

PERBANDINGAN RERATA EKSPRESI Bcl-2 DAN Bcl-XL PADA PREEKLAMPSIA BERAT DAN KEHAMILAN NORMOTENSI

Budi Arianto¹, Diah Rumekti H², Detty S Nurdiati³

ABSTRACT

Background: The state of hypoxia in severe preeclampsia cause placental oxidative stress that can lead excessive trophoblast apoptosis through the mitochondrial pathway. Apoptosis stimuli occurs through modulation of p53 and Bcl-2 family expression which has antiapoptosis and proapoptosis function. Antiapoptosis protein consist of Bcl-2 and Bcl-XL and is expressed lower in apoptosis.

Objective: To compare the mean difference of the expression of antiapoptosis proteins Bcl-2 & Bcl-XL and identify the type of protein that can be used as indicators of increased apoptosis.

Method: A cross-sectional study which consisted of 43 severe preeclampsia pregnancies and 38 third trimester normotensive pregnancies, recruited between October 2011 - March 2012. Observation of protein expression Bcl-2 and Bcl-XL used immunohistochemical techniques. Statistical analysis applied independent t test ($P < 0.05$).

Result and Discussion: There were significant differences ($p < 0.05$) between the mean expression of Bcl-2 protein in trophoblast tissue among severe preeclampsia group (1.03 ± 0.04) compared to normotensive group (1.10 ± 0.08). The mean expression of Bcl-XL protein in trophoblast tissue severe preeclampsia group (1.29 ± 0.12) compared to normotensive group (1.71 ± 0.14) were significantly difference ($p < 0.05$). The mean difference in protein expression of Bcl-2 (0.076; 95% CI 0.046 to 0.104) was lower than Bcl-XL protein (0.42; 95% CI 0.47 to 0.36). The mean protein expression of Bcl-2 and Bcl-XL were lower in severe preeclampsia group compared with normotensive group, either in preterm or full-term gestation age with p value < 0.05 .

Conclusion: The mean difference in protein expression of Bcl-2 and Bcl-XL is lower in severe preeclampsia pregnancies than normotensive pregnancies. The mean difference in protein expression of Bcl-2 is lower than Bcl-XL. Severe preeclampsia affects protein expression of Bcl-2 and Bcl-XL more than influence of gestational age.

Keywords: severe preeclampsia, trophoblast, Bcl-2, Bcl-XL, apoptosis.

ABSTRAK

Latar belakang: Keadaan hipoksia pada preeklamsia berat akan menyebabkan stress oksidatif plasenta yang dapat memicu terjadi peningkatan apoptosis trofoblas melalui jalur mitokondria. Stimulus apoptosis terjadi melalui modulasi ekspresi P53 dan ekspresi protein Bcl-2 family yang memiliki fungsi antiapoptosis dan proapoptosis. Protein antiapoptosis terdiri atas Bcl-2 dan Bcl-XL akan diekspresikan lebih rendah pada keadaan apoptosis.

Tujuan: Untuk melihat perbedaan rerata ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan Bcl-XL dan mengidentifikasi jenis protein yang dapat dijadikan indikator peningkatan apoptosis.

Metode: Rancangan penelitian ini potong lintang dengan populasi penderita kehamilan preeklamsia berat dan normotensi yang dirawat di RSUP Sardjito antara bulan Oktober 2011 hingga Maret 2012. Didapatkan sampel plasenta sebanyak 43 kehamilan preeklamsia berat dan 38 kehamilan normotensi. Pengamatan ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-XL dengan teknik imunohistokimia. Analisis statistik menggunakan independent t test ($p < 0.05$).

^{1,2,3} Bagian Obstetri dan Ginekologi FK UGM/RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta

Hasil dan Pembahasan: Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) rerata ekspresi protein Bcl-2 pada jaringan trofoblas kelompok kehamilan preeklamsia berat ($1,03 \pm 0,04$) dibandingkan kelompok kehamilan normotensi ($1,10 \pm 0,08$). Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) rerata ekspresi protein Bcl-xL pada jaringan trofoblas kelompok kehamilan preeklamsia berat ($1,29 \pm 0,12$) dibandingkan kelompok kehamilan normotensi ($1,71 \pm 0,14$). Beda rerata ekspresi protein untuk Bcl-2 (0,076; CI 95% 0,046 – 0,104) lebih rendah dibandingkan beda rerata ekspresi protein Bcl-xL (0,42; CI 95% 0,47- 0,36). Rerata ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-XL lebih rendah pada kelompok preeklamsia berat dibandingkan dengan normotensi baik pada umur kehamilan preterm maupun aterm yang ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$.

Kesimpulan: Beda rerata ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-xL lebih rendah pada kehamilan preeklamsia berat dibandingkan kehamilan normotensi. Beda rerata ekspresi protein Bcl-2 lebih rendah dibandingkan beda rerata ekspresi protein Bcl-xL. Preeklamsia berat lebih berpengaruh terhadap ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-XL dibandingkan umur kehamilan

Kata Kunci: preeklamsia berat, trofoblas, protein Bcl-2, protein Bcl-xL, apoptosis

PENDAHULUAN

Di Indonesia, angka kejadian preeklamsia pada tahun 1980-2001 berkisar antara 5-8% dari seluruh kehamilan. Di RSUP DR. Sardjito angka kematian maternal karena preeklamsia-eklamsia adalah sebesar 34,09%. Di RSU Dr. Saiful Anwar tahun 2006 terdapat sekitar 321 kasus preeklamsia dan 72 kasus eklamsia dari 2588 persalinan. Angka kejadian preeklamsia di RSUP. H. Adam Malik dan RSU. Dr. Pirngadi Medan periode 2000-2003 adalah 5,94%, sedangkan eklamsia 1,07%.^{1,2,3,4}

Preeklamsia sampai saat ini masih merupakan *disease of theory*. Berbagai macam penelitian belum dapat menerangkan dengan jelas penyebab pasti preeklamsia. Akibatnya sampai saat ini belum ada pengobatan definitif pada kelainan ini. Banyak teori telah dikemukakan tentang terjadinya hipertensi dalam kehamilan namun tidak satu pun teori tersebut yang dianggap mutlak benar.⁵

Bcl-2 family dapat mengatur sinyal kematian baik secara langsung atau diinisiasi melalui jalur instrinsik dalam pengaturan pelepasan faktor-faktor proapoptosis dari mitokondria. Bcl-₂ dan Bcl-_{xL} adalah kelompok antiapoptosis yang

menghambat pelepasan sitokrom c dan faktor-faktor proapoptosis lain dari mitokondria, yang selanjutnya mencegah perjalanan lebih lanjut dari sinyal apoptosis. Ketika sel kehilangan sinyal untuk bertahan hidup atau mengalami stres, Bcl-₂ dan Bcl-_{xL} akan hilang dari membran mitokondria dan digantikan oleh anggota famili proapoptosis (Bax, Bak dan Bim). Dengan penurunan kadar Bcl-₂ dan Bcl-_{xL}, permeabilitas membran mitokondria meningkat, selanjutnya akan terjadi pelepasan faktor-faktor proapoptosis seperti sitokrom c, smac/DIABLO, omi melalui pori-pori mitokondria yang disebut *Permeability Transition Pore* (PTP/PT Pore). Pelepasan sitokrom c dari mitokondria memainkan peranan penting dalam induksi apoptosis. Begitu sitokrom c dilepaskan ke sitosol maka akan mampu berinteraksi dengan protein yang disebut dengan Apaf-1. Bersama dengan pro-caspase 9 dan kompleks multi protein dengan sitokrom c dan Apaf-1 akan membentuk suatu apoptosome. Formasi apoptosome ini akan mengaktifasi caspase 9 dan selanjutnya caspase 9 akan mengaktifasi caspase 3 sebagai caspase eksekusiner.^{6,7}

Dari kedua kelompok antiapoptosis Bcl-₂ dan Bcl-_{xL}, sama-sama diekspresikan lebih rendah

(*down regulation*) pada proses apoptosis. Sejauh ini menarik untuk diketahui dari kedua protein antiapoptosis tersebut, apakah ekspresi kedua protein tersebut mengalami tingkat penurunan yang sama atau hanya salah satu dari kedua protein tersebut yang secara konstan diekspresikan lebih rendah pada plasenta ibu hamil dengan preeklamsia berat.

Hung et al. melakukan studi untuk membandingkan ekspresi 5 protein *bcl-2 family* yaitu Bcl-₂, Bcl-_{XL}, Bax, Bak dan Bad setelah jaringan plasenta kehamilan normal dikultur dalam suasana hipoxia (2% O₂), *prolong hypoxia-reoxygenation* (HR), dan normoxic (8% O₂) sebagai kontrol. Hasilnya didapatkan peningkatan ekspresi Bax, dan Bak mRNA, dan penurunan ekspresi Bcl-₂ mRNA. Tidak terdapat perubahan ekspresi pada BCL-_{XL} dan Bad setelah oksigen stress dibandingkan pada yang kontrol normoxic.

Levi R et al. melakukan studi untuk membuktikan hipotesisnya bahwa hipoksia dapat menginduksi apoptosis pada trofoblas. Trofoblas diambil dari jaringan plasenta wanita hamil cukup bulan tanpa komplikasi kehamilan yang kemudian dikultur sampai dengan 72 jam pada kondisi standar (PO₂=120 mmHg) atau hipoksia (PO₂ <15 mmHg). Paparan kondisi hipoksia 24 jam ditandai dengan peningkatan apoptosis trofoblas. Apoptosis diikuti dengan peningkatan ekspresi P53 dan Bax dan penurunan ekspresi Bcl-₂.^{9,10}

Di Indonesia, Keman dalam penelitiannya membandingkan ekspresi p53, Bcl-₂ dan indeks apoptosis trofoblas pada preeklamsia/ eklamsia dan kehamilan normal. Penelitian ini merupakan studi laboratorium secara potong lintang dengan sampel jaringan trofoblas berasal dari biopsi jaringan plasenta preeklamsia (n=20) dibandingkan dengan kehamilan normal (n=20). Hasil yang diperoleh adalah terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi protein Bcl-₂ dan p53 pada preeklamsia dibandingkan kehamilan normal dan

jumlah sel trofoblas yang mengalami apoptosis pada jaringan trofoblas preeklamsia atau eklamsia lebih tinggi dari kehamilan normal.³

METODE

Penelitian dilakukan menggunakan desain studi potong lintang. Subyek penelitian berasal dari dua kelompok yaitu kelompok preeklamsia berat dan kelompok normotensi. Populasi penelitian adalah penderita preeklamsia berat dan kehamilan normotensi dengan usia kehamilan 28 – 40 minggu. Terhadap mereka terlebih dahulu dimintakan persetujuan untuk dilibatkan dalam penelitian.

Kriteria inklusi adalah pasien preeklamsia berat dan kehamilan normotensi dengan umur kehamilan 28-40 minggu dan setuju untuk diteliti. Kriteria eksklusi adalah pasien dengan penyakit penyerta (korioamnionitis, hipertensi kronik, diabetes mellitus, penyakit jantung).

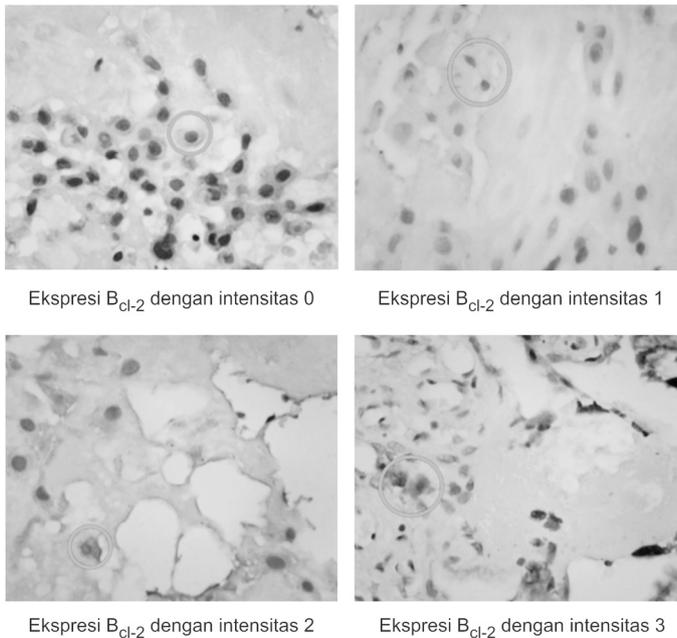
Setiap pasien diambil sampel jaringan plasenta dengan cara yang sama, kemudian dikirim ke laboratorium histologi FK UGM untuk dilakukan pengecatan secara immunohistokimia pada pemeriksaan ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL}.

HASIL DAN PEMBAHASAN

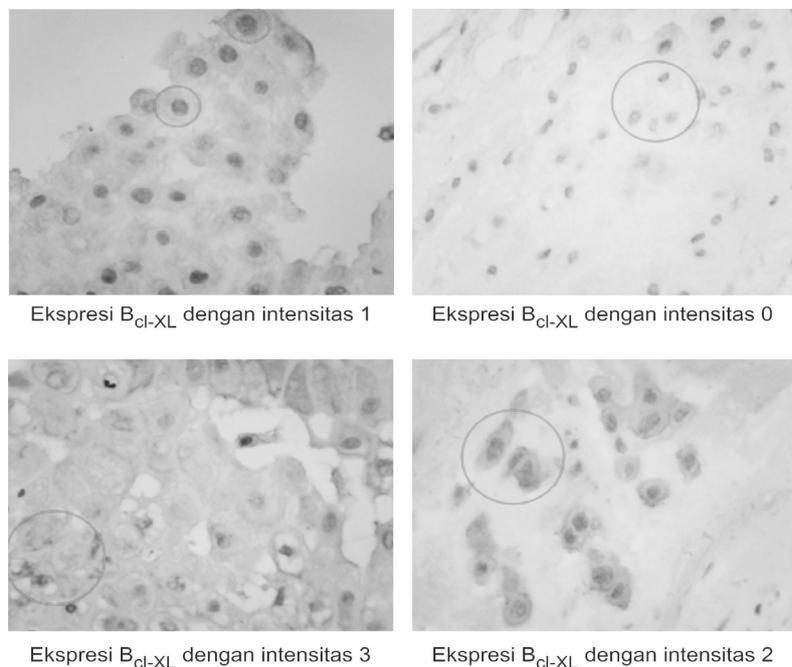
Pengumpulan sampel penelitian dilakukan selama 6 bulan yang dimulai pada bulan Oktober 2011 sampai dengan bulan Maret 2012. Dalam penelitian ini didapatkan 81 plasenta yang memenuhi syarat sebagai subyek penelitian yang terdiri dari 43 plasenta dari kehamilan dengan preeklamsia berat dan 38 plasenta dari kehamilan normotensi. Ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} diukur dengan cara *semiquantitative immunohistochemical scoring system* (HSCORE). Penghitungan nilai HSCORE dilakukan oleh dua orang pemeriksa dan dilakukan uji kesesuaian antar *observer* atau uji konsistensi dengan *Intraclass Correlation Coefficient* (ICC). Setelah

dilakukan uji ICC, didapat nilai ICC untuk ekspresi protein Bcl-₂ adalah 0.998, sedangkan untuk Bcl-_{XL} didapatkan nilai ICC 0.88. Ekspresi Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} dilihat dengan menggunakan mikroskop pembesaran kuat (400x) pada lima lapang pandang pada masing-masing sampel. Perubahan warna kecoklatan pada sel-sel trofoblas di desidua dengan intensitas bervariasi menunjukkan adanya ekspresi Bcl-₂ dan Bcl-_{XL}.

Pada tabel 1 ditampilkan karakteristik subyek penelitian, dimana kelompok variabel usia ibu dan paritas tidak didapatkan perbedaan bermakna secara statistik ($p > 0.05$). Terdapat perbedaan pada rerata usia kehamilan, tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik dan *mean arterial pressure* (MAP) yang secara statistik bermakna antara kelompok preeklampsia berat dan normotensi.



Gambar 1. Intensitas warna pengecatan protein BCL-2



Gambar 2. Intensitas warna pengecatan protein BCL-XL

Tabel 1. Karakteristik subyek kedua kelompok penelitian

Variabel	Preeklamsia Berat (n = 43)	Nomotensi (n = 38)	p
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Usia ibu	28,4 ± 6,8	28,4 ± 7,1	0,97
Paritas	0,6 ± 0,8	1,0 ± 1,3	0,13
Usia kehamilan	36,0 ± 2,5	38,6 ± 1,1	0,00
Sistolik	166,7 ± 20,8	114,2 ± 7,2	0,00
Diastolik	106,4 ± 17,4	76,3 ± 6,7	0,00
MAP	126,5 ± 16,8	88,7 ± 6,4	0,00
BMI	28,1 ± 5,4	25,9 ± 4,3	0,06

Perbandingan rerata ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} kelompok preeklamsia berat dan normotensi pada tabel 2 menunjukkan bahwa rerata ekspresi kedua protein pada kelompok

preeklamsia berat lebih rendah dan bermakna secara statistik dibandingkan kelompok normotensi (p=0,00) dengan beda rerata 0,076 (CI 95% 0,046 – 0,104) untuk Bcl-₂ dan 0,42 (CI 95% 0,47 – 0,36) untuk Bcl-_{XL}.

Tabel 2. Perbandingan Ekspresi Protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} Plasenta Kehamilan Preeklamsia Berat Dibandingkan Dengan Kehamilan Normotensi

Variabel	Preeklamsia Berat (n = 43)	Nomotensi (n = 38)	Perbedaan rerata (CI 95%)	p
	Mean ± SD	Mean ± SD		
Ekspresi Bcl-2	1,03 ± 0,04	1,10 ± 0,08	0,076 (0,046-0,104)	0,00
Ekspresi Bcl-XL	1,29 ± 0,12	1,71 ± 0,14	0,42 (0,47-0,36)	0,00

Dengan membagi umur kehamilan dalam kelompok preterm dan aterm, pada tabel 3 dan 4 dibawah menunjukkan terdapat perbedaan rerata ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} antara umur kehamilan preterm dan aterm dengan nilai p<0,05.

Pada tabel 5 dan 6 di bawah menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-_{XL} antara kelompok preeklamsia berat dan normotensi baik pada saat umur kehamilan preterm maupun aterm dengan nilai p<0,05.

Tabel 3. Hubungan antara umur kehamilan dengan ekspresi protein Bcl-₂

	Jumlah Sampel (n = 80)	Ekspresi Bcl-2	p
Preterm	28	1,03 ± 0,03	0,000
Aterm	52	1,08 ± 0,08	

Tabel 4. Hubungan antara umur kehamilan dengan ekspresi protein Bcl-_{xl}

	Jumlah Sampel (n = 81)	Ekspresi Bcl-xl	p
Preterm	28	1,32 ± 0,14	0,000
Aterm	52	1,60 ± 0,23	

PEMBAHASAN

Penelitian tentang perbandingan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-_{xl} pada trofoblas sejauh ini belum

penulis dapatkan. Ekspresi Bcl-_{xl} pernah diteliti pada pasien karsinoma hepatoseluler. Pada penelitian ini didapatkan ekspresi Bcl-2 dan

Tabel 5. Hubungan antara preeklamsia berat dan Bcl-₂ dengan mengendalikan umur kehamilan

Umur kehamilan	Variabel	n	Ekspresi Bcl-2	p
Preterm	Preeklamsia berat	27	1,03 ± 0,03	0,008
	Normotensi	1	1,08 ± –	
Aterm	Preeklamsia berat	16	1,04 ± 0,06	0,005
	Normotensi	36	1,11 ± 0,08	

Tabel 6. Hubungan antara preeklamsia berat dan Bcl-_{xl} dengan mengendalikan umur kehamilan

Umur kehamilan	Variabel	n	Ekspresi Bcl-2	p
Preterm	Preeklamsia berat	27	1,30 ± 0,13	0,015
	Normotensi	1	1,65 ± –	
Aterm	Preeklamsia berat	16	1,30 ± 0,11	0,000
	Normotensi	36	1,27 ± 0,14	

Bcl-x_L pada wanita preeklamsia lebih rendah dibandingkan dengan kehamilan normotensi. Perbedaan yang ditunjukkan bermakna secara statistik ($p=0.00$). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian oleh Schawn dkk menyatakan bahwa ekspresi protein antiapoptosis (Bcl-2 dan Bcl-xl) lebih rendah pada penderita preeklamsia, dimana apoptosis dipicu oleh keadaan hipoksia.⁶ Allaire menyimpulkan dalam penelitiannya bahwa kehadiran marker apoptosis dapat digunakan sebagai penanda adanya hipoksia intrauterine, dan mendapatkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-x_L rendah sebagai antiapoptosis dari kelompok Bcl-2.¹¹

Beda rerata ekspresi protein pada kedua kelompok diketahui untuk Bcl-2 adalah 0,076 (CI 95% 0,046 – 0,104), sedangkan Bcl-xl adalah 0,42 (CI 95% 0,47 – 0,36). Dari data tersebut diketahui bahwa beda rerata ekspresi protein Bcl-2 pada preeklamsia dan normotensi lebih rendah (0,076) dibandingkan beda rerata ekspresi protein Bcl-xl (0,42) pada preeklamsia dan normotensi. Hung dalam penelitiannya mendapatkan adanya penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan tidak ada perubahan dalam ekspresi protein Bcl-xl. Belum diketahui dengan jelas mengenai adanya perbedaan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl, padahal kedua protein antiapoptosis tersebut mempunyai peran yang sama dan pada jalur apoptosis yang sama.^{8,12}

Dalam keadaan normal aktivitas apoptosis juga meningkat sesuai usia kehamilan, sehingga ekspresi Bcl-₂ dan Bcl-x_L dalam keadaan normal juga menurun seiring bertambahnya usia kehamilan. Pada uji variabel luar dengan variabel tergantung pada tabel 3 dan 4 diatas, menunjukkan adanya perbedaan rerata ekspresi protein Bcl-₂ ($p=0,000$) dan Bcl-x_L ($p=0,000$) antara umur kehamilan preterm dan aterm. Pada kelompok preterm rerata ekspresi protein Bcl-₂ ($1,03 \pm 0,03$) dan Bcl-x_L ($1,32 \pm 0,14$) justru lebih rendah dibandingkan rerata ekspresi protein Bcl-₂ ($1,08 \pm 0,08$) dan Bcl-x_L ($1,60 \pm 0,23$) pada kelompok aterm. Hasil yang

berbeda ini terjadi karena pada data penelitian ini sebagian besar kelompok preterm berasal dari sampel preeklamsia (27 sampel 28 sampel total kelompok preterm). Preeklamsia diketahui memang mengekspresikan protein antiapoptosis lebih rendah dibandingkan kelompok normotensi pada umur kehamilan yang sama. Tabel 5 dan 6 mempertegas adanya perbedaan rerata ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-x_L antara kelompok preeklamsia berat dan normotensi baik saat usia kehamilan preterm maupun aterm. Dari data ini dapat diartikan bahwa faktor preeklamsia berat lebih mempengaruhi ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-x_L dibandingkan faktor umur kehamilan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Beda rerata ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-x_L lebih rendah pada kehamilan preeklamsia berat dibandingkan kehamilan normotensi. Beda rerata ekspresi protein Bcl-2 lebih rendah dibandingkan beda rerata ekspresi protein Bcl-xl. Preeklamsia berat lebih berpengaruh terhadap ekspresi protein Bcl-₂ dan Bcl-x_L dibandingkan umur kehamilan

DAFTAR PUSTAKA

1. Girsang ES. 2004. *Analisis tekanan darah dan proteinuria sebagai faktor prognosis kematian maternal dan perinatal pada preeklamsia berat dan eklamsia*. Tesis PPDS ObsGin FK USU, RSUP H Adam Malik/RSUD Dr Pringadi Medan.
2. Sofoewan S. 1998. *Preeklamsia di Beberapa Rumah Sakit Di Indonesia, Patogenesis, dan Kemungkinan Pencegahan*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
3. Keman K, Presetyorini N, Langgar M J. Perbandingan ekspresi p53, Bcl-2, dan Indeks Apoptosis Trofoblas pada Preeklamsia/Eklamsia dan Kehamilan Normal. *Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia*, 2009; 33-3, pp.151-159.
4. Roeshadi HR. Hipertensi dalam Kehamilan, dalam *Ilmu Kedokteran Feto-maternal*, edisi perdana, hal 494-99, Himpunan Kedokteran Fetomaternal,

- Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia, Surabaya, 2004.
5. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanism of Disease: Pre-eclampsia, *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005 Dec;1(2):98-114
 6. Shawn L., Straszewski-Chavez, Vikki MA., Mor G. The Role of Apoptosis in The Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation During Pregnancy, *Endocrine reviews*. 2005; 26(7): 877-97.
 7. Dash P. Apoptosis, *Basic Medical Sciences*, St George's, University of London, 2009.
 8. Hung TH., Chen SF., Liou JD., Hsu JJ, Li MJ, Yeh YL et al. Bax, Bak and Mitochondrial Oxidants are Involved in Hypoxia-reoxygenation-induced Apoptosis in Human Placenta. *Placenta* 2008; 29: 65-83.
 9. Levi R et al. Apoptosis In Human cultured Trophoblast is Enhanced by hypoxia and diminished by Epidermal Growth factor, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000; C982-C988.
 10. Churchill D and Duley L. Interventionist versus expectant for severe preeclampsia before term (Review), *Cochrane Database of Systematic Review*, 2002; issue 3. Art, No. CD003106.
 11. Allaire AD., Ballenger KA., Well SR., McMohan MJ, Lessey BA. Placental Apoptosis in Preeclampsia, *Obstetrics & gynecology*, 2000; 96: 271-76.
 12. De Angelis PM., Stokke T, Thorstensen L, Lothe RA, Clausen OP. Apoptosis and Expression of Bax, Bcl-x and Bcl-2 apoptotic regulatory protein in colorectal carcinomas, and association with p53 genotype/phenotype, *Mol Path* 1998; 51(5) 254-261.