. Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang dapat dilihat pada preeklampsia membuat para ahli memikirkan

kemungkinan untuk memberikan antioksidan sebagai upaya pencegahan terjadinya atau bertambah beratnya preeklampsia.

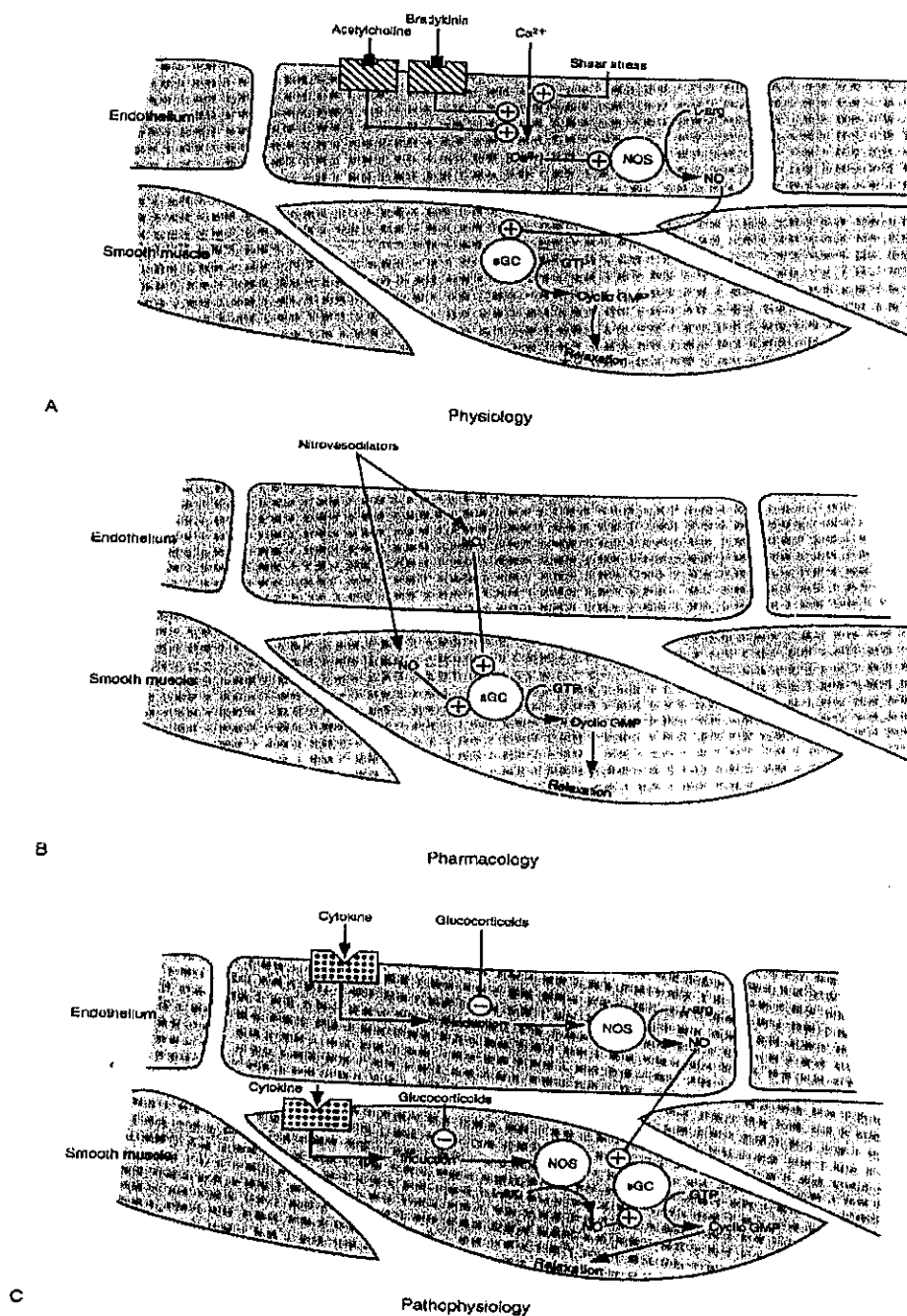
## 2.5. Disfungsi NO pada Preeklampsia

Para ahli mengajukan hipotesis bahwa disfungsi primer dari preeklampsia adalah akibat defisiensi relatif dari NO yang tersedia (akibat sekunder dari degradasi oksidatif) dan ONOO<sup>-</sup> yang berlebihan.<sup>7,13,19</sup> Preeklampsia merupakan penyakit yang kompleks yang menyebabkan ketidakseimbangan antara NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dan ONOO<sup>-</sup> dalam vaskular endotel.<sup>13,23</sup> Proses stress oksidatif akan menyebabkan disfungsi NO akibat penggunaan NO yang berlebihan akibat bereaksi dengan O<sub>2</sub><sup>-</sup> sehingga membentuk ONOO<sup>-</sup>. ONOO<sup>-</sup> merupakan zat yang sangat reaktif dan mampu menyebabkan disfungsi endotel dengan cara berinteraksi dengan residu tirosin membentuk nitrotirosin.<sup>12-14</sup> Kombinasi dari defisiensi NO dan peningkatan ONOO<sup>-</sup> secara langsung maupun tidak langsung dapat memicu timbulnya perubahan fisiologis maupun serologis yang berkaitan dengan preeklampsia, misalnya peningkatan tekanan darah, proteinuria, disfungsi platelet, peningkatan TXA dan endotelin, dan penurunan PGI<sub>2</sub>.<sup>13-14</sup>

NO adalah suatu zat mediator parakrin yang sangat penting dalam regulasi tonus vaskular dan homeostatis. Selain menstimulasi relaksasi sel otot polos pembuluh darah dan vasodilatasi, NO juga memberikan efek antiaterogenik yang poten, termasuk inhibisi proliferasi sel otot halus, agregasi platelet, dan interaksi leukosit dengan sel endotel.<sup>1,13,38</sup> NO terbukti berpengaruh terhadap tonus miogenik dan resistensi vaskuler arteri pada sirkulasi uterus pada kehamilan normal, dan terhadap sirkulasi uteroplasenter pada preeklampsia.<sup>42-43</sup> Aktifitas NO diperantari

oleh reaksi dan aktivasi *guanylate cyclase* (GC) yang menghasilkan peningkatan cGMP, sehingga dalam beberapa detik NO mampu berdifusi dalam membran sel dan mampu menyebabkan dilatasi vaskular.<sup>13</sup> Gambar 1 menjelaskan mekanisme relaksasi vaskular yang diperantarai oleh NO.

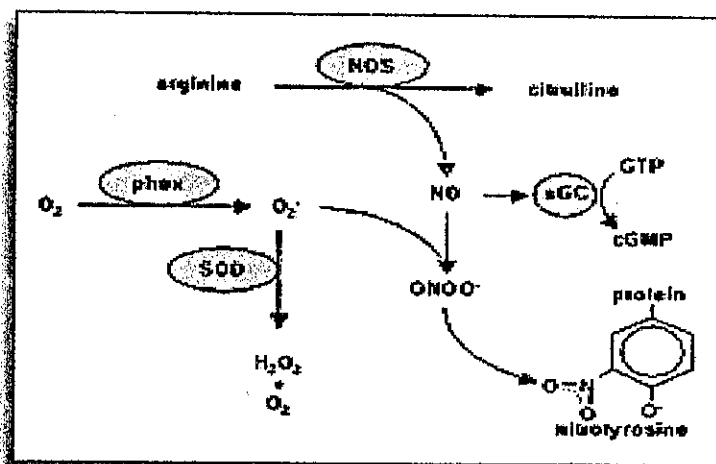
NO disintesis dari asam amino non esensial *L-arginine* melalui kerja enzim yang disebut dengan NOS. Ada 3 isoform dari NOS: neuronal (nNOS atau NOS1), *cytokineinducible* (iNOS atau NOS2), dan endotelial (eNOS atau NOS3). Salah satu yang membedakan ketiga isoform tersebut yaitu dalam hal lokasi subseluler. iNOS banyak dijumpai dalam sitosol dan normalnya diproduksi di sel-sel makrofag, nNOS lebih banyak dijumpai dalam sitosol neuron, sebagian kecil pada muskuloskeletal, sedangkan eNOS lebih banyak dijumpai pada membran sel endotel.<sup>14</sup> eNOS merupakan enzim yang paling berpengaruh dalam metabolisme NO pada membran sel endotel. Radikal bebas terutama  $O_2^-$  mengakibatkan terpakainya NO yang berlebihan membentuk  $ONOO^-$  yang sangat radikal (Gambar 2).<sup>45</sup>



**Gambar 1. Relaksasi vaskular yang diperantarai oleh NO<sup>44</sup>.**

Pada gambar 1A, shear stress atau aktivasi reseptor endotel vaskular oleh bradikinin atau asetilkolin mengakibatkan influks kalsium. Peningkatan kalsium intraselular sebagai akibatnya menstimulasi NOS. NO yang dibentuk dari *L-arginine* (L-arg) oleh enzim tersebut berdifusi ke sel-sel otot polos di dekatnya sehingga menstimulasi *soluble guanylate cyclase* (sGC), menghasilkan peningkatan sintesis *cyclic GMP* dari *guanosine triphosphate* (GTP). Peningkatan *cyclic GMP* pada sel-sel otot polos menyebabkan terjadinya relaksasi. Pada gambar 1B, *nitrovasodilators* seperti *sodium nitroprusside* dan *nitroglycerin* melepaskan NO, secara spontan atau melalui reaksi enzimatik. NO menstimulasi sGC dalam vascular otot polos mengakibatkan relaksasi. Pada gambar 1C interaksi antara sitokin-sitokin dengan reseptornya di sel endotel menyebabkan terbentuknya *calcium-independent nitric oxide synthase*. NOS akan terus memproduksi NO, menyebabkan aktivasi dari sGC dan relaksasi otot polos, mengurangi sensitivitas terhadap vasokonstriktor, serta kerusakan jaringan yang mungkin terjadi. Tanda  $\oplus$  menandakan stimulasi,  $\ominus$  menandakan inhibisi.





**Gambar 2. Reaksi radikal bebas dengan NO** <sup>48</sup>.

O<sub>2</sub><sup>-</sup> yang diproduksi oleh NADPH oksidase (phox) dalam mitokondria, bereaksi dengan NO untuk membentuk ONOO<sup>-</sup>. ONOO<sup>-</sup> intrasel dapat mengubah protein dengan berinteraksi dengan residu tirosin membentuk 3-nitrotirosin.

*Tetrahydrobiopterin* (BH<sub>4</sub>) adalah sebuah kofaktor yang sangat penting untuk aktivitas katalitik dari ketiga isoform NOS. Maka availabilitas dari BH<sub>4</sub> juga mempengaruhi produksi NO di sel-sel endotel <sup>13,19</sup>. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel peningkatan BH<sub>4</sub> intrasel menstimulasi aktivitas eNOS dan meningkatkan produksi NO <sup>19</sup>. Oksidasi yang berlebihan terhadap BH<sub>4</sub> akibat stress oksidatif memberikan kontribusi terhadap terjadinya disfungsi endotel akibat penurunan NO <sup>19,44</sup>.

Pada jaringan mamalia, NOS dengan kofaktor BH<sub>4</sub> menyimpan cukup elektron untuk mengubah kosubstrat oksigen (O<sub>2</sub>) dan *L-arginine* menjadi NO dan *L-citrulline*. In vitro, NOS yang mengalami defisiensi BH<sub>4</sub> tidak dapat mengkatalisasi *L-arginine* menjadi NO tetapi mampu mereduksi O<sub>2</sub> menjadi O<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>13</sup>. Maka disfungsi NOS akibat penurunan BH<sub>4</sub> dalam sel endotel memproduksi O<sub>2</sub><sup>-</sup> dan

berlanjut terbentuknya  $\text{ONOO}^-$ .  $\text{ONOO}^-$  mengakibatkan peroksidasi lipid dan kerusakan protein<sup>12</sup>.

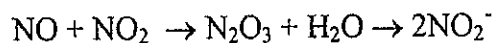
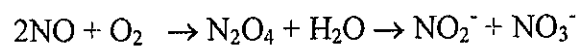
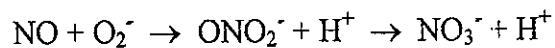
Konsentrasi yang adekuat dari *L-arginine* juga dibutuhkan untuk mencegah pembentukan  $\text{O}_2^-$  ini<sup>45</sup>. Normalnya radikal bebas  $\text{O}_2^-$  ini akan dimetabolisir oleh enzim superoksida dismutase (SOD), menjadi  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang selanjutnya akan dikatalisir oleh enzim katalase. Tetapi  $\text{O}_2^-$  dapat bereaksi dengan NO untuk memproduksi peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Reaksi  $\text{O}_2^-$  dengan NO tiga kali lebih cepat daripada dengan SOD, sehingga bila  $\text{O}_2^-$  meningkat maka  $\text{ONOO}^-$  akan meningkat dan NO yang siap pakai pun akan berkurang<sup>13,44</sup>.

*Asymmetrical dimethylarginine* (ADMA) yaitu inhibitor NOS endogen. Asalnya yang tepat tidak diketahui. Kadar ADMA normalnya dipertahankan untuk tetap rendah dengan adanya enzim *dimethylating enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH)<sup>44</sup>. Meningkatnya kadar ADMA dijumpai pada beberapa keadaan, salah satunya yaitu pada preeklampsia. Hal ini disebabkan turunnya DDAH yang diakibatkan oleh oksidasi LDL dan  $\text{TNF-}\alpha$  yang terjadi pada preeklampsia. Selanjutnya diketahui bahwa efek ADMA *in vivo* lebih ke peningkatan produksi  $\text{O}_2^-$  daripada inhibisi aktivitas NOS, sehingga  $\text{ONOO}^-$  naik dan NO yang siap pakai akan berkurang<sup>13</sup>.

Peningkatan radikal bebas  $\text{O}_2^-$  pada preeklampsia dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satunya yaitu penurunan kadar antioksidan<sup>12,34</sup>. Keadaan stress oksidatif pada preeklampsia membutuhkan konsentrasi dan aktivitas antioksidan. Tetapi pada preeklampsia justru terjadi penurunan antioksidan, baik enzimatis maupun non enzimatis dibandingkan dengan kehamilan normal<sup>14,16,46-47</sup>. Sebab terjadinya kegagalan adaptasi dari stress oksidatif tersebut masih belum

diketahui. Faktor yang lain yang tadi telah disebutkan yaitu defisiensi kofaktor BH<sub>4</sub>. Terutama eNOS sangat tergantung pada BH<sub>4</sub> untuk mencegah produksi O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Peningkatan radikal bebas endogen juga menyebabkan defisiensi BH<sub>4</sub><sup>48</sup>. Faktor yang lain yaitu adanya defisiensi *L-arginine*<sup>45</sup>. Defisiensi *L-arginine* juga dapat meningkatkan produksi O<sub>2</sub><sup>-</sup> oleh NOS. Walaupun demikian rasio *L-arginine*/ADMA dapat menurun walaupun *L-arginine* normal, sehingga kadar *L-arginine* yang normal tidak dapat menjamin bahwa pembentukan O<sub>2</sub><sup>-</sup> tidak terjadi<sup>13</sup>.

NO mengalami sejumlah reaksi dengan beberapa molekul yang ada dalam cairan biologis, yaitu :



Maka NO dalam tubuh mamalia tidak stabil dan segera diubah menjadi metabolitnya yaitu nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Jumlah dari keduanya menggambarkan kadar NO total dalam tubuh<sup>38</sup>.

Beberapa penelitian telah berusaha untuk meneliti kadar NO dengan melihat kadar metabolitnya, yaitu nitrat dan nitrit, dalam serum atau plasma penderita preeklampsia dibandingkan dengan kehamilan normotensi, dengan hasil yang bervariasi. Sebagian besar peneliti setuju dengan hipotesis bahwa pada preeklampsia terjadi penurunan NO akibat dari stress oksidatif<sup>21-23,49-50</sup>. Beberapa peneliti yang menemukan peningkatan pada kadar NO plasma maupun serum pada preeklampsia menyimpulkan bahwa peningkatan tersebut akibat kompensasi terhadap preeklampsia daripada merupakan etiologi dari penyakit itu sendiri<sup>51-53</sup>.

Telah pula diteliti hubungan disfungsi NO dengan terganggunya sirkulasi uteroplasenter yang ditandai oleh adanya pertumbuhan janin terhambat. Didapatkan bahwa konsentrasi metabolit dari NO yaitu nitrit dan nitrat dalam cairan amnion berhubungan dengan *flow velocimetry waveforms* arteri uterina. Konsentrasi nitrit terbukti lebih rendah pada pasien dengan pertumbuhan janin terhambat dengan indeks resistensi abnormal dibandingkan dengan *flow* normal<sup>54</sup>. Pada preeklampsia dijumpai peningkatan kadar S-nitrosothiols (reservoir utama NO) dan S-nitrosoalbumin (kontributor S-nitrosothiols)<sup>55</sup>. Bukti disfungsi NO juga didukung oleh penelitian yang menemukan residu nitrotirosin (marker pembentukan ONOO<sup>-</sup>) pada pembuluh darah plasenta pada penderita preeklampsia yang menunjukkan adanya proses stress oksidatif<sup>56</sup>.

## 2.6. Antioksidan

Antioksidan yaitu suatu senyawa yang dapat menetralkan oksidan dengan memberikan pasangan elektron pada oksidan sehingga keduanya menjadi tidak bereaksi kembali atau menjadi netral<sup>38</sup>. Seperti telah disebutkan di atas bahwa antioksidan ini merupakan salah satu mekanisme penting dari pertahanan tubuh untuk menangkal radikal bebas.

Terdapat 2 mekanisme penting dalam mengurangi efek merugikan dari oksidan terhadap sel. Pada keadaan normal mekanisme ini mampu mempertahankan homeostasis dan mengontrol radikal bebas untuk tetap pada kadar tertentu. Bila mekanisme ini rusak maka terjadi yang disebut dengan stress oksidatif<sup>15,38</sup>. Mekanisme pertama yaitu sistem enzimatik. Enzim ini bekerja intra dan ekstraseluler, tetapi sebagian besar terdapat di mitokondria dan sitoplasma sel. Satu

molekul enzim antioksidan dapat menetralkan beberapa ratus radikal bebas sebelum akhirnya struktur protein enzim tersebut kehilangan fungsinya. Terdapat beberapa enzim yang mengurangi proses oksidatif yaitu enzim superoksida dismutase (SOD), enzim katalase, dan glutathion peroksidase (GSH Px). SOD merupakan katalisator dekomposisi  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$ , sedangkan katalase adalah suatu protein heme (besi) yang merupakan katalisator dekomposisi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . GSH Px adalah suatu protein selenium yang merupakan katalisator dekomposisi  $H_2O_2$  dan hidroperoksida organik dengan bantuan glutathion (GSH). Enzim ini dapat pula mereduksi lipid hidroperoksida pada proses peroksidasi lipid<sup>15</sup>. Mekanisme yang kedua yaitu antioksidan nonenzimatik. Prinsip kerja antioksidan yang terletak di ekstraseluler ini adalah kemampuannya memberikan ion hidrogen, sehingga radikal bebas menjadi molekul yang stabil<sup>17</sup>. Vitamin E dan C merupakan contoh antioksidan jenis ini, selain karotenoid, asam amino tiol, asam amino fenolik, alopurinol, trimetazidine, serta Mn, Cu, dan Zn sebagai komponen SOD<sup>15,17,38</sup>.

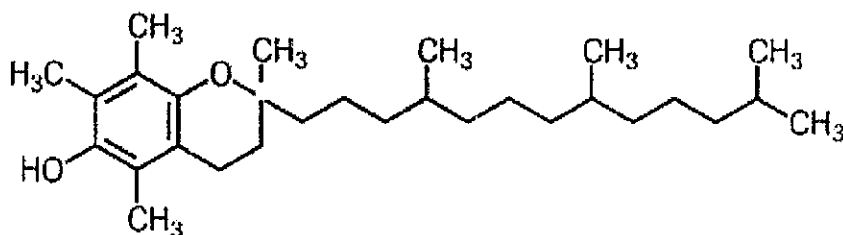
Pada preeklampsia telah banyak dibuktikan melalui berbagai penelitian bahwa kadar antioksidan lebih rendah dibandingkan dengan kehamilan normal. Vitamin E dan C pada penderita preeklampsia didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan hamil normotensi<sup>47</sup>. Sebuah studi di Amerika Serikat menggunakan *plasma assay* dan *dietary questionnaire* untuk menentukan asupan dan kadar vitamin E dan C menemukan peningkatan risiko dua kali lipat untuk terjadinya preeklampsia pada wanita yang mengkonsumsi vitamin E dan C kurang dari standar kebutuhan sehari<sup>46</sup>.

Banyak penelitian eksperimental yang membuktikan bahwa vitamin E, terutama bila diberikan dengan vitamin C, secara efektif mengurangi kerusakan

akibat stress oksidatif. Sebuah uji kontrol acak yang dilakukan pada penderita hipertensi menemukan bahwa suplementasi vitamin C 500 mg/hari selama 8 bulan dapat menurunkan tekanan darah secara bermakna<sup>57</sup>. Penelitian serupa dilakukan di Amerika Serikat, yaitu dengan memberikan vitamin C 500-1000 mg/hari selama 10 minggu kadar vitamin C dalam darah meningkat 55% dan parameter stress oksidatif berkurang 60%<sup>58</sup>. Sebuah penelitian mendapatkan penurunan secara bermakna dari kadar peroksida lemak serum pada penderita preeklampsia ringan yang diberikan vitamin E<sup>19</sup>. Di London sebuah uji kontrol acak dilakukan terhadap 283 wanita risiko tinggi untuk menderita preeklampsia. Sejak umur kehamilan 22 minggu diberikan vitamin C 1000 mg/hari dan vitamin E 400 IU/hari, dengan hasil penurunan sebesar 21% pada PAI-1/PAI-2, penurunan kejadian preeklampsia dan peningkatan kadar vitamin E dan C plasma setelah pemberian vitamin<sup>18</sup>. Peneliti yang sama menemukan perbaikan indeks disfungsi plasenta, disfungsi endotel, dan stress oksidatif pada preeklampsia (kadar asam askorbat, 8-epi-prostaglandin, leptin, dan rasio PAI-1/PAI-2) setelah pemberian vitamin E 400IU/hari dan vitamin C 1000mg/hari mulai umur kehamilan 20-22 minggu<sup>20</sup>. Penelitian di Afrika Selatan yang memberikan vitamin E 800 IU/hari, vitamin C 1000 mg/hari dan allopurinol 200 mg/hari pada penderita preeklampsia berat sejak umur kehamilan 24-32 minggu selama kurang lebih 2 minggu menemukan bahwa lebih banyak penderita di kelompok plasebo yang memerlukan dua obat antihipertensi sekaligus untuk menurunkan tekanan darah<sup>36</sup>.

### 2.6.1. Vitamin E

Ada beberapa jenis *tocopherol* dalam bentuk alami. Vitamin E terdapat dalam bentuk 8 isomer yang berbeda, yaitu 4 *tocopherol* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) dan 4 *tocotrienol* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ).  $\alpha$ -*tocopherol* merupakan bentuk yang dibutuhkan oleh tubuh<sup>60-61</sup>.



Gambar 3. Struktur kimia  $\alpha$ -*tocopherol*<sup>60</sup>.

Gangguan absorpsi lemak akan menimbulkan defisiensi lemak karena vitamin E larut dalam lemak makanan dan dibebaskan serta diserap selama proses pencernaan lemak. Lebih lanjut vitamin E diangkut dalam darah oleh lipoprotein. Pertama, yaitu lewat penyatuan ke dalam kilomikron yang mendistribusikan vitamin tersebut ke jaringan yang mengandung lipoprotein lipase serta kemudian ke hati dalam bentuk fragmen sisa kilomikron. Kedua, lewat pengeluaran dari dalam hati di dalam *very low density lipoprotein* (VLDL). Selanjutnya vitamin E disimpan dalam jaringan lemak dan hati<sup>38</sup>.

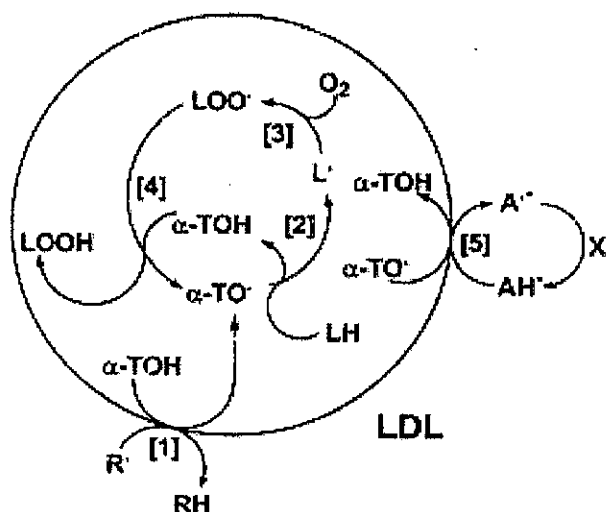
*Tocopherol* mengalami oksidasi menjadi radikal *tocopheroxyl* yang merupakan proses reversibel, yaitu mengalami proses daur ulang yang diperantarai oleh vitamin C (asam askorbat) menjadi *tocopherol* kembali. Proses selanjutnya

adalah proses yang ireversibel, yaitu mengalami oksidasi menjadi *tocopherylquinone*, yang sebagian direduksi menjadi  $\alpha$ -*tocopherylhydroquinone* dan terkonjugasi menjadi asam glukoronat dan diekskresi di feces. Sebagian kecil (< 1%) akan diekskresi di urine<sup>60</sup>.

Fungsi terpenting dari vitamin E yaitu sebagai antioksidan biologis yang bekerja sinergis dengan enzim GSH Px, SOD, dan katalase<sup>38</sup>. Vitamin E tampaknya merupakan baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam fosfolipid membran seluler dan subseluler. Fosfolipid pada mitokondria, retikulum endoplasma serta membran plasma mempunyai afinitas terhadap  $\alpha$ -*tocopherol*, dan vitamin E tampaknya terkonsentrasi pada tempat-tempat ini<sup>39,60</sup>.

Vitamin E bersifat lipofilik dan menetralkan radikal bebas terutama peroksilipid, selain itu dalam reaksi lebih lambat juga  $O_2$ - dan OH, serta  $^1O_2$ . Karena keberadaannya dalam membran,  $\alpha$ -*tocopherol* dapat bereaksi dengan radikal lipid (L) dan radikal peroksilipid (LOO), membentuk radikal *tocopheroxyl* ( $\alpha$ -TO) atau *tocopheroxyl* yang tidak reaktif. Walaupun tidak reaktif namun demikian perlu juga dihilangkan melalui reaksi dengan askorbat (AH) menghasilkan radikal askorbil (A), yaitu melalui proses daur ulang in vivo melalui proses reduksi *tocopheroxyl* kembali menjadi *tocopherol*<sup>15,38</sup>. Dengan cara ini maka kadar vitamin E diharapkan dapat dipertahankan sehingga mampu mengimbangi peroksidasi lipid dan oksidasi protein yang meningkat<sup>15,38,59-60</sup>.





**Gambar 4 . Reaksi  $\alpha$ -tocopherol dengan radikal bebas<sup>62</sup>.**

Reaksi [1] disebut fase reaksi transfer dari  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOH). Reaksi [2] merupakan proses peroksidasi lipid, diikuti dengan reaksi [3] dan [4] yaitu reaksi propagasi. Askorbat (AH) bereaksi dengan radikal  $\alpha$ -tocopheroxyl ( $\alpha$ -TO) untuk membentuk  $\alpha$ -TOH (reaksi [5]). LH: asam lemak tak jenuh ganda, L: radikal lipid, LOO: radikal peroksilipid, R radikal bebas, RH radikal bebas dalam bentuk tereduksi.

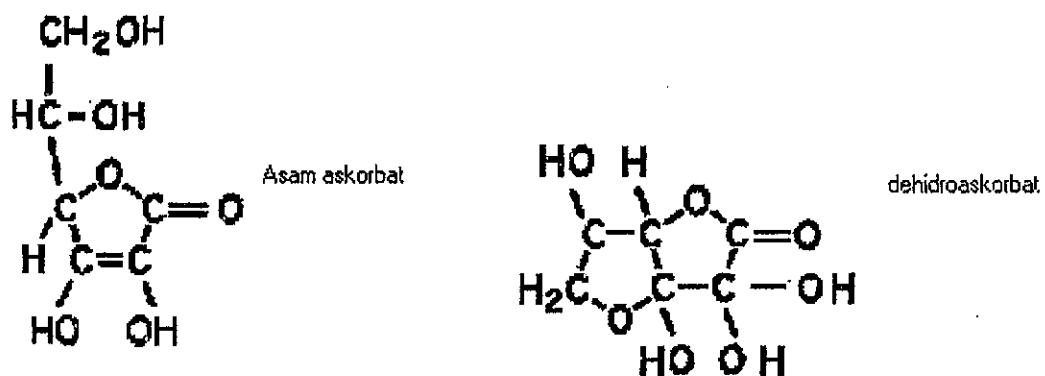
Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek vitamin E terhadap vaskular dan stress oksidatif. Peneliti di Jepang memberikan 300 mg  $\alpha$ -tocopherol selama 4 minggu pada penderita angina dengan hasil meningkatnya vasodilatasi vaskular dan menurunnya lipid peroksidase plasma<sup>26</sup>. Penelitian dengan memberikan vitamin E 400 IU/hari selama 8 minggu pada penderita dispilidemia memberikan hasil perbaikan terhadap disfungsi endotel<sup>27</sup>.

Vitamin E mampu meningkatkan kadar NO, dengan cara meningkatkan aktivasi dari NOS, sehingga sintesis dan aktivitas biologi dari NO akan meningkat<sup>62</sup>. Secara tidak langsung peningkatan produksi NO pada preeklampsia didapatkan dari aktivitas vitamin E dalam menghambat proses stress oksidatif, sehingga pemberiannya disarankan untuk mencegah terjadinya disfungsi endotel<sup>13</sup>.

Penelitian tidak mendapatkan bukti adanya efek mutagenik, karsinogenik, dan teratogenik vitamin E pada dosis yang aman. Dosis aman untuk vitamin E berada pada rentang RDA (*Recommended Day Allowance*) 15 IU/hari sampai 1200 IU/hari. Daerah kuning (*yellow zone*) pada dosis antara 1200-3200 IU/hari, dan daerah merah (*red zone*) pada dosis lebih dari 3200/hari. Penelitian klinik pada dosis 3200 IU/hari ditemukan hanya sedikit efek samping berupa mual dan diare. Sementara yang lain mengeluh sakit kepala, lemah, dan pusing. Walaupun vitamin E dikatakan relatif aman dengan dosis aman yang cukup lebar, beberapa kondisi harus mendapat perhatian khusus yakni pada penderita yang mengalami masalah gangguan pembekuan darah, atau menggunakan terapi antikoagulan seperti warfarin atau heparin<sup>63</sup>.

### 2.6.2. Vitamin C

Vitamin C terdapat dalam bentuk asam askorbat maupun dehidroaskorbat. Asam askorbat teroksidasi dengan mudah dalam air oleh O<sub>2</sub> menjadi dehidroaskorbat<sup>60-61</sup>

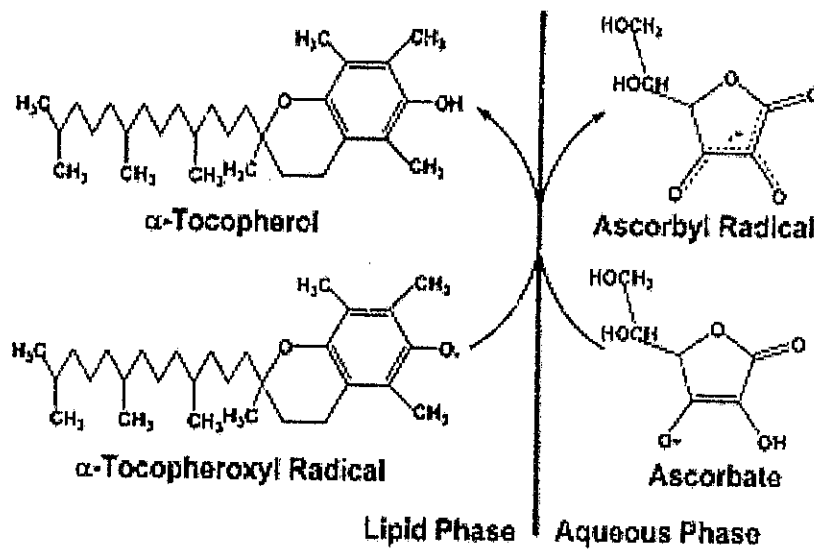


Gambar 5. Struktur kimia vitamin C<sup>60</sup>.

Walaupun fungsi vitamin C belum jelas seluruhnya, beberapa proses yang tercatat membutuhkan asam askorbat, yaitu sintesis kolagen, penguraian tirosin, sintesis epinefrin dari tirosin, pembentukan asam empedu, penyerapan besi, bertindak sebagai antioksidan umum yang larut dalam air, dan dapat menghambat pembentukan nitrosamin selama proses pencernaan berlangsung<sup>38</sup>.

Asam askorbat diabsorpsi oleh usus halus, dan hampir seluruh asam askorbat dari diet terabsorpsi secara sempurna. Asam askorbat masuk dalam sirkulasi untuk didistribusikan ke dalam sel-sel tubuh. Asam askorbat dioksidasi *in vivo* menjadi radikal bebas askorbil. Selanjutnya sebagian akan mengalami proses reversibel menjadi vitamin C kembali, sedangkan sebagian lagi menjadi dehidroaskorbat yang selanjutnya akan mengalami hidrolisis, oksidasi, dan pada akhirnya diekskresi melalui urine<sup>38,61</sup>.

Vitamin C mampu menghambat oksidasi LDL oleh sel-sel vaskular dan netrofil di kompartemen hidrofilik sehingga mencegah radikal bebas bereaksi di membran lipid.<sup>62</sup> Asam askorbat bereaksi dengan OH menjadi radikal askorbil yang relatif tidak reaktif. Reaksi tersebut berperan dalam proses daur ulang vitamin E, yaitu perubahan radikal *α-tocopheroxyl* menjadi *α-tocopherol* sehingga kombinasi keduanya mempunyai potensi antioksidan yang sangat kuat (gambar 6).

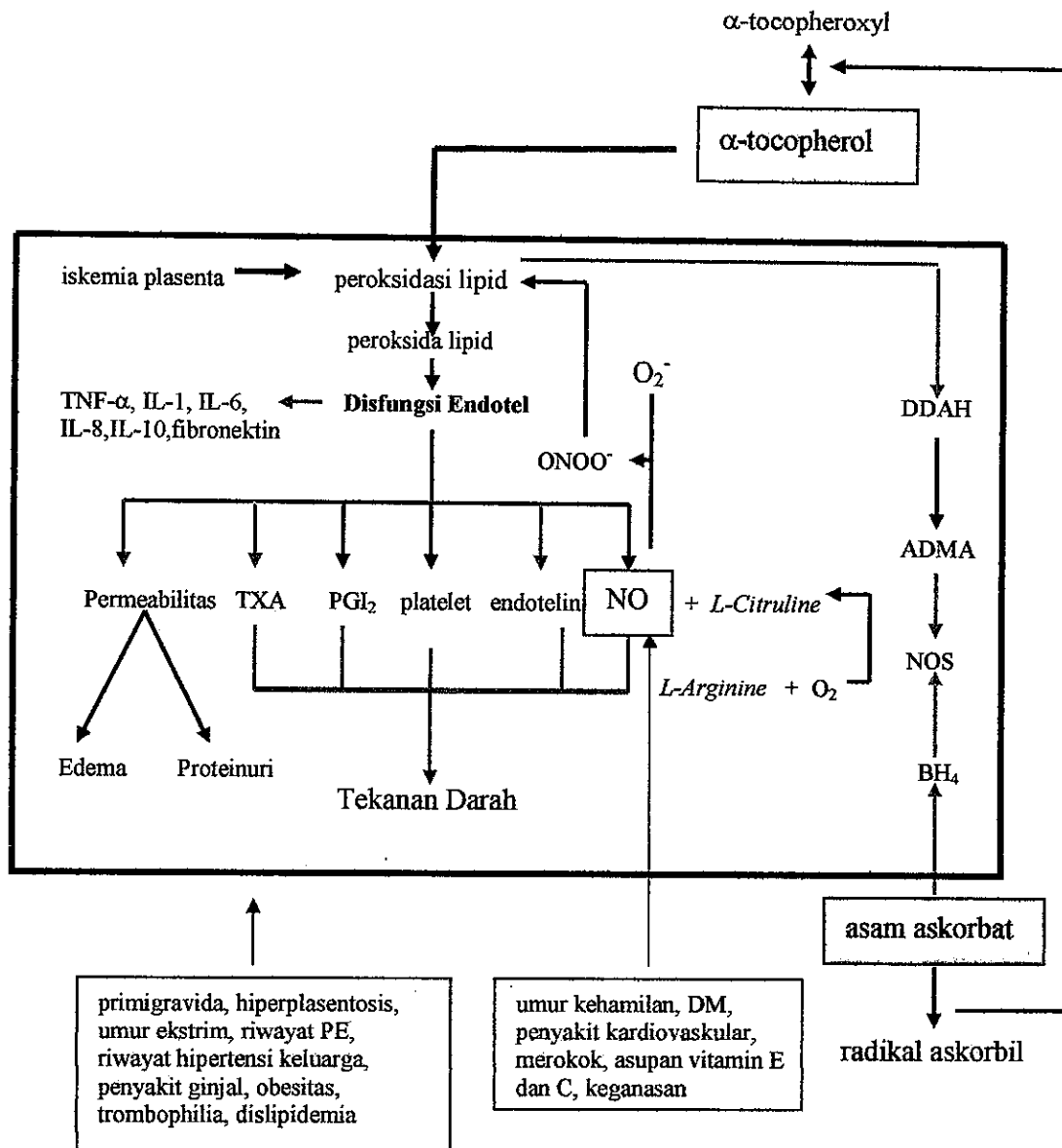


**Gambar 6. Peran vitamin C dalam proses daur ulang vitamin E <sup>62</sup>.**

Seperti vitamin E, vitamin C mampu meningkatkan sintesis dan aktivitas biologi NO dengan cara menghambat pembentukan  $O_2^-$  dan mencegah peroksidasi lipid yang membuat turunnya kadar NO, mampu meningkatkan produksi reservoir utamanya yaitu S-nitrosothiol, melepaskan NO dari S-nitrosothiol, dan meningkatkan kadar  $BH_4$  intrasel yang diperlukan dalam pembentukan NOS <sup>13,62</sup>. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa vitamin C meningkatkan sintesis NO dengan meningkatkan dan menstabilisasi  $BH_4$  intrasel <sup>64-66</sup>.

Keluhan yang sering timbul akibat konsumsi vitamin C dosis tinggi yaitu gangguan gastrointestinal. Pada megadosis (>1000 mg/hari) diduga menimbulkan pembentukan batu oksalat, menghambat absorpsi asam urat, meningkatkan destruksi vitamin B12, dan urikosuria. Dari berbagai penelitian tidak dijumpai efek samping yang berarti akibat pemberian vitamin C dosis tinggi, termasuk dugaan terjadinya batu oksalat di ginjal yang tidak terbukti <sup>60-61</sup>.

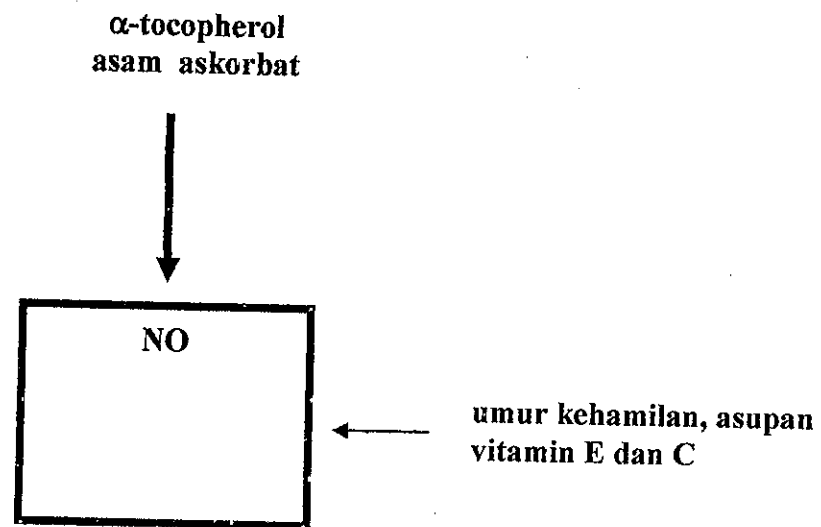
2.7. KERANGKA TEORI



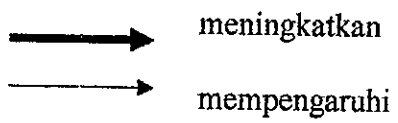
**Keterangan :**

- > Menyebabkan terjadinya, berubah menjadi
- > Menghambat terjadinya
- > Meningkatkan
- > Menurunkan
- > Faktor yang berpengaruh

## 2.8. KERANGKA KONSEP



Keterangan :



## **BAB 3**

### **HIPOTESIS**

Dengan asumsi iNOS dan nNOS tidak berbeda antara kedua kelompok, maka hipotesis penelitian ini adalah :

Terdapat peningkatan kadar NO serum setelah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000mg/hari selama 8 minggu.

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan suatu uji kontrol acak (*randomized controlled trial*), *pre and post test design*.

#### **4.2. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Unit Rawat Jalan Ibu Hamil Rumah Sakit dr. Kariadi – Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Puskesmas Halmahera dan Jatingaleh mulai Agustus 2004 – Februari 2005.

#### **4.3. Cara Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling*, sedangkan alokasi random dilakukan dengan tabel angka random. Pasien dikelompokkan menjadi kelompok vitamin (kelompok yang mendapat kombinasi vitamin E dan C) dan kelompok plasebo (kelompok yang mendapat plasebo).

#### **4.4. Subyek penelitian**

Subyek penelitian adalah semua penderita preeklampsia ringan yang memenuhi ketentuan sebagai berikut.



**Kriteria inklusi :**

1. umur kehamilan 20-34 minggu
2. kehamilan tunggal
3. preeklampsia ringan
4. setuju untuk mengikuti penelitian

**Kriteria eksklusi :**

1. gangguan kardiovaskular
2. riwayat diabetes melitus
3. keganasan
4. merokok
5. riwayat alergi vitamin E atau C
6. sedang mendapatkan terapi antikoagulan

**Drop out :**

1. mengalami persalinan sebelum terapi selesai
2. tidak meneruskan pengobatan

**4.5. Perhitungan besar sampel**

Di dalam penelitian ini untuk menerima atau menolak hipotesis untuk mendapat kekuatan atau *power* statistik 80% ( $1-\beta$ ) dengan menggunakan tingkat kemaknaan ( $\alpha$ ) 0,05, digunakan rumus uji hipotesis terhadap rerata dua populasi, yaitu:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[ \frac{(z\alpha + z\beta) \times SD}{x_1 - x_2} \right]^2$$

keterangan :

SD : simpang baku kedua kelompok (dari pustaka)

$X_1 - X_2$  : perbedaan klinis yang diinginkan (*clinical judgement*)

$z\alpha = 1,96$

$z\beta = 0,842$

Dari penelitian di Finlandia tahun 1999 didapatkan simpang baku sebesar  $10\mu\text{M}$  , dan perbedaan sebesar  $10\mu\text{M}$  dianggap berarti secara klinis ( $X_1 = 25\mu\text{M}$ ,  $X_2 = 15\mu\text{M}$ ). Maka dari rumus tersebut didapatkan  $n_1 = n_2 = 15,68$ , ditambah antisipasi drop out sebesar 10% maka  $n_1 = n_2 = 17,18$  dibulatkan menjadi 18. Maka jumlah sampel adalah 18 untuk kelompok yang diberi vitamin E dan C, dan 18 untuk kelompok yang diberi plasebo.

#### 4.6. Variabel Penelitian

Variabel bebas adalah pemberian antioksidan (vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari). Variabel tergantung adalah kadar NO serum dan tekanan darah.

Variabel perancu adalah umur kehamilan dan asupan vitamin E dan C dari makanan. Beberapa faktor yang diperkirakan dapat mempengaruhi hasil penelitian, yaitu gangguan kardiovaskular, riwayat diabetes melitus, keganasan, dan merokok dimasukkan dalam kriteria eksklusi. Sedangkan trombophilia sebagai kondisi sistemik yang dapat mengakibatkan iskemia tidak diperiksa dalam penelitian ini karena keterbatasan biaya.

#### 4.7. Proses Penelitian

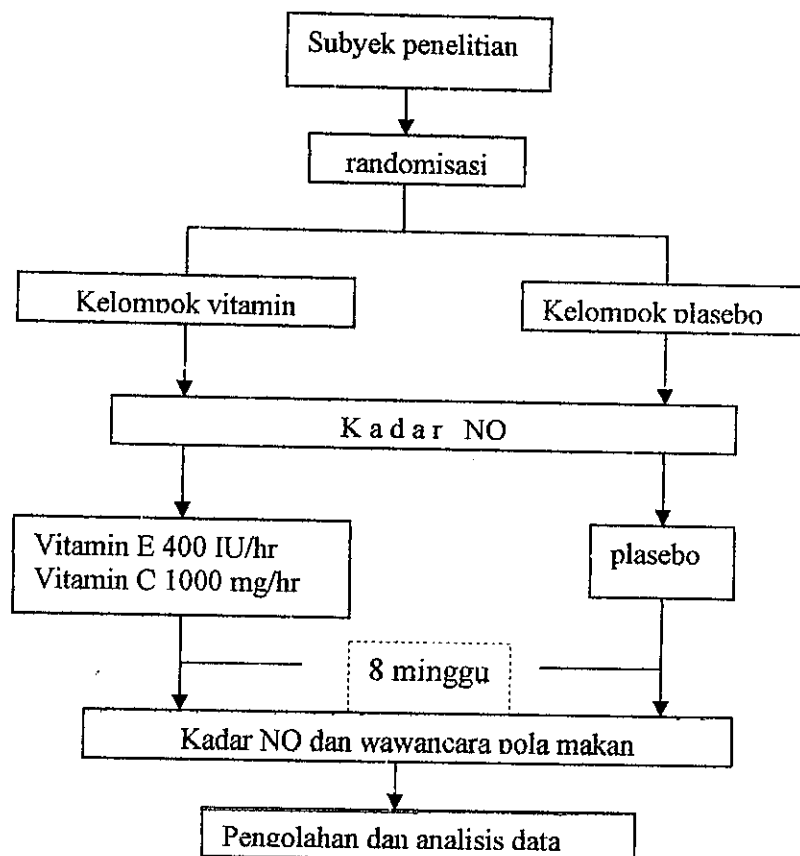
1. Penderita yang memenuhi syarat penerimaan sampel diberi penjelasan mengenai penelitian yang akan dilakukan dan menandatangani surat persetujuan untuk mengikuti penelitian.
2. Data-data mengenai penderita diambil sesuai dengan variabel yang diperlukan.
3. Seluruh penderita dilakukan pengambilan darah vena perifer (vena kubiti) sebanyak 3 cc untuk dilakukan pemeriksaan kadar NO serum sebelum intervensi. Sampel darah dimasukkan dalam tabung tanpa antikoagulan, diberi kode dan dikirim ke laboratorium GAKI untuk dilakukan *centrifuge*. Serum diambil dengan mikropipet *blue tip*, kemudian dimasukkan dalam tabung krio Eppendorf dan dibekukan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai pada saat pemeriksaan dilakukan.
4. Setelah melalui proses randomisasi penderita diberi vitamin C 1000 mg dalam dosis terbagi 2 kali 500 mg/hari dan vitamin E 400 IU/hari untuk kelompok vitamin, dan plasebo untuk kelompok plasebo.
5. Pada akhir minggu ke-8 dilakukan pengambilan darah vena kembali untuk mengetahui kadar NO serum setelah intervensi, serta dilakukan wawancara mengenai pola makan selama 2 bulan terakhir. Wawancara menggunakan *food frequency questionnaire*.
6. Pemeriksaan sampel serum dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas Universitas Gajahmada Yogyakarta.

7. Di Laboratorium sampel serum dipersiapkan sesuai prosedur, kemudian kadar NO diperiksa menggunakan metode *colorimetric non-enzymatic*. Metode ini dipilih karena sampel berupa serum yang banyak mengandung protein sehingga kadmium lebih baik digunakan dibandingkan nitrat reduktase (metode *enzymatic*) untuk konversi nitrat menjadi nitrit. Seluruh sampel serum diduplikasi, selanjutnya dilakukan pemeriksaan sesuai prosedur yang tertera dalam buku manual.
8. Pembacaan absorbans pada setiap sumuran menggunakan spektrofotometer (ELISA Reader) dengan panjang gelombang 450 nm. Selanjutnya kadar NO dicari dengan menggunakan regresi linier (proses dengan piranti lunak KC-4). Kadar NO dalam satuan  $\mu\text{M}$ .
9. Seluruh data dikumpulkan, diolah, dan dianalisis secara statistik.

#### **4.8. Pengolahan dan analisis data**

Pengolahan dan analisis data menggunakan program SPSS for Windows 11.5. Asupan vitamin E dan vitamin C diperoleh dari pengolahan data menggunakan program Nutrisoft. Analisis data menggunakan Kolmogorov-Smirnov untuk uji normalitas distribusi, uji  $t$  untuk mengetahui perbedaan rerata kedua kelompok pada distribusi normal, *Wilcoxon Signed Ranks test* dan *Mann Whitney U test* untuk mengetahui perbedaan rerata kedua kelompok pada distribusi abnormal, dan uji Kai kuadrat serta *Fisher exact test* untuk mengetahui hubungan antar variabel yang bersifat kategorikal. Variabel yang dianggap berpengaruh terhadap hasil penelitian dianalisis dengan uji regresi logistik. Perbedaan dianggap bermakna bila  $p < 0,05$ .

#### 4.9. Alur Penelitian



#### 4.10. Definisi Operasional

Preeklampsia ringan adalah hipertensi yang disertai dengan proteinuria yang terjadi pada umur kehamilan 20 minggu atau lebih, tanpa satupun gejala atau tanda dari preeklampsia berat.

**Hipertensi** adalah tekanan darah sistolik  $\geq 140$  mmHg atau tekanan darah diastolik  $\geq 90$  mmHg. Pemeriksaan menggunakan sphygmomanometer air raksa, *cuff* dengan ukuran yang sesuai (paling tidak dapat melingkari 80% pertengahan lengan atas), posisi duduk dengan lengan disangga atau relaks (*cuff* sesuai tinggi jantung), dan menentukan *Korotkoff phase I* (sistolik) dan *phase V* (diastolik).

**Proteinuria** adalah terdapatnya protein dalam urin minimal 300 mg/L atau dengan pemeriksaan kualitatif minimal +1 pada pengambilan urine acak.

**Preeklampsia berat** adalah preeklampsia yang disertai salah satu atau lebih gejala di bawah ini :

1. Tekanan sistolik  $\geq 160$  mmHg atau tekanan diastolik  $\geq 110$  mmHg.
2. Proteinuria  $> 5$  gr/24 jam atau +4 dengan pemeriksaan kualitatif.
3. Oliguria, yaitu produksi urine  $< 500$  ml/ 24 jam yang disertai kenaikan kadar kreatinin plasma.
4. Gangguan visus dan serebral.
5. Nyeri epigastrium atau kuadran kanan atas abdomen.
6. Edema paru – paru dan sianosis.
7. Pertumbuhan janin terhambat.
8. Sindroma HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*)

**Kadar NO serum** adalah kadar NO total dalam serum yang diperoleh dari pengukuran kadar nitrit dan nitrat sebagai produk stabil dari NO dengan menggunakan metode kolorimetrik non enzimatik. Sebelum dilakukan pengukuran kadar nitrit dan nitrat dilakukan persiapan sampel untuk mengurangi protein yang terkandung dalam serum, karena protein yang berlebihan dapat mengganggu hasil

pemeriksaan. Pengukuran kadar nitrit dan nitrat tersebut meliputi 2 tahap, yaitu konversi nitrat menjadi nitrit dengan kadmium sebagai katalisator; diikuti dengan penghitungan nitrit menggunakan reagen Griess. Kadar NO ditetapkan dalam  $\mu\text{M}$ .

**Vitamin E 400 IU** adalah kapsul lunak yang berisi d- $\alpha$  tocopherol 400 IU, diberikan sekali sehari. 1 IU d- $\alpha$  tocopherol setara dengan 1,49 mg d- $\alpha$  tocopherol.

**Vitamin C 1000 mg** adalah kapsul yang berisi asam askorbat 500 mg yang diberikan 2 kali sehari.

**Plasebo** adalah kapsul berisi laktosa untuk menggantikan vitamin E dan vitamin C.

**Asupan vitamin E dan C** adalah asupan vitamin E dan C dari makanan selama 2 bulan terakhir yang didapatkan dari wawancara berdasarkan *Food Frequency Questionnaire*. Setelah itu data yang didapat diolah dengan menggunakan program *Nutrisoft*. Asupan vitamin E dan C menggunakan satuan mg/hari.

**Usia kehamilan** ditentukan berdasarkan hari pertama hari terakhir, dinyatakan dalam minggu.

**Kehamilan tunggal** adalah kehamilan dengan satu janin intrauterin.

**Gangguan kardiovaskular** adalah keadaan abnormal dari sistem kardiovaskular yang diketahui berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan fisik.

**Riwayat diabetes melitus** adalah riwayat menderita suatu keadaan dimana kadar gula dalam darah lebih dari normal yang dapat menimbulkan keluhan sistemik, diketahui berdasarkan anamnesis.

**Keganasan** ditentukan berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan fisik.

**Riwayat alergi vitamin E dan C** adalah riwayat mengalami gangguan sistem tubuh akibat mengonsumsi vitamin E maupun vitamin C.

#### **4.11. Etika penelitian**

- Subyek penelitian yang bersedia mengikuti penelitian menandatangani surat kesediaan.
- Penelitian ini tidak membahayakan jiwa pasien maupun janin yang dikandungnya.
- Bila terjadi efek samping obat yang memerlukan tindak lanjut akan ditanggung oleh peneliti dan subyek dikeluarkan dari penelitian.
- Subyek penelitian tidak dibebani biaya tambahan untuk pemeriksaan yang berkaitan dengan penelitian.
- Identitas subyek penelitian dirahasiakan.



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Bagian/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS dr. Kariadi Semarang, Puskesmas Halmahera, dan Puskesmas Jatingaleh sejak bulan Agustus 2004 sampai dengan Februari 2005, didapatkan subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi adalah 46 orang, dengan 10 orang dikeluarkan dari penelitian, yaitu 9 orang karena tidak meneruskan pengobatan dan 1 orang karena mengalami persalinan sebelum pengobatan selesai, masing-masing 5 dari kelompok vitamin dan plasebo. Dari 36 sampel penelitian, 18 masuk ke dalam kelompok vitamin dan 18 lainnya kelompok plasebo.

#### 5.1. Karakteristik penderita

Karakteristik penderita, seperti yang tercantum dalam tabel 1 meliputi umur, pendidikan, paritas, umur kehamilan, riwayat hipertensi pada kehamilan sebelumnya, dan riwayat hipertensi pada keluarga.

Umur penderita berkisar antara 18 sampai dengan 44 tahun dengan rerata 30,1 (6,68) tahun. Sebanyak 38,88% subyek penelitian memiliki umur kurang dari 20 tahun dan lebih atau sama dengan 35 tahun. Rerata usia penderita pada kelompok vitamin dan plasebo masing-masing adalah 31,5 (7,21) dan 28,7 (5,98) tahun, dengan perbedaan rerata umur penderita antara kedua kelompok tidak bermakna secara statistik ( $p = 0,21$ ). Tidak ada perbedaan dalam hal umur antara kedua kelompok.

Tingkat pendidikan dari seluruh sampel yang terbanyak yaitu SMP dan SMU (masing-masing 36,1%). Dari kelompok vitamin didapatkan tingkat pendidikan SD dan SMP masing-masing sebesar 27,8%, SMU 33,3% dan paling tinggi hanya setingkat D3 sebanyak 11,1%. Tidak jauh berbeda dengan kelompok plasebo dimana didapatkan pendidikan SD 11,1%, SMP 44,4%, SMU 38,9% dan D3 hanya 5,6%. Tingkat pendidikan antara kedua kelompok tidak berbeda bermakna secara statistik ( $p = 0,49$ ). Tingkat pendidikan subyek penelitian pada kedua kelompok sama.

Multipara lebih banyak dijumpai pada keseluruhan penderita, yaitu 63,9%, dibandingkan dengan primipara, yaitu sebanyak 36,1%. Pada kelompok vitamin didapatkan 16,7% adalah nullipara dan 83,3% multipara, sedangkan pada kelompok plasebo nullipara sebanyak 55,6% dan multipara 44,4%. Perbedaan antara kedua kelompok bermakna secara statistik ( $p = 0,035$ ). Subyek penelitian pada kelompok vitamin dan plasebo berbeda dalam hal paritas.

Rerata umur kehamilan pada keseluruhan sampel yaitu 29,3 (3,59) minggu. Rerata umur kehamilan pada kelompok vitamin dan plasebo masing-masing yaitu 28,4 (4,53) dan 30,2 (2,07) minggu. Perbedaan antara kedua kelompok tidak bermakna secara statistik ( $p = 0,13$ ). Tidak ada perbedaan dalam hal umur kehamilan antara kedua kelompok.

Rerata kadar NO sebelum perlakuan pada kelompok vitamin dan kelompok plasebo tidak berbeda secara statistik ( $p = 0,23$ ). Tidak ada perbedaan dalam hal rerata tekanan darah sistolik sebelum perlakuan pada kelompok vitamin dan plasebo ( $p = 0,22$ ). Dengan uji normalitas distribusi didapatkan distribusi yang abnormal dari tekanan darah diastolik sebelum dan sesudah perlakuan. Tekanan darah diastolik

sebelum perlakuan pada kelompok vitamin dan plasebo tidak berbeda bermakna (*Mann Whitney U test*  $p = 0,24$ ). Tidak ada perbedaan dalam hal tekanan darah sebelum perlakuan pada kedua kelompok.

Rerata asupan vitamin E dari makanan pada kelompok vitamin yaitu 4,56 (1,38) mg/hari, sedangkan pada kelompok plasebo adalah 4,72 (2,02) mg/hari. Beda antara kedua kelompok tidak bermakna secara statistik ( $p=0,78$ ). Rerata asupan vitamin C pada kelompok vitamin yaitu 103,67 (45,28) mg/hari, sedangkan pada kelompok plasebo adalah 131,33 (52,79) mg/hari. Beda antara kedua kelompok tidak bermakna secara statistik ( $p=0,11$ ) Tidak ada perbedaan dalam hal asupan vitamin E dan vitamin C dari makanan antara kedua kelompok

Sebanyak 22,% sampel memiliki riwayat hipertensi pada kehamilan sebelumnya. Sebagian besar penderita pada kelompok vitamin (44,4%) tidak mengetahui adanya riwayat hipertensi pada keluarga.

Seluruh peserta penelitian tidak memberikan keluhan efek samping dari pemberian vitamin maupun plasebo.

**Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian pada kelompok vitamin dan plasebo**

Karakteristik	Kelompok vitamin	Kelompok plasebo	<i>p</i>
Umur	Rerata 31,5	Rerata 28,7	
< 20 tahun	1	2	0,21 <sup>a</sup>
20-34 tahun	9	13	
> 34 tahun	8	3	
Pendidikan			0,49 <sup>b</sup>
SD	5	2	
SMP	5	8	
SMU	6	7	
D3	2	1	
Paritas			0,035 <sup>b</sup>
Nullipara	3	10	
Multipara	15	8	
Umur kehamilan (minggu)	Rerata 28,4	Rerata 30,2	0,13 <sup>c</sup>
NO sebelum perlakuan ( $\mu\text{M}$ )	Rerata 20,33	Rerata 24,26	0,23 <sup>c</sup>
Tekanan darah sistolik sebelum perlakuan (mmHg)	Rerata 140	Rerata 136,7	0,22 <sup>c</sup>
Tekanan darah diastolik sebelum perlakuan (mmHg)	Rerata 95	Rerata 92,8	0,24 <sup>d</sup>
Vitamin E sebelum perlakuan (mg/hari)	Rerata 4,56	Rerata 4,72	0,78 <sup>c</sup>
Vitamin C sebelum perlakuan (mg/hari)	Rerata 103,67	Rerata 131,33	0,11 <sup>c</sup>
Riwayat hipertensi hamil sebelumnya			
Ada	7	1	
Tidak ada	11	17	
Riwayat hipertensi pada keluarga			
Ada	5	5	
Tidak ada	5	9	
Tidak tahu	8	4	

<sup>a</sup> Fisher exact test <sup>b</sup> Uji Kai kuadrat <sup>c</sup> Uji t tak berpasangan <sup>d</sup> Mann Whitney U test

## 5.2. Kadar NO

Rerata kadar NO sebelum perlakuan pada kelompok vitamin yaitu 20,33 (10,58)  $\mu\text{M}$ , sesudah perlakuan meningkat menjadi 28,94 (14,08)  $\mu\text{M}$ . Sedangkan pada

kelompok plasebo rerata kadar NO sebelum perlakuan yaitu 24,26 (8,51)  $\mu\text{M}$ , dan sesudah perlakuan turun menjadi 21,14 (8,84)  $\mu\text{M}$ . Beda selisih rerata kadar NO sebelum dan sesudah perlakuan pada kedua kelompok bermakna secara statistik ( $p = 0,004$ ), seperti dapat dilihat pada tabel 2 dan grafik 1. Terdapat peningkatan kadar NO sesudah pemberian vitamin E dan vitamin C pada kelompok vitamin.

Dari analisis bivariat didapatkan adanya perbedaan dalam hal paritas antara kedua kelompok. Seperti telah diketahui bahwa nullipara adalah salahsatu faktor risiko terjadinya preeklampsia.<sup>1</sup> Karena kedua kelompok berbeda dalam hal paritas sehingga diduga akan berpengaruh terhadap luaran, maka dilakukan analisis dengan regresi logistik. Ternyata hasil regresi logistik menunjukkan bahwa faktor paritas tidak memberikan kontribusi terhadap peningkatan kadar NO (Exp (B) 0,39 ;  $p = 0,28$ ). Sedangkan pemberian vitamin berpengaruh besar terhadap kadar NO (Exp(B) 4,87 ;  $p = 0,05$ ).

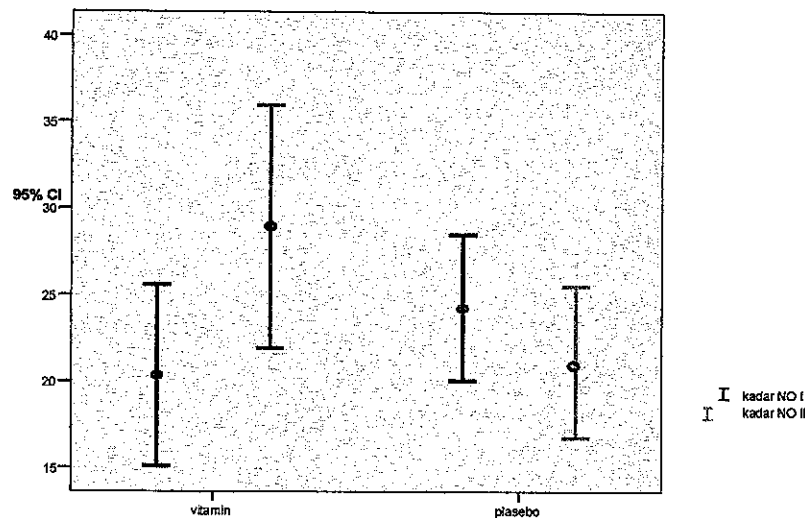
**Tabel 2. Rerata kadar NO pada kelompok vitamin dan kelompok plasebo.**

Kadar NO ( $\mu\text{M}$ )	Kelompok vitamin		Kelompok plasebo		<i>p</i>
	Rerata	SB	Rerata	SB	
NO I	20,33	10,58	24,26	8,1	
NO II	28,94	14,08	21,14	8,84	
Selisih	9,8	14,93	-3,99	11,92	0,004

NO I: kadar NO sebelum perlakuan

NO II: kadar NO sesudah perlakuan

Uji t tak berpasangan SB = simpang baku



**Grafik 1. Kadar NO pada kelompok vitamin dan kelompok plasebo**

Kadar NO I: kadar NO sebelum perlakuan

Kadar NO II: kadar NO sesudah perlakuan

### 5.3. Tekanan darah

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa didapatkan penurunan rerata tekanan darah sistolik sebesar 10,5 mmHg pada kelompok yang diberi vitamin E dan vitamin C, yaitu 140 (6,86) mmHg turun menjadi 129,4 (12,59) mmHg. Demikian pula didapatkan penurunan rerata tekanan darah diastolik sebesar 7,8 mmHg, yaitu dari 95 (7,07) mmHg turun menjadi 87,2 (8,95) mmHg setelah perlakuan. Sebaliknya pada kelompok plasebo didapatkan peningkatan rerata tekanan darah sistolik sebesar 6,7 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 1,6 mmHg. Pada kelompok plasebo rerata tekanan darah sistolik sebelum perlakuan yaitu 136,7 (9,06) mmHg dan 143,3 (15,72) mmHg setelah perlakuan. Sedangkan tekanan diastolik 92,8 (4,61) mmHg menjadi 94,4 (9,84) mmHg. Beda rerata tekanan darah sistolik sebelum dan sesudah

perlakuan pada kelompok vitamin bermakna secara statistik (Uji t berpasangan  $p=0,006$ ), demikian pula tekanan darah diastolik (*Wilcoxon signed ranks test*  $p=0,028$ ). Beda rerata tekanan darah sistolik sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok plasebo bermakna secara statistik (Uji t berpasangan  $p = 0,02$ ), sedangkan beda rerata tekanan darah diastolik tidak bermakna secara statistik (*Wilcoxon signed ranks test*  $p = 0,43$ ). Didapatkan penurunan tekanan darah pada kelompok vitamin dan peningkatan tekanan darah pada kelompok plasebo setelah perlakuan, walaupun secara klinis kurang bermakna. Pada kelompok plasebo didapatkan 5 orang (27 %) yang mengalami progresivitas penyakit menjadi preeklampsia berat setelah perlakuan.

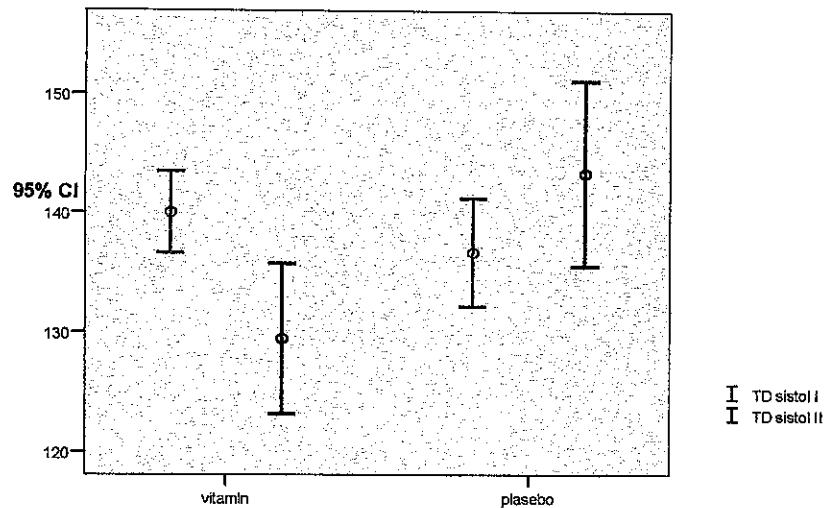
**Tabel 3. Rerata tekanan darah sistolik dan diastolik sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok.**

Tekanan darah (mmHg)	Kelompok Vitamin		Kelompok Plasebo		<i>p</i>
	Rerata	SB	Rerata	SB	
Sistolik I (mmHg)	140	6,86	136,7	9,07	
Sistolik II (mmHg)	129,4	12,59	143,3	15,72	
<i>p</i>	0,006 <sup>a</sup>		0,02 <sup>a</sup>		
Selisih sistolik (mmHg)	-10,5		6,7		0,001 <sup>b</sup>
Diastolik I (mmHg)	95	7,07	92,8	4,61	
Diastolik II (mmHg)	87,2	8,95	94,4	2,32	
<i>p</i>	0,028 <sup>c</sup>		0,43 <sup>c</sup>		
Selisih diastolik (mmHg)	-7,8		1,6		0,008 <sup>d</sup>

I : sebelum perlakuan

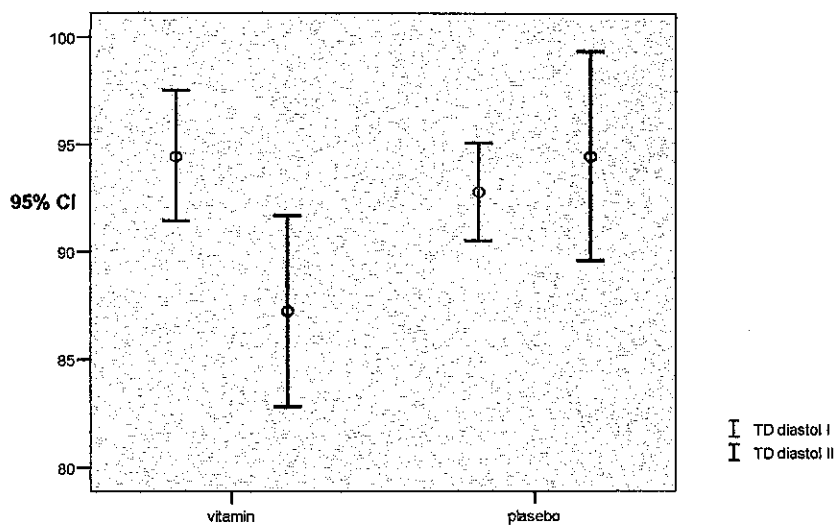
II: sesudah perlakuan

<sup>a</sup> Uji t berpasangan <sup>b</sup> Uji t tak berpasangan <sup>c</sup> *Wilcoxon signed ranks test* <sup>d</sup> *Mann Whitney U test*, SB = simpang baku



**Grafik 2. Tekanan darah sistolik pada kelompok vitamin dan plasebo**

TD sistolik I: tekanan darah sistolik sebelum perlakuan, TD sistolik II: tekanan darah sistolik setelah perlakuan.



**Grafik 3. Tekanan darah diastolik pada kelompok vitamin dan plasebo**

TD diastolik I: tekanan darah diastolik sebelum perlakuan, TD diastolik II: tekanan darah diastolik setelah perlakuan.



Pada kelompok plasebo didapatkan 5 orang (27 %) yang menderita preeklampsia berat setelah perlakuan, sedangkan pada kelompok vitamin tidak didapatkan subyek yang mengalami progresivitas penyakit menjadi preeklampsia berat, dan sebanyak 6 orang (33,33%) menjadi normotensi (Tabel 4). Pada kelompok vitamin sebanyak 33,3% mengalami perbaikan menjadi normotensi, sedangkan pada kelompok plasebo hanya 11,1%. Tidak didapatkan hubungan yang bermakna antara pemberian vitamin dengan perbaikan preeklampsia menjadi normotensi ( $p = 0,21$ ).

**Tabel 4. Progresivitas penyakit antara kedua kelompok**

	Menjadi Preeklampsia berat n (%)	Tidak menjadi preeklampsia berat n (%)	Total
Kelompok vitamin	0 (0)	18 (100)	18
Kelompok plasebo	5 (27)	13 (72)	18
Total	5 (27)	8 (44,44)	36

Relative Risk Reduction (RRR) = 100% ; Absolute Risk Reduction (ARR) = 28% ; Number needed to treat (NTT) = 3,57 (95% CI interval 1,58 - 3,61)

**Tabel 5. Perbaikan penyakit antara kedua kelompok**

	Menjadi Normotensi n (%)	Tidak menjadi normotensi n (%)	Total
Kelompok vitamin	6 (33,33)	12 (66,66)	18
Kelompok plasebo	2 (11,11)	16 (88,88)	18
Total	8 (44,44)	28 (77,77)	36

Uji Kai Kuadrat  $p = 0,21$

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian pada 36 penderita preeklampsia ringan, yang setelah dialokasikan secara acak 18 penderita masuk ke dalam kelompok vitamin dan 18 lainnya masuk ke dalam kelompok plasebo. Kelompok vitamin mendapatkan vitamin E (*α-tocopherol*) 400 IU per hari dan vitamin C (asam askorbat) 1000 mg per hari, sedangkan kelompok plasebo mendapatkan plasebo. Masing-masing diberikan selama 8 minggu.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah trombophilia sebagai kondisi sistemik yang dapat mengakibatkan iskemia tidak diperiksa dalam penelitian ini karena keterbatasan biaya. Keadaan ini sering didapatkan pada sindrom antifosfolipid, mutasi faktor V Leiden, resistensi protein C aktif, dan hiperhomosisteinemia. Keterbatasan yang lain yaitu bahwa NO yang diperiksa adalah kadar NO total dalam serum, padahal NO disintesis dari asam amino non essensial *L-arginine* melalui kerja enzim yang disebut dengan NOS. Ada 3 isoform dari NOS: neuronal (nNOS atau NOS1), *cytokineinducible* (iNOS atau NOS2), dan endotelial (eNOS atau NOS3). eNOS merupakan enzim yang paling berpengaruh dalam metabolisme NO di sel endotel, karena eNOS lebih banyak dijumpai pada membran sel endotel.<sup>14</sup> Karena yang diperiksa adalah kadar NO total dalam serum, maka penelitian ini dilakukan dengan asumsi bahwa kadar nNOS dan iNOS tidak berbeda antara kedua kelompok. Keterbatasan yang lain adalah tidak dapat

dilakukan *blinding* antar subyek penelitian karena plasebo yang digunakan tidak dapat menyerupai kapsul vitamin E yang asli.

Umur penderita berkisar antara 18 sampai dengan 44 tahun dengan rerata 30,08 tahun. Rerata umur ini tidak berbeda dengan penelitian sebelumnya, di mana usia berkisar 18-44 tahun dengan median 27 tahun<sup>36</sup> dan rerata 33 tahun<sup>50</sup>. Umur yang ekstrem merupakan salah satu faktor predisposisi terjadinya preeklampsia<sup>1,10,32</sup>. Sebanyak 38,88% subyek penelitian memiliki umur kurang dari 20 tahun dan lebih atau sama dengan 35 tahun. Tidak ada perbedaan dalam hal umur penderita antara kedua kelompok.

Tingkat pendidikan dari seluruh sampel yang terbanyak yaitu tingkat pendidikan SD dan SMU, dengan tingkat tertinggi yaitu D3. Tingkat pendidikan diperkirakan berpengaruh pada tingkat kepatuhan penderita dalam minum obat, maupun dalam wawancara mengenai pola makan. Tiga dari 10 orang yang dikeluarkan dari penelitian tidak meneruskan pengobatan karena sering lupa minum obat dan takut akan pengaruh obat terhadap kehamilan. Tetapi pada penelitian ini tingkat pendidikan antara kedua kelompok tidak berbeda.

Sebanyak 36,1% dari sampel penelitian ini adalah nullipara. Nullipara adalah salah satu faktor risiko terjadinya preeklampsia<sup>1</sup>. Peneliti lain menemukan 26%-39% responden nullipara pada penderita preeklampsia<sup>36,51</sup>. Terdapat perbedaan dalam hal paritas antara kedua kelompok. Setelah dilakukan uji regresi logistik didapatkan bahwa faktor pemberian vitamin lebih berpengaruh terhadap peningkatan kadar NO daripada paritas.

Kadar nitrit dan nitrat plasma tidak tergantung pada umur kehamilan wanita hamil normotensif pada trimester ketiga kehamilan, tetapi pada preeklampsia ada

korelasi positif antara umur kehamilan dan kadar nitrit maupun nitrat plasma<sup>50</sup>. Rerata umur kehamilan pada keseluruhan sampel yaitu 29,31 (3,59) minggu. Penelitian di Finlandia dilakukan terhadap subyek penelitian dengan rerata umur kehamilan 34,5 (3) minggu<sup>50</sup>. Tidak ada perbedaan dalam hal umur kehamilan antara kedua kelompok, sehingga faktor umur kehamilan tidak berpengaruh terhadap hasil penelitian.

Kadar vitamin E maupun vitamin C plasma lebih rendah pada penderita preeklampsia dibandingkan hamil normotensi<sup>67</sup>. Walaupun pada penelitian ini tidak diperiksa kadar vitamin E dan vitamin C dalam tubuh, asupan vitamin E dan vitamin C dari makanan diduga akan berpengaruh terhadap hasil penelitian, sehingga peneliti berusaha memperoleh informasi mengenai asupan vitamin E dan vitamin C dari makanan selama 8 minggu dengan menggunakan *Food Frequency Questioner*. Rerata asupan vitamin E pada keseluruhan sampel penelitian adalah 4,64 mg/hari, sedangkan untuk vitamin C adalah 117,5 mg/hari. Pada penelitian ini didapatkan bahwa asupan vitamin E dan vitamin C dari makanan per hari pada kedua kelompok tidak berbeda.

Sebanyak 22,2% sampel memiliki riwayat hipertensi pada kehamilan sebelumnya. Riwayat preeklampsia pada kehamilan sebelumnya merupakan salah satu faktor risiko terjadinya preeklampsia. Penelitian di London menemukan angka yang tidak jauh berbeda, yaitu 20-22%<sup>20</sup>.

Rerata kadar NO keseluruhan subyek penelitian sebelum pemberian vitamin yaitu 22,3 (9,67)  $\mu\text{M}$ , dengan rerata umur kehamilan 29,31 (3,59) minggu. Penelitian pada tahun 1999 mendapatkan kadar nitrit dan nitrat plasma pada preeklampsia sebesar 18,1 (6,2)  $\mu\text{mol/L}$ , dengan rerata umur kehamilan 34,9 (3)

minggu<sup>50</sup>. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan rerata umur kehamilan, karena semakin tua umur kehamilan maka kadar NO akan semakin menurun<sup>50</sup>. Penelitian lain menemukan kadar nitrat plasma sebesar 30,5 (2,2)  $\mu\text{mol/L}$ , dengan rerata umur kehamilan 33,6 (0,7) minggu<sup>49</sup>. Pada penelitian tersebut hanya diperiksa kadar nitrat dan bukan NO total. Tidak ada perbedaan kadar NO sebelum perlakuan pada kedua kelompok. Pada penelitian ini terdapat perbedaan selisih kadar NO sebelum dan sesudah perlakuan pada kedua kelompok. Pada kelompok vitamin terjadi peningkatan NO yang bermakna (9,8  $\mu\text{M}$ ) setelah pemberian vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari selama 8 minggu, sedangkan pada kelompok plasebo justru terjadi penurunan kadar NO serum. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C mampu meningkatkan kadar NO<sup>24-28</sup>, walaupun penelitian-penelitian tersebut menggunakan subyek penelitian yang berbeda, bukan pada penderita preeklampsia tetapi pada penderita gagal jantung, angina, dislipidemia, dan hiperkolesterolemia. Lamanya pemberian vitamin dan dosis vitamin E maupun vitamin C yang digunakan antara penelitian-penelitian yang sudah ada sebelumnya juga masih bervariasi, dan belum ada kesepakatan mengenai lama pemberian maupun dosis vitamin yang optimal untuk meningkatkan NO. Hasil dari penelitian ini mendukung teori bahwa pemberian antioksidan mampu menghambat terjadinya peroksidasi lipid yang pada akhirnya akan menurunkan kadar NO sebagai akibat disfungsi endotel<sup>13-14</sup>, sehingga beberapa peneliti menyarankan pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C untuk menghambat stress oksidatif, termasuk pada penderita preeklampsia<sup>67</sup>, walaupun penelitian lebih lanjut masih tetap harus

dilakukan untuk menemukan durasi pemberian dan dosis vitamin E dan vitamin C yang optimal untuk mencegah terjadinya atau progresivitas preeklampsia.

Hasil penelitian ini juga sesuai dengan teori bahwa peningkatan NO diharapkan dapat bermanifestasi secara klinis dalam penurunan tekanan darah. Didapatkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kelompok vitamin setelah diberi perlakuan selama 8 minggu, sebaliknya justru terjadi peningkatan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kelompok plasebo. Pada penelitian ini didapatkan penurunan rerata tekanan darah sistolik sebesar 10,56 mmHg pada kelompok yang diberi vitamin E dan C, sedangkan rerata tekanan darah diastolik turun sebesar 7,78 mmHg. Sebaliknya pada kelompok plasebo didapatkan peningkatan rerata tekanan darah sistolik sebesar 6,66 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 1,66 mmHg. Sebelum perlakuan tidak ada perbedaan tekanan darah antara kedua kelompok. Penurunan tekanan darah pada kelompok vitamin secara klinis kurang bermakna karena hanya sebesar 10,56 mmHg untuk tekanan darah sistolik dan 7,78 mmHg untuk tekanan darah diastolik. Tetapi penurunan tersebut cukup menggembirakan karena pada preeklampsia ringan penurunan tekanan darah sistolik maupun diastolik ditujukan pada target normotensi, sehingga menurunkan risiko peningkatan morbiditas dan mortalitas ibu dan janin<sup>9</sup>. Pada penelitian ini penurunan tekanan darah sistolik pada kelompok vitamin berhasil mencapai target kriteria normotensi. Target penurunan tekanan darah pada penderita hipertensi secara umum pun adalah di bawah 140/90 mmHg, sehingga sebagian klinisi menganggap bahwa penurunan tekanan darah akan dianggap bermakna secara klinis bila berhasil mencapai target tersebut<sup>68</sup>. Pada kelompok plasebo didapatkan peningkatan tekanan darah sistolik maupun diastolik, walaupun secara klinis tidak

bermakna karena hanya sebesar 6,66 mmHg dan 1,66 mmHg untuk tekanan darah sistolik dan diastolik, serta rerata tekanan darah masih dalam kriteria preeklampsia ringan. Sebanyak 5 orang (0,27%) subyek penelitian dalam kelompok plasebo mengalami progresivitas penyakit menjadi preeklampsia berat (RRR = 100%; ARR = 28%; NTT = 3; 95%CI 1,576 – 3,608). Sedangkan pada kelompok vitamin tidak dijumpai penderita yang mengalami progresivitas penyakit menjadi preeklampsia berat, bahkan 33,33% mengalami penurunan tekanan darah menjadi normotensi. Dengan pemberian vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg selama 8 minggu dapat mengurangi proporsi kemungkinan terjadi preeklampsia berat sampai 100%, dan perbedaan rata-rata penurunan kemungkinan terjadinya preeklampsia berat mencapai 28%. Dibutuhkan 3 pasien untuk mendapatkan terapi antioksidan tersebut untuk mencapai luaran yang diinginkan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dengan pemberian vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg per hari selama 8 minggu dapat menurunkan risiko memberatnya penyakit dari preeklampsia ringan menjadi preeklampsia berat.

Pada kelompok vitamin sebanyak 33,3% mengalami perbaikan menjadi normotensi, sedangkan pada kelompok plasebo hanya 11,1%. Dengan pemberian vitamin tekanan darah cenderung menurun, walaupun demikian tidak didapatkan hubungan antara pemberian vitamin dengan perbaikan preeklampsia menjadi normotensi ( $p = 0,21$ ). Penurunan tekanan darah pada kelompok vitamin setelah pemberian vitamin E 400 IU/hari dan vitamin C 1000 mg/hari sesuai dengan teori bahwa pemberian antioksidan mengurangi stress oksidatif dan disfungsi endotel yang bermanifestasi timbulnya hipertensi<sup>12-14</sup>. Sebuah penelitian di London tahun 1999 terhadap 283 wanita risiko tinggi memberikan vitamin E 400 IU/hari dan

vitamin C 1000 mg/hari sejak umur kehamilan 16-22 minggu. Mereka menemukan angka kejadian preeklampsia lebih rendah pada kelompok vitamin<sup>18</sup>. Peneliti yang sama pada tahun 2002 memberikan vitamin E dan C pada wanita risiko tinggi sejak umur kehamilan 20-22 minggu dan menemukan angka kejadian preeklampsia lebih tinggi pada kelompok risiko tinggi yang diberi plasebo, dibandingkan dengan kelompok vitamin<sup>20</sup>. Sebuah penelitian di Afrika Selatan yang memberikan kombinasi vitamin E 800 IU/hari, vitamin C 1000 mg/hari dan allopurinol 200 mg/hari pada penderita preeklampsia berat sejak umur kehamilan 24-32 minggu menemukan bahwa lebih banyak penderita di kelompok plasebo yang memerlukan dua obat antihipertensi sekaligus untuk menurunkan tekanan darah, dibandingkan kelompok antioksidan<sup>36</sup>. Belum tercapai kesepakatan mengenai lamanya pemberian maupun dosis optimal vitamin E dan vitamin C yang diberikan yang berpengaruh dalam penurunan tekanan darah ataupun dalam pencegahan terjadinya preeklampsia.



## BAB 7

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. Simpulan

1. Pemberian kombinasi vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg per hari selama 8 minggu meningkatkan kadar NO pada penderita preeklampsia.
2. Terdapat penurunan tekanan darah sistolik maupun diastolik setelah pemberian kombinasi vitamin E 400 IU dan vitamin C 1000 mg per hari selama 8 minggu.

#### 7.2. Saran

##### Untuk ilmu pengetahuan

Disfungsi primer dari preeklampsia adalah akibat ketidakseimbangan antara NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dan ONOO<sup>-</sup>. Selain pemberian antioksidan yang diperlukan untuk menghambat stress oksidatif, konsentrasi *L-arginine* yang adekuat juga dibutuhkan untuk mencegah pembentukan O<sub>2</sub>.

Masih belum ada kesepakatan mengenai lama pemberian dan dosis vitamin E dan vitamin C yang optimal untuk pencegahan preeklampsia. Dari pernyataan di atas maka:

- Perlu dilakukan penelitian serupa dengan memberikan *L-arginine* dan antioksidan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kadar NO dan pencegahan terjadinya atau bertambah beratnya preeklampsia.

- Perlu dilakukan penelitian serupa dengan lama pemberian atau dosis vitamin E dan vitamin C yang berbeda untuk menemukan lama dan dosis optimal dalam pencegahan terjadinya atau bertambah beratnya preeklampsia.

#### **Untuk pelayanan**

- Karena pemberian kombinasi vitamin E 400 IU per hari dan vitamin C 1000 mg/hari terbukti meningkatkan kadar NO dan memberikan hasil yang cukup menggembirakan dalam menurunkan tekanan darah maka disarankan untuk memberikan kombinasi vitamin tersebut pada penderita preeklampsia ringan.
- Asupan vitamin E dan vitamin C dari makanan lebih rendah dibandingkan dengan kebutuhan per hari pada wanita hamil, maka disarankan untuk memberikan edukasi mengenai intake yang benar pada saat pemeriksaan antenatal pada wanita hamil.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD.. Williams Obstetrics. 21<sup>st</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
2. Suparmanto S. Gerakan Sayang Ibu. Penatalaksanaan kegawatdaruratan obstetri dan neonatal dalam gerakan sayang ibu. Semarang: Perinasia Cabang Jawa Tengah; 1997. h. 1-6.
3. Hauth JC, Cunningham FG. Preeclampsia-eclampsia. In: Lindheimer MD, Roberts JM, Cunniknham FG, editors. Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy (2nd ed). Stamford, CT: Appleton & Lange; 1999. p. 169-199.
4. Working Group on High Blood Pressure on Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program. Am J Obstet Gynecol 2000;183:S1-S21.
5. Junaedi A, Soejoenoes A. Kematian maternal di RSUP Dr.Kariadi Semarang tahun 1991-1995. Naskah lengkap POGI Cabang Semarang. PIT POGI Padang 1996.
6. Anggorowati D. Hadisaputro H. Kejadian preeklampsia/eklampsia di RSDK tahun 1997-1999. Kumpulan makalah/Kuliah utama. KOGI X Denpasar: POGI Cabang Semarang; 2000.
7. Wahdi, Suhartono A, Praptohardjo U. Kematian maternal di RSUP Dr.Kariadi Semarang tahun 1996-1998. Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia. POGI. Jakarta. 2000; h. 65-70.
8. Cowles T, Saleh A, Cotton DB. Hypertensive Disorders of Pregnancy. In: High Risk Pregnancy. London: W.B.Saunders Company LTD; 1996. p. 253-61.
9. Mabie WC, Sibai BM. Hypertensive states of pregnancy. In: Decherney AH, Nathan L. Current obstetric & gynecologic. Diagnosis & treatment. 9<sup>th</sup> ed. New York: The Mc Graw-Hill Companies; 2003. p.338-53.

10. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. Part 1: Clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57(9):598-613.
11. Angsar MD. Dampak radikal bebas pada kehamilan (Suatu hipotesis patogenesis preeklampsia). Makalah simposium dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaat antioksidan. Panitia Indonesia Emas dan Dies Natalis XLI Fakultas Kedokteran UNAIR. Surabaya: November 1995.
12. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:222-35.
13. Lowe DT. Nitric Oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *NITRIC OXIDE: Biol Chem* 2000;4(4):441-58.
14. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. Part 2: Experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57:619-34.
15. Suryohusodo P. Oksidan, anti oksidan, dan radikal bebas. Dalam: Makalah symposium dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaat antioksidan. Panitia Indonesia Emas dan Dies Natalis XLI Fakultas Kedokteran UNAIR. Surabaya: November 1995.
16. Wiknjosastro GH. Radikal bebas dan proses inflamasi pada preeklampsia. *PIT XIII POGI Malang*; 2002.
17. Adam S. The antioxidant vitamins. Available from: URL: <http://www.i2k.~suzanne/vitamineandc.htm#c>.
18. Chappel LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, LEE R, Hunt BJ, et al. Effect of antioxidants on the occurrence of preeclampsia in women at increased risk: a randomized trial. *Lancet* 1999; 354:810-15.
19. Chalid MT, Patellongi IJ, Rambulangi J. Efek pemberian suplemen alfa tokoferol terhadap aktivitas radikal bebas pada penderita preeklampsia. Makalah Pertemuan Ilmiah Berkala XI Fakultas Kedokteran UNHAS; 1998.
20. Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, Charnock-Jones S, et al. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:777-84.

21. Orpana AK, Avela K, Ranta V, Viinikka L, Ylikorkala O. The calcium-dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1056-60.
22. Delacretaz E, de Quay N, Weber B. Differential nitric oxide synthase in human platelets during pregnancy and preeclampsia. *Clin Sci* 1995;88:607-10.
23. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(3):817-24.
24. Heller R, Unbehauen A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2001; 276(1): 40-7.
25. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;97(4):363-8.
26. Motoyama T, Kawana H, Kugiyama K. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilatation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1672-9.
27. Kugiyama K, Motoyama T, Doi H. Improvement of endothelial vasomotor dysfunction by treatment with  $\alpha$ -tocopherol in patients with high remnant lipoprotein levels. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1512-8.
28. Desideri G, Marinucci MC, Tomassoni G, Masci PG, Sartucci A, Ferri C. Vitamin C supplementation reduces plasma vascular cell adhesion molecule and von Willebrand factor levels and increases NO concentration in hypercholesterolemic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 87(6):2940-45.
29. Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, National High Blood Pressure Education Program. 2000 July. NIH Publication No. 00-3029.
30. Hadisaputro H. Prediksi dan pencegahan preeklamsia-eklamsia. Dalam: Naskah lengkap simposium kemajuan obstetrik 4. Rujukan dan kemajuan terkini di bidang

- obstetrik. POGI cabang Semarang. Bag/SMF Obstetri ginekologi FK Undip/RS dr. Kariadi Semarang, 2003: h. 65-77.
31. Angsar MD. Hypertension in pregnancy. Proposal for clinical practice guide-line in Indonesia. Maternal-Fetal Study Group Indonesian Society of Obstetrics and Gynecology; 2005.
  32. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carillo J, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 2001;344:867-72.
  33. Matijevic R, Johnston T. In vivo assesment of failed trophoblastic invasion of the spiral arteries in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1999;106;78-82.
  34. Solomon CG, Seely EW. Preeclampsia-Searching for the cause. *N Engl J Med* 2004;350(7):641-2.
  35. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2000;356:1260-65.
  36. Gulmezoglu AM, Hofmeys GJ, Oosthuisen MJ. Antioxidants in treatment of severe preeclampsia: an explanatory randomized controlled trial. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104:689-96.
  37. Raijmakers MT, Zuzterzeel PM, Roes EM, Steegers EA, Mulder TP, Peters WH. Oxidized and free whole blood thiols in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:272-6.
  38. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biokimia Harper*. Ed. 24. Jakarta: EGC; 1997.
  39. Gonzalez-Quintero VH, Smarkusky LP, Jimenez JJ, Mauro LM, Wenche , Hortsman LL, et al. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191;1418-24.
  40. Silver RM, Schwintzer B, MCGregor JA. Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small for gestasional age fetus, and premature labor. *Am J Obstet Gynecol* 1999;169;1101-5.
  41. Redman CWG, sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnant. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:975-80.

42. Modulation of vascular tone by nitric oxide and endothelin 1 in myometrial resistance arteries from pregnant women at term. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182;87-93.
43. Kublickiene KR, Lindblom B, Kruger K, Nisell H. Preeclampsia: Evidence for impaired shear stress-mediated nitric oxide release in uterine circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2000 ;183:160-6.
44. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
45. Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Capplini A, Bonazzola S, et al. L-Arginine Depletion in Preeclampsia Orients Nitric Oxide Synthase Toward Oxidant Species. *Hypertension* 2004;43:614.
46. Zhang C, Williams MA, King IB, Dashow EE, Sorensen TK, Frederick IO, Thompson ML, Luthy DA. Vitamin C and the risk of preeclampsia--results from dietary questionnaire and plasma assay. *Epidemiology* 2002 Jul;13(4):409-16.
47. Kharb S. Vitamin E and C in Preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;93:37-9.
48. Granville L, Fink B, Dikalov S. Recovery of activity of endothelial nitric oxide synthase under condition of oxidative stress: role of tetrahydrobiopterin. *The Sure Program.* Atlanta: 2003.
49. Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Miura A, Doi D, Otsubo Y, et al. Plasma nitric oxide levels and the expression of P-selectin on platelets in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:676-80.
50. Bisseling TM, Roes EM, Raijmakers MT, Steegers EAP, Peters WHM, Smits P. N-acetylcysteine restores nitric oxide-mediated effects in the fetoplacental circulation of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:328-33.
51. Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O. Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999;93:442-5.
52. Anna RD, Baviera G, Corrado F, Crisafulli A, Ientile R, Buemi M, et al. Neurokinin B and nitric oxide plasma levels in pre-eclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2004;111:1046-50.

53. Smarason AK, Allman KG, Young D, Redman CWG. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104:538-43.
54. Di Iorio R, Marinoni E, Coacci F, La Torre R, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide and uteroplacental blood flow in pregnancy complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104:1134-9.
55. Tyurin VA, Liu SX, Tyurin YY, Sussman NB, Hubel CA. Elevated levels of S-Nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res* 2001;88:1210.
56. Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999;33:83-89.
57. Hajjar IM, George V, Sasse EA, Kocher MS. A randomized, double-blind, controlled trial of vitamin C in the management of hypertension and lipids. *Am J Ther* 2002; 9(4):289-93.
58. Johnston CS, Cox SK. Plasma-Saturating intakes of vitamin C confer maximal antioxidant protection to plasma. *J Am Coll Nutr* 2001;20(6):623-7.
59. Pressman EK, Cavanaugh JL, Mingione m, Norkus EP, Woods JR. Effects of maternal antioxidant supplementaion on maternal and fetal antioxidant levels: A randomized, double-blind study. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1729-5.
60. Lavoisier AL. Chemical and physiological properties of vitamins. In: Combs GF, editor. *The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic press; 1998. p. 191-263.
61. Horvath PJ. Vitamins as therapeutic agents. In: Smith CM, Reynard AM. Editors. *Textbook of pharmacology*. W.B.Saunders Company. Philadelphia; 1992. p.1067-78.
62. Carr AC, Zhu B, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000;87:349.
63. Papas AM. How safe is vitamin E? In: *The vitamin E factor: The miraculous antioxidant for the prevention and treatment of heart disease, cancer and aging*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Harper Perennial; 1999. p 312-20.
64. Das UN. Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition* 2003;19:686-92.



65. d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic ZS. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activith. *Circ Res* 2003;92:88-95.
66. Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2001 Jan 5; 276(1):40-7.
67. Roberts JM, Balk JL, Bodnar LM, Belizan JM, Bergel E, Martinez A. Nutrient involvement in preeclampsia. *J Nutr* 2003; 133 Suppl 1:1684-92.
68. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42:1206-52.