

Peningkatan *L-type Calcium Channel*, Kalsium Intraseluler, Protease Activating Receptor-1 dan Heat Shock Protein-27 pada Uterus Kelinci *New Zealand* yang Dilakukan Penjahitan Modifikasi Surabaya (Kajian Biomolekuler pada penanganan Perdarahan Pascapersalinan karena Atonia Uteri)

(The Increased Expression of L-Type Calcium Channel, Protease Activating Receptor-1 and Heat Shock Protein-27 and Density of Intracellular Calcium on Animal Model of New Zealand Rabbit Myometrium that Using Conservative Surgical Procedure of Surabaya Suture Compression Modification
(Biomolecular Study in Conservative Surgical Management of Pph Due to Uterine Atony))

Agus Sulistyono*, Agus Abadi*, Endang Joewarini*, F.M. Judajana*

ABSTRACT

Uterine atony as the common cause of PPH, which causing high maternal mortality especially in under developed and developing countries, can indeed be largely rescued by compression with conservative surgical procedure by performing Surabaya suture compression modification (SSCM). The purpose of this study was to analyze the increasing expression of L-type calcium channel, PAR-1 and HSP-27 and density of intracellular calcium on animal model of aterm pregnant New Zealand rabbit uterus. True experimental single blinded study was done in Airlangga University Veterinary Faculty and Brawijaya University Physiology Department from March–August 2011. Twenty two samples were obtained over this study which applied on aterm pregnant rabbit uterus as animal model. Animal model consisted of rabbit uterus in which practiced on by SSCM in 11 samples after terminating pregnancy and removing pup and placenta as well, and the remainder of another 11 samples without SSCM as the control. The assessment of L-type calcium channel, PAR-1 and HSP-27 expression and density of intracellular calcium on myometrium sample was done respectively by immunohistochemistry and fluoro-2 double staining method at ½, 1, 2, and 24 hours intervals. For all times intervals the increasing expression of L-type calcium channel was observed significantly in SSCM compared to control ($p = 0.001$; $p < 0.0001$; $p = 0.011$ and $p < 0.0001$), also for intracellular calcium density ($p = 0.022$; $p = 0.001$; $p = 0.005$ and $p = 0.002$). The study showed PAR-1 and HSP-27 expression increasing sharply that statistically analysis indicated both all of p similarly < 0.0001 against control. SSCM suggested strongly increasing some component (all variable) that absolutely required to myometrial contraction.

Key words: PPH, Surabaya suture compression modification, L-type calcium channel, PAR-1, HSP-27 and intracellular calcium

PENDAHULUAN

Perdarahan Pascapersalinan (PPP) sampai saat ini masih merupakan penyebab utama kematian maternal terutama di negara berkembang. Diseluruh dunia diperkirakan terdapat kematian maternal sebanyak 529.000 setiap tahunnya. Dari seluruh kematian tersebut 99% terjadi di negara-negara

berkembang (Geller and Adams, 2007), dan lebih dari 25% disebabkan perdarahan pascapersalinan.

Empat penyebab utama PPP yaitu atonia uteri, laserasi jalan lahir, kelainan penempelan plasenta, dan kelainan darah. Atonia uteri merupakan penyebab terbanyak, yaitu 70% sebagai penyebab PPP. Penanganan PPP yang

* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

paling penting adalah menentukan etiologinya kemudian memberikan terapi yang sesuai. Kegagalan dalam menentukan kausa dan terapi yang sesuai menyebabkan perdarahan tidak berhenti dan menimbulkan penyulit yang serius (**Chervenak**, 2001).

Mekanisme penghentian perdarahan pada PPP berbeda dengan tempat lain yang peran faktor vasospasme dan pembekuan darah sangat penting, pada PPP penghentian perdarahan pada bekas implantasi plasenta terutama karena kontraksi dan retraksi miometrium sehingga menyempitkan dan membuntu lumen pembuluh darah. Bila kontraksi dan retraksi kurang baik maka akan dapat mengakibatkan PPP walaupun faktor pembekuan darahnya normal atau sebaliknya walaupun sistem pembekuan darahnya abnormal tetapi bila kontraksi dan retraksi miometrium baik dapat menghentikan perdarahan (**Cunningham et al.**, 2010).

Kontraksi miometrium, seperti halnya otot yang lain, sangat dipengaruhi oleh kalsium intraseluler [Ca^{2+}]_i yang terutama berasal dari influks ekstraseluler melalui L-type calcium channel. Selanjutnya (Ca^{2+})_i akan berikatan dengan *Calmodulin* untuk mengaktifkan *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) dan memfosforilasi MLC sehingga dapat berikatan dengan aktin yang juga telah diaktifkan menjadi aktin-F oleh HSP-27 untuk menimbulkan kontraksi miometrium (**MacIntyre et al.**, 2007; **Coughlin et al.**, 1997; **O'Brien et al.**, 2008; **O'Sullivan et al.**, 2004).

Adanya luka (jejas) dan perdarahan di bekas implantasi plasenta pada uterus postpartum berkonsekuensi terjadinya aktivasi trombin secara spesifik dan temporer pada tempat tersebut. Trombin berikatan dengan reseptornya, yaitu *protease activating receptor-1* (PAR-1) yang merupakan salah satu dari kelompok reseptor yang dapat berikatan dengan protein G di membran sel miometrium. Ikatan trombin dengan PAR-1 menyebabkan stimulasi PLC melalui protein G sehingga memecah PIP₂ menjadi IP₃ dan DAG. DAG melalui MAPK dapat memfosforilasi HSP-27 yang selanjutnya mengaktifasi aktin-G menjadi aktin-F yang siap berikatan dengan MLC (**Dery et al.**, 1998; **Shintani et al.**, 2000; **Macfarlane et al.**, 2001; **Smith**, 2007).

Pada tahun 1997, **B-Lynch et al.**, memperkenalkan cara baru yang merupakan alternatif dalam penanganan PPP dan secara mekanis berfungsi seperti kontraksi uterus, yaitu dengan pengikatan vertikal melingkari uterus sedemikian rupa sehingga uterus terkompresi dan perdarahan berhenti. Dari 5 kasus PPP semuanya dapat dihentikan perdarahannya dengan tanpa dilakukan histerektomi. Metode ini mudah diaplikasikan, sederhana, cepat, efektif untuk mengatasi perdarahan pada PPP. Keuntungannya adalah dapat mempertahankan fungsi fertilitas dan menghindari tindakan

operatif yang lebih sulit termasuk histerektomi. Setelah itu teknik ini sangat populer dilaksanakan dan banyak teknik modifikasi yang dikerjakan (**B-Lynch**, 2006).

Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dikembangkan teknik modifikasi B-Lynch dengan teknik penjahitan yang lebih sederhana, lebih cepat dan lebih mudah. Selanjutnya teknik penjahitan kompresi uterus modifikasi ini disebut "PENJAHITAN MODIFIKASI SURABAYA". Metode ini bersama teknik B-Lynch dikerjakan untuk penanganan PPP yang gagal dengan medikamentosa ataupun tindakan mekanis. Pada bulan Juli 2007 sampai dengan Agustus 2008 telah dilakukan penelitian dengan hasil 8 dari 8 kasus PPP berhasil dihentikan perdarahannya dengan penjahitan modifikasi Surabaya, sedang 2 dari 4 kasus PPP yang dikerjakan dengan cara B-Lynch gagal, sehingga diperlukan tindakan histerektomi. Keuntungan penjahitan modifikasi Surabaya adalah lebih mudah, lebih sederhana dan lebih cepat daripada metode aslinya (**Sulistiyono et al.**, 2010).

Data Departemen/SMF Obstetri dan Ginekologi RSUD Dr. Soetomo, tahun 2009–2011 terdapat 112 kasus PPP dan 75 kasus merupakan PPP dini. Penjahitan modifikasi Surabaya dikerjakan pada 8 kasus, 6 kasus berhasil dihentikan perdarahannya dan 2 gagal. Apabila digabungkan dengan data tahun sebelumnya, angka keberhasilan penjahitan modifikasi ini cukup tinggi, yaitu dapat menghentikan 14 dari 16 kasus (87,5%) PPP karena atonia uteri. Berdasar data tersebut dan dari kepustakaan yang menyatakan *stretch* menimbulkan kontraksi, timbul pemikiran untuk meneliti bahwa penjahitan kompresi dapat menghentikan PPP bukan hanya karena mekanis saja, tetapi kemungkinan ada rangkaian proses biomolekuler yang ditimbulkannya sehingga menyebabkan uterus tetap berkontraksi dan perdarahan tidak berlanjut lagi. Penelitian dikerjakan dengan model kelinci karena terkendala etika bila dikerjakan pada manusia. Tujuan penelitian untuk menjelaskan patofisiologi biomolekuler yang mendasari mekanisme penghentian perdarahan pada PPP karena atonia uteri setelah dilakukan penjahitan kompresi uterus yang pada penelitian ini menggunakan penjahitan modifikasi Surabaya dengan cara mengkonfirmasi peningkatan *L-type Calcium Channel*, kalsium intraseluler, PAR-1 dan HSP-27 pada uterus kelinci setelah dilakukan penjahitan modifikasi Surabaya.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*True Experimental*) dengan *single blinded*, dengan interval waktu ½ jam, 1 jam, 2 jam dan 24 jam. Sebagai sampel perlakuan adalah 16 ekor kelinci bunting

aterm yang dilakukan operasi pengeluaran janinnya, dijahit pada bekas irisan uterusnya kemudian dilakukan jahitan kompresi uterus modifikasi Surabaya (pada uterus sisi ipsilateral), sedang sebagai kontrol setelah dilakukan penjahitan pada irisan uterus tidak dilakukan jahitan kompresi modifikasi Surabaya (pada sisi kontralateral).

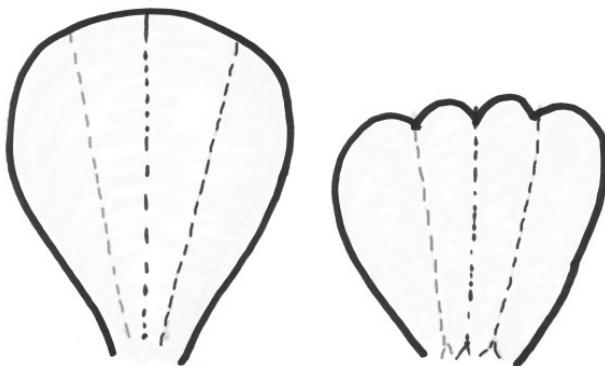
Penelitian dilakukan di laboratorium in vitro dan laboratorium patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk pemeriksaan imunohistokimia *L-type calcium channel*, dan di LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati) Universitas Brawijaya Malang untuk pemeriksaan kalsium intraseluler dan HSP-27, serta di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Brawijaya Malang untuk pemeriksaan PAR-1.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2011–Agustus 2011.

Teknik operasi jahitan modifikasi Surabaya untuk PPP:

- Uterus dieksteriorisasi dari rongga abdomen setelah dilakukan irisan di dinding abdomen bila PPP pascapersalinan pervaginam atau setelah dilakukan penjahitan pada irisan SBR bila PPP terjadi pada pascaseksio sesar.
- Seorang asisten memegang *corpus uteri* sebelah kanan dan kiri, kemudian menarik uterus ke arah *cranial* sehingga dinding SBR menjadi lebih tipis.
- Jahitan pertama dikerjakan pada ± 2 cm dibawah jahitan irisan SBR setelah seksio sesaria atau pada bidang yang sejajar dengannya bila pada PPP pascapersalinan pervaginam.

- Jarum ditusukkan dari *ventral* menembus dinding uterus sampai keluar dari dinding *dorsal*/SBR, benang jahitan dibawa ke atas fundus dan di klem.
- Jahitan kedua dikerjakan seperti pada jahitan pertama tetapi pada sisi kontralateral dengan menggunakan benang yang baru.
- Jahitan ketiga juga dengan benang yang baru dijahitkan di antara kedua jahitan.
- Asisten yang awalnya menarik uterus, sekarang dianjurkan untuk melakukan kompresi uterus ke arah *anterior inferior* (kaudal) sehingga posisi uterus menjadi antefleksi.
- Operator melakukan pengikatan jahitan di daerah fundus ± 3 cm dari tepi lateral sedemikian rupa sambil asisten tetap mempertahankan posisi antefleksi uterus. Demikian juga pada ikatan kontralateral dan bagian yang tengah. Dengan 3 ikatan kompresi ini maka kompresi awal yang dikerjakan oleh asisten dapat digantikan oleh ikatan ke 3 benang ini.
- Untuk menilai efektivitas pengikatan kompresi uterus, sebelum dinding abdomen ditutup dilakukan pemeriksaan perdarahan pervaginam dengan cara ibu diposisikan litotomi dan asisten yang lain memeriksa vagina apakah masih terdapat perdarahan. Bila tidak didapatkan perdarahan yang mengalir, berarti teknik penjahitan berhasil dan dinding abdomen ditutup, bila masih perdarahan banyak berarti teknik penjahitan tidak berhasil, maka perlu dilakukan tindakan operasi yang selanjutnya, ligasi arteri *Hypogastrica* atau histerektomi (Sulistyono *et al.*, 2010).



Gambar 1. Gambaran skematis jahitan uterus metode Surabaya (Sulistyono, 2010).

Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia

Pemeriksaan ekspresi *L-type calcium channel*, PAR-1 dan HSP-27 menggunakan pewarnaan imunohistokimia metode ABC dengan tahapan sebagai berikut:

1. *Clearing* (pencucian) dan rehidrasi preparat secara bertingkat, kemudian dibilas dengan *destilate water* (DW) 3 kali à 5 menit, keringkan cairan sekitar sampel.
2. Rendam sampel didalam larutan 3% hydrogen peroksida dalam DW selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian dibilas dengan DW 3 kali à 5 menit dan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 3 kali à 5 menit.
3. Inkubasi sampel dengan 10% larutan *skim milk* atau 10% *normal goat* selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian dibilas dengan PBS 3 kali à 5 menit.
4. Inkubasi sampel dengan antibodi anti DHP (*dyhidropyridine*) untuk ekspresi *L-type calcium channel*, antibodi PAR-1 untuk ekspresi PAR-1 dan antibodi HSP-27 untuk ekspresi HSP-27, kemudian dibilas dengan PBS 3 kali à 5 menit.
5. Inkubasi sampel dengan AB II selama 30 menit pada suhu ruang, pada waktu yang sama inkubasi 10 mikroliter Avidin dan 10 mikroliter Biotin dalam 1 cc PBS dan kemudian dibilas dengan PBS 3 kali à 5 menit.
6. Inkubasi sampel dengan larutan *Diamino Benzidine* (DAB) sambil diamati di bawah mikroskop.
7. *Counter staining* dengan *Commassie blue*, kemudian dehidrasi sampel dan diperiksa.

Ekspresi *L-type calcium channel* menunjukkan aktivitas *calcium channel*, yaitu terbukanya *L-type calcium channel*. Dengan pewarnaan histokimia ini gambaran peningkatan ekspresi *L-type calcium channel* dan PAR-1 tampak dengan semakin banyaknya warna kecoklatan pada membran sel, sedang ekspresi HSP-27 pada sitoplasma.

Prosedur Pemeriksaan *Fluoro 3 Double Staining*

Proses pemeriksaan *Fluoro 3 double staining* hampir sama dengan metode ABC pewarnaan imunohistokimia. Mula-mula dibuat sediaan *slide*/preparat miometrium dalam blok parafin, kemudian dilakukan deparafinisasi dan selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *Fluoro 3* dan dilakukan *double staining* dengan HSP-90 yang merupakan petanda khusus (*marker*) untuk sitoplasma. Selanjutnya

dilakukan pembacaan dengan mikroskop konfokal *laser scanning* (tipe FV 1000, merk Olympus) dalam waktu kurang dari 2 jam supaya perpendaran warna/cahaya yang dihasilkan tidak hilang. Warna hijau menunjukkan gambaran total kalsium intraseluler akibat pengaruh *Fluoro 3*, sedang warna merah hanya menunjukkan gambaran kalsium di sitoplasma saja, akibat pengaruh HSP-90.

Analisis Data

Data-data yang didapat pada penelitian dicatat pada formulir pengumpul data yang dirancang khusus untuk penelitian ini. Karakteristik subjek penelitian, berat induk kelinci, jumlah kebuntingan dan berat anak kelinci dibuat dalam bentuk deskriptif.

Untuk melihat normalitas hasil, maka dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov 1 sampel pada tiap sampel *L-type Calcium Channel*, Kalsium intraseluler, PAR-1 dan HSP-27, bila semua berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji beda menggunakan uji t berpasangan, bila tidak berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji beda menggunakan *Wilcoxon signed rank test*. Tingkat kemaknaan yang digunakan adalah 95% atau $\alpha = 0,05$. Penelitian dikerjakan menggunakan SPSS.

HASIL DAN DISKUSI

Karakteristik Subjek Penelitian

Tabel 1. Karakteristik masing-masing berat anak kelinci pada unit uterus berdasarkan waktu pengamatan

Waktu pengamatan	Kontrol X ± SD (gram)	Perlakuan X ± SD (gram)	Nilai p
½ jam	31,27 ± 8,67	30,55 ± 7,74	0,403
1 jam	33,18 ± 7,53	30,45 ± 7,76	0,057
2 jam	32,27 ± 5,42	33,82 ± 8,58	0,418
24 jam	37,09 ± 9,58	36,00 ± 9,21	0,560

Dari *tabel 1*, pada pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam dari kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov dan hasil yang didapat semua sampel berdistribusi normal, dengan nilai $p > 0,05$. Setelah semua sampel berdistribusi normal, maka dilakukan uji t berpasangan. Dari uji t berpasangan didapatkan nilai p pada pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam adalah 0,403, 0,057, 0,418 dan 0,560. Semua p bernilai $> 0,05$ yang artinya semua sampel pada masing-masing waktu pengamatan tidak berbeda bermakna (homogen).

Ekspresi L-type calcium channel

Tabel 2. Ekspresi *L-type calcium channel* pada masing-masing waktu pengamatan

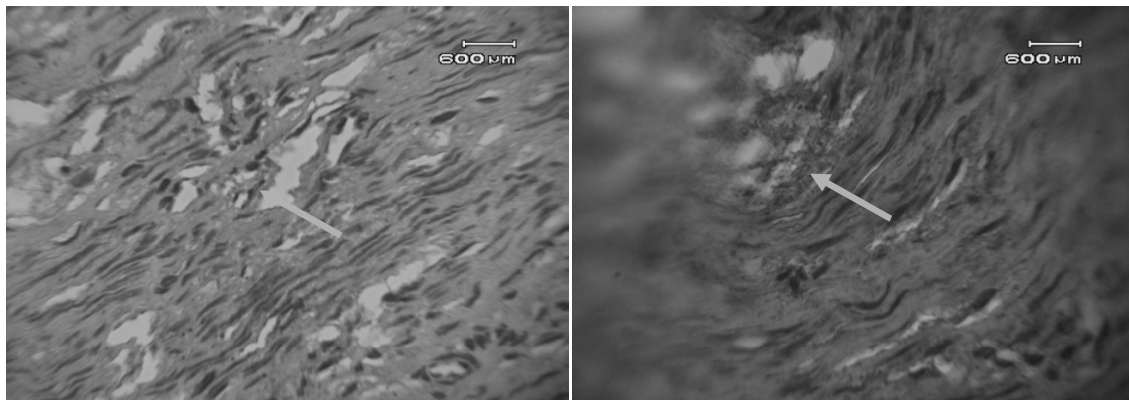
Waktu pengamatan	Kontrol X ± SD (jumlah sel/100 sel plp)	Perlakuan X ± SD (jumlah sel/100 sel plp)	Nilai p
½ jam	2,78 ± 1,39	12,89 ± 5,30	0,001
1 jam	3,93 ± 0,49	14,87 ± 1,05	< 0,0001
2 jam	1,48 ± 0,46	16,62 ± 12,10	0,011
24 jam	2,95 ± 0,18	10,01 ± 3,21	< 0,0001

Sampel *L-type calcium channel* yang didapat dilakukan uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov, hasilnya berdistribusi normal, dengan nilai $p > 0,05$.

Setelah semua sampel berdistribusi normal, dilakukan uji t berpasangan dan didapatkan hasil nilai p pada pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam adalah $0,001 < 0,0001, 0,011 < 0,0001$, menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna, ekspresi *L-type calcium channel* pada perlakuan lebih tinggi daripada kontrol, dengan nilai $p < 0,05$.

Densitas kalsium intraseluler

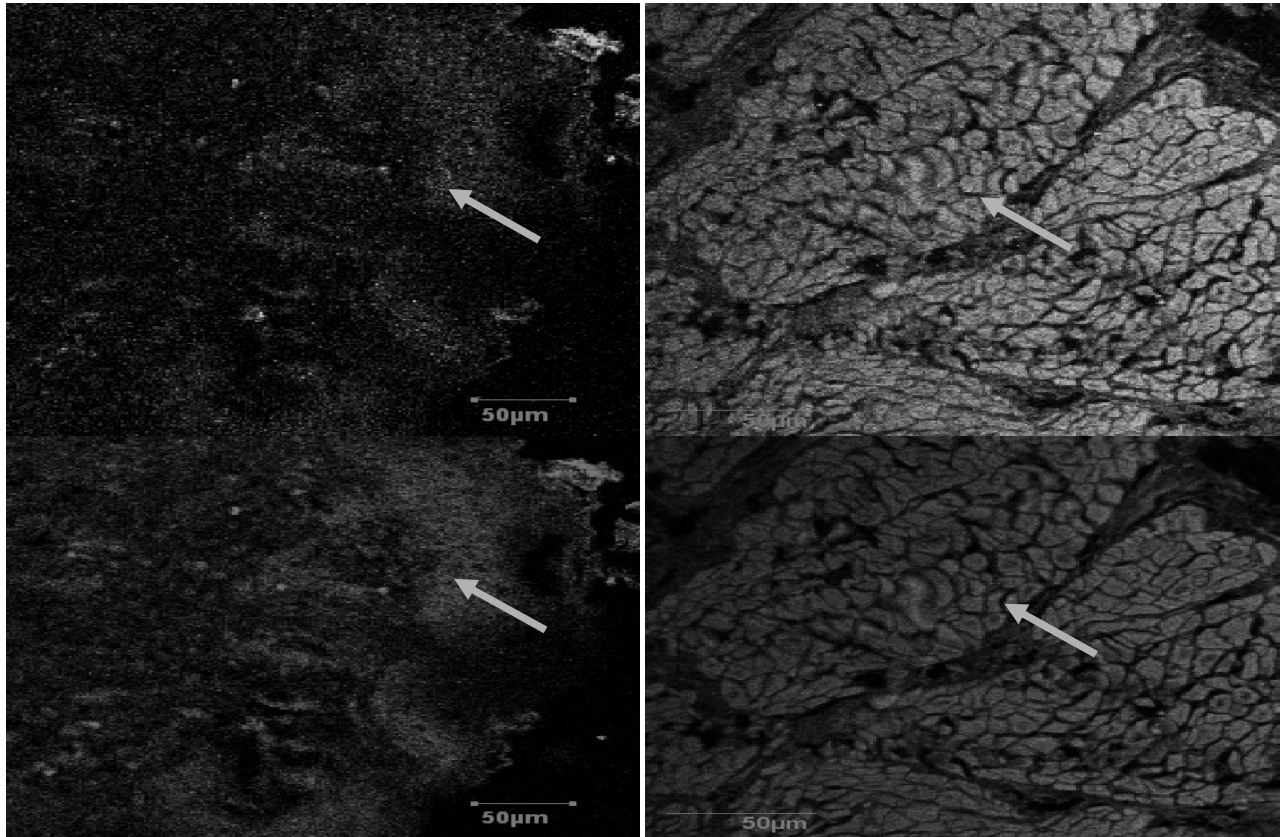
Semua sampel densitas Ca^{2+} intraseluler diuji normalitas berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov dan berdistribusi normal, dengan nilai $p > 0,05$, maka selanjutnya dilakukan uji kemaknaan dengan uji t berpasangan. Pada uji t berpasangan didapatkan nilai p pada pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam adalah $0,022, 0,001, 0,005$ dan $0,002$. Hasil nilai $p < 0,05$ dapat diartikan bahwa densitas Ca^{2+} intraseluler



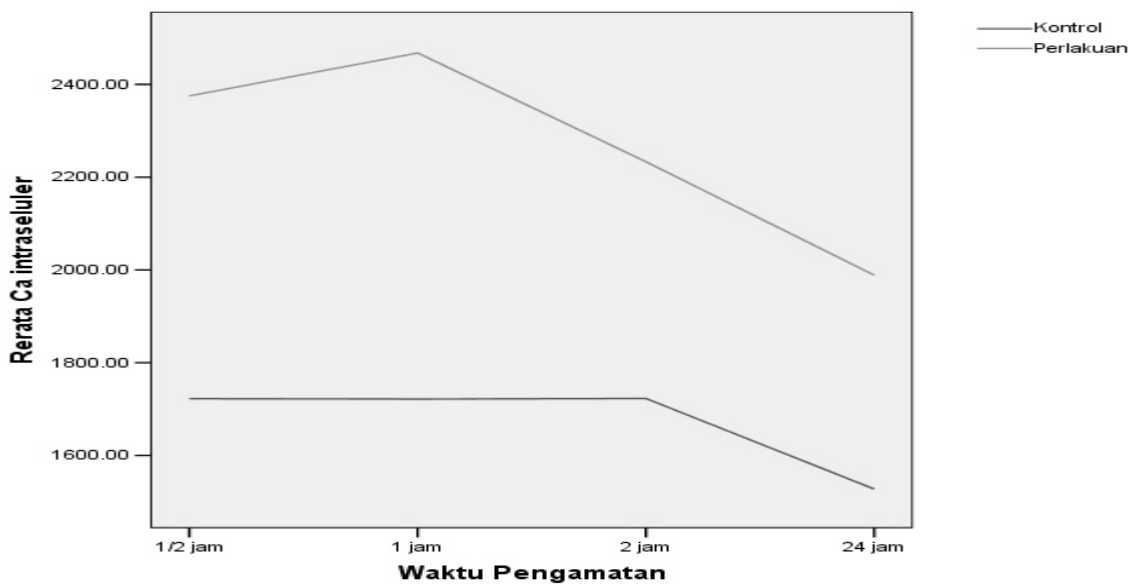
Gambar 2. Menunjukkan gambaran ekspresi *L-type calcium channel* pada membran sel. Gambar kanan menunjukkan peningkatan ekspresi yang ditandai dengan gambaran warna coklat yang semakin banyak dari kelompok perlakuan.



Gambar 3. Perbandingan rerata ekspresi *L-type calcium channel* berdasarkan waktu pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 4. Menunjukkan densitas Ca^{2+} intraseluler. Pada gambar atas menunjukkan gambaran Ca^{2+} intraseluler total akibat pengaruh *Fluoro-3* berwarna hijau. Warna merah karena pengaruh HSP-90 pada gambar bawah menunjukkan Ca^{2+} di sitoplasma saja. Warna yang lebih dominan pada gambar kanan menunjukkan peningkatan intensitas Ca^{2+} .



Gambar 5. diagram batang rerata densitas Ca^{2+} intraseluler berdasarkan waktu pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Tabel 3. Densitas Ca²⁺ intraseluler

Waktu pengamatan	Kontrol X ± SD (intensitas/μm ²)	Perlakuan X ± SD (intensitas/μm ²)	Nilai p
½ jam	1722,52 ± 769,30	2375,26 ± 264,53	0,022
1 jam	1721,60 ± 426,93	2467,84 ± 209,13	0,001
2 jam	1722,78 ± 449,92	2233,24 ± 283,73	0,005
24 jam	1527,52 ± 167,63	1988,61 ± 293,73	0,002

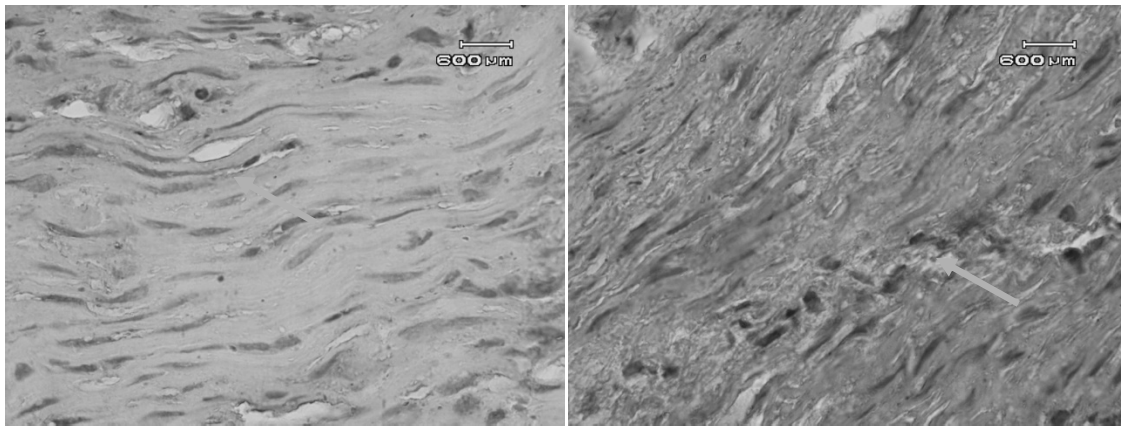
lebih tinggi secara bermakna pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

Ekspresi PAR-1

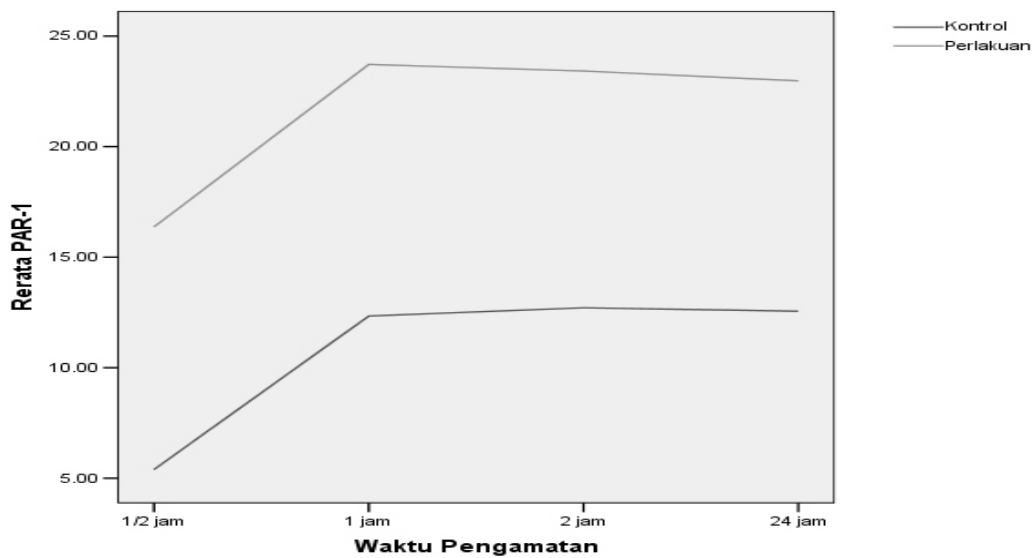
Tabel 4. Ekspresi PAR-1

Waktu pengamatan	Kontrol X ± SD (sel/lp)	Perlakuan X ± SD (sel/lp)	Nilai p
½ jam	5,39 ± 1,28	16,36 ± 1,31	< 0,0001
1 jam	12,34 ± 1,81	23,72 ± 2,80	< 0,0001
2 jam	12,71 ± 1,60	23,42 ± 1,38	< 0,0001
24 jam	12,55 ± 1,60	22,97 ± 1,35	< 0,0001

Setelah dilakukan uji normalitas berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov, dan hasilnya sampel berdistribusi normal dengan nilai p > 0,05. Setelah semua sampel berdistribusi normal, maka dilakukan uji t berpasangan,



Gambar 6. Menunjukkan gambaran ekspresi PAR-1. Peningkatan ekspresi PAR-1 pada kelompok perlakuan dapat dilihat dengan adanya peningkatan warna coklat di membran sel pada gambar sebelah kanan.



Gambar 7. Perbandingan rerata ekspresi PAR-1 berdasarkan waktu pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan.

didapatkan hasil nilai p pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam semua bernilai < 0,0001. Nilai p < 0,05 dapat diartikan bahwa ekspresi PAR-1 pada kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol.

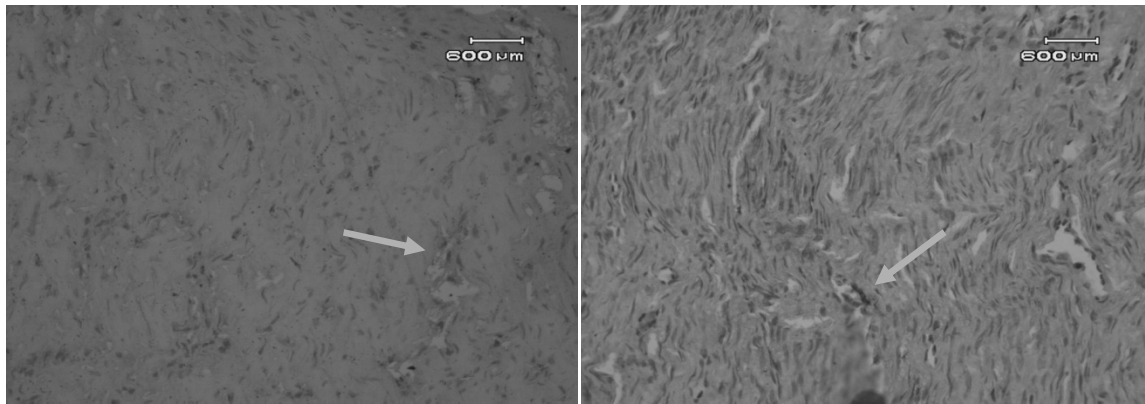
Ekspresi HSP-27

Tabel 5. Rerata jumlah miosit yang mengekspresi HSP-27

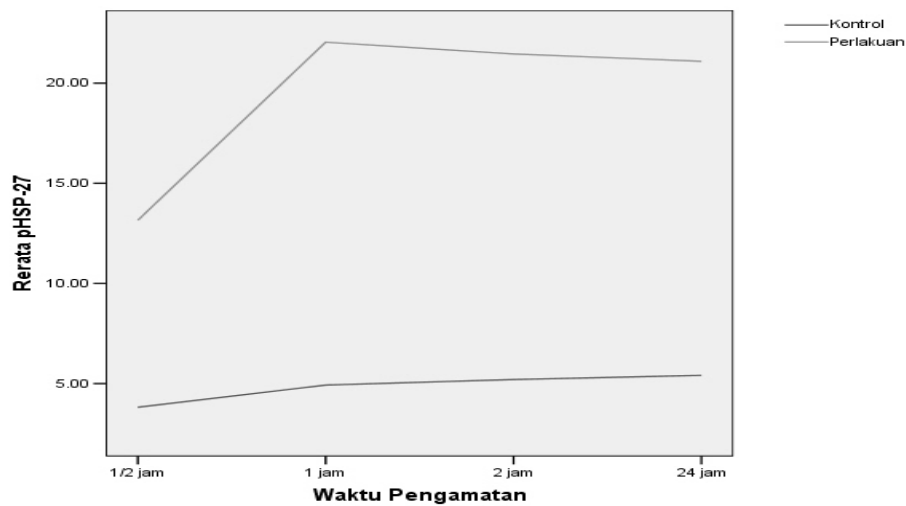
Waktu pengamatan	Kontrol X ± SD (sel/lp)	Perlakuan X ± SD (sel/lp)	Nilai p
½ jam	3,82 ± 1,49	13,15 ± 2,99	< 0,0001
1 jam	4,93 ± 2,67	22,05 ± 3,56	< 0,0001
2 jam	5,20 ± 1,71	21,45 ± 4,06	< 0,0001
24 jam	5,41 ± 1,73	21,09 ± 1,92	< 0,0001

Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov pada ekspresi HSP-27 didapatkan sampel yang berdistribusi normal. Dari uji t berpasangan didapatkan nilai p pada pengamatan ½, 1, 2 dan 24 jam semuanya bernilai < 0,0001 artinya jumlah ekspresi HSP-27 pada kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna daripada kelompok kontrol dengan nilai p < 0,05.

Penelitian pada ibu hamil yang dilakukan terminasi menyimpulkan yang berperan penting untuk menimbulkan kontraksi uterus adalah *stretch* pada miometrium. **Kasai et al.**, (1995) berdasar penelitian pada otot polos uterus tikus mengatakan *stretch* menyebabkan perubahan potensial aksi sehingga timbul influks kalsium ke dalam sel otot polos dan menimbulkan kontraksi. **Lee et al.**, (1999), **Zou et al.**, (2002) dan **Ito et al.**, (2007) menyimpulkan



Gambar 8. Menunjukkan gambar ekspresi HSP-27. Peningkatan ekspresi HSP-27 dapat dilihat pada gambar kanan, yaitu kelompok perlakuan, tampak warna kecoklatan yang semakin banyak pada sitoplasma sel miometrium.



Gambar 9. Perbandingan rerata ekspresi HSP-27 berdasarkan waktu pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan.

stretch mekanis mengaktifkan *stretch-activated (SA) calcium channel* sehingga terjadi depolarisasi dan influks kalsium melalui *L-type calcium channel*. **Sanborn (2007)** melakukan penelitian yang menghubungkan trombin dengan aktivasi *L-type calcium channel*. Trombin berikatan dengan PAR-1 mengaktifkan PLC, terbentuk IP3 dan DAG. DAG melalui PKC dan RACK dapat mengaktifkan *L-type calcium channel*.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan *L-type calcium channel* pada uterus sisi perlakuan (penjahitan modifikasi Surabaya) pada semua interval waktu dibanding uterus sisi kontrol. Jahitan modifikasi Surabaya menyebabkan dinding uterus terkompresi sehingga terjadi *stretch* (**Guyton et al., 2006**). Peningkatan tekanan ini dapat mengubah potensial membran dan terjadi depolarisasi akibatnya *L-type calcium channel* terbuka, terjadi influks kalsium menuju intraseluler dan timbullah kontraksi (**Bolton, 1979**). Peningkatan kalsium intraseluler, walau terbanyak berasal dari eksogen, tetapi ada juga penambahan yang berasal dari endogen yaitu pengeluaran ion kalsium dari retikulum sarkoplasma menuju sitosol sehingga bisa berikatan dengan kalmodulin, mengaktifkan MLCK dan memfosforilasi miosin untuk berikatan dengan aktin menimbulkan kontraksi. Pada penelitian ini juga terjadi peningkatan kalsium intraseluler pada sisi perlakuan dibanding kontrol pada semua interval waktu.

Shintani et al., (2000), menyimpulkan dari penelitian pada uterus tikus hamil bahwa pemberian trombin menyebabkan kontraksi uterus. Kontraksi terjadi melalui ikatan dengan reseptornya, yaitu PAR-1, tetapi kontraksi tidak akan timbul bila diberi *calcium channel inhibitor*, sehingga disimpulkan trombin menyebabkan kontraksi melalui ikatannya dengan PAR-1 dan mengaktifkan *L-type calcium channel*. Pada uterus pascapersalinan, pembentukan trombin merupakan konsekuensi dari pelepasan plasenta. Penelitian pada uterus ibu hamil dilakukan oleh **O'Sullivan et al., (2004)** dan **O'Brien et al., (2008)**, menyimpulkan efek trombin untuk menimbulkan kontraksi uterus juga melalui PAR-1 yang jumlahnya meningkat saat hamil aterm dan persalinan.

Peningkatan PAR-1 juga didapatkan pada uterus sisi perlakuan dibanding kontrol pada penelitian ini, Ikatan trombin dan PAR-1 menyebabkan PLC memecah PIP2 menjadi IP3 dan DAG. DAG melalui PKC dan RACK mengaktifkan *L-type calcium channel* sehingga timbul influks ion kalsium. Disamping itu DAG melalui MAPK dapat memfosforilasi HSP-27 sehingga mengaktifkan aktin dan bentuk aktin-F ini dapat berikatan dengan myosin untuk menimbulkan kontraksi.

Oldenhoff et al., (2002) mendapatkan peningkatan MAPK pada sisi uterus tikus bunting dibandingkan sisi yang tidak bunting. **Oldenhoff** menyimpulkan *stretch* pada uterus meningkatkan MAPK. MAPK melalui MKK menyebabkan HSP-27 terfosforilasi dan membentuk aktin yang aktif (aktin F) dari bentuk yang tidak aktif (aktin G). **White et al., (2005)** memeriksa HSP-27 miometrium tikus mulai bunting muda sampai 24 jam pascamelahirkan. Didapatkan peningkatan HSP-27 pada sitoplasma uterus bunting aterm dan 24 jam pascamelahirkan. Peningkatan HSP-27 di sitoplasma merupakan langkah penting terjadinya kontraksi miometrium (**Gerthoffer and Gunst, 2001**).

Pada penelitian ini juga didapatkan peningkatan HSP-27 pada sisi uterus perlakuan dibanding kontrol pada semua interval waktu. Peningkatan HSP-27 ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan stimulasi mekanik berupa traksi pada kultur sel fibroblas embrio tikus meningkatkan ekspresi HSP-27. **Yamboliev (1999)** juga menyebutkan peningkatan HSP-27 pada otot polos usus anjing melalui peningkatan MAPK.

Pengaruh penjahitan modifikasi Surabaya pada kontraksi miometrium

Penjahitan modifikasi Surabaya melalui sinyal mekanotransduksi, secara bermakna meningkatkan ekspresi *L-type calcium channel*, PAR-1, HSP-27 dan densitas kalsium intraseluler pada model uterus kelinci bunting aterm. Penjahitan kompresi mengaktifkan *SA channel* dan meningkatkan kalsium intraseluler secara transien. Peningkatan transien ini penting untuk mengubah potensial membran sel sehingga terjadi depolarisasi dan terbukanya *L-type calcium channel*. Karena konsentrasi kalsium ekstra-seluler 10.000 kali lebih tinggi dibanding intraseluler, maka influks kalsium dengan mudah dapat melalui *channel* tersebut. Di dalam sel, kalsium intraseluler yang meningkat konsentrasinya berikatan dengan reseptornya yaitu kalmodulin sehingga terbentuk kompleks kalsium kalmodulin yang dapat mengaktifkan MLCK dengan akibat terjadi fosforilasi MLC. MLC yang telah terfosforilasi ini baru bisa berikatan dengan aktin yang juga telah aktif. (**Collier et al., 1999; Bolton et al., 1999; Zou et al., 2002; Ito et al., 2008**).

Pada PPP yang profus karena atonia uteri dapat dihentikan dengan efektif perdarahannya bila dilakukan penekanan pada dinding luar uterus, sehingga cavum uteri terjepit seperti pada tindakan kompresi uterus bimanual interna (**Cunningham et al., 2010**). Penjahitan kompresi uterus dimaksudkan berfungsi seperti kompresi bimanual, sehingga perdarahan juga akan berhenti. Dengan

berhentinya aliran darah pada PPP, secara fisiologis memberi kesempatan terbentuknya trombin. Trombin melalui reseptornya yang meningkat saat akhir kehamilan dan 24 jam postpartum, yaitu PAR-1 dapat mengaktifkan jalur PLC dari jalur protein Gq dan terjadi peningkatan IP3 dan DAG. IP3 berikatan dengan reseptornya di membran retikulum sarkoplasma menyebabkan keluarnya kalsium endogen sehingga makin meningkatkan kalsium di sitosol walaupun hanya sedikit dibanding dari eksogen (O'Brien *et al.*, 2008). DAG meningkatkan ekspresi MAPK yang pada keadaan fisiologis juga meningkat saat 24 jam sebelum inpartu (Oldenhoff *et al.*, 2002). MAPK mengaktifkan MKK dan selanjutnya terjadi fosforilasi HSP-27 sehingga terjadi *remodelling* aktin dari bentuk tidak aktif, yaitu aktin-G menjadi bentuk aktifnya yaitu aktin-F yang telah siap untuk berinteraksi (*sliding*) dengan MLC, sehingga terjadi kontraksi miometrium (Gerthoffer and Gunst, 2001; Shynlova *et al.*, 2002; Sooranna *et al.*, 2004; Guyton and Hall, 2006; MacIntyre *et al.*, 2007).

SIMPULAN

1. Terjadi peningkatan ekspresi *L-type Calcium Channel*, PAR-1 dan HASP-27 serta densitas kalsium intraseluler pada uterus kelinci setelah dilakukan penjahitan modifikasi Surabaya dibanding yang tidak dilakukan.
2. Penjahitan modifikasi Surabaya menimbulkan *stretch* pada miosit miometrium sehingga menyebabkan terbukanya *L-type calcium channel* dan terjadi influksi ion kalsium yang berakibat kalsium intraseluler meningkat. Kalsium intraseluler menyebabkan pengeluaran kalsium endogen yang berasal dari retikulum sarkoplasma melalui *calcium induced calcium release*. Penjahitan modifikasi Surabaya secara mekanis memberi kesempatan terbentuknya trombin dan meningkatkan PAR-1. Ikatan trombin dan PAR-1 mengaktifkan fosfolipase C melalui protein G menyebabkan terpecahnya PIP2 menjadi IP3 dan DAG. IP3 menyebabkan pengeluaran kalsium endogen melalui jalur *IP3 induced calcium release* sehingga makin meningkatkan kalsium intraseluler. Kalsium intraseluler berikatan dengan kalmodulin mengaktifkan MLCK dan menyebabkan fosforilasi MLC. DAG yang dihasilkan dari PIP2 juga dapat mengaktifkan *L-type calcium channel* melalui jalur PKC dan RACK. Disamping itu DAG melalui MAPK dapat memfosforilasi HSP-27 dan menyebabkan aktin berubah menjadi bentuk aktifnya yaitu aktin F yang

siap berikatan dengan MLC yang telah terfosforilasi untuk menimbulkan kontraksi uterus dan menghentikan perdarahan.

3. Penelitian ini merupakan justifikasi empiris teknologi kedokteran (penjahitan modifikasi Surabaya) yaitu prosedur bedah konservasi uterus untuk mengatasi PPP dengan menghindari mutilasi uterus.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian yang hanya menggunakan kelinci dengan kebuntingan 8 janin atau lebih, dengan memeriksa kebuntingannya lebih dahulu dengan palpasi dan ultrasonografi.
2. Perlu dilakukan penelitian observasional pada PPP dengan kompresi bimanual selama ½ jam, dengan harapan dengan adanya peningkatan variabel yang telah terbukti meningkat pada hewan coba, dapat diasumsikan (diekstrapolasikan) meningkat juga pada uterus ibu pascapersalinan dengan PPP karena atonia, sehingga dapat menimbulkan kontraksi yang menyebabkan perdarahan berhenti dan tidak diperlukan tindakan yang lebih invasif yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- B-Lynch C, Coker A, Lawal AH, Abu J, Cowen MJ, 1997. The B-Lynch surgical technique for the control of massive postpartum haemorrhage: an alternative to hysterectomy? Five cases reported. *Br J Obstet Gynaecol*; 104: 372–375.
- B-Lynch C, 2006. Conservative Surgical management. In *A Text Book of Postpartum Hemorrhage* 1st ed. UK: Sapiens: 287–298.
- Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV, 1999. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Ann Rev Physiol*; 61: 85–115.
- Chevernak FA, 2001. Perinatal health in North America. Proceedings of the 5th World Congress of Perinatal Medicine. In *the Perinatal Medicine of the millennium*. Editor Carrera JM: 16–19.
- Collier ML, Thomas AP, Berlin JR, 1999. Relationship between L-type Ca²⁺ current and unitary sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release events in rat ventricular myocytes. *J Physiol*; 516(1): 117–128.
- Coughlin SR, 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11023–11027.

- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY**, 2010. Obstetrical Hemorrhage. In Williams Obstetrics, 23rd Ed, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York-Toronto, 757–822.
- Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW**, 1998. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Cell Physiol* 274: C1429–C1452.
- Geller SE, Adams MG**, 2007. A continuum of care model for postpartum hemorrhage. *Int J Fertil*; 52(2–3): 97–105.
- Gerthoffer WT, Gunst SJ**, 2001. Signal transduction in smooth muscle. Invited review: Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J App Physiol*; 91: 963–972.
- Guyton AC, Hall JE**, 2006. Textbook of medical physiology. 11th Ed. Elsevier Saunders. Philadelphia-Pennsylvania.
- Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Nohara D, Kato K**, 2000. Phosphorilation induced change of the oligomerization state of $\alpha\beta$ -chrySTALLIN. *J Biol Chem* 276: 5346–5351.
- Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sokabe M**, 2008. A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 38: 407–413.
- Kasai Y, Tsutsumi O, Taketani Y, Endo M, Iino M**, 1995. Sterch-induced enhancement of contractions in uterine smooth muscle rats. *J Physiol*, 486(Pt 2): 373–384.
- Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K**, 1999. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*; 410: 382–389.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Konku T, Hunter GD, Plevin R**, 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53(2): 245–282.
- Macintyre DA, Chan E, Smith R**, 2007. Myometrial activation–coordination, connectivity and contractility. *Fetal Mat Med Rev*, 18(4): 333–356.
- O'Brien M, Morrison JJ, Smith TJ**, 2008. Expression of prothrombin and protease activated receptors in human myometrium during pregnancy and labor. *Biol Reprod* 78: 20–26.
- O'Sullivan CJ, Allen NM, O'Loughlin AJ, Friel AM, Morrison JJ**, 2004. Thrombin and PAR1-activating peptide: Effect on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol*; 190: 1098–1103.
- Oldenhof AD, Shynlova OP, Liu M, Langille BM, Lye SJ**, 2002. Mitogen-activated protein kinase mediate stretch-induced c-fos mRNA expression in myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282: C1530-1539.
- Sanborn BM**, 2007. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin Cell Dev Biol*; 18: 305–314.
- Shintani Y, Hirano K, Nishimura J, Nakano H, Kanaide H**, 2000. Enhanced contractile response to thrombin in pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol*, 131(8): 1619–1628.
- Shynlova OP, Oldenhof AD, Mingyao L, Lowell LL, Lye SJ**, 2002. Regulation of c-fos expression by static stretch in rat myometrial smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol*, 186: 1358–1365.
- Smith R**, 2007. Parturition. *N Engl J Med* 356(3): 271–283.
- Sooranna SR, Lee Y, Kim LU, Mohan AR, Bennett PR, Johnson MR**, 2004. Mechanical stretch activates type 2 cyclooxygenase via activator protein-1 transcription factor in human myometrial cells. *Mol Hum Reprod* 10: 109–113.
- Sulistiyono A, Gultom ESM, Dachlan EG, Prabowo P**, 2010. Conservative surgical management of postpartum hemorrhage using ‘Surabaya Method’ (Modified B-Lynch Compression suture). *Indones J Obstet Gynecol*; 24–3: 108–113.
- White BG, Williams SJ, Highmore, MacPhee DJ**, 2005. Small heat shock protein 27 (Hsp27) expression is highly induced in rat myometrium during late pregnancy and labour. *Reproduction* 129: 115–126.
- Yamboliev IA, Wiesman KM, Singer CA, Hedges JC, Gerthoffer WT**, 1999. Phosphatidylinositol 3-kinases regulate ERK and p38 MAPK in canine colonic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*; 279(2): C352–360.
- Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE, Singer JJ**, 2002. Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels. *PNAS*; 99(9): 6404–6409.