

Identifikasi Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS pada Penderita Preeklampsia di Rumah Sakit Dr. Mohammad Hoesin Palembang

Fadel Fikri Suharto¹, Mgs. Irsan Saleh², Subandrate³

1. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

2. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

3. Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

Jl. Dr. Moh. Ali Komplek RSMH PalembangMadang, Sekip, Palembang, 30126, Palembang, Indonesia

Email: fadel_del@hotmail.com

Abstrak

Preeklampsia adalah timbulnya hipertensi disertai dengan proteinuria pada umur kehamilan lebih dari 20 minggu atau segera setelah persalinan. Insiden preeklampsia sangat dipengaruhi oleh paritas, ras, etnis, predisposisi lingkungan dan genetik. Salah satu predisposisi genetik yang berperan memicu preeklampsia adalah kelainan gen endothelial *nitric oxide synthase* (eNOS) yang mengatur aktivasi *nitric oxide*. Polimorfisme gen eNOS dapat menurunkan aktivitas *nitric oxide* sehingga meningkatkan kerentanan terjadinya gangguan endothelial yang berdampak kepada kenaikan tekanan darah dan timbul proteinuria. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme Glu298Asp gen eNOS pada penderita preeklampsia di Rumah Sakit dr. Mohammad Hoesin Palembang. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional terhadap 32 penderita preeklampsia di Rumah Sakit dr. Mohammad Hoesin Palembang. Identifikasi polimorfisme Glu298Asp gen eNOS dilakukan dengan teknik PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) menggunakan enzim *DpnII*. Genotip GG (*wild type*) ditemukan sebanyak 20 subjek (62,5%), genotip GT (heterozigot mutan) sebanyak 11 subjek (34,3%), dan genotip TT (homozigot mutan) sebanyak 1 subjek (3,1%). Terdapat 51 (79,7%) alotip G (*wild type*) dan 13 (20,3%) alotip T (polimorfik) dari 32 subjek penelitian. Gambaran genotip dan alotip *wild type* lebih banyak ditemukan pada penderita preeklampsia di Rumah Sakit Dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Kata Kunci: preeklampsia, polimorfisme, Glu298Asp, gen eNOS

Abstract

Preeclampsia is pregnancy-induced hypertension accompanied with proteinuria at the gestational age of more than 20 weeks or immediately after labor. Incidence of preeclampsia is strongly influenced by parity, race, ethnicity, environment and genetic predisposition. One of the genetic predispositions playing a role in preeclampsia is the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS), which regulate the activation of nitric oxide. The eNOS gene polymorphism may decrease the activity of nitric oxide, thereby increasing the susceptibility of endothelial disorders that causes an increase in blood pressure and proteinuria. This study aims to identify the Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene in preeclampsia patients at dr. Mohammad Hoesin General Hospital Palembang. This study is a descriptive observational study on 32 preeclampsia patients in dr. Mohammad Hoesin Palembang. Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene identification was performed by PCR - RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) using *DpnII* enzyme. GG genotype (wild-type) was found in 20 subjects (62.5%), GT (heterozygous mutant) genotype in 11 subjects (34.3 %), and TT genotype (homozygous mutant) in 1 subject (3.1 %). There were 51 (79.7%) G (wild type) allotypes and 13 (20,3%) T (polymorphic) allotypes in the 32 subjects studied. The wild-type genotype and allotype were more commonly found in patients with preeclampsia in Dr. Mohammad Hoesin General Hospital Palembang.

Keywords: preeclampsia, polymorphism, Glu298Asp, eNOS gene

1. Pendahuluan

Preeklampsia adalah timbulnya hipertensi disertai dengan proteinuria pada umur kehamilan lebih dari 20 minggu atau segera setelah persalinan.¹ Gejalanya berkurang atau menghilang setelah melahirkan sehingga terapi definitifnya adalah mengakhiri kehamilan.^{2,3} Preeklampsia dapat berakibat buruk baik pada ibu maupun janin yang dikandungnya. Komplikasi pada ibu berupa sindroma HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme, low platelet*), edema paru, gangguan ginjal, perdarahan, solusio plasenta bahkan kematian ibu. Komplikasi pada bayi dapat berupa kelahiran premature, gawat janin, berat badan lahir rendah *atau intra uterine fetal death* (IUFD).^{4,5}

Insiden preeklampsia sangat dipengaruhi oleh paritas, ras, dan etnis. Disamping itu juga dipengaruhi oleh predisposisi genetik dan juga faktor lingkungan. Salah satu predisposisi genetik yang berperan memicu preeklampsia adalah kelainan gen *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS/NOS3) yang mengatur aktivasi *nitric oxide*.⁶

Nitric oxide (NO) adalah *endothelial vasodilator* dengan fungsi tambahan sebagai antitrombotik dan *atheroprotective*.⁷ Pada kehamilan yang normal, jalur NO diaktivasi, yang akan berdampak kepada peningkatan kadar dari NO. Peningkatan dari kadar NO bertanggung jawab pada vasodilatasi maternal yang dibutuhkan untuk akomodasi peningkatan volume sirkulasi selama kehamilan tanpa menaikkan tekanan darah. Pada preeklampsia, adaptasi ini gagal, terjadi gangguan endothelial, sehingga tekanan darah meningkat, dan timbul proteinuria.⁸ Terjadinya penurunan produksi NO dikaitkan dengan polimorfisme yang terjadi pada gen yang mengatur produksi NO, yaitu gen eNOS (*endothelial nitric oxide synthase/ NOS3*).⁹

Beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen eNOS yang berkaitan dengan preeklampsia, salah satunya adalah substitusi dari G894T di exon 7 menyebabkan substitusi Glu298Asp, insersi-delesi di intron 4 (4a/b) yang terdiri dari 2 alel, dan substitusi T786C di region promoter.¹⁰ Polimorfisme Glu298Asp gen eNOS, yaitu penggantian dari asam glutamat menjadi asam aspartat pada kodon 298 berkaitan dengan penurunan *endothelium-dependent vasodilatation* di dalam kehamilan.¹¹

Sampai saat ini, belum ada penelitian mengenai hubungan polimorfisme Glu298Asp gen eNOS dengan kejadian preeklampsia pada pasien preeklampsia khususnya di Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang. Mengingat pentingnya penelitian hubungan Glu298Asp gen eNOS dengan kejadian preeklampsia, diperlukan suatu penelitian yang mengidentifikasi polimorfisme Glu298Asp gen eNOS pada pasien preeklampsia khususnya di Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang.

2. Metode Penelitian

Penelitian identifikasi polimorfisme Glu298Asp (eNOS) pada penderita preeklampsia di Rumah Sakit Dr. Mohammad Hoesin Palembang merupakan penelitian deskriptif observasional dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* dan *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP).

Sampel penelitian ini adalah semua pasien preeklampsia di Poliklinik Obstetri dan Ginekologi dan Instalasi Rawat Inap Obstetri dan Ginekologi Rumah Sakit Dr. Mohammad Hoesin Palembang dalam periode Agustus 2013 sampai dengan November 2013.

Metode pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah *consecutive sampling*. *Consecutive sampling* merupakan teknik pengambilan sampel berdasarkan kebetulan, yaitu siapapun yang kebetulan bertemu dengan peneliti dapat digunakan sebagai sampel bila dinilai cocok sebagai sumber data.

Pengambilan Darah

Sampel darah diambil melalui punksi vena antecubiti sebanyak 2 ml. Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) untuk ekstraksi DNA dan PCR.

Isolasi DNA

Darah sebanyak 200 µl diambil menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml. Kemudian darah tersebut dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 1ml/1000 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan kembali PBS pH 7,4 sebanyak 1000 µl sebelum kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Kegiatan ini diulangi sebanyak 2 kali. Selanjutnya supernatan dibuang, lalu ditambahkan saponin (0,5% saponin dalam PBS dicampur dengan baik menggunakan vortex, kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit). Campuran ini diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam.

Setelah diinkubasi, campuran kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Campuran dicuci kembali sebanyak 3 kali dengan PBS pH 7,4 1000 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan 50 µl chelex 20% dalam ddH₂O pH 10,50 serta 100 µl ddH₂O, kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. DNA berada pada bagian supernatan (*DNA containing water*) dipindahkan ke dalam tabung steril sebanyak 200 µl dan disimpan pada suhu -20°C.

Desain Primer

Desain primer dilakukan dengan memperhitungkan syarat primer dan memperhatikan letak polimorfisme Glu298Asp gen eNOS yang dapat diketahui melalui enzim restriksi endonuklease *Dpn II*. Sekuens primer *forward* adalah 5'-CCCCTCCATCCCACCCAGTCAAC-3' dan primer *reverse* adalah 5'-AGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTG-3'.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pada penelitian ini, digunakan sepasang primer oligonukleotida untuk deteksi polimorfisme titik. Komposisi campuran dengan volume total 25 µl yang digunakan saat melakukan PCR adalah PCR *mix GoTaq* (Promega, USA) yang terdiri dari 12,5 µl ddH₂O, 3 µl DNA cetakan (*template*), serta primer oligonukleotida *reverse* (R) dan *forward* (F) masing-masing 1µl.

Reaksi denaturasi awal berlangsung pada suhu 95°C selama 10 menit dan 30 siklus denaturasi lanjutan pada suhu 95°C selama 45 detik untuk memisahkan DNA rantai ganda menjadi dua rantai tunggal. Reaksi *annealing*, di mana primer menyatu dengan kedua rantai tunggal DNA, berlangsung pada suhu 58°C selama 1 menit. Reaksi polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi ekstensi, yaitu sintesis DNA melalui perpanjangan primer mengikuti urutan nukleotida DNA rantai tunggal pasangannya, umumnya berlangsung pada suhu 72°C selama 10 menit.

Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR divisualisasikan dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa (konsentrasi 4%).

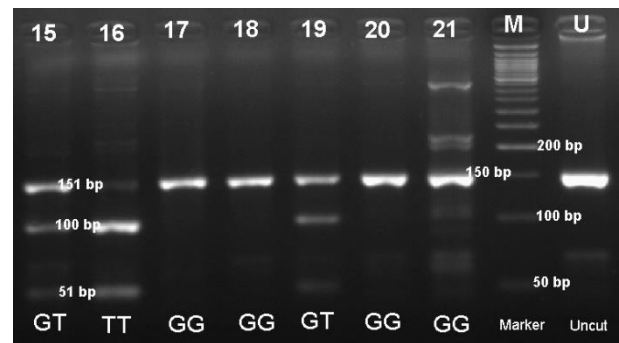
Elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 80 volt. Selanjutnya, hasil elektroforesis dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*Biorad*, USA) untuk divisualisasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam.

Gambaran alel mutan homozigot ditunjukkan dengan terpotongnya fragmen DNA menjadi 2 pita, yaitu pada 100 bp dan 51 bp seperti yang terlihat pada gambar 5 (sampel nomor 16). Sedangkan gambaran alel mutan heterozigot ditunjukkan dengan terpotongnya fragmen DNA menjadi 3 pita pada 51 bp dan 100 bp serta adanya pita di 151 bp. Untuk gambaran alel *wild type*, tidak terpotongnya fragmen DNA sama sekali (151 bp).

3. Hasil

Pemisahan dengan gel agarosa 4% memperlihatkan satu pita dengan panjang 151 bp, tiga pita dengan panjang masing-masing 51 bp, 100bp, dan 151 bp, serta dua pita

dengan panjang pita 100 bp dan 51 bp. Visualisasi hasil PCR gen eNOS disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi Hasil PCR Gen 3NOS (Sampel 15-21). M: *mark ladder* 50 bp, Sampel 17, 18, 20, 21: GG (*wild type*), Sampel 15 dan 19: GT (heterozigot mutan), Sampel 16: TT (homozigot mutan)

Distribusi Genotip Polimorfisme glu298Asp Gen eNOS

Pada penelitian kali ini, ditemukan subjek dengan genotip *wild type* (GG) sebanyak 20 orang (62,5%). Subjek dengan genotip mutan heterozigot (GT) ditemukan sebanyak 11 orang (34,3%). Sedangkan subjek dengan genotip mutan homozigot (TT) ditemukan sebanyak 1 orang (3,1%). Distribusi genotip disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi Genotip Polimorfisme PROGINS Gen Reseptor Progesteron

Genotip	Jumlah Subjek	Persentase
GG	20	62,5%
GT	11	34,3%
TT	1	3,1%

Kota Palembang merupakan tempat tinggal dengan distribusi GG, GT, maupun TT tertinggi pada penelitian ini. Distribusi genotip berdasarkan tempat tinggal subjek yang lengkap disajikan dalam Tabel 2.

Perbandingan Distribusi Genotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS di Dunia

Penelitian mengenai polimorfisme Glu298Asp gen eNOS telah dilakukan di beberapa negara. Sebagian besar penelitian menunjukkan distribusi genotip GG (*wild type*) lebih tinggi daripada genotip GT (heterozigot mutan) ataupun TT (homozigot mutan). Perbandingan distribusi genotip polimorfisme Glu298Asp eNOS selengkapnya disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 2. Distribusi Genotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS Berdasarkan Karakteristik Sosiodemografi Subjek

Karakteristik Sosiodemografi	Distribusi Genotip		
	GG (<i>wild type</i>)	GT (heterozig ot mutan)	TT (homozig ot mutan)
Kabupaten Muba	1 (3,1%)	2 (6,3%)	0 (0,0%)
Kabupaten Banyuasin	4 (12,5%)	1 (3,1%)	0 (0,0%)
Kabupaten Ogan Ilir	1 (3,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Muara Enim	0 (0,0%)	1 (3,1%)	0 (0,0%)
Palembang	14 (43,8%)	7 (21,9%)	1 (3,1%)

Distribusi Alotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS

Distribusi alotip dengan subjek berjumlah 32 orang ditemukan 51 (79,7%) dengan alotip G dan 13 (20,3%) dengan alotip T. Distribusi alotip disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 3. Perbandingan Distribusi Genotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS di Dunia

Penelitian	n	Distribusi Genotip		
		GG	GT	TT
Yoshimura dkk. (2000) di Jepang. ¹²	35	31	4	0
Yoshimura dkk. (2004) di Bangladesh. ¹²	112	72	35	5
Serrano dkk. (2004) di Kolombia. ¹²	322	217	84	21
Fatini dkk. (2006) di Itali. ¹²	106	42	50	14
Turan dkk. (2009) di Turki. ¹²	55	29	23	3
Aggarwal dkk. (2010) di India. ¹²	120	64	46	10
Pappa dkk. (2011) di Yunani. ¹²	87	22	59	6
Penelitian ini (2013)	32	20	11	1

Tabel 4. Distribusi Alotip Polimorfisme Glu298Asp GeneNOS

Alotip	Total	Persentase
G (<i>wild type</i>)	51	79,7%
T (polimorfik)	13	20,3%

Frekuensi distribusi alotip G terbanyak bertempat tinggal tertinggi ada di Palembang (54,6%). Untuk frekuensi alotip T terbanyak bertempat tinggal di Palembang (14,1%). Distribusi alotip berdasarkan asal suku subjek selengkapnya disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Distribusi Alotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS Berdasarkan Karakteristik Sosiodemografi Subjek

Karakteristik Sosiodemografi	Distribusi Alotip	
	G (<i>wild type</i>)	T (polimorfik)
Kabupaten Muba	4 (6,2%)	2 (3,1%)
Kabupaten Banyuasin	9 (14,1%)	1 (1,6%)
Kabupaten Ogan Ilir	2 (3,1%)	0 (0%)
Muara Enim	1 (1,6%)	1 (1,6%)
Palembang	35 (54,6%)	9 (14,1%)

Perbandingan Distribusi Alotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS di Dunia

Penelitian mengenai polimorfisme Glu298Asp gen eNOS sudah dilakukan di beberapa negara. Semua penelitian menunjukkan distribusi alotip G (*wild type*) lebih tinggi daripada alotip T (polimorfik). Perbandingan distribusi alotip polimorfisme Glu298Asp gen eNOS selengkapnya disajikan dalam Tabel 6.

Tabel 6. Perbandingan Distribusi Alotip Polimorfisme Glu298Asp Gen eNOS di Dunia

Penelitian	Distribusi Alotip	
	G (<i>wild type</i>)	T (polimorfik)
Serrano dkk. (2004) di Kolombia. ⁸	518 (80,4%)	126 (19,6%)
Penelitian ini (2013)	51 (79,7%)	13 (20,3%)

4. Pembahasan

Kelompok usia tertinggi berada pada usia 20-35 tahun sebanyak 18 orang (56,3%), usia ini berada pada usia aman untuk melahirkan yaitu usia 20-30 tahun.¹³ Menurut Bobak (2004), usia yang rentan terkena preeklampsia adalah usia dibawah 18 tahun atau diatas 35 tahun. Menurut Manuaba (1998) pada usia dibawah 18 tahun keadaan alat reproduksi belum siap untuk proses kehamilan. Hal ini akan menyebabkan peningkatan terjadinya keracunan kehamilan atau *toxaemia gravidarum* dalam bentuk preeklampsia dan eklampsia.¹⁴ Sedangkan pada usia 35 tahun, menurut Rochjati, P (2003) usia 35 tahun rentan terjadi penyakit dalam bentuk hipertensi dan eklampsia disebabkan terjadinya perubahan jaringan pada organ reproduksi serta jalan lahir tidak lentur lagi.¹⁵ Menurut Potter, PA (2005), hal ini diakibatkan karena tekanan darah cenderung meningkat dengan pertambahan usia.¹⁶

Gen *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) terletak di area 7q35-q36, yang dikandidatkan sebagai gen yang

berpengaruh di dalam perkembangan preeklampsia.¹⁰ Gen *endothelial nitric oxide synthase* terdiri dari 26 exon dengan panjang gen 21 kb dan mengkode 1203 asam amino.

Nitric oxide (NO) merupakan mediator yang memiliki peranan penting pada proses fisiologis seperti regulasi vaskular, penyembuhan luka, dan efek antiproliferatif pada sel otot polos vaskular. *Nitric oxide* (NO) diproduksi dari asam amino *arginine* dan dikatalisasi oleh enzim *nitric oxide synthase*. *Endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) berperan penting dalam mengontrol tonus pembuluh darah sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, seperti rangsangan mekanik (*shear stress*), reseptor dependen (asetilkolin), dan reseptor independen (*calcium ionophore*).¹⁷

Perubahan basa guanin menjadi timin pada nukleotid ke 894 (G894T) di exon 7 gen eNOS menyebabkan perubahan glutamat (GAG) menjadi aspartat (GAT) di kodon 298.¹⁸ Polimorfisme Glu298Asp gen eNOS memiliki dampak terhadap situs katalitik enzim eNOS, yang menyebabkan terjadinya penurunan fungsi katalitik enzim eNOS yang berdampak pada penurunan sintesis *nitric oxide*. Terjadinya penurunan sintesis *nitric oxide* dapat menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah secara sistemik yang menjadi patogenesis awal dari penyakit preeklampsia.⁹

Polimorfisme Glu298Asp gen eNOS adalah polimorfisme nukleotida tunggal (*single-nucleotide polymorphism*) yaitu perubahan basa guanin menjadi timin pada nukleotid ke 894 (G894T) di exon 7 gen eNOS menyebabkan perubahan glutamat (GAG) menjadi aspartat (GAT) di kodon 298 (Wang, 2012). Polimorfisme Glu298Asp gen eNOS memiliki dampak terhadap situs katalitik enzim eNOS, yang menyebabkan terjadinya penurunan fungsi katalitik enzim eNOS yang berdampak pada penurunan sintesis *nitric oxide*.⁹

Pada penelitian kali ini, ditemukan subjek dengan genotip GG sebanyak 20 orang (62,5%), subjek dengan GT ditemukan sebanyak 11 orang (34,3%), dan subjek dengan genotip TT ditemukan sebanyak 1 orang (3,1%). Pada penelitian sebelumnya, penelitian polimorfisme Glu298Asp gen eNOS seperti di India oleh Aggarwal, dkk (2010), sebanyak 64 subjek (53,3%) memiliki genotip GG, empat puluh enam (38,3%) subjek memiliki genotip GT, dan 10 subjek (8,3%) memiliki genotip TT. Sedangkan penelitian Fatini, dkk (2006) di Italia memiliki hasil yang berbeda, empat puluh dua subjek (39,6%) memiliki genotip GG, lima puluh subjek (47,1%) memiliki genotip GT, dan 14 subjek (13,2%) memiliki genotip TT.¹²

Untuk distribusi alotip, didapatkan 51 alel G (79,7%) dan 13 alel T (20,3%). Dapat ditarik kesimpulan bahwa frekuensi alel G (79,7%) pada penderita preeklampsia di Rumah Sakit Dr. Mohammad Hoelsing Palembang lebih

tinggi daripada frekuensi alel T (20,3%). Penelitian sebelumnya, Serrano, N.C., dkk (2004) yang dilakukan di negara Kolombia, menyimpulkan bahwa terdapat 518 alel G (80,4%) dan 126 alel T (19,6%).¹²

5. Simpulan

Distribusi genotip *wild type* (GG) sebanyak 20 orang (62,5%), genotip mutan heterozigot (GT) sebanyak 11 orang (34,3%), dan mutan homozigot (TT) sebanyak 1 orang (3,1%).

Distribusi alotip *wild type* (G) sebanyak 51 (79,7%), sedangkan distribusi alotip mutan (T) sebanyak 13 (20,3%).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Dr. dr. Mgs. Irsan Saleh, M.Biomed, dr. Subandrate, M.Biomed, Dr. dr. Yuwono, M.Biomed, dan Prof. dr. Hermansyah, Sp.PD-KR atas bimbingan, kritik, dan saran untuk penyempurnaan penelitian. Terima kasih untuk dr. Charnaen atas bantuan pengambilan sampel penelitian. Terima kasih untuk Mbak Venny Patricia, S.Pd, M.Kes bantuan dan pengawasan proses penelitian yang dimulai dari pengisolasian DNA, proses PCR, hingga visualisasi. Terima kasih juga untuk Biomol's Crew (Asep, Retno, Kiki, Aulia, dan Muth) atas bantuan penyelesaian penelitian, serta keluarga yang selalu memberikan dukungan.

Daftar Acuan

1. National Heart Lung and Blood Institute. National High Blood Pressure Education Program : Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnany. Bethesda : National Heart Lung and Blood Institute 2000. p.38.
2. Handaya. Penanganan preeklampsia/eklampsia. Prosiding Seminar Konsep Mutakhir Preeklampsia. Jakarta, Indonesia. 2001.
3. Roberts JM, Redman CWG. Preeklampsia : More Than Pregnancy-induced Hypertension. *Lancet*1993; 341: 1447-1454.
4. Davey DA, MacGillivray I. The Classification and Definition of The Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*1988; 158: 892-898.
5. Isler CM, Rinehart BK, Terrone DA, Martin RW, Magann EF, Martin JN. Maternity Mortality with HELLP (Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, And Low Platelets) Syndrome. *Am J Obstet Gynecol*1999; 181: 924-928.
6. Lindheimer MD, Taler S, Cunningham FG. Hypertensive disorders in pregnancy. *J Am Soc Hyper*2009. 6:484

7. Savvidou, Makrina D., Vallance, Oatrick J.T., Nicolaidis, Kypros H., dkk. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism and Maternal Vascular Adaptation to Pregnancy. *Hypertension*2001. 38:1289-1293.
8. Serrano, Norma C., Casas, Juan P., Diaz, Luis A., dkk. Enothelial NO Synthase Genotype and Risk of Preeclampsia : A Multicenter Case-Control Study. *Hypertension*2004.44:702-707.
9. Komatsu, Miyoko, dkk. eNOS Gene Polymorphism is Associated with Endothelium-dependent Vasodilatation in Type 2 Diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2002. 283:557-561.
10. Zdoukopoulos, Nikos, dkk. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene in preeclampsia: a candidate-gene association study. *BMC Pregnancy and Childbirth*2011. 11:89.
11. Sharma, Deepika, dkk. Role of eNOS (Glu298Asp) Gene Polymorphism and Intergenotypic Variation of Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines in Preeclampsia. *International Journal of Pharma and Bio Science*2010. 184-190.
12. Chen, Yuanxiu, dkk. Polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic retinopathy in a cohort of West Africans. *Molecular Visions* 2007. 13:2142-7.
13. Rozikhan. Faktor-Faktor Risiko Terjadinya Preeklampsia Berat di Rumah Sakit Dr. H. E. Soewondo Kendal. Tesis. Jurusan Epidemiologi Universitas Diponegoro, 2007.
14. Bobak. Buku Ajar Keperawatan Maternitas, Jakarta : EGC, 2004.
15. Rochjati, Poedji. Skrining Antenatal Pada Ibu Hamil, Pengendalian Faktor Risiko, Deteksi Dini Ibu Hamil Resiko Tinggi, Surabaya : Airlangga University Press. 2003.
16. Potter, P.A. Buku Ajar Fundamental Keperawatan. Jakarta : EGC, 2005.
17. Alwi Shahab. Disfungsi Endotel. Media Informasi Kesehatan dan kedokteran (<http://dokter-alwi.blogspot.com/2009/07/rahasia-sel-endotel.html>). 2009.
18. Wang, Meiyun, dkk. Association of G894T polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene with the risk of ischemic stroke: A meta-analysis. *Biomedical Reports*. 2012. 1: 144-150