

## **Perbandingan Efek Pemberian Asam Folat Selama Kehamilan Terhadap Kejadian *Neural Tube Defect* (NTD) pada Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley***

**Rodiani<sup>1</sup>, Dwi Indria Angraini<sup>2</sup>, dan Analia<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

<sup>2</sup>Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

<sup>3</sup>Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

### **Abstrak**

*Neural Tube Defects* (NTD) atau cacat tabung saraf merupakan malformasi pada sistem saraf pusat yang diakibatkan kegagalan penutupan tabung saraf selama embriogenesis. Suplementasi asam folat diperlukan untuk mencegah bayi lahir dengan NTD. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek asam folat pada berbagai periode pemberian terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih betina galur *Sprague dawley* dengan berat badan 200-250 gram yang dibagi ke dalam lima kelompok, yaitu kontrol negatif (KN) yang tidak diberikan asam folat selama kehamilan, kontrol positif (KP) yang diberikan asam folat selama kehamilan, perlakuan 1 (P1) yang diberikan asam folat pada trimester satu, perlakuan 2 (P2) yang diberikan asam folat pada trimester dua, dan perlakuan 3 (P3) yang diberikan asam folat pada trimester tiga. Pada kelompok KN didapatkan tiga ekor fetus dengan NTD; pada KP semua fetus normal; pada P1 semua fetus normal; pada P2 semua fetus normal; pada P3 semua fetus normal. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan didapatkan nilai signifikansi  $p=0,080$ . Tidak terdapat perbedaan efek asam folat pada berbagai periode pemberian terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

**Kata kunci:** asam folat, kehamilan, *neural tube defects*, tikus putih.

## **The Effect of Folic Acid Given During Pregnancy to the Incidences of Neural Tube Defects (NTD) on Fetal Rats (*Rattus norvegicus*) Strains *Sprague dawley***

### **Abstract**

*Neural Tube Defects* (NTD) are malformations of the central nervous system which are caused by failure of neural tube closure during embryogenesis. Folic acid supplementation is needed to prevent babies born with neural tube defects. This study aims to determine the effect of folic acid on the various administration periods against NTD incidence of fetal rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague dawley*. This study used 30 white female rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague dawley* with 200-250 grams body weight which are divided into five groups: negative control (NC) were not given folic acid during pregnancy, positive control (PC) were given folic acid during pregnancy, treatment group 1 (P1) were given folic acid in first trimester, treatment group 2 (P2) were given folic acid in second trimester, and treatment group 3 (P3) were given folic acid in third trimester. In NC groups obtained three fetal rats with NTD; all fetal in PC group were normal; all fetal in P1 group were normal; all fetal in P2 groups were normal; all fetal in P3 were normal. Data were analyzed using Kruskal-Wallis non parametric test and obtained significant value of  $p=0,080$ . There are no difference in the effects of folic acid on various administration periods against NTD incidence of fetal rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague dawley*.

**Keywords:** folic acid, neural tube defects, pregnancy, rats.

Korespondensi: Analia, Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Unila, Bandar Lampung, HP 081219197856, e-mail: nabila\_andi@yahoo.com.

### **Pendahuluan**

Satu dari 40 atau sekitar 2,5% dari total bayi yang baru lahir mengalami malformasi. Malformasi kongenital merupakan penyebab utama kematian bayi, yaitu sekitar 21% dari semua kematian bayi.<sup>1</sup> Penyebab malformasi pada umumnya bersifat multifaktorial.<sup>2,3</sup>

Salah satu faktor yang dapat menyebabkan malformasi, yaitu defisiensi asam folat selama kehamilan. Beberapa

malformasi kongenital, seperti NTD, cacat jantung, langit-langit atau bibir sumbing bahkan *Down Syndrome* diperkirakan terkait dengan defisiensi dan gangguan metabolik asam folat. *Neural Tube Defects* merupakan malformasi yang sering muncul akibat defisiensi folat, dan merupakan malformasi kedua tersering setelah cacat jantung.<sup>4</sup> Malformasi ini meliputi spina bifida, anensefalus dan ensefalokel.<sup>5,6</sup>

Secara global, diperkirakan sekitar 300.000 bayi dilahirkan dengan NTD setiap tahunnya, yang mengakibatkan sekitar 88.000 kematian dan 8,6 juta *disability adjusted live years* (DALY). Surveillans jangka panjang di negara-negara yang telah berhasil menerapkan fortifikasi, seperti Amerika Serikat, Kanada, Kosta Rika, Afrika Selatan, Chili, dan Cina menunjukkan bahwa suplementasi folat dapat mengurangi prevalensi NTD menjadi lima sampai enam per 10.000 kehamilan.<sup>7</sup>

Hal tersebut membuat asam folat menjadi mikronutrien yang sangat penting untuk ibu hamil. Asam folat merupakan nutrisi esensial yang tidak bisa disintesis oleh tubuh manusia, sehingga membutuhkan asupan dari makanan, fortifikasi dan suplementasi. Folat banyak terdapat di berbagai sumber makanan, namun karena bersifat termolabil dan larut air membuatnya mudah rusak oleh pemanasan. Folat dibutuhkan untuk replikasi DNA dan sebagai substrat dalam berbagai reaksi enzimatik termasuk sintesis asam amino dan metabolisme vitamin. Peningkatan kebutuhan asam folat selama kehamilan dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan fetus.<sup>8,9</sup>

Suplementasi umumnya berupa pil besi (200 mg *sulfas ferosus* dan 0,25 mg asam folat) diperlukan agar tercukupinya kebutuhan asam folat. Persentase ibu hamil yang minum pil besi di Provinsi Lampung hanya sekitar 79,43% pada tahun 2007, sebesar 85,61% pada tahun 2008, dan tahun 2009 sebesar 76,22%.<sup>10</sup> Secara nasional cakupan ibu hamil mendapat tablet besi tahun 2014 yaitu 85,1%, angka tersebut belum mencapai target program tahun 2014 sebesar 95%. Cakupan pemberian 90 tablet besi pada ibu hamil di Provinsi Lampung sebesar 83,5%.<sup>11</sup>

Pada awal kehamilan, terdapat kesepakatan universal tentang rekomendasi asam folat. Setelah kehamilan minggu ke-12 tidak ada rekomendasi resmi untuk suplementasi asam folat. Dengan demikian, rekomendasi ini difokuskan untuk mencegah NTD pada awal kehamilan, tetapi manfaat suplementasi pada kehamilan lanjut masih belum diketahui dengan baik. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa suplementasi lanjutan setelah trimester pertama kehamilan, dapat mencegah penurunan konsentrasi folat

serum dan peningkatan konsentrasi homosistein plasma, yang telah dikaitkan dengan peningkatan risiko NTD, yang umumnya terjadi pada tahap akhir kehamilan.<sup>12</sup> Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melihat pengaruh asam folat pada berbagai periode pemberian terhadap kejadian NTD yang akan dilakukan pada hewan percobaan.

## Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan pendekatan *post test only control group design*. Penelitian ini memungkinkan peneliti dapat mengetahui efek perlakuan pada kelompok eksperimen, dengan cara membandingkannya dengan kelompok kontrol. Penelitian dilaksanakan di *Animal House & Laboratorium Biomolekuler* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dari bulan Agustus-Oktober 2016.

Sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina hamil galur *Sprague dawley*, berumur 10-16 minggu yang memenuhi kriteria inklusi dan dipilih secara acak (*random*) kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Kontrol negatif (KN) merupakan kelompok yang tidak diberikan asam folat selama kehamilan. Kontrol positif (KP) merupakan kelompok yang diberikan asam folat (0,062 mg/kgBB) selama kehamilan. P1 merupakan kelompok yang diberikan asam folat hanya pada trimester I (hari ke-1 sampai ke-7). P2 merupakan kelompok yang diberikan asam folat hanya pada trimester II (hari ke-8 sampai ke-14). P3 merupakan kelompok yang diberikan asam folat hanya pada trimester III (hari ke-15 sampai ke-21). Setelah diberikan perlakuan pada masing-masing kelompok, kemudian tikus dilakukan nekropsi pada hari ke-21. Gambaran morfologi NTD pada fetus diamati melalui pengamatan secara langsung. *Neural Tube Defects* dinilai dari ada atau tidaknya spina bifida, anensefalus dan ensefalokel.

Analisis data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang digunakan untuk uji normalitas data. Apabila sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan analisis *post-hoc Bonferroni* untuk menilai kebermaknaan antar kelompok. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka digunakan analisis non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 128/UN26.8/DL/2017.

### Hasil

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan pada lima kelompok percobaan, maka didapatkan hasil gambaran dan rata-rata jumlah fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) seperti pada tabel 1.

**Tabel 1. Rerata Jumlah Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

Kelompok	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Rata-rata ± Standar Deviasi
KN	5	33	6,6 ± 0,894
KP	5	43	8,6 ± 0,894
P1	5	38	7,6 ± 1,140
P2	5	35	7 ± 0,707
P3	5	33	6,6 ± 0,894

Pada tabel 1, dapat diketahui bahwa jumlah fetus terbanyak didapatkan pada KP yang diberikan asam folat selama kehamilan, yaitu sejumlah 43 dengan rata-rata ± standar deviasi (SD) adalah 8,6 ± 0,894. Sedangkan jumlah fetus tersedikit didapatkan pada kelompok KN dan P3 yaitu sejumlah 33 dengan rata-rata ± SD adalah 6,6 ± 0,894. Pada kelompok P1 didapatkan jumlah fetus 38 dengan rata-rata ± SD adalah 7,6 ± 1,140. Pada kelompok P2 didapatkan jumlah fetus 35 dengan rata-rata ± SD adalah 7 ± 0,707.

Kemudian untuk mengetahui perbandingan efek pemberian asam folat terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*), maka dilakukan analisis dan didapatkan hasil seperti pada tabel 2.

**Tabel 2. Rerata Jumlah Kejadian NTD Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

Kelompok	Jumlah Induk	Jumlah NTD	Median (Min-Max)
KN	5	3	0 (0-2)
KP	5	0	0
P1	5	0	0
P2	5	0	0
P3	5	0	0

Pada tabel 2, dapat dilihat bahwa pada kelompok KN didapatkan tiga kejadian NTD (ensefalokel) dengan nilai median 0, minimum

0 dan maksimum 2. Hasil ini lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok KP, P1, P2 dan P3. Setelah didapatkan nilai median (minimum-maksimum) jumlah kejadian NTD pada setiap kelompok maka dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk.

Pada penelitian ini didapatkan distribusi data yang tidak normal ( $p=0,000$ ). Kemudian data ditransformasi namun tetap didapatkan data yang terdistribusi tidak normal, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Hasil uji didapatkan nilai  $p=0,080$  ( $p>0,05$ ), maka dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah kejadian NTD yang bermakna pada semua kelompok. Dengan demikian analisis *post hoc* pada penelitian ini tidak dapat dilanjutkan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang bermakna.

### Pembahasan

Pada penelitian ini, NTD didapatkan hanya pada kelompok kontrol negatif, yaitu sebanyak tiga fetus mengalami NTD dengan nilai median 0, nilai minimum 0 dan nilai maksimum 2. Sedangkan pada semua kelompok perlakuan dan KP, tidak didapatkan fetus tikus putih yang mengalami NTD. Hal ini memperlihatkan adanya perbedaan jumlah kejadian NTD pada kelompok KN jika dibandingkan dengan kelompok yang lain, meskipun secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Kenaikan jumlah kejadian NTD pada kelompok KN diduga karena asam folat memiliki efek positif dalam mencegah NTD pada kelompok KP dan perlakuan.

Pada penelitian ini juga didapatkan ada lima fetus yang mengalami resorpsi pada kelompok KN. Resorpsi merupakan kematian embrio sejak dini yang ditunjukkan dengan adanya sisa jaringan embrio di dalam uterus berupa gumpalan merah. Embrio yang sedang berkembang pada masa organogenesis tidak mampu menyesuaikan diri dan bertahan sehingga mati dan tidak dapat berkembang lagi. Salah satu yang dapat menyebabkan resorpsi yaitu malformasi berat seperti anensefalus. Oleh karena itu, ada kemungkinan fetus dengan kejadian NTD yang tidak diketahui ataupun tidak terhitung dalam penelitian karena mengalami resorpsi dan membuat penelitian ini menjadi tidak bermakna secara statistik.<sup>13,14</sup>

Ketidakbermaknaan ini juga dapat terjadi karena penyebab NTD yang bersifat multifaktorial. Pada dasarnya, NTD merupakan kegagalan penutupan struktur embrionik tabung saraf yang membentuk otak dan spinal kord. Perkembangan dan penutupan tabung saraf ini normalnya akan selesai dalam waktu 28 hari setelah konsepsi. Bila terjadi gangguan dari faktor lingkungan yang berinteraksi dengan faktor genetik maka akan dapat menyebabkan kegagalan pada perkembangan dan penutupan tabung saraf.<sup>15</sup>

Penelitian terdahulu menjelaskan bahwa sampai saat ini belum diketahui semua faktor lingkungan yang terlibat dan bagaimana mekanisme dari faktor-faktor tersebut dalam menyebabkan NTD. Beberapa diantaranya yaitu defisiensi asam folat, hipertermia, obesitas, obat (thalidomide, antagonis folat, antiepilepsi seperti asam valproat dan carbamazepin, hipervitaminosis A), infeksi maternal (rubella, sitomegalovirus, *Toxoplasma gondii*, sifilis), kondisi metabolik maternal (fenilketonuria, diabetes mellitus dan kretinisme).<sup>6,16</sup> Diantara faktor-faktor tersebut, status nutrisi (kadar folat) merupakan faktor penentu utama penyebab NTD. Sering diasumsikan bahwa NTD merupakan hasil dari keadaan defisiensi asam folat, namun pada banyak kasus, ibu dari janin dengan NTD tidak mengalami defisiensi folat.<sup>17</sup>

Pada penelitian lain juga menjelaskan bahwa defisiensi folat dapat menyebabkan NTD hanya jika ada predisposisi genetik. Tikus dengan genotip yang normal tidak akan berkembang menjadi NTD meskipun dalam keadaan defisiensi folat yang berat.<sup>18</sup> Selain itu, genetik juga berperan dalam menentukan tingkat responsif asam folat pada tikus. Nakuozi menjelaskan bahwa suplementasi asam folat tidak mengurangi insidensi dan keparahan NTD pada tikus mutan. Hal ini berarti ada peranan genetik yang membuat tikus menjadi tidak responsif dengan pemberian asam folat atau *folate non preventable* NTD.<sup>19</sup>

Penelitian pada hewan telah menunjukkan bahwa ada sebanyak 100 gen mutan yang mempengaruhi neurulasi maupun metabolisme folat dan hampir semua gen tersebut homolog pada manusia. *Neural Tube Defects* berhubungan dengan beberapa kelainan gen tunggal seperti sindrom

*cerebrocostomandibular*, sindrom Fraser, sindrom Meckel-Gruber dan sindrom Waardenburg. Namun, sejauh ini dapat diketahui bahwa tidak ada gen tunggal yang bertanggung jawab untuk terjadinya NTD pada manusia.<sup>6</sup>

Folat berperan dalam sintesis pirimidin dan purin untuk sintesis DNA dan merupakan donor metil untuk semua makromolekul. Proliferasi dan kelangsungan hidup sel sangat tergantung pada kelancaran dalam sintesis DNA. Salah satu kemungkinan mekanisme asam folat dalam mencegah NTD, yaitu dengan merangsang respon selular sehingga embrio dapat mengatasi kelainan metabolisme folat akibat mutasi genetik atau faktor lingkungan. Efek asam folat ini yang diduga berperan dalam mencegah NTD, sehingga suplementasi asam folat sangat dianjurkan untuk mencegah terjadinya NTD.<sup>18</sup>

Bila defisiensi folat merupakan penyebab utama NTD, maka berdasarkan teori embriologi yang menjelaskan bahwa pembentukan dan penutupan tabung saraf terjadi pada trimester satu, akan ada kejadian NTD pada kelompok perlakuan dua dan tiga, selain dari kontrol negatif. Namun, pada penelitian ini didapatkan hasil yang negatif untuk kelompok perlakuan dua dan tiga. Berdasarkan bukti-bukti penelitian terdahulu, dapat diketahui bahwa NTD akan terjadi hanya jika adanya interaksi antara faktor genetik dan faktor lingkungan/nutrisi secara bersamaan.<sup>16,18</sup> Hal inilah yang mungkin menjadi penyebab dari tidak dididkannya fetus dengan NTD pada kelompok perlakuan dua dan tiga.

Terdapat beberapa faktor yang menjadi keterbatasan atau kekurangan dari penelitian ini, baik dari faktor objek penelitian (tikus putih) maupun dari peneliti. Tikus putih sebagai objek penelitian memiliki faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian seperti genetik yang tidak diketahui oleh peneliti, serta makanan seperti ketimun yang mengandung asam folat dan pelet yang mengandung protein tinggi, vitamin (asam folat) dan mineral yang diberikan sebelum dan selama kehamilan. Sedangkan peneliti memiliki kekurangan seperti kurang cermat dalam menentukan kehamilan pada tikus, sehingga didapatkan tikus yang lahir di luar perkiraan. Selain itu, terdapat keterbatasan metode penentuan NTD yang hanya secara

makroskopis, sehingga NTD yang mikroskopis kemungkinan tidak terlihat.

### Simpulan

Tidak terdapat perbedaan efek asam folat pada berbagai periode pemberian terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada objek penelitian dengan kelainan genetik (mutan) yang diketahui atau dengan pemberian *trigger* yang dapat menyebabkan NTD agar lebih dapat menilai peranan asam folat.

### Daftar Pustaka

1. Sadler TW. Embriologi kedokteran langman. Jakarta: EGC; 2000.
2. Imbard A, Benoist J, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(1):4352–89.
3. Wang M, Wang Z, Gao L, Gong R, Sun X, Zhao Z. Maternal body mass index and the association between folic acid supplements and neural tube defects. *J Acta Paediatrica*. 2013; 102(1):908–13.
4. Cunningham FG, Levano KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. *Obstetri williams*. Edisi ke-23. Jakarta: EGC; 2014.
5. Cochard LR. *Netter's atlas of human embryology*. Edisi ke-1. USA: Elsevier Health Sciences; 2012.
6. Padmanabhan R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *J Japanese Teratology Society*. 2006; 46(1):55–67.
7. Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, Williams J. Describing the prevalence of neural tube defects worldwide : a systematic literature review. *J Plos One*. 2016; 11(4):1–31.
8. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu YH. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *J Reviews in Obstetrics & Gynecology*. 2011; 4(2):52–9.
9. Tangkilisan HA, Rumbajan D. Defisiensi asam folat. *J Sari Pediatri*. 2002; 4(1):21–5.
10. Dinas Kesehatan Provinsi Lampung. Profil kesehatan provinsi Lampung tahun 2012. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Provinsi Lampung; 2013.
11. Kementerian Kesehatan RI. Profil kesehatan Indonesia 2014. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2015.
12. McNulty B, McNulty H, Marshall B, Ward M, Molloy AM, Scott JM, et al. Impact of continuing folic acid after the first trimester of pregnancy: findings of a randomized trial of folic acid supplementation in the second and third trimesters. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98(1):92–8.
13. Sidharta VM, Gunardi S. Anensefali fetus pada ibu dengan dugaan defisiensi asam folat. *Journal of Medicine*. 2011; 2(10):111–6.
14. Silvia GA. Pengaruh pemberian suspensi sari akar manis terhadap perkembangan janin pada mencit bunting [Skripsi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2011.
15. Abeywardana S, Sullivan EA. Neural tube defects in Australia. An epidemiological report. Sydney: AIHW National Perinatal Statistics Unit; 2008.
16. Copp AJ, Greene NDE. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol*. 2014; 220(2):217–230.
17. Dunlevy LPE, Chitty LS, Burren KA, Doudney K, Stojilkovic MT, Stanier P, et al. Abnormal folate metabolism in foetuses affected by neural tube defects. *J Brain*. 2007; 130(4):1043–49.
18. Burren K, Savery D, Massa V, Kok R, Scott J, Blom H. Gene-environment interactions in the of neural tube defect: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of pax function. *J Human Molecular Genetics*. 2008; 17(23):3675–85.
19. Nakouzi GA, Nadeau JH. Does dietary folic acid supplementation in mouse NTD models affect neural tube development or gamete preference at fertilization. *J BMC Genetics*. 2014; 15(91):1–9.