

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Persalinan prematur adalah hari pertama persalinan sebelum usia kehamilan 37 minggu atau kurang dari 259 hari dihitung dari menstruasi terakhir. Sampai saat ini mortalitas dan morbiditas bayi prematur masih sangat tinggi. Hal ini berkaitan dengan maturitas organ pada bayi baru lahir seperti paru, otak dan gastrointestinal. Di negara barat sampai 80% dari kematian neonatus adalah akibat prematuritas dan pada bayi prematur yang selamat 10% nya mengalami permasalahan dalam jangka panjang . (Drife J *et al* .2004)

Angka kejadian bayi prematur meningkat di banyak negara. Kenaikan ini dikarenakan faktor membaiknya tehnik pengumpulan data, meningkatnya penyakit kronis, meningkatnya kehamilan kembar karena pengobatan infertilitas, dan meningkatnya jumlah kelahiran prematur melalui seksio sesarea. Negara dengan jumlah kejadian kelahiran prematur terbanyak pertahun adalah India (3,52juta), China (1,17juta), Indonesia (675.000) dan Amerika Serikat (514.400). (Nour *et al* .2012)

Prematuritas merupakan masalah serius karena dapat menyebabkan kematian dan kesakitan neonatus. Hampir separuh dari neonatus yang berhasil hidup akan mengalami kecacatan neurologis kongenital termasuk *Cerebral Palsy* (CP). Kejadian CP dan gangguan kognitif berhubungan dengan kerusakan *periventrikuler white matter*, dimana hal ini sering ditemui pada bayi yang dilahirkan sebelum usia kehamilan 32 minggu atau didapatkan kelainan corticosubcortical pada bayi yang baru dilahirkan cukup bulan. (Degos V *et al* .2008). Sitokin pro inflamasi telah di ketahui secara signifikan meningkat pada cairan amnion dan otak janin neonatus dengan infeksi, termasuk respon inflamasi lokal yang menyebabkan kerusakan otak

janin. Peningkatan sitokin telah diteliti di cairan amnion dan darah neonatus yang menderita *Cerebral Palsy* (CP). Infeksi mikroba ke dalam cairan amnion dapat menimbulkan persalinan prematur dan berakibat menjadi infeksi janin. Mikroorganisme menghasilkan produk yang dapat memicu sel mononuclear menghasilkan IL-1 dan TNF- $\alpha$ . Yang dapat meningkatkan permeabilitas sawar darah otak (*blood brain barrier*) sehingga produk mikroorganisme dan sitokin pro inflamasi tersebut dapat masuk ke otak dan menimbulkan kerusakan pada jaringan putih otak (*White Matter Damage*) janin, sehingga dibutuhkan neuroproteksi yang tepat agar dapat melindungi otak janin dari kerusakan yang di akibatkan oleh sitokin pro inflamasi tersebut.

Pre-eklampsia masih menjadi penyebab utama mortalitas dan morbiditas janin dan maternal di dunia, dan menjadi nomor 1 persoalan yang kompleks dalam obstetri. (Vahid et al, 2008). Penyebab penyakit ini masih belum diketahui, namun disfungsi endotel dapat menjadi salah satu faktor penyebabnya. Pre-eklampsia dikenal sebagai komplikasi kehamilan yang berakibat terjadinya aktifitas pengurangan perfusi sekunder organ dan vasospasme endotel. (Mihu et al, 2010). Pre-eklampsia juga merupakan sindroma hiperaktivitas leukosit didalam sirkulasi maternal. (Mihu et al, 2010). Beberapa sitokin yang berbeda selama kehamilan dilepaskan oleh sel imun dan limfosit dipermukaan trophoblas dan desidua. Beberapa sitokin ini ditemukan meningkat pada wanita yang menderita pre-eklampsia dan menjadi hal yang menarik sebagai bio marker untuk perkembangan pre-eklampsia.

Hipotesis yang terbaru menyebutkan bahwa penyebab dari pre-eklampsia lebih di fokuskan kepada respon imun. Sitokin adalah suatu substansi regulator imun yang terlibat dalam patogenesis pre-eklampsia. Kehamilan yang berhasil adalah suatu fenomena Th2, dimana Th1/Th2 shift ke Th2 tipe reaksi. Tipe 1 sitokin termasuk interleukin-2, interferon (IFN) dan tumor nekrosis faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) banyak ditemukan pada pre-eklampsia yang disebabkan oleh inflamasi. (Mirahmadian et al, 2008). Konsentrasi sitokin proinflamasi plasma

dari plasenta seperti Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) dan Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) tinggi pada pasien dengan pre-eklampsia dibanding dengan wanita hamil yang normal.

Sitokin TNF- $\alpha$  adalah peptida 17kd, yang merupakan solubel mediator dari imunitas seluler.(Gulti et al,2005). Beberapa peneliti telah menunjukkan bahwa kadar TNF $\alpha$  serum secara signifikan tinggi pada trimester satu dan tri mester dua di antara wanita hamil yang berkembang menjadi pre eklampsia dibandingkan dengan kelompok kontrol.Dari penelitian yang dilakukan oleh Kocyigit et al, konsentrasi TNF $\alpha$  tinggi pada kelompok pre-eklampsia.(Kocyigit et al,2004). Dalam beberapa penelitian diduga bahwa infeksi dan proses inflamasi berhubungan dengan pre-eklampsia. Sekresi IL-1 $\beta$  mengawali kaskade proinflamasi, termasuk produksi dari TNF- $\alpha$ , interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2,dan IL-12. Famili gen IL-1 $\beta$  berlokasi pada kromosom 2q13-14 . Gen IL-1 $\beta$  adalah polimorfik yang paling tinggi dan beberapa *diallelic polymorphisms* juga telah di teliti.Pada Pre-eklampsia, sitokin pro inflamasi IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  sebagai mediasi respon inflamasi dengan menarik dan mengaktivasi leukosit di jaringan dan menstimulasi sekresi dari limfosit sitokin dan enzim katabolik yang terlibat pada oksidatif stres yang berhubungan dengan pre eklampsia. Mekanisme inflamasi dan infeksi dalam patogenesis dari pre eklampsia sangat signifikan didalam negara berkembang,dimana insiden tertinggi subklinik infeksi kronik dapat menjadi salah satu penyebab insiden tertinggi dari pre eklampsia.(Tavakol et al,2005).

Magnesium Sulfat (MgSO<sub>4</sub>) sudah banyak dipakai didalam dunia obstetri biasa nya sebagai tokolisis, sebagai antikonvulsan dalam terapi preeklampsia dan diduga dapat berfungsi juga sebagai neuroproteksi terhadap otak janin,dimana magnesium sulfat (MgSO<sub>4</sub>) berfungsi sebagai antagonis *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) sehingga mencegah terjadinya kerusakan saraf otak janin.

Lesi patologi yang paling sering terjadi yang berhubungan dengan *Cerebral Palsy*(CP) pada bayi prematur adalah *Periventrikular White Matter Injury* (PWMI). Oligodendrosit berkumpul paling banyak pada glia di *White Matter* otak. *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) reseptor pada oligodendrosit menjadi sangat penting didalam proses kerusakan pada Glia. *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) reseptor antagonis menjadi agen neuroprotektif yg potensial di beberapa binatang percobaan dari kerusakan otak dalam kehamilan. Pada manusia, magnesium sangat penting dalam suatu proses seluler, termasuk glikolisis, oxidative phosphorylase, sintesis protein, agregasi DNA dan RNA dan mempertahankan membran plasma. Magnesium mempunyai efek yang menguntungkan pada sel mati dengan menurunkan cytokine proinflammasi atau radikal bebas yang terbentuk selama proses *hypoxic-ischemia reperfusion* dan proses inflammasi dalam kehamilan. Magnesium menjaga excitotoxic calcium yang menyebabkan kerusakan jaringan, dengan *non kompetitive voltage-dependent inhibition* dari *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) reseptor ke glutamate mengurangi masuknya calcium ke dalam sel. Bayi dan otak janin lebih rentan terhadap kerusakan oleh glutamate. Dengan memblokir reseptor glutamate oleh agen seperti magnesium sulphate dapat menurunkan resiko terjadinya kerusakan jaringan pada periode perinatal. Magnesium memiliki efek hemodinamik yang menguntungkan termasuk menstabilisasikan tekanan darah saat dua hari pertama dalam kehidupan janin preterm dan dapat meningkatkan cerebral blood flow dengan mengurangi konstiksi pada cerebral arteri. Transfer magnesium transplasental dapat terjadi dengan cepat, konsentrasi magnesium akan meningkat di darah serum janin hanya dalam waktu 1 jam setelah pemberian magnesium pada ibu.(Crowther *et al* .2013)

Magnesium sulfat dapat membalikkan efek berbahaya dari hypoxic/ischaemic brain injury dengan cara memblokir reseptor NMDA, berlaku sebagai antagonis kalsium dan menurunkan masuknya kalsium ke dalam sel. Magnesium sulfat juga berimplikasi

melindungi jaringan terhadap aktivitas radikal bebas, sebagai vasodilator, mengurangi instabilitas pembuluh darah, preventif terhadap kerusakan yang ditimbulkan dari proses hipoksia, melemahkan sitokin atau *excitatory* amino acid yang menyebabkan kerusakan sel dan mempunyai kerja sebagai anti-apoptosis. Magnesium kompleks dengan adenosin triphosphate termasuk dibutuhkan dalam aktivitas fungsional protein, termasuk membran transport, pompa ion dan beberapa enzim. (Peebles et al 2014)

Inisiasi dari respon pro inflamasi sitokin yang berhubungan dengan infeksi bakteri pada jaringan plasenta dapat menyebabkan persalinan preterm. Sitokin yang berhubungan dengan persalinan preterm termasuk IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . Aktifasi sel imun termasuk didalamnya sirkulasi neutrophil, fagosit makrofag, sel T, sel NK, astrosit CNS dan mikroglia memproduksi mediator biologi seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan *growth factors* yang terlibat didalam interaksi kompleks intermolekular yang berpartisipasi dalam proses immunoinflamasi yang berhubungan dengan kerusakan otak.

Mediator Inflamasi menimbulkan kerusakan pada otak yang sedang berkembang melalui jalan yang berbeda beda, seperti TNF $\alpha$ 1, memegang peranan penting dalam proses imun yang menyebabkan terjadinya kerusakan *Periventrikular White Matter* pada fetus/neonatus. Proses sitotoksik dan inflamasi dari TNF $\alpha$  terjadi melalui membran reseptor diantara Reseptor 1 TNF. TNF-R1 memiliki daerah intraseluler yg telah mati dan aktifasinya mengatur apoptosis sel. Menyimpang dari kebiasaan sinyal TNF $\alpha$ /TNF-R1 memiliki aturan main yang potensial dalam patogenesis kerusakan awal dari otak dimana oligodendrosit yang telah mati dan demyeliniasi merupakan faktor patologi primer dalam proses ini. Ekspresi TNF-R1 di oligodendrosit secara signifikan meningkat pada *Periventrikular White Matter* otak yg sedang berkembang. Hal ini berpasangan dengan peningkatan sel mati yang disebabkan oleh apoptosis dan nekrosis di *Periventrikular White Matter*. Sehingga terlihat bahwa produksi TNF $\alpha$  oleh sel mikroglial dalam kondisi hipoksia menginduksi apoptosis

oligodendrosit melalui TNF-R1. Tidak seperti TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  tidak bersifat toksik terhadap oligodendrosit, tetapi dapat memblokir proliferasi dari oligodendrosit. Saat ini telah diteliti mengenai peningkatan signifikan produksi IL-1 $\beta$  oleh sel mikroglial bersamaan dengan ekspresi Reseptor 1 IL-1 pada oligodendrosit di *Periventrikular white matter* otak neonatus. Diperkirakan bahwa aktivasi dan orientasi pro inflamasi dari produksi IL-1 oleh sel mikroglial pada kondisi hipoksia menghambat perkembangan *white matter* dan perbaikan dari kondisi hipoksia. (Berger et al 2012)

## **B. Rumusan Masalah**

Apakah kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibu lebih rendah bila dibandingkan dengan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub>.

## **C. Tujuan Penelitian**

### 1. Tujuan Umum

Mengetahui manfaat pemberian MgSO<sub>4</sub> 40% untuk mencegah kerusakan sel neuron korteks otak bayi yang dilahirkan prematur

### 2. Tujuan Khusus

Untuk mengetahui dan menganalisis perbedaan kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibu nya dan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub>.

## **D. Manfaat Penelitian**

### 1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan pengetahuan mengenai kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibunya dan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub> sehingga dapat dijadikan dasar penelitian selanjutnya.

### 2. Manfaat Aplikasi

Menambah wawasan hubungan pemeriksaan klinis dan laboratorium biomolekuler pada bayi prematur sehingga dapat menurunkan angka kejadian *Cerebral Palsy* (CP) dan Gangguan Kognitif pada anak-anak yang diakibatkan oleh *Periventricular White Matter Damage* (PWMD).

### 3. Manfaat kedokteran keluarga

Dengan mengetahui adanya perbedaan kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibu nya dan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub>, diharapkan dapat menjadi usaha deteksi dini sehingga ini merupakan usaha preventif yang lebih awal dalam penanganan *Cerebral Palsy* (CP) dan Gangguan Kognitif pada anak-anak.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Prematuritas

##### 1. Definisi

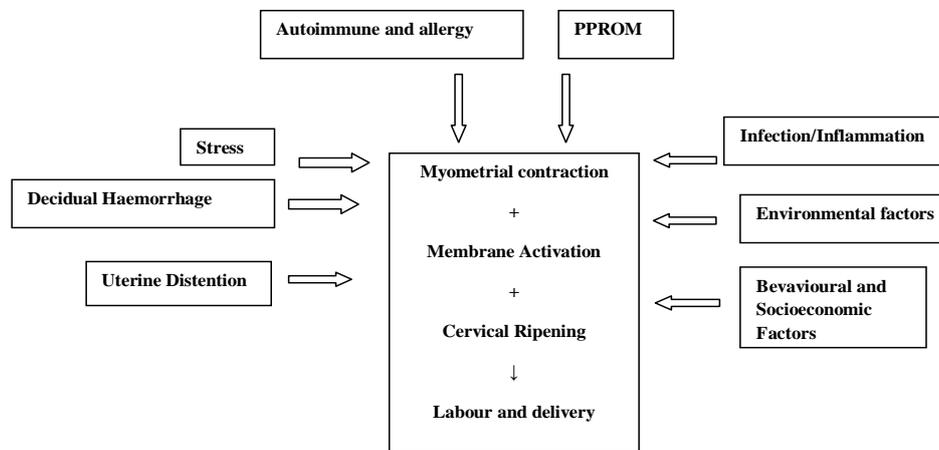
Persalinan prematur adalah hari pertama persalinan sebelum usia kehamilan 37 mgg atau kurang dari 259 hari dihitung dari menstruasi terakhir. Lebih jauh lagi persalinan preterm dapat dibagi berdasarkan dari usia kehamilannya : *extremely preterm* (<28 weeks), *very preterm* (28 - <32 weeks) dan *moderate preterm* (32 - <37 completed weeks of gestation). *Moderate preterm birth* istilah itu berubah menjadi *late preterm birth* (34 - <37 completed weeks). Sekarang ini usia kehamilan 37 minggu menjadi batas untuk usia kehamilan matur. Resiko terjadi persalinan prematur lebih besar kemungkinannya bila semakin rendah usia kehamilannya.(Marlow et al,2012). Definisi secara Internasional untuk *stillbirth* sangat jelas *stillbirths* >1000 g atau 28 mgg kehamilan.(Lawn JE et al.2011 dan Cousens S et al.2011)

Di negara Inggris, resiko terjadinya kelahiran prematur sekitar 6% pada golongan kulit putih dan sekitar 10% pada golongan berkulit hitam. Demikian juga di Amerika, bahwa kejadian persalinan prematur banyak terjadi pada kulit hitam. Faktor resiko kelahiran prematur adalah ras, umur, status sosio ekonomi dan indeks massa tubuh.. Kondisi sosio ekonomi yang rendah dan adanya faktor genetik untuk terjadinya persalinan prematur seperti terjadi *polymorphisms tumor necrosis factor- $\alpha$*  (berperan sebagai sitokin proinflamasi).(Romero R et al.2009)

##### 2. Etiologi

Persalinan *preterm* bukanlah wujud satu penyakit, tetapi merupakan gejala atau sindrome yang mungkin mempunyai 1 (satu) atau lebih sejumlah penyebab. Persalinan

*preterm* telah dikaitkan dengan inkompetensi servik, kelainan haemostasis, infeksi dalam uterus, perdarahan desidua, stres ibu dan kehamilan multipel.



**Gambar 2.** Penyebab dari terjadinya persalinan *preterm* (Sara *et al.*2009)

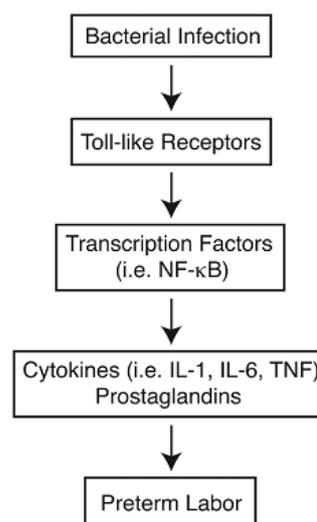
Terdapat korelasi yang kuat antara infeksi dalam uterus dan mulainya permulaan persalinan *preterm* spontan. Infeksi pada selaput dan cairan amnion disebabkan oleh berbagai mikroorganisme dapat menyebabkan beberapa kasus seperti ketuban pecah, persalinan *preterm*, atau keduanya. Infeksi dalam uterus memiliki potensi untuk mengaktivasi semua jalur biokimia yang mengarah pada pematangan servik dan kontraksi uterus. Infeksi dari darah dari tempat lain jarang terjadi. (Bennett *et al.* 2007; Gary,2010)

Kelemahan atau pendeknya servik merupakan faktor utama terjadinya risiko infeksi ascendens bakteri. Namun, terdapat kemungkinan juga bahwa dengan jumlah patogen mematkan yang tinggi dalam vagina, bakteri dapat memperoleh akses menuju daerah uterus yang lebih rendah melalui leher uterus yang berfungsi normal, di mana bakteri tersebut mengaktifkan mediator inflamasi yang membuat servik menjadi matang dan memendek. Bakteri mungkin juga mendapatkan akses menuju rongga ketuban

melalui penyebaran secara hematogen atau melalui bersamaan dengan dilakukannya prosedur yang invasif. (Bennett *et al.* 2007)

Produk-produk bakteri seperti endotoksin merangsang monosit desidua untuk memproduksi sitokin, termasuk interleukin-1, faktor nekrosis tumor, dan interleukin-6, yang pada gilirannya merangsang asam arakidonat dan kemudian memproduksi prostaglandin. Prostaglandin E2 dan F2 bertindak sebagai parakrin untuk merangsang kontraksi miometrium. (Gary, 2010)

Faktor pengaktif trombosit juga ikut berperan dalam aktivasi jaringan sitokin, yang ditemukan di dalam cairan amnion. Faktor pengaktif trombosit diperkirakan diproduksi di dalam paru dan ginjal janin. Oleh karenanya, janin tampaknya memainkan suatu peran sinergistik untuk inisiasi kelahiran *preterm* yang disebabkan oleh infeksi bakterial. Secara teori, hal ini kemungkinan menguntungkan bagi janin yang ingin melepaskan dirinya dari lingkungan yang terinfeksi. (Gary,2010)



**Gambar 3** Patogenesis bakteri menghasilkan persalinan *preterm* (Christine,2008)

### 3. Komplikasi Prematuritas

Prematuritas merupakan masalah serius karena dapat menyebabkan kematian dan kesakitan neonatus. Resiko kelahiran preterm antara lain kematian bayi, kecacatan bayi, gawat nafas, perdarahan intrakranial, infeksi/sepsis dan gagal jantung. Neonatus yang lahir secara prematur sebaiknya dirawat dan dirujuk ke rumah sakit yang memiliki fasilitas *neonatal intensif care unit* (NICU). Tidak semua Rumah sakit memiliki fasilitas ini. Fasilitas NICU masih terbilang cukup mahal. Sehingga penatalaksanaan neonatus ini membutuhkan biaya dan tenaga yang banyak. Hampir separuh dari neonatus yang berhasil hidup akan mengalami kecacatan neurologis kongenital termasuk *Cerebral Palsy* (CP) akan menderita penyakit kronis yang merupakan komplikasi preterm seperti displasia bronkopulmoner, enterokolitis nekrotikan, retinopati pretermitas dan kerusakan organ akibat septikemia. Berbagai komplikasi tersebut pada akhirnya dapat berdampak jangka panjang yang membutuhkan biaya pengelolaan yang jangka panjang juga.

*Cerebral Palsy* (CP) dan gangguan perilaku berhubungan dengan kerusakan *periventrikular white matter* atau dikenal sebagai *Periventrikular White Matter Damage* (PWMD), dimana hal ini sering terlihat pada bayi-bayi yang lahir sebelum usia kehamilan 32 minggu. PWMD juga dapat terjadi dari lesi cortical sub cortical yang terjadi pada bayi-bayi lahir cukup bulan. (Tyler CP et al.2012,Burd I et al.2009, dan Goscik E et.al.2011).

Infeksi maternal merupakan penyebab tersering sebagai inisiasi persalinan prematur (Romero *et al.*,2007). Dan sering dibarengi dengan respon inflamasi sistemik dari fetus (Gotsch *et al.*, 2007). Pemberian antibiotik pada perawatan antenatal ibu hamil dengan persalinan prematur (tetapi tanpa infeksi terbuka),tidak menurunkan resiko terkena gangguan perhatian(Kenyon *et al.*, 2008).

## **B. Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF- $\alpha$ )**

### **1. Definisi**

Tumor Nekrosis Faktor (TNF) adalah anggota dari superfamili TNF yang terdiri dari setidaknya 18 ligan dan 29 reseptor berbeda yang terlibat dalam proses seluler yang banyak. Sinyal TNF melalui dua reseptor yang berbeda TNFR1 dan TNFR2 yang mengendalikan ekspresi sitokin, reseptor kekebalan tubuh, protease, faktor pertumbuhan dan gen siklus sel yang pada gilirannya mengatur peradangan, kelangsungan hidup, apoptosis, migrasi sel, proliferasi dan diferensiasi. Karena ekspresi TNF ditemukan dalam amnion dan plasenta, banyak sitokin dan reseptor nya dalam beragam jaringan reproduksi manusia.

TNF telah terlibat dalam ovulasi, pembentukan korpus luteum dan luteolysis, ulasan ini berfokus pada fungsi TNF pada plasenta manusia, jenis sel endometrium dan desidua dari jaringan normal dan juga membahas perannya dalam penyakit endometrium dan kehamilan. Tingkat fisiologis dari sitokin yang mungkin penting untuk menyeimbangkan fusi sel dan pengguguran apoptosis pada vili trofoblas dan untuk membatasi invasi trofoblas ke desidua maternal. Pengaturan dari sistem TNF / TNFR oleh hormon steroid juga menunjukkan peran dalam fungsi rahim termasuk kerusakan dan regenerasi jaringan endometrium yang berkaitan dengan siklus menstruasi. Tingkat menyimpang dari TNF, bagaimanapun, berhubungan dengan beragam penyakit reproduksi seperti infeksi ketuban, aborsi spontan berulang, preeklamsia, kelahiran *preterm* atau endometriosis. Selain itu, konsentrasi, distribusi reseptor dan panjang stimulasi menentukan apakah TNF memiliki efek menguntungkan atau merugikan pada reproduksi wanita dan kehamilan.

### **2. Ekspresi dan Reseptor Tumor Nekrosis Faktor Pada kehamilan**

Sejak TNF pertama kali terdeteksi dalam cairan ketuban dan supernatan plasenta selama kehamilan manusia normal, banyak penelitian telah menyelidiki pola ekspresi sitokin

tertentu serta reseptornya, TNFR1 dan TNFR2, dalam jaringan kehamilan yang berbeda. Secara umum, banyak jenis sel endometrium manusia, desidua dan plasenta diketahui mengekspresikan TNF dan reseptornya yang menunjukkan bahwa interaksi beberapa autokrin dan parakrin mungkin telah terjadi.

## 2.1. Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor

Berdasarkan studi hibridisasi *in situ* dan analisis imunohistokimia diketahui TNF mRNA dan protein yang diekspresikan dalam endometrium dan sel otot polos miometrium rahim. Berbagai jenis sel endometrium, yaitu fibroblas, makrofag, sel epitel kelenjar dan sel-sel pembuluh darah, semuanya diketahui mengekspresikan sitokin tertentu. Secara rinci, kandungan protein TNF dalam kelenjar adalah negatif menuju lemah di fase proliferasi awal dengan peningkatan kandungan selama fase proliferasi dan mencapai maksimal dalam fase proliferasi akhir. Ekspresi tetap tinggi sepanjang fase sekretori dengan intensitas pewarnaan sedikit lebih rendah daripada di fase proliferasi akhir. Perubahan lokalisasi juga terlihat karena selama fase sekretori TNF ini sebagian besar diekspresikan di dalam bagian apikal epitel kelenjar. Menjelang akhir siklus, mRNA TNF menurun sedangkan TNF-protein tetap tinggi dalam kelenjar endometrium. Intensitas ekspresi serupa di lapisan basal dan fungsional endometrium. Kesan produksi yang lemah dalam sel stroma terdapat disepanjang keseluruhan siklus sedangkan yang lain terlihat melakukan ekspresi terus menerus dari pertengahan-proliferasi ke fase sekretori akhir dan di desidua selama trimester pertama kehamilan. Selama deciduasi TNF mRNA telah terdeteksi dalam sel stroma dan makrofag, sel NK rahim, T-sel dan sel endotel. Beberapa penulis juga melihat sekresi basal protein TNF dari jaringan desidua atau sel stroma desidua *in vitro* terisolasi. (Gustafsson *et al.* 2006)

Ekspresi TNF plasenta yang berubah selama kehamilan menunjukkan fungsi tertentu dalam proses perkembangan diferensiasi. Setelah fertilisasi *in vitro* berbagai jumlah TNF

telah terdeteksi dalam supernatan dari embrio manusia yang namun tidak terkait dengan hasil kehamilan . Selama sepertiga pertama kehamilan mRNA TNF tampaknya diekspresikan secara predominan dalam semua jenis sel dari garis keturunan trofoblas termasuk vili sitotrofoblas dan syncytiotrophoblasts selain itu juga diekspresikan di proliferasi sitotrofoblas dari pulau sel dan trofoblast invasif . Selama kemajuan proses kehamilan ekspresi mRNA berganti dari populasi sel trofoblas menuju sinyal yang lebih kuat dalam sel stroma vili . Analisis imunohistokimia protein TNF terdeteksi terutama di kolom sel . Intensitas sinyal dipertahankan selama invasi dan bahkan intensitasnya meningkat ketika trofoblast ekstravili (EVT) menggantikan sel-sel endotel spiral arteri . Namun, pada tahap akhir dari kehamilan ekspresi protein TNF menurun dalam sel invasif dan sel raksasa trofoblast ekspresi TNF berkurang .(Haider *et al.*2009)

## **2.2. Ekspresi reseptor Tumor Nekrosis Factor**

Ekspresi dari dua reseptor TNF terdeteksi pada sel epitel endometrium selama siklus menstruasi keseluruhan dengan ekspresi yang lebih tinggi di lapisan basalis dibandingkan dengan Fungsional . Penulis lain melaporkan peningkatan tingkat TNFR1 selama siklus menstruasi dengan tingkat memuncak dalam fase sekresi akhir . Ekspresi TNFR2 bervariasi selama siklus dan ekspresi tertinggi terjadi pada akhir proliferasi dan fase sekresi akhir . Studi lain gagal untuk mendeteksi protein TNFR2 dalam kelenjar endometrium dari desidua manusia, namun terobservasi sebagian ekspresinya dalam sel NK desidua, T-sel, makrofag, stroma dan sel endotel . Memang, banyak penelitian telah menunjukkan bahwa kultur sel desidua menanggapi perlakuan TNF yang menunjukkan bahwa berbagai jenis sel desidua yang berbeda mengekspresikan reseptor TNF.

Dalam plasenta, trofoblast trimester pertama yang berupa kolom sel menunjukkan adanya sinyal yang kuat dari mRNA TNFR1 sedangkan pada vili sitotrofoblas dan

syncytiotrophoblasts menunjukkan distribusi seragam dari reseptor mRNA. Berbeda dengan mRNA TNF, mRNA TNFR1 sangat diekspresikan dalam sel vili stroma selama trimester pertama. Dalam plasenta, TNFR1 mRNA tetap konsisten kuat dalam stroma vili dan sel endotel tetapi juga telah terdeteksi di syncytiotrophoblasts meskipun pada tingkat yang lebih rendah. Distribusi plasenta dari mRNA TNFR2 mirip dengan mRNA TNFR1 tetapi sinyalnya lebih lemah dan akan meningkat di sel stroma vili saat akhir kehamilan. Ekspresi *in vitro* dari mRNA TNFR1 dan pada luasan yang lebih kecil mRNA TNFR2 juga bisa diamati di kultur trofoblast pada saat trimester pertama. (Jacobo *et al.* 2013)

TNFR1 protein terbukti secara luas diekspresikan dalam vili sitotrofoblas, kolom sel dan trofoblast invasif pada usia kehamilan awal. Dalam sel vili mesenchymal produksinya lemah sedangkan sinyal yang kuat diperoleh dari syncytiotrophoblasts selama seluruh usia kehamilan. Mengenai data ekspresi protein TNFR2 pada plasenta yang inkonsisten dapat ditemukan dalam literatur. Sedangkan polipeptida TNFR2 dapat diamati pada trimester pertama pada sitotrofoblas dan syncytium dengan penurunan tingkat dalam jenis sel menjelang akhir kehamilan, Studi lain gagal untuk mendeteksi protein dalam salah satu sub tipe trofoblas trimester pertama. Dengan ekspresi syncytial dari polipeptida TNFR2 dapat dideteksi pada sebagian besar tapi tidak semua studi. Menariknya, mungkin ada perbedaan dalam distribusi intraseluler dan pola pewarnaan antara dua reseptor. Sementara syncytial protein TNFR1 menunjukkan lokalisasi perinuklear, pewarnaan dari TNFR2 menunjukkan pola yang lebih granular di dalam sitoplasma. Dalam kondisi *In vitro*, permukaan serta pewarnaan perinuklear dari kedua reseptor dapat dideteksi pada kultur trofoblas trimester ketiga. Selain itu, sel-sel ini juga cepat melepaskan sTNFR1 dan sTNR2 ke dalam media kultur yang memberikan penjelasan untuk peningkatan konsentrasi reseptor TNF larut dalam urine pada wanita hamil.

### 3. Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF $\alpha$ ) dalam kehamilan

Sudah banyak dijelaskan mengenai fungsi Pleiotrophic TNF pada beragam jenis sel reproduksi. Ekspresi TNF dan reseptornya telah terdeteksi pada oocytes, sel granulosa dan sel interstitial menunjukkan adanya autokrin serta interaksi parakrin. Sitokin tersebut terbukti dapat menghambat steroidogenesis dalam ovarium yang belum terdeferensiasi dan merangsang sintesis progesteron dalam ovarium yang terdeferensiasi. TNF juga terlibat dalam regresi korpus luteum karena luteal TNF menunjukkan peningkatan pada penurunan sekresi progesteron. Regresi TNF-dependent dapat dimediasi melalui sintesis prostaglandin yang diinduksi dan / atau proses apoptosis. Singkatnya, dapat disimpulkan bahwa TNF secara kritis terlibat dalam homeostasis fungsi ovarium, ovulasi, korpus luteum dan pembentukan luteolysis. (Haider *et al.* 2009).

Tumor necrosis factor menimbulkan berbagai efek biologis pada jenis sel plasenta dan endometrium seperti apoptosis, penghambatan fusi sel trofoblas dan invasi atau peluruhan epitel yang kemungkinan melibatkan kedua jenis reseptor TNF. Namun rincian tentang persinyalan dimediasi-TNF seperti protein adaptor hilir atau pada langkah-langkah fosforilasi dalam tipe sel ini, sebagian besar tidak diketahui.

### 4. Peran Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$ dalam kerusakan *Periventrikuler White Matter*

TNF $\alpha$ 1, memegang peranan penting dalam proses imun yang menyebabkan terjadinya kerusakan *Periventrikuler White Matter* pada fetus/neonatus. Proses cytotoxic dan inflamasi dari TNF $\alpha$  terjadi melalui membran reseptor diantara Reseptor 1 TNF. TNF-R1 memiliki daerah intraseluler yg telah mati dan aktifasinya mengatur apoptosis sel. Menyimpang dari kebiasaan sinyal TNF $\alpha$ /TNF-R1 memiliki aturan main yang potensial dalam patogenesis kerusakan awal dari otak dimana oligodendrosit yang telah mati dan demyelinisasi merupakan faktor patologi primer dalam proses ini. Ekspresi TNF-R1 di oligodendrosit

secara signifikan meningkat pada *periventricular white matter* otak yg sedang berkembang. Hal ini berpasangan dengan peningkatan sel mati yang disebabkan oleh apoptosis dan nekrosis di *periventricular white matter*. Sehingga terlihat bahwa produksi TNF $\alpha$  oleh sel mikroglial dalam kondisi hipoksia menginduksi apoptosis oligodendrosit melalui TNF-R. Dari data penelitian yang telah ada menyebutkan bahwa Infeksi lipopolysacharide (LPS) menginduksi produksi TNF-  $\alpha$  dari astrosit dan juga menyebabkan desentralisasi berat dari sirkulasi janin, menghasilkan hipoperfusi cerebral dan kerusakan iskemia otak. Pada penelitian yang lain menunjukkan bahwa hampir 90% dari kasus PVL kadar TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 sangat tinggi.

#### **D. INTERLEUKIN 1 BETA (IL-1 $\beta$ )**

##### **1. Definisi Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ )**

Interleukin-1 adalah sebutan bagi beberapa polipeptida sitokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-1Ra, yang memainkan peran penting dalam regulasi sistem kekebalan dan respon peradangan. IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  masing-masing memiliki berkas genetik IL-1A, dan IL-1B, pada kromosom 2 deret yang sama yaitu 2q14, dan merupakan sitokina pleiotropik hasil sekresi monosit dan makrofaga berupa prohormon, sebagai respon saat sel mengalami cedera, oleh karena itu menginduksi apoptosis. Interleukin-1 (IL-1) merupakan keluarga dari polipeptida dengan berbagai kegiatan biologis. Setidaknya dua produk gen yang berbeda telah dikloning, ada mungkin lebih. Keluarga IL-1 manusia memainkan peran penting dalam patogenesis banyak penyakit dan fungsi sebagai mediator kunci dari respon host terhadap tantangan infeksi, inflamasi, dan imunologi yang berbeda. IL-1 Recombinant mouse (pI 5) dan recombinant human (pI 7) yang digunakan untuk mengkonfirmasi beberapa sifat biologis IL-1” s tetapi penyelidikan yang cukup besar diperlukan sebelum kegiatan tertentu (unit biologis per

miligram protein) ditetapkan untuk setiap bentuk IL-1 human. Beberapa kegiatan IL-1 biologis seperti induksi hati fase akut sintesis protein telah dibuktikan dalam invertebrata dalam evolusi limfosit. IL-1 adalah sangat inflamasi dan meningkatkan konsentrasi metabolit asam arakidonat, terutama prostaglandin E<sub>2</sub>, di otak, otot, kondrosit, dan fibroblas sinovial. Sintesis leukotrien juga terlibat dalam mekanisme kerja pada jaringan tertentu. Kloning dan ekspresi gen IL-1 human akan memperluas pemahaman kita tentang IL-1 dalam berbagai penyakit melalui sistem deteksi peningkatan dan penggunaan probe cDNA, pengembangan antagonis IL-1, serta penggunaan IL-1 sebagai immunomodulator, saat ini sedang dipertimbangkan. Beberapa pakar menganggap bahwa defisiensi genetik IL1A berperan dalam reumatoid arthritis dan Alzheimer. IL-1 $\beta$  merupakan sitokina yang diiris oleh ICE, dan berperan di dalam aktivitas selular seperti proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. Induksi COX-2 pada sitokina ini di dalam sistem saraf pusat ditemukan sebagai penyebab hipersensitivitas yang memberikan rasa sakit. Dari percobaan yang dilakukan terhadap manusia dan hewan, ada peranan yang kuat dari IL-1 sebagai mediator stimulasi hilangnya tulang pada penyakit periodontal. IL-1 adalah mediator utama terhadap respon inflamasi yang dihasilkan oleh banyak sel yang berbeda, termasuk makrofag, sel-sel endotel, sel-sel B, fibroblas, sel-sel epitel, astrocytes, dan osteoblas. IL-1 dihasilkan sebagai respon terhadap mikroorganisme, bakteri toksin, komponen komplemen atau injuri jaringan. Salah satu aksi terpenting dari IL-1 adalah kemampuannya untuk menginduksi sitokin lain, dan IL-1 muncul sebagai bagian jaringan sitokin dengan sifat self-regulating dan self-suppressing. Pada awalnya IL-1 ditemukan sebagai faktor yang bisa menginduksi terjadinya demam, sebagai pengontrol limfosit, meningkatkan jumlah sel-sel sumsum tulang dan menyebabkan degenerasi komposisi tulang. Sekitar tahun 1984-1985, IL-1 ditemukan oleh para ahli bahwa sebenarnya terdiri dari dua protein yang terpisah, sekarang disebut dengan IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  merupakan pro-inflamatori sitokin yang terlibat dalam pertahanan imun

melawan infeksi. IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  keduanya dihasilkan oleh makrofag, monosit, dan sel-sel dendrit. Mereka dibentuk sebagai bagian penting terhadap respon inflamasi tubuh melawan infeksi. Sitokin-sitokin ini meningkatkan ekspresi faktor-faktor adhesi pada sel-sel endotel untuk memungkinkan transmigrasinya leukosit-leukosit, sel-sel yang melawan patogen, ke tempat infeksi dan berkumpul di pusat pengatur suhu hipotalamus, dan menyebabkan peningkatan suhu tubuh atau demam. Dengan demikian IL-1 disebut endogenous pyrogen. IL-1 juga penting dalam pengaturan hematopoiesis, IL-1 diketahui menstimulasi fibroblas untuk menghasilkan kolagenase. IL-1 dikenal paling berpotensi menginduksi proses demineralisasi tulang dan sinergis dengan tumor necrosis factor  $\alpha$  dalam menstimulasi resorpsi tulang terutama dalam mengubah matriks jaringan ikat. Kadar IL-1 diketahui meningkat pada gingiva periodontitis dewasa dibandingkan dengan individu yang secara klinis sehat atau mengalami gingivitis ringan. IL-1 juga meningkat pada periodontitis aktif dibandingkan dengan inflamasi yang stabil.

## **2. Peran Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) pada kehamilan normal**

IL-1 $\beta$  adalah satu dari sekian banyak sitokin yang di produksi dari sel imun dan non imun.(Maedler *et al.*2009 dan Soliman *et al.* 2009).Sitokin ini mempunyai aturan dalam merespon inflamasi, infeksi atau kerusakan.(Yang *et al.*2004).Terdapat penelitian yang berhubungan dengan aturan ini pada persalinan normal. Protein sitokin terklasifikasi berdasar dari sel T sebagai T helper limfosit 1 (Th1) atau T helper limfosit 2 (Th2). Terdapat penelitian yang membuktikan bahwa pada wanita hamil normal terdapat sirkulasi peningkatan sel Th2 sitokin dan penurunan sel Th1 sitokin. Peningkatan keduanya pada maternal, IL-6 (Th2) dan TNF- $\alpha$  (Th1) sitokin, pernah dilaporkan pada wanita hamil normal.(Jahromi *et al.*2011). Dalam satu penelitian kadar IL-1 $\beta$  maternal pada wanita hamil lebih rendah pada wanita yang tidak hamil dan secara signifikan menggambarkan korelasi negatif antara IL-1 $\beta$  dan usia kehamilan. Kadar serum IL-1 $\beta$  pada maternal lebih jauh

meningkat pada periode kehamilan. IL-1 $\beta$  berpartisipasi dalam sistem imun paralel pada sel Th1.(Sobhani *et al.*2008) dan berkategori sebagai Th1sitokin dan Th1 sitokin menurun dalam kehamilan.(Szarka *et al.*2010 dan Jahromi *et al.*2011). Pada penelitian *in vitro*, dilakukan pengukuran kadar IL-1 $\beta$  pada trimester ketiga dan didapatkan kadar IL-1 $\beta$  yang tidak berubah. Terdapat penurunan yang berangsur-angsur dari ekspresi IL-1 $\beta$  sebagai sel trophoblastik yang secara progresif berdiferensiasi menjadi sel syncytial.(Das *et al.*2004).

### **3. Peran Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) dalam kerusakan *Periventrikuler White Matter***

. Tidak seperti TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  tidak bersifat toksik terhadap oligodendrosit, tetapi dapat memblok proliferasi dari oligodendrosit. Saat ini telah di teliti mengenai peningkatan signifikan produksi IL-1 $\beta$  oleh sel mikroglial bersamaan dengan ekspresi Reseptor 1 IL-1 $\beta$  pada oligodendrosit di *periventrikular white matter* otak neonatus. Diperkirakan bahwa aktivasi dan orientasi pro inflamasi dari produksi IL-1 $\beta$  oleh sel mikroglial pada kondisi hipoksia menghambat perkembangan *white matter* dan perbaikan dari kondisi hipoksia. ( Berger *et al* 2012)

## **E. PERAN TNF- $\alpha$ DAN IL-1 $\beta$ DALAM PERSALINAN PREMATUR**

Bukti terlibatnya IL-1 dan TNF- $\alpha$  dalam mekanisme persalinan prematur sangat meyakinkan, walaupun aturan pasti dari mediator pro inflamasi masih sebatas teori.

Bukti yang mendukung IL-1 dan TNF- $\alpha$  dalam persalinan preterm yaitu : (Gil Mor *et al.*2006)

1. IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  menstimulasi produksi prostaglandin pada amnion, decidua dan miometrium.

2. Human decidua dapat memproduksi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dalam rangka respon terhadap produk dari bakteri.
3. Cairan amnion IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  bioaktivitas dan konsentrasinya meningkat pada wanita dengan persalinan preterm dan infeksi intraamnion.
4. Pada wanita dengan KPD prematur dan infeksi intraamnion, kadar IL-1 $\beta$  tinggi saat persalinan.
5. IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dapat menginduksi persalinan prematur bila diberikan secara sistematis pada hewan percobaan yang hamil.
6. Kadar IL-1 $\beta$  pada fetal plasma secara dramatis meningkat pada persalinan preterm dengan infeksi intrauterin.
7. Jaringan plasenta yang di ambil dari wanita yang setelah melahirkan, terutama dengan korioamnionitis, memproduksi IL-1 $\beta$  dalam jumlah besar daripada jaringan plasenta dari wanita yang tidak dalam persalinan.

Inisiasi dari respon pro inflamasi sitokin yang berhubungan dengan infeksi bakteri pada jaringan plasenta dapat menyebabkan persalinan prematur. Sitokin yang berhubungan dengan persalinan prematur termasuk IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . Aktifasi sel imun termasuk didalamnya sirkulasi neutrophil, fagosit makrofag, sel T, sel NK, astrosit CNS dan mikroglia memproduksi mediator biologi seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan *growth factors* yang terlibat didalam interaksi kompleks intermolekular yang berpartisipasi dalam proses immunoinflamasi yang berhubungan dengan kerusakan otak. (McAdams et al 2011)

Setidaknya 25% dari semua kelahiran *preterm* terjadi pada wanita hamil dengan infeksi mikroba dari rongga ketuban yang dalam keadaan normal biasa membentuk lingkungan yang steril bagi perkembangan janin dan pertumbuhan. Namun demikian, lebih

dari 60% dari kelahiran *preterm* tetap tidak dapat dijelaskan dan tanpa tanda-tanda infeksi ketuban.

Bahkan ketiadaan dari sitokin pro-inflamasi infeksi, seperti IL-1 dan TNF diperkirakan memainkan peran penting dalam persalinan *preterm* serta persalinan tepat waktu dengan mengubah status rahim dari diam ke keadaan aktif. Sitokin merangsang aktivitas rahim melalui produksi uterine activation proteins (UAPs) yang prostaglandin, pada PGF<sub>2a</sub> tertentu dan reseptornya, MMPs, VEGF, dan reseptor oksitosin mungkin mempunyai utama TNF, misalnya, meningkatkan produksi PG in vitro dengan merangsang ekspresi endometrial and trophoblastic cyclooxygenase-2 (COX-2) dan dengan mengurangi PG 15-hydroxy dehydrogenase yang mengubah PG menjadi metabolit inaktif. peningkatan PG tergantung-Sitokin menimbulkan kontraksi rahim dan mengaktifkan MMPs seperti MMP-2 dan MMP-9 yang mendegradasi matriks ekstraselular dari membran chorio-amniotic. Protein lain penting yang dirangsang oleh TNF kemungkinan adalah kortisol karena meningkatkannya produksi kortisol plasenta releasing hormone (CRH) terlibat dalam persalinan *preterm*. peningkatan kortisol tergantung-TNF dicapai dengan penghambatan placental 11p-hydroxysteroid dehydrogenase yang mengubah kortisol menjadi derivat kortison yang tidak aktif. Pada kondisi in vivo, percobaan dengan monyet rhesus menunjukkan bahwa infusi intra-amniotik TNF memicu berbagai tingkat variabel aktivitas uterus berbeda di antara individu hewan yang merangsang baik persalinan *preterm* atau pola kontraksi uterus dengan intensitas sedang, sementara substitusi IL-1 mengakibatkan persalinan *preterm* dalam semua kasus. Oleh karena itu, mirip dengan komplikasi kehamilan lainnya kombinasi dan tingkat kadar sitokin menyimpang sangat penting untuk keparahan dari penyakit.

Beberapa penelitian sudah menunjukkan adanya hubungan sebab akibat antara infeksi intrauterin, munculnya sitokin inflamasi oleh jaringan intrauterin dengan kejadian persalinan

prematur. Sitokin inflamasi muncul pada saat proses inflamasi intrauterin seperti IL-1 dan TNF- $\alpha$  juga berakibat timbulnya PWMD pada bayi yg lahir prematur. Dimana setelah di ikuti beberapa tahun selanjutnya, bayi-bayi tersebut dapat terkena *Cerebral Palsy* (CP).

#### **F. PERAN TNF- $\alpha$ DAN IL-1 $\beta$ DALAM PROSES TERJADINYA *PERIVENTRIKULAR WHITEMATTER DAMAGE* (PWMD)**

Sitokin pro inflamasi telah di ketahui secara signifikan meningkat pada cairan amnion dan otak janin neonatus dengan infeksi, termasuk respon inflamasi lokal yang menyebabkan kerusakan otak janin. Peningkatan sitokin telah diteliti di cairan amnion dan darah neonatus yang menderita *Cerebral Palsy*(CP). *Fetal Inflammatory Response Syndrome* (FIRS) juga mempunyai kaitan erat dengan peningkatan IL-6, IL-8 dan TNF- $\alpha$  berimplikasi pada kerusakan jaringan putih otak dan predomnan pada perkembangan *Periventrikular Leukomalacia* (PVL) yang kemudian berkembang menjadi gangguan motor dan gangguan kognitif. PVL di konfirmasi telah ditemukan adanya IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dengan konsentrasi yang tinggi dari fase awal sampai akhir dari kerusakan otak PVL. Pada penelitian lain dari studi autopsi dari PVL ditemukan kadar yang tinggi dari TNF- $\alpha$  dan hipertropi astrosit dari daerah yang rusak pada jaringan putih di otak(*white matter damage*).

Infeksi mikroba ke dalam cairan amnion dapat menimbulkan persalinan prematur, dan berakibat menjadi infeksi janin. Mikroorganisme menghasilkan produk yang dapat memicu sel mononuclear menghasilkan IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dapat meningkatkan permeabilitas dari sawar darah otak ( *blood brain barrier*) sehingga produk mikroorganisme dan sitokin inflamasi tersebut dapat masuk ke otak. Produk mikroorganisme dapat merangsang mikroglia memproduksi IL-1 dan TNF- $\alpha$ , hal ini juga akan mengaktifkan proliferasi astrosit dan produksi TNF . Sitokin ini dapat memicu terjadinya kerusakan

oligodendrosit, sedangkan sel oligodendrosit menghasilkan myelin yang berguna untuk perkembangan otak.

Data ini mempunyai kecocokan dengan teori bahwa IL-1 $\beta$  menginduksi secara *in vitro* aktivasi mikroglial. Aktivasi mikroglial juga memproduksi TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  menginduksi terjadinya apoptosis dari oligodendrosit. (Hailer, Vogt *et al.* 2005). Sitokin inflamasi lainnya seperti IL-12, IL-15 dan IL-18 juga ditemukan pada anak-anak yang menderita *Cerebral Palsy* (CP). IL-18 diaktifkan oleh caspase-1 dan menyebabkan produksi lanjutan dari IL-1, TNF- $\alpha$  dan interferon- $\gamma$ . Dengan hasil IL-18 menginduksi apoptosis dan berhubungan dengan perkembangan PVL dan CP pada neonatus. IL-18 ditemukan dengan konsentrasi tinggi pada binatang percobaan, mengindikasikan hal ini menjadi hal penting dalam kerusakan otak. (Hedtjarn *et al.* 2005).

Lebih jauh lagi aktivasi *Toll-Like Receptors* (TLRs) ternyata juga ditemukan pada proses infeksi/inflamasi intrauterin yang menginduksi respon inflamasi dan kerusakan jaringan otak (Yuan *et al.* 2010). TLRs, protein membran yang digunakan oleh sel imun sistem, memainkan peran penting dalam respon imun di nervus central sistem, aktifasinya pada proses imun diantaranya TLR1, TLR2, TLR3, dan terutama reseptor TLR6 (Abrahams *et al.* 2008). Aktifasi reseptor TLRs menginduksi produksi *Nuclear Factor-kappa  $\beta$*  (NF- $\kappa\beta$ ), yang menginisiasi induksi ekspresi *Nitric Oxide* (NO) di otak (Chen *et al.* 2005). NF- $\kappa\beta$  juga di aktifasi oleh sitokin proinflamasi setelah terexpose LPS dan menginduksi ekspresi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8.

Hubungan yang selalu terjadi antara inflamasi perinatal dan gangguan otak, termasuk gangguan perhatian, hal ini bisa dikarenakan intervensi *immuno modulatory* yang mungkin dapat menurunkan resiko terkena gangguan perhatian pada *extremely preterm infants*. Perawatan antenatal pada ibu hamil dengan menggunakan glucocorticoids dapat menurunkan

resiko terkena *Cerebral Palsy* (CP) (Roberts and Dalziel, 2006). Pada 2 penelitian dengan randomized klinis trial dengan menggunakan steroid, gangguan perhatian tidak terbukti, dan juga tidak ada penurunan resiko terkena gangguan perhatian dengan intervensi steroid ini. (Dalziel *et al.*, 2005; Crowther *et al.*, 2007). Walaupun sumber infeksi tidak berdekatan dengan otak, infeksi neonatus dan maternal berhubungan dengan kerusakan otak perinatal (Dammann *et al.*, 2008). Penyebaran endotoksin dari berbagai macam percobaan hewan imatur terdapat kerusakan pada cerebral, dan kerusakannya di mediasi oleh proses inflamasi yang berhubungan dengan molekul yg didalamnya termasuk sitokin, kemokin, molekul adhesi dan *matrix metalloproteinase* (MMP) (Wang *et al.*, 2006). Beberapa gangguan klinis pada manusia selalu berhubungan dengan infeksi dan inflamasi pada saat perinatal, termasuk pemeriksaan ultrasonografi untuk mencari kerusakan di *white matter*, *microcephaly*, *cerebral palsy*, gangguan kognitif, gangguan perilaku, dan penyakit psikiatri (Hagberg *et al.*, 2012). Biomarker infeksi dan inflamasi pada perinatal termasuk infiltrasi neutrophil ke placenta (Holzman *et al.*, 2007) dan inflamasi yg berhubungan dengan protein pada cairan amnion dan darah neonatus. Insiasi klinik dari inflamasi termasuk infeksi maternal (McElrath *et al.*, 2011), kerusakan paru paru yang di picu dari gangguan mekanisme ventilasi (Bose *et al.*, 2013), necrotizing enterocolitis (Martin *et al.*, 2013), dan sepsis neonatus (Leviton *et al.*, 2012).

#### **G. MAGNESIUM SULFAT ( MgSO<sub>4</sub> )**

Magnesium sulfat (MgSO<sub>4</sub>) sudah sejak lama kita kenal penggunaannya pada kasus preeklampsia dan eklampsia. Pada saat ini MgSO<sub>4</sub> merupakan standar pelayanan medis terhadap pencegahan dan pengobatan terhadap preeklampsia dan eklampsia ,pada kasus prematur berfungsi sebagai tokolitik walaupun masih merupakan kontroversial.(Dribben *et al.* 2009)

Magnesium sulfat ( $MgSO_4$ ) merupakan obat yang sudah dikenal. Magnesium sulfat ini merupakan senyawa kompleks berupa  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Pemberian secara parenteral diekresikan melalui ginjal. Kejadian intoksikasi jarang terjadi selama glomerular filtration rate dijaga dengan baik. Hasil produksi urin yang baik berhubungan dengan fungsi glomerular filtration rate yang masih baik. Karena itu serum creatinin harus diketahui untuk mendeteksi adanya penurunan glomerular filtration rate. (Driben *et al.* 2009)

Magnesium merupakan kation kedua setelah kalium yang ada di tubuh manusia. Magnesium memiliki peran penting dalam berbagai proses metabolisme ditingkat seluler, seperti produksi energi, neurotransmisi sinaps dan sinyal intraseluler. Dasar penggunaannya sebagai tokolitik adalah karena fungsi magnesium dalam mengurangi kontraksi myometrium melalui mekanisme ekstra dan intraseluler. Magnesium perannya di otak dan dalam hubungannya dengan saluran reseptor glutamat NMDA dimana magnesium berperan secara fisiologis menghentikan pergerakan ion yang akan melalui saluran tersebut selama proses polarisasi membran. Magnesium dikenal sebagai modulator dari excitabilitas sel neuron dan ketika diberikan sebagai obat dari luar akan menghambat aktifitas sel neuron. (Costantine *et al.* 2009 dan Mittendorf *et al.* 2005)

### **1. Efek $MgSO_4$ terhadap $IL-1\beta$ dan $TNF-\alpha$ dalam persalinan prematur**

Telah banyak diteliti ada beberapa obat yang dapat menghambat aktifitas sel neuron, termasuk didalamnya antagonis NMDA, yang berfungsi menghambat proses apoptosis neurodegenerasi pada otak yang sedang berkembang dan dapat menyebabkan gangguan saraf dan perilaku. Adanya periode yang rawan untuk terjadi gangguan pada otak, seperti halnya periode pertumbuhan otak (brain growth spurt), dimana pada tikus terjadi pada hari ke nol sampai hari ke empat belas setelah lahir yang hampir sama halnya dengan

trimester ketiga pada manusia. Penelitian-penelitian yang sedang dilakukan hampir semua terfokus terhadap keberhasilan terapi neuroproteksi antenatal pada bayi-bayi prematur yang berisiko terjadinya kerusakan otak karena proses hipoksia-iskemia, ensefalopati, perdarahan interventrikularis dan cerebral. (Costantine *et al.*2009 dan Mittendorf *et al.*2005).

Beberapa penelitian menggunakan binatang untuk menggambarkan bagaimana magnesium sulfat dapat melindungi otak janin dari Cerebral Palsy. Sebagai contoh ada peneliti yang membuat model hewan dengan excitotoxic membran sel, dimana magnesium menghambat laju kalsium dengan cara menghambat reseptor NMDA. Ketika sel neuron itu rusak, maka sel tersebut tidak dapat mempertahankan homeostasis glutamate sehingga ion kalsium dapat masuk ke sel sehingga terjadilah kematian sel neuron. Proses ini dihambat oleh magnesium. Beberapa teori lainnya menyebutkan bahwa magnesium menyebabkan vasodilatasi dan secara spesifik menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah otak sehingga meningkatkan vaskularisasi ke otak. (Kabadere *et al.*2004)

Peneliti Burd tahun 2010 menyebutkan juga bahwa magnesium mengurangi jumlah radikal bebas oksigen dan ada juga yang berpendapat magnesium mengurangi jumlah sitokin inflamasi, karena dari beberapa penelitian membuktikan bahwa tikus yang kekurangan magnesium akan memiliki banyak sitokin inflamasi dan kerusakan otak. (Burd *et al.*2010)

Meskipun banyak peneliti yang mencari tentang kebenaran tentang proses penyebab dan terapi pada kerusakan otak, sampai sekarang sebetulnya kita belum mengetahui mekanisme yang sebenarnya tentang mengapa magnesium sulfat dapat melindungi sel neuron dari proses hipoksia-iskhemia.

Mekanisme pasti  $MgSO_4$  berfungsi sebagai neuroproteksi masih belum diketahui. Sebenarnya, terdapat 2 teori yang menggambarkan bagaimana magnesium menghambat kerusakan saraf, kerusakan hipoksia-iskemia dan kerusakan inflamasi. Cerebral palsy

merupakan hasil dari kerusakan jaringan putih pada periventrikular otak (*periventricular white matter damage*) dan dominan terjadi pada prematur infant, terutama sebelum usia kehamilan 32 mgg.(Degos *et al.*2008 dan Burd *et al.*2009)

Kerusakan pada periventrikular digambarkan sebagai hilangnya oligodendrosit (sel otak yang mengalami myelinisasi atau saraf yang terhambat) dan astrosit yang membesar(sel terlibat dalam scarring). (Burd *et al.*2009). Kerusakan hipoksia iskemia merupakan akibat atau hasil dari rendahnya oksigen dan rendahnya suplai glukosa, dan proses ini menyebabkan terlepasnya glutamat dalam jumlah besar. (Degos *et al.*2008). Glutamat akan menstimulasi reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA), sehingga terjadi masuknya sodium dan kalsium dalam jumlah besar ke dalam saraf. (Degos *et al.*2008). Kalsium intraseluler menginduksi beberapa enzim yang menyebabkan kematian sel saraf, dan proses reperfusion menyebabkan kerusakan oksidatif menjadi radikal bebas. MgSO<sub>4</sub> adalah antagonis reseptor NMDA. (Degos *et al.*2008) dan NMDA antagonis telah terbukti merupakan neuroprotektif kuat pada beberapa binatang percobaan.

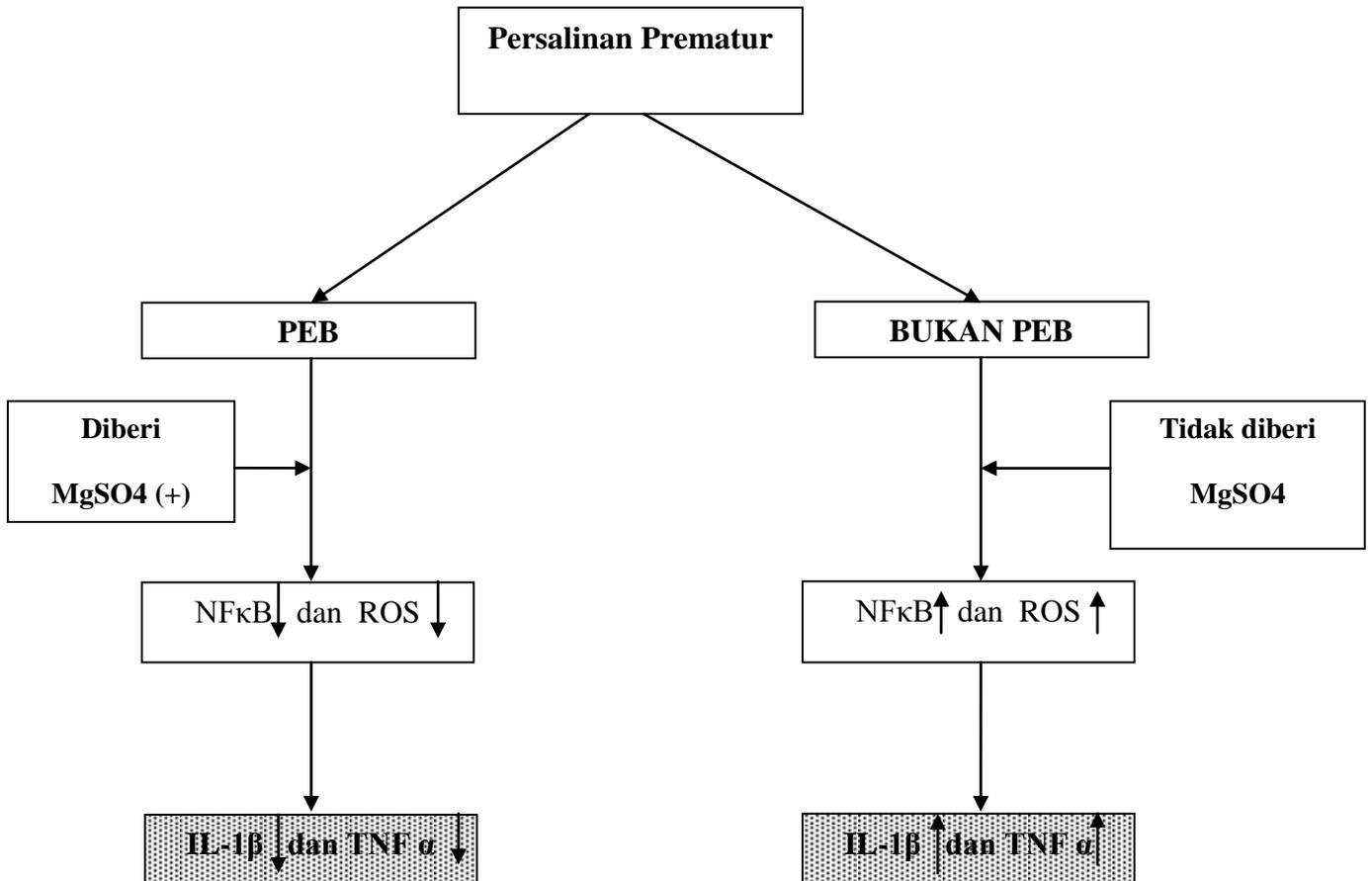
Bagaimanapun reseptor NMDA merupakan hal yang vital dalam beberapa aspek perkembangan otak, telah menjadi isu bahwa MgSO<sub>4</sub> berpotensi untuk perkembangan otak janin bila diberikan pada spesifik fase dalam perkembangan saraf.( Degos *et al.*2008). Sangat penting untuk diingat bahwa terdapat hubungan yang kuat antara persalinan prematur spontan dan inflamasi intrauterin (Burd *et al.* 2009). Fakta persalinan prematur,inflamasi dan produksi sitokin mempengaruhi sel saraf telah ditunjukkan pada hewan percobaan.

Pernah dilakukan penelitian mengenai mekanisme penyebab terjadi kerusakan saraf dan ditemukan bahwa kerusakan saraf janin mencit dapat terjadi kerusakan pada saraf normal lainnya.(Burd *et al.*2009). Mereka juga menemukan bahwa otak janin mencit yang terekspos lipopolisakarida, antigen bakteri dapat menyebabkan inflamasi intrauterin, menunjukkan

morfologi saraf yang abnormal dengan penurunan proses dendritik, sehingga mengganggu komunikasi antar saraf synaptik. (Burd *et al.*2009). Dari salah satu penelitian yang pernah dilakukan dengan hewan percobaan menunjukkan otak janin yang terdapat proses inflamasi kemudian diberi MgSO<sub>4</sub> tidak menunjukkan kerusakan saraf yang berhubungan dengan proses dendritik.

Dalam penelitian yang lain disebutkan bahwa kadar magnesium intraselular meningkat saat diberikan terapi MgSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> ini akan melewati plasenta sehingga kadar nya di maternal dan fetal menjadi equivalen. Efek anti inflamasi nya bersifat reversibel, magnesium akan menurunkan produksi sitokin dan ini tidak berhubungan dengan perubahan tekanan osmotik. MgSO<sub>4</sub> juga menurunkan sitokin dan ekspresi gen I $\kappa$ B $\alpha$ . Sebagai tambahan juga mengurangi level fosforilasi NF- $\kappa$ B p56 dan lokasi NF- $\kappa$ B nuclear mengikuti stimulasi TLR4. Dan menurunkan produksi sitokin akan membatalkan fungsi NF- $\kappa$ B *inhibitors* , hal ini membuktikan MgSO<sub>4</sub> mempengaruhi produksi sitokin didalam perilaku NF- $\kappa$ B *dependent* . MgSO<sub>4</sub> mengurangi presentasi produksi monosit TNF $\alpha$  dan IL-6 mengikuti TLR2/6 *agonist exposure* ..Suplemen Magnesium meningkatkan level I $\kappa$ B $\alpha$ , sehingga menurunkan aktivasi NF- $\kappa$ B dan produksi sitokin. (Sugimoto *et al.*,2012)

## H. KERANGKA KONSEP



Keterangan :

 Yang diperiksa

## **Penjelasan Kerangka Konsep**

Persalinan prematur dengan segala penyebabnya akan menghasilkan Lipopolisakarida yang akan mengaktifkan NF $\kappa$ B dan ROS sehingga produksi TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  meningkat baik didalam darah maternal maupun fetal, di otak janin produksi sitokin ini akan ditangkap oleh NMDA reseptor sehingga terjadi peningkatan kadar kalsium sehingga akan terjadi proses apoptosis maupun kerusakan jaringan periventrikular *whitematter* otak janin. Sehingga akan menimbulkan gejala gangguan kognitif atau paralisis anggota gerak pada bayi. Pemberian MgSO<sub>4</sub> berfungsi sebagai antagonis NMDA sehingga produk sitokin tidak ditangkap oleh NMDA dan ion kalsium tidak akan berlebih di intraseluler dan tidak terjadi apoptosis maupun kerusakan di periventrikular.

## **I. HIPOTESIS**

Dari kerangka konsep di atas di susun suatu hipotesis bahwa:

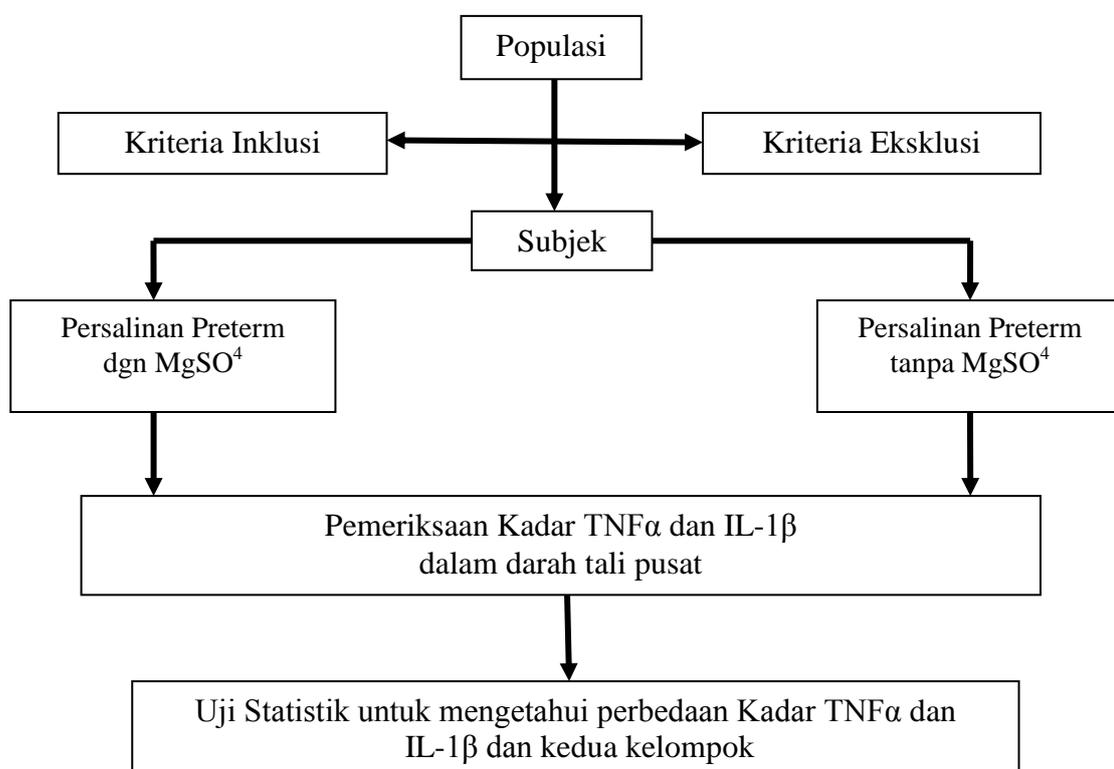
Kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  lebih rendah pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibunya dibandingkan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub>.

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. JENIS DAN RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian analitik menggunakan pendekatan Cross Sectional dengan pendekatan uji klinis kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada wanita hamil prematur dengan menggunakan MgSO $_4$  dan tanpa menggunakan MgSO $_4$  dengan metode ELISA



#### B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di bagian Obstetri dan Ginekologi RSUD Dr.Moewardi Surakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Desember 2014 sampai dengan jumlah sampel terpenuhi.

### **C. SUBYEK PENELITIAN**

Pasien dengan persalinan prematur yang mendapat terapi MgSO<sub>4</sub> dan tanpa menggunakan MgSO<sub>4</sub> di kamar bersalin Kebidanan dan Kandungan RSUD Dr.Moewardi Surakarta yang sesuai dengan syarat penerimaan sampel (kriteria inklusi dan eksklusi) yang telah menyatakan setuju untuk ikut dalam penelitian setelah mendapat penjelasan mengenai penelitian ini.

#### **Kriteria Inklusi**

1. Ibu hamil usia 20-35 tahun
2. Usia kehamilan 28-34 mgg.
3. Pasien dalam persalinan dengan pembukaan aktif atau pasien dengan perencanaan persalinan karena alasan medis tanpa disertai penyakit kronis.
4. Pasien dengan kriteria Pre Eklampsia Berat (PEB)
5. Bersedia ikut penelitian.

#### **Kriteria Eksklusi**

1. Ibu hamil dengan penyakit kronis seperti : Diabetes Melitus, kelainan ginjal, kelainan jantung, hipertensi kronik.
2. Tidak bersedia ikut penelitian.
3. Kehamilan kembar.
4. Kematian janin dalam rahim.
5. Janin dengan kelainan kongenital mayor atau minor.
6. Janin dengan pertumbuhan janin terganggu.

#### D. BESAR SAMPEL

Insiden persalinan prematur di Indonesia sekitar 5%. (Robert et al. 2008). Proporsi disini sebesar 5% atau  $P=0,05$  sehingga  $Q = 1 - P$  atau 0,956.

Penentuan besar sampel didasarkan pada rumus :

$$\frac{Z\alpha^2PQ}{d^2}$$

Maka besarnya sampel (n) adalah :  $\frac{(1,96)^2 \times 0,05 \times 0,956}{(0,1)^2}$

$$(0,1)^2$$

$$: \underline{0,18362848}$$

$$0,01$$

$$: 18,36 \approx 20$$

n = besar sampel

P = persentase kejadian Prematur

$\alpha$  = tingkat kemaknaan yaitu  $\alpha = 0,05 \rightarrow Z \alpha = 1,96$

d = tingkat presisi (tingkat kesalahan penduga) yaitu 0,1

## **E. VARIABEL PENELITIAN**

- a. Variabel bebas : Terapi Magnesium Sulfat ( $\text{MgSO}_4$ )
- b. Variabel terikat : Kadar  $\text{TNF } \alpha$  dan  $\text{IL-1}\beta$

## **F. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL**

- a. Magnesium Sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) adalah. Magnesium sulfat ini merupakan senyawa kompleks berupa  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . merupakan kation kedua setelah kalium yang ada di tubuh manusia. Magnesium memiliki peran penting dalam berbagai proses metabolisme ditingkat seluler, seperti produksi energi, neurotransmisi sinaps dan sinyal intraseluler.
- b. Tumor Nekrosis Faktor Alpha ( $\text{TNF } \alpha$ ) adalah merupakan sitokin inflamasi pleiotropic yang diproduksi di monosit dan atau makrofag. Satuan dari  $\text{TNF } \alpha$  adalah  $\text{pg/mL}$ . Kadar normal  $\text{TNF } \alpha$  pada wanita  $27.8838 \pm 35.8213 \text{ pg/ml}$ .
- c. Interleukin 1 ( $\text{IL-1}$ ) adalah polipeptida sitokina  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  dan  $\text{IL-1Ra}$ , yang memainkan peran penting dalam regulasi sistem kekebalan dan respon peradangan.  $\text{IL-1}\alpha$  dan  $\text{IL-1}\beta$  masing-masing memiliki berkas genetik  $\text{IL1A}$ , dan  $\text{IL1B}$ , pada kromosom 2 deret yang sama yaitu 2q14, dan merupakan sitokina pleiotropik hasil sekresi monosit dan makrofag berupa prohormon, sebagai respon saat sel mengalami cedera, oleh karena itu menginduksi apoptosis.
- d. Metode ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) adalah suatu teknik biokimia yang terutama di gunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel.

## **G. INSTRUMEN DAN PENGAMBILAN SAMPEL**

### a. Alat :

- Sduit disposibel
- Tabung kaca
- Kapas alkohol
- Alat tulis kantor dan seperangkat komputer
- Tabung rekasi dan spuit 5 ml

### b. Bahan:

- Reagen IL-1 $\beta$  assay Diluent RDI-82
- Reagen TNF- $\alpha$  Assay Diluent RD1F
- Alkohol Absolut 90 %
- Kapas

## **H. PROSES PENELITIAN**

a.Penderita yang memenuhi syarat penerimaan sampel diberikan penjelasan mengenai tindakan yang akan dilakukan dan penderita menandatangani persetujuan jika telah tersedia.

b.Dilakukan pengambilan darah pada vena umbilikalisis sebanyak 10 ml selanjutnya masing-masing 5 ml untuk pemeriksaan serum IL-1 $\beta$  dan TNF  $\alpha$ . Tabung sampel darah diberikan label, nama dan register, kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 15 menit selanjutnya serum disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20 C dan selanjutnya dikirim ke Jakarta menggunakan Ice pack dan dikerjakan di Laboraturium

PRODIA Jakarta. Pemeriksaan kadar IL-1 $\beta$  dan TNF  $\alpha$  serum dilakukan dengan cara kuantitatif menggunakan metode ELISA.

### **Pemeriksaan ELISA pada TNF- $\alpha$**

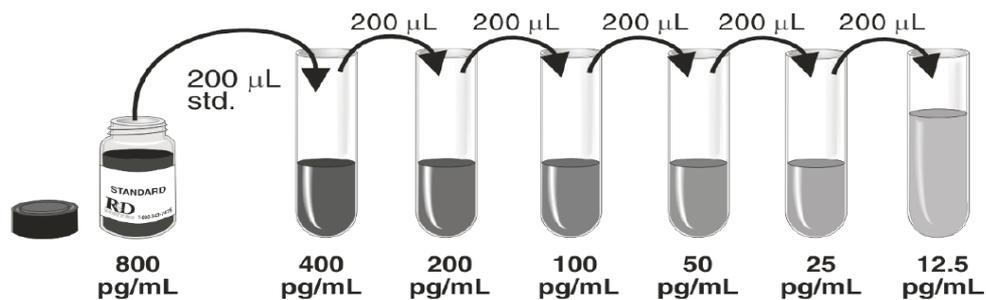
Bawa semua reagen dan sampel kedalam suhu kamar. Hal ini merekomendasikan bahwa semua sampel, standard dan control akan diuji dalam rangkap dua.

1. Siapkan reagen, standard kerja, control dan sampel seperti yang diinstruksikan.
2. Tambahkan 50 $\mu$ L pengencer assay RD1F untuk masing-masing cekungan
3. Tambahkan 50  $\mu$ L standar pada control dan sampel untuk setiap cekungan. Campur dengan lembut menekan piring cekungan selama 1 menit. Tutup dengan strip perekat yang disediakan kemudian diinkubasikan selama 2 jam dalam suhu kamar.
4. Aspirasi masing-masing cairan pada cekungan dengan baik dan masukkanlah kedalam botol manifold kemudia cuci dengan buffer cuci ( 400  $\mu$ L). ulangi proses ini sebanyak 4 kali sehingga total lima kali pencucian. Bersihkan sisa buffer cuci dengan cara membalikkan piring pemeriksaan dan keringkan dengan kertas penyerap yang bersih.
5. Tambahkan 100  $\mu$ L TNF- $\alpha$  conjugated pada tiap cekungan. Tutup pdengan strip perekat yang baru. Di inkubasi dengan suhu kamar selama 2 jam.
6. Ulangi aspirasi/ cuci seperti pada langkah 5.
7. Tambahkan 100  $\mu$ L solusi substrat untuk setiap cekungan, inkubasi lagi selama 30 menit pada suhu kamar, lindungi dari cahaya.
8. Tambahkan 100  $\mu$ L stop solution untuk setiap tabung, dengan lembut tekan piring untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
9. Periksa kepadatan optic masing-masing dengan baik dalam waktu 30 menit, dengan menggunakan lempeng pembaca dengan set dasar 450 nm. Jika koreksi panjang gelombang tersedia, set ke 450 nm atau 570 nm. Jika koreksi panjang gelombang tidak

tersedia, mengurangi pembacaan pada 540 nm- 570 nm dari pembacaan pada 450 nm.

Pengurangan akan mengoreksi ketidaksempurnaan optic di piring.

10. Pembacaan dilakukan secara langsung pada 450 nm tanpa koreksi akan mendapatkan hasil yang lebih tinggi dan kurang akurat.

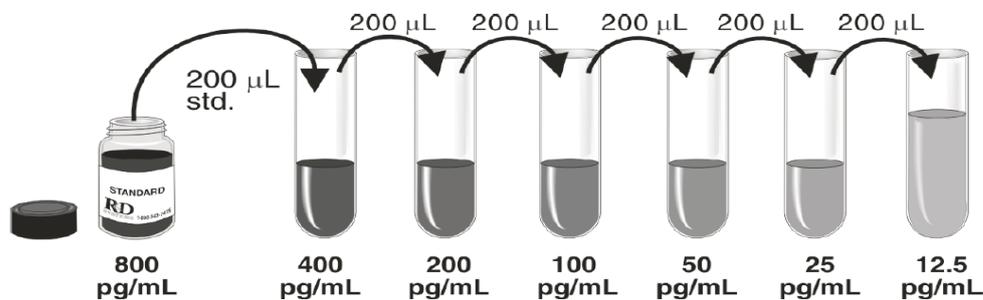


### Pemeriksaan ELISA pada IL-1 $\beta$

Bawa semua reagen dan sampel kedalam suhu kamar. Hal ini merekomendasikan bahwa semua sampel, standard dan control akan diuji dalam rangkap dua.

1. Siapkan reagen, standard kerja, control dan sampel seperti yang diinstruksikan.
2. Tambahkan 50 $\mu$ L pengencer assay RDI-82 untuk masing-masing cekungan
3. Tambahkan 50  $\mu$ L standar pada control dan sampel untuk setiap cekungan. Campur dengan lembut menekan piring cekungan selama 1 menit. Tutup dengan strip perekat yang disediakan kemudian diinkubasikan selama 2 jam dalam suhu kamar.
4. Aspirasi masing-masing cairan pada cekungan dengan baik dan masukkanlah kedalam botol manifold kemudian cuci dengan buffer cuci ( 400  $\mu$ L). ulangi proses ini sebanyak 4 kali sehingga total lima kali pencucian. Bersihkan sisa buffer cuci dengan cara membalikkan piring pemeriksaan dan keringkan dengan kertas penyerap yang bersih.
5. Tambahkan 100  $\mu$ L TNF- $\alpha$  conjugated pada tiap cekungan. Tutup dengan strip perekat yang baru. Di inkubasi dengan suhu kamar selama 2 jam.

6. Ulangi aspirasi/ cuci seperti pada langkah 5.
7. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  solusi substrat untuk setiap cekungan, inkubasi lagi selama 30 menit pada suhu kamar, lindungi dari cahaya.
8. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  stop solution untuk setiap tabung, dengan lembut tekan piring untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
9. Periksa kepadatan optic masing-masing dengan baik dalam waktu 30 menit, dengan menggunakan lempeng pembaca dengan set dasar 450 nm. Jika koreksi panjang gelombang tersedia, set ke 450 nm atau 570 nm. Jika koreksi panjang gelombang tidak tersedia, mengurangi pembacaan pada 540 nm- 570 nm dari pembacaan pada 450 nm. Pengurangan akan mengoreksi ketidaksempurnaan optic di piring.
10. Pembacaan dilakukan secara langsung pada 450 nm tanpa koreksi akan mendapatkan hasil yang lebih tinggi dan kurang akurat.



## I. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dari kadar serum  $\text{TNF}\alpha$  dan  $\text{IL-1}\beta$  pada kehamilan prematur yang mendapat  $\text{MgSO}_4$  dan yang tidak mendapat  $\text{MgSO}_4$  dikumpulkan dan dibandingkan kemaknaanya secara statistik menggunakan uji t dengan menggunakan SPSS versi 17.00 *for windows*.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Karakteristik Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah 40 ibu hamil preterm, janin tunggal dengan status gizi baik yang melahirkan di RSUD Dr. Moewardi Surakarta yang terbagi dalam 2 kelompok yaitu 20 orang ibu hamil preterm PEB yang diberikan MgSO<sub>4</sub> dan 20 orang ibu hamil preterm yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub> yang semuanya memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Tabel 1. Sebaran dan Keragaman Data Subjek Penelitian

Variabel	N	Min	Max	Rerata	SD
Umur ibu (tahun)	40	17.00	34.00	24.82	4.20
Umur kehamilan (mgg)	40	30.00	36.00	33.52	1.50
Haemoglobin (gr/dl)	40	8.20	13.20	10.61	1.09
Albumin (gr/dL)	40	10,000.00	16,000.00	12,682.50	1,361.16
Trombosit (10 <sup>3</sup> /μl)	40	150,000.00	330,000.00	194,150.00	30,951.20
Gula darah sewaktu (mg/dL)	40	72.00	128.00	103.40	13.17
SGOT (U/I)	40	12.00	45.00	28.27	8.09
SGPT (U/I)	40	10.00	45.00	26.60	7.59
TNf-alpha (ng/mL)	40	1.02	4.48	2.52	0.76
IL1-beta (ng/mL)	40	0.16	1.30	0.60	0.27

Dari data di atas didapatkan bahwa rerata variabel umur ibu hamil adalah  $24.82 \pm 4.20$  tahun dengan umur kehamilan rerata  $33.52 \pm 1.50$  minggu, kadar Hemoglobin rerata  $10.61 \pm 1.09$  gr/dl, kadar albumin rerata  $12,682.50 \pm 1,361.16$  (10<sup>3</sup>/ μl), gula darah sewaktu  $103.40 \pm 13.17$  (mg/dL), rerata SGOT  $28.27 \pm 8.09$  U/I, SGPT dengan rerata  $26.60 \pm 7.59$  U/I, rerata TNF-alpha  $2.52 \pm 0.76$  ng/mL dan rerata IL-1 beta  $0.60 \pm 0.27$  ng/mL. Lampiran 1.

Tabel 2 Uji Beda Rerata Subjek Penelitian Menurut Kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO<sub>4</sub> dan Kelompok yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub>

Variabel	Diberikan MgSO <sub>4</sub>		Tidak diberikan MgSO <sub>4</sub>		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Umur ibu (tahun)	26.55	4.46	23.10	3.17	0.00*
Umur kehamilan (mgg)	34.00	1.07	33.05	1.73	0.04*
Haemoglobin (gr/dl)	10.71	1.03	10.51	1.16	0.56
Albumin (gr/dL)	12,040.00	1,160.94	13,325.00	1,259.43	0.00*
Trombosit (10 <sup>3</sup> /μl)	180,650.00	19,326.21	207,650.00	34,773.36	0.00*
Gula darah sewaktu (mg/dL)	98.70	13.01	108.10	11.85	0.02*
SGOT (U/I)	26.55	10.04	30.00	5.23	0.18
SGPT (U/I)	30.25	7.27	22.95	6.12	0.00*

\*Nilai signifikan :  $p < 0.05$

Dari hasil uji beda rerata kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO<sub>4</sub> dengan kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub> didapatkan bahwa umur ibu, umur kehamilan, kadar albumin, Angka Trombosit, gula darah sewaktu dan SGPT secara statistik berbeda significant ( $p < 0.05$ ), sedangkan kadar Hemoglobin dan SGOT tidak ada perbedaan yang bermakna/normal (homogen) ( $p > 0.05$ ).

## B. Uji Normalitas TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$

Analisis variabel TNF-alpha dengan menggunakan uji normalitas (Kolmogorov-Smirnov) pada kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO<sub>4</sub> dan kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub> terdistribusi secara normal dengan nilai  $p = 0.71$  ( $p > 0.05$ ).

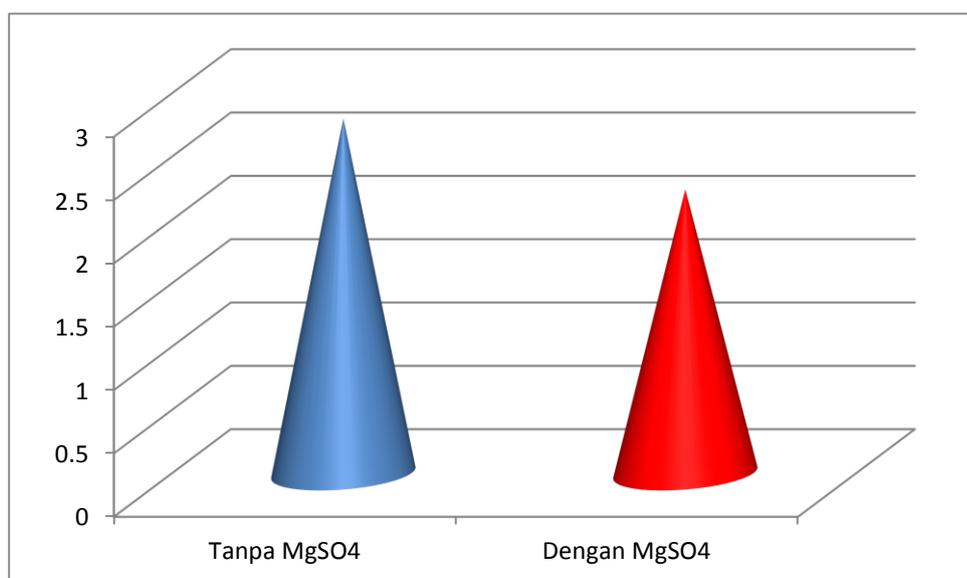
Tabel 3 Distribusi Rerata TNF-alpha Kelompok Hamil Yang Diberikan MgSO4 dan Kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4

Kelompok	Besar Sampel (N)	Distribusi Rerata TNF-alpha (ng/mL)	p
tidak diberikan MgSO4	20	$2.80 \pm 0.85$	0.01*
Yang diberikan MgSO4	20	$2.24 \pm 0.56$	

\*signifikan  $p < 0,05$

Dari tabel 3 diperoleh hasil distribusi rerata TNF-alpha tampak lebih rendah pada kelompok hamil perterm yang diberikan MgSO4 ( $2.24 \pm 0.56$  ng/mL), dibandingkan dengan hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 ( $2.80 \pm 0.85$  ng/mL). Hasil interpretasi grafik menunjukkan bahwa adanya penurunan kadar TNF-alpha pada kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 yang mempunyai puncak lebih rendah dibandingkan dengan kadar TNF-alpha pada kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4. (Gambar 3.)

Tabulasi hasil perhitungan distribusi rerata TNF-alpha, menunjukkan penurunan distribusi rerata TNF-alpha dari kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 dengan kelompok hamil yang diberikan MgSO4.



Gambar 3 Distribusi Rerata TNF-alpha

Analisis uji t dengan menggunakan  $\alpha=0.05$  membuktikan bahwa kadar TNF-alpha antara kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 dan kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p=0.01$  ( $<0.05$ ).

### Lampiran 3

Analisis variabel IL-1 beta dengan menggunakan uji normalitas (Kolmogorov-Smirnov) pada kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 dan kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 terdistribusi secara normal dengan nilai  $p=0.95$  ( $p>0.05$ )

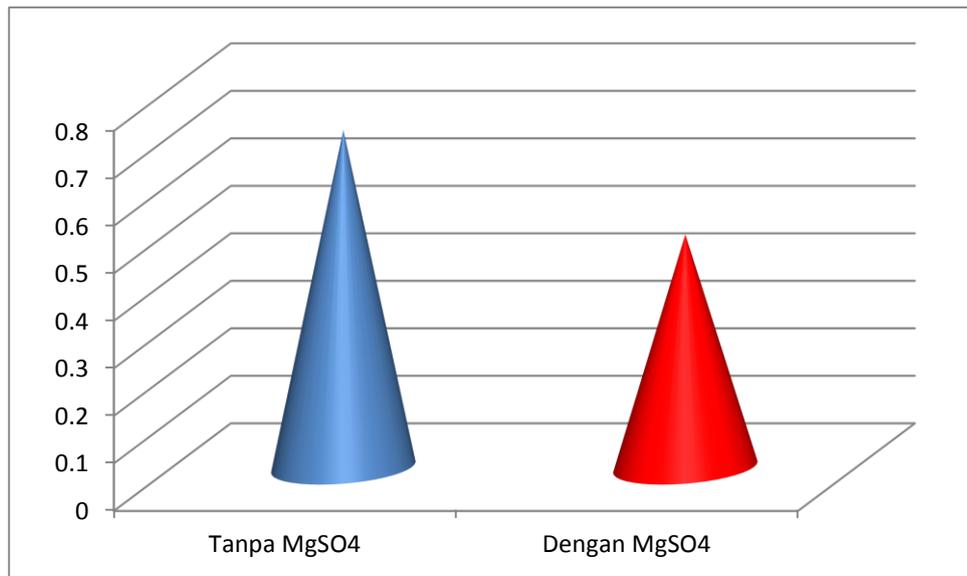
Tabel 4 Distribusi Rerata IL-1 beta Kelompok Hamil Yang Diberikan MgSO4 dan Kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4

Kelompok	Besar Sampel (N)	Distribusi Rerata IL-1 beta (ng/mL)	p
Tidak diberikan MgSO4	20	$0.71 \pm 0.28$	0.01*
Yang diberikan MgSO4	20	$0.49 \pm 0.22$	

\*signifikan  $p<0,05$

Dari tabel 4 diperoleh hasil distribusi rerata IL-1beta tampak lebih rendah pada kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 ( $0.49 \pm 0.22$  ng/mL), dibandingkan dengan hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 ( $0.71 \pm 0.28$  ng/mL). Hasil interpretasi grafik menunjukkan bahwa adanya penurunan kadar IL-1beta pada kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 yang mempunyai puncak lebih rendah dibandingkan dengan kadar IL-1beta pada kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4. (Gambar 4.)

Tabulasi hasil perhitungan distribusi rerata IL-1beta, menunjukkan penurunan distribusi rerata IL-1beta dari kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 dengan kelompok hamil yang diberikan MgSO4.



Gambar 4 Distribusi Rerata IL-1beta

Analisis uji t dengan menggunakan  $\alpha=0.05$  membuktikan bahwa kadar IL-1beta antara kelompok hamil preterm yang tidak diberikan MgSO4 dan kelompok hamil preterm yang diberikan MgSO4 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p=0.01$  ( $<0.05$ ). Lampiran 4.

### C. Pembahasan

Tingginya angka bayi lahir prematur baik di dunia maupun di Indonesia khususnya, tentu menjadi perhatian khusus bagi kita. Selain tingginya angka kematian neonatus akibat prematuritas, komplikasi permanen seperti *Cerebral Palsy* (CP) adalah hal yang menakutkan bahkan bagi ahli obstetri maupun ahli perinatologi. Prematuritas telah dibuktikan mengakibatkan jejas neuronal baik melalui jalur hipoksik-iskemik maupun inflamasi-infeksi. Tindakan terapi terhadap jejas neuronal tidak akan banyak membantu. Pencegahan yang tepat adalah hal yang dibutuhkan. Konsep obstetri pencegahan adalah konsep obstetri yang baru dengan harapan kualitas luaran maternal dan neonatal yang optimal tidak hanya sekedar menghindari kematian saja.

Sitokin yang berhubungan dengan persalinan prematur termasuk IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . Aktifasi sel imun termasuk didalamnya sirkulasi neutrophil, fagosit makrofag, sel T, sel NK, astrosit CNS dan mikroglia memproduksi mediator biologi seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan *growth factors* yang terlibat didalam interaksi kompleks intermolekular yang berpartisipasi dalam proses immunoinflamasi yang berhubungan dengan kerusakan otak. (Adams et al 2011)

Hasil dari analisis data yang kami lakukan didapatkan kadar serum TNF- $\alpha$  lebih rendah pada kelompok persalinan prematur yang diberikan MgSO<sub>4</sub> ( $2.24 \pm 0.56$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan persalinan prematur yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub> ( $2.80 \pm 0.85$  ng/mL,  $p < 0.05$ ). Kadar serum IL-1 $\beta$  lebih rendah pada kelompok persalinan prematur yang diberikan MgSO<sub>4</sub> ( $0.49 \pm 0.22$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan persalinan prematur yang tidak diberikan MgSO<sub>4</sub> ( $0.71 \pm 0.28$  ng/mL,  $p < 0.05$ ). Hasil kami sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana didapatkan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  lebih rendah pada kelompok persalinan prematur yang mendapat MgSO<sub>4</sub>. Namun pada penelitian terdahulu penelitian tersebut dilakukan pada binatang percobaan tikus. Kelemahan pada penelitian kami adalah populasi dari subyek kami tidak homogen dikarenakan di negara Indonesia protap penggunaan MgSO<sub>4</sub> hanya digunakan untuk pasien PEB dan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada subyek yang tidak PEB akan melanggar etik penelitian karena subyek kami manusia, berbeda halnya bila penelitian eksperimental dengan perlakuan pada hewan percobaan, sehingga populasinya dapat dibuat homogen.

Pada penelitian yang lain, terapi magnesium sulfat diberikan pada ibu yang sangat rentan terhadap persalinan *very preterm*, magnesium sulfat mengurangi angka kejadian Cerebral Palsy sekitar 30% (*relative risk* [RR] 0.68, 95% *confidence interval* [CI] 0.54-0.87) dan *moderate to severe cerebral palsy* (40-45%) tanpa meningkatkan resiko kematian janin dari 6,145 bayi (RR 10.4, 95% CI 0.92-1.17). (Min-Jeong Oh, et al 2013)

Dalam penelitian yang lain disebutkan bahwa MgSO<sub>4</sub> dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$  pada sirkulasi darah ibu dan janinnya (pada janin  $0.89 \pm 0.09$  pg/mL/g kotiledon;  $p < 0.05$  dan pada sirkulasi ibu  $4.74 \pm 2.78$  pg/mL/g kotiledon;  $p < 0.05$ ) namun pada penelitian ini subyek yang diteliti adalah plasenta dari pasien preeklampsia (Alaa Amash, et al 2009)

Meskipun banyak peneliti yang mencari tentang kebenaran tentang proses penyebab dan terapi pada kerusakan otak, sampai sekarang sebetulnya kita belum mengetahui mekanisme yang sebenarnya tentang mengapa magnesium sulfat dapat melindungi sel neuron dari proses hipoksia-iskhemia. Namun dari data penelitian ini jelas menunjukkan bahwa dengan diberikannya MgSO<sub>4</sub> dapat menurunkan secara signifikan kadar TNF  $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

Peneliti Burd tahun 2010 menyebutkan juga bahwa magnesium mengurangi jumlah radikal bebas oksigen dan ada juga yang berpendapat magnesium mengurangi jumlah sitokin inflamasi, karena dari beberapa penelitian membuktikan bahwa tikus yang kekurangan magnesium akan memiliki banyak sitokin inflamasi dan kerusakan otak. (Burd *et al.* 2009)

Pernah dilakukan penelitian mengenai mekanisme penyebab terjadi kerusakan saraf dan ditemukan bahwa kerusakan saraf janin mencit dapat terjadi kerusakan pada saraf normal lainnya. Mereka juga menemukan bahwa otak janin mencit yang terekspos lipopolisakarida, antigen bakteri dapat menyebabkan inflamasi intrauterin, menunjukkan morfologi saraf yang abnormal dengan penurunan proses dendritik, sehingga mengganggu komunikasi antar saraf synaptik. . Dari salah satu penelitian yang pernah dilakukan dengan hewan percobaan menunjukkan otak janin yang terdapat proses inflamasi kemudian diberi MgSO<sub>4</sub> tidak menunjukkan kerusakan saraf yang berhubungan dengan proses dendritik. (Burd *et al.* 2009).

Dalam penelitian yang lain ditemukan hasil yang berbeda, dimana tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dari kadar IL-1 $\beta$  dan TNF  $\alpha$  sebelum dan sesudah pemberian

MgSO<sub>4</sub>. Interleukin-1 $\beta$  (1.5 pg/mL [1.5-58] vs 1.5 pg/mL [1.5-10]; P =.5); atau Tumor Nekrosis Factor- $\alpha$  (16 pg/mL [7.6-20.3] vs 16.6 pg/mL [8.3-22.2]; P =.5). Sampel diambil dari vena umbilikalis namun dari ibu dengan hamil aterm yang tidak mempunyai indikasi apa pun untuk diberikan MgSO<sub>4</sub> maupun Pre eklampsia, juga tidak didapatkan gejala Khorioamnionitis. (Blackwell et al 2004).

#### **D. Keterbatasan Penelitian**

1. Penelitian ini tidak mengendalikan faktor perancu lain seperti kadar lipid, ureum, kreatinin dan mediator biokimiawi lainnya yang diduga dapat mempengaruhi kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .
2. Penelitian ini juga tidak bisa mengendalikan faktor Pre Eklampsia Berat pada subjek.
3. Penelitian ini mempunyai subyek dari populasi yang tidak homogen disebabkan karena keterbatasan pada penggunaan terapi MgSO<sub>4</sub> saat ini di negara kita hanya digunakan untuk pasien Pre Eklampsia Berat.
4. Selain adanya populasi yang tidak homogen keterbatasan tersebut sekaligus menjadi kelemahan pada penelitian ini.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  lebih rendah pada bayi prematur dengan pemberian MgSO<sub>4</sub> pada ibunya dibandingkan tanpa pemberian MgSO<sub>4</sub>.

#### B. Saran

1. Dapat dilakukannya pemberian MgSO<sub>4</sub> pada kasus prematuritas dimana akan terjadi persalinan sebagai neuroprotektor otak janin sehingga menurunkan resiko terkena penyakit *Cerebral Palsy* (CP) pada bayi.
2. Dapat dilakukannya penelitian lanjutan yang tidak hanya bersifat observasional namun juga eksperimental pada hewan percobaan sehingga bisa didapatkan populasi yg homogen dan hasil yang lebih signifikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abrahams, V. M., P. B. Aldo. 2008. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. *J Immunol* 180(9): 6035-6043.
- Alaa Amash, Adi Y Weintraub, Eyal Sheiner, Atef Zeadna, Mahmoud Huleihel, Gershon Holcberg. 2010. Possible therapeutic effect of magnesium sulfate in pre-eclampsia by the down-regulation of placental tumor necrosis factor-alpha secretion. *Research article, Eur. Cytokine Netw.*, Vol. 21 n° 1, March, 58-64
- Bennett P, Thornton S. 2007. Preterm labour - Preface, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, Vol:21, ISSN:1521-6934, Pages:727-728
- Bose, C. L., Laughon, M. M., Allred, E. N., O'Shea, T.M., VanMarter, L.J., Ehrenkranz, R.A. 2013. Systemic inflammation associated with mechanical ventilation among extremely preterm infants. *Cytokine* 61, 315–322. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.014
- Burd I, Chai J, Gonzales J, Ofori E, Monnerie H, Le Roux PD. 2009. Beyond white matter damage : fetal neuronal injury in a mouse model of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*:201:279 e1-8.
- Bradley JR .2008. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal Pathol*;214:149–60. [PubMed: 18161752]
- Berger, Ofra Peleg, Noa Ofek-Shlomai. 2012. Inflammation and early Brain injury in term and Preterm infants. *Reviews IMAJ* • vol.14
- Blackwell SC, Hallak M, Hassan SS, Berry SM, Russell E, Sorokin Y. 2004. The effects of intrapartum magnesium sulfate therapy on fetal serum interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha at delivery: a randomized, placebo-controlled trial. *Clinical Trial, Journal Article, Randomized Controlled Trial American Journal of Obstetrics and Gynecology* [184(7):1320-3; discussion 1323-4]
- Chen, J. C., F. M. Ho. 2005. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *European Journal Pharmacol* 521(1-3): 9-20
- Costantine MM, Weiner SJ. 2009. Effects of antenatal exposure to magnesium sulfate on neuroprotection and mortality in preterm infants: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*;114:354-64
- Cousens S, Blencowe H, Stanton C, Chou D, Ahmed S, Steinhardt L, Creanga AA, Tuncalp O, Balsara ZP, Gupta S, et al. 2011. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet*, 377:1319-1330.
- Crowther et al. 2013. BMC Pregnancy and Childbirth , 13:91 <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/13/91>

- Drife J, Magowan BA. 2004. *Clinical obstetrics and gynaecology: Prematurity*. Saunders, London:375-80
- Degos V, Loron G, Mantz J, Gressens P. 2008. *Neuroprotective strategies for the neonatal brain*. *Anesth Analg*;106:1670-80
- Dammann, O., and O'Shea, T. M. 2008. *Cytokines and perinatal brain damage*. *Clin. Perinatol.* 35,643–663. doi: 10.1016/j.clp.2008.07.011
- Dalziel, S. R., Lim, V. K., Lambert, A., McCarthy, D., Parag, V., Rodgers, A. 2005. Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *Br. Med. Journal.* 331, 665–668A. doi:10.1136/bmj.38576.494363.E0
- Doyle, L. W., Crowther, C. A., Middleton, P., and Marret, S. 2009. *Antenatal magnesium sulfate and neurologic outcome in preterm infants*. *Obstet. Gynecol.* 113, 1327–1333.
- Das, C., V.S.Kumar, S.Gupta and S.Kumar. 2002. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J.Reprod.Immunol.*,53: 257-268.
- Driben WH, Creeley CE, Wang HH, Smith DJ, Farber NB, Olney JW. 2009. *High dose magnesium sulfate exposure induces apoptotic cell death in the developing neonatal mouse brain.*;96:23-32.
- Gary Cunningham., Kenneth J. L., Stephen L. B., 2010. *Fetal Growth Disorder*. Williams Obstetric. 23<sup>rd</sup> edition. New York : Mc graw Hill.
- Gotsch, F., Romero, R., Kusanovic, J. P., Mazaki-Tovi, S., Pineles, B. L., Erez, O. 2007. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin. Obstet.Gynecol.* 50, 652–683.
- Goscik E, Kulak W, Goscik J, J.G, Okurowska-Zawada B, Tarasow E, 2011. *The cerebellum in children with spastic cerebral palsy: Volumetrics MRI study*. *Prog Health Sci*;1:67-75
- Gil Mor et al. 2006. *Immunology of Pregnancy*. Eureka.com and Springer Science+Business Media.
- Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L. 2006. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* ;71:41–56.
- Gulti R. 2005. Raised serum TNF-alpha, blood sugar and uric acid in preeclampsia in third trimester of pregnancy. *J Nep Med Assoc*; 44: 36-38.
- Hagberg, H., Gressens, P., and Mallard, C. 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol.* 71, 444–457.
- Holzman, C., Lin, X. M., Senagore, P., and Chung, H. 2007. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery. *Am.J.Epidemiol.* 166, 786–794.
- Hailer, N. P., C. Vogt. 2005. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *European Journal Neurosci* 21(9): 2347-2360.

- Hedtjarn, M., C. Mallard. 2005. White matter injury in the immature brain: role of interleukin-18. *Neurosci Lett* 373(1): 16-20.
- Haider S ,Leisser C, Saleh L,Husslein H, 2006. Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol Hum Reprod*;12:601–9.
- Haider S, Knofler M. 2009. *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium*. *Placenta*.30(2);111-23.
- Jacobo L. Santolaya, Lindsay Kugler, Lissa Francois, 2013, Base Line TNF  $\alpha$  Operational Capacity in Fetal and Maternal Circulation Prior to the Onset of Labor, *Sagepub.com/journals* .
- Kabadere S,Oztopcu P,Korkmaz S,Erol K,Uyar R. 2004. MgSO<sub>4</sub> and lazardoid partially protects glioma cells against glutamate toxicity in vitro. *Acta Neurobiol Exp*;64:461-6.
- Kenyon, S., Pike, K., Jones, D. R., Brocklehurst, P., Marlow, N., Salt, A. 2008. Childhood outcomes after prescription of antibiotics to pregnant women with spontaneous preterm labour: 7-year follow-up of the ORACLE II trial. *Lancet* 372, 1319–1327.
- Kocyigit Y, Atamer Y, Atamer A, Tuzcu A, Akkus Z. 2004. *Changes in serum levels of leptin, cytokines and lipoprotein in preeclamptic and normotensive pregnant women*. *Gynecol Endocrinol*;19: 267-273.
- Lawn JE, Blencowe H, Pattinson R, Cousens S, Kumar R, Ibiebele I, Gardosi J, Day LT, Stanton C. 2011: Stillbirths: Where? When? Why? How to make the data count? *Lancet*, 377:1448-1463.
- Leviton, A., O’Shea, T. M., Bednarek, F. J., Allred, E. N., Fichorova, R. N., and Damman, O. 2012. Systemic responses of preterm new borns with presumed or documented bacteraemia. *Acta Paediatr.* 101, 355–359
- McAdams and Sandra E. Juul. 2011. The Role of Cytokines and Inflammatory Cells in Perinatal Brain Injury. *Review Article*.
- McElrath, T. F., Fichorova, R. N., Allred, E. N., Hecht, J. L., Ismail, M., and Leviton, A. 2011. Blood protein profiles of infants differ by the pregnancy complication in infants born before the 28th week of gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, 418.e1–418.e12
- Martin, C.R., Bellomy, M., Allred, E.N., Fichorova, R. N., and Leviton, A. 2013. Systemic inflammation associated with severe intestinal injury in extremely low gestational age newborns. *Fetal Pediatr. Pathol.* 32, 222–234.
- Mihu D, Sabau L, Costin N, Ciortea R, Oancea M, Malutan A. 2010. *Evaluation of Leukocytes and Neutrophils Markers of Inflammatory Syndrom in Preeclampsia*. *Applied Medical Informatics*;27:15-22.
- Mittendorf R, Pryde PG. 2005. A review of the role for magnesium sulphate in preterm labour. *Bjog*, 112; suppl 1:84-8
- Mirahmadian M, Kalantar F, Heidari G, Safdarian L, Mansouri R, Amirzagar AA. 2008. Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukine-10 gene polymorphisms in Iranian patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*;60:179-185.

- Min-Jeong Oh, M.D., Ph.D. *et al* 2013. Effects of Antenatal Exposure to Magnesium Sulfate on Neuroprotection in Preterm Infants. *Korean J Perinatol* Vol.24, No.3.
- Maedler K, G. Dharmadhikari, D.M. Schumann and J. Storing. 2009. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9:1177-1188.
- Nour NM. 2012. Premature delivery and the millennium development goal. *Rev Obstet Gynecol*; 5: 100-5
- Peebles, AP Kenyon. 2014. *Scientific Impact Paper No. 29* © Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.
- Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, 2009. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*; 202:431 e1-34.
- Romero, R., Espinoza, J., Goncalves, L. F., Kusanovic, J. P., Friel, L., and Hassan, S. 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin. Reprod. Med.* 25, 21–39.
- Soliman, M.M, Y.A. El-Fattah El-senosi, O.M.A. El-Hamid, A. El-Desouki Abd El-Mageed, R.S. Ismaeil and H.A. El-Maqsoud Ali. 2009. Nigella sativa modulates cytokine expression in mature bovine adipocytes. *Asian J. Biochem.* 4:60-67.
- Sara Gracie, Craig Pennell, Gunvor Ekman-Ordeberg, 2009, An integrated systems biology approach to the study of preterm birth using “omic” technology - a guideline for research. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 1471-2393/11/71
- Sugimoto, Andrea M.R, Alice M. Valentin. 2012. Magnesium Decrease Inflammatory Cytokine Production: A Novel Innate Immunomodulatory Mechanism, *J. Immunol*; 188(12) : doi:10.4049.
- Tyler CP, Paneth N, Allererd EN, Hirtz D, Kuban K, McElrath T. 2012. Brain damage in preterm newborns and maternal medication: the ELGAN Study. *Am J Obstet Gynecol* 207:192 e1-9
- Tavakol Afshari J, Ghomian N, Shameli A, Shakeri MT, Fahmidehkar MA, Mahajer E. 2005. Determination of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC Pregnancy and Childbirth*; 5:14.
- Vahid Roudsari F, Ayati S, Torabizadeh A, Ayatollahi H, Esmali H, Shahabian M. 2008, Serum calcium and magnesium in preeclamptic and normal pregnancies; A comparative study. *Journal of Reproduction & Infertility*; 9: 256 – 262.
- Wang, X. Y., Rousset, C. I., Hagberg, H., and Mallard, C. 2006. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 11, 343–353
- Yuan, T. M., Y. Sun, 2010. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling. *J Neuroimmunol* 229(1-2):16-25.