

PENGARUH EKSTRAK KULIT BUAH NAGA MERAH (*HYLOCEREUS POLYRHIZUS*) TERHADAP KADAR *INTERLEUKIN-6* MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Sagita Candra Puspitasari¹, Hendy Hendarto², Widjiati³

¹ Mahasiswa Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya

² Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo

³ Departemen Embriologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

e-mail : frice_star89@yahoo.co.id

ABSTRAK

Pada endometriosis terjadi proses inflamasi lokal pada pelvis dengan perubahan fungsi sel-sel imun di lingkungan peritoneum. Respon imun pada zahir peritoneum endometriosis berupa peningkatan aktivitas makrofag dan terjadinya sekresi berlebihan beberapa sitokin seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α sehingga menyebabkan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B. Buah naga merah merupakan salah satu tanaman yang mampu menghambat sekresi sitokin NF- κ B dari endometriosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak buah naga merah terhadap kadar Interleukin-6 mencit model endometriosis. Sampel 30 mencit betina dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan dosis bertingkat. Kontrol positif dan kelompok perlakuan dijadikan endometriosis selama 14 hari, kemudian 14 hari berikutnya kelompok positif dan kelompok negatif diberi larutan Na-CMC 0,5%, sedangkan kelompok perlakuan diberi dosis bertingkat. Jenis penelitian ini true eksperimental dengan menggunakan rancangan randomized post test only control group design. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar Interleukin-6 antar kelompok. Pemberian ekstrak kulit buah naga pada mencit model endometriosis dapat menekan kadar Interleukin-6 dengan hasil signifikan $p < 0,05$.

Kata kunci : ekstrak kulit buah *hylocereus polyrhizus*, endometriosis, IL-6,

PENDAHULUAN

Infertilitas didefinisikan sebagai ketidakmampuan untuk tidak terjadinya kehamilan setelah satu tahun berhubungan seksual tanpa proteksi (ASRM, 2012). Pada endometriosis terjadi proses inflamasi lokal pada pelvis dengan perubahan fungsi sel-sel terkait imun di lingkungan peritoneum (Harada, 2001). Beberapa pendekatan dari patomekanisme infertilitas pada endometriosis, berdasarkan dampaknya terhadap sejumlah kondisi patologis seperti adanya perlengketan pelvis dan endometrioma, folikulogenesis yang abnormal dan gangguan fungsi oosit, perubahan fungsi sperma, kualitas embrio berkurang dan gangguan reseptivitas endometrium. Berdasarkan beberapa studi diduga bahwa faktor-faktor pro-inflamasi dan ROS (*reactive oxygen species*) pada cairan folikel wanita dengan endometriosis berdifusi dan mempengaruhi komunikasi autokrin-parakrin dari folikel ovarium yang kemudian menyebabkan perubahan siklus sel dan meningkatnya apoptosis pada sel granulosa. Selain itu, adanya faktor pro-inflamasi dan ROS juga mempengaruhi oosit seperti *abnormal meiotic spindle*, *chromosomal misalignment* dan penurunan produksi GDF-9. Keduanya dapat mengganggu komunikasi sel oosit-granulosa dan menyebabkan folikulogenesis abnormal dan pada gilirannya, menghasilkan penurunan kualitas oosit (Hendarto, 2012).

Perlengketan pada pelvis dapat menghambat motilitas tuba dan *pick-up* ovum merupakan penyebab utama gangguan mekanik pada kesuburan terutama pada endometriosis berat. Endometriosis pelvis, bentuk paling umum dari endometriosis, dikaitkan juga dengan peningkatan sekresi sitokin pro-inflamasi,

gangguan imunitas seluler dan neo-angiogenesis. Terjadinya perlengketan melibatkan tiga komponen penting : 1. Respon inflamasi akut, 2. Fibrinolisis, dan 3. Metalloproteinase dan inhibitor jaringannya. Mediator seluler dalam aliran peritoneum dapat memodulasi respon inflamasi pada area permukaan yang luas karena sifat cairan dari aliran peritoneum. Ada tiga sitokin pro-inflamasi penting yang terlibat dalam pembentukan perlengketan : *interleukin (IL)-1*, *IL-6* dan *Tumor Necrosis Factor (TNF)- α* . *TNF- α* dilaporkan berperan dalam merangsang proliferasi sel stroma endometrium *in vitro* dan perlengketan organ pelvis ini akhirnya dapat menghambat *pick up* ovum setelah ovulasi. Selain itu, endometrioma dapat melekat pada uterus, usus atau dinding pelvis yang dapat ikut juga mengakibatkan gangguan infertilitas (Cheong *et al.*, 2002; Hendarto, 2012).

Mekanisme infertilitas terkait endometriosis yang tidak melibatkan perlengketan dan endometrioma, seperti endometriosis minimal atau ringan dan juga dampak negatif dari semua derajat penyakit pada infertilitas masih belum jelas dipahami. Beberapa pendapat menduga bahwa beberapa mekanisme infertilitas yang terkait dengan endometriosis meliputi folikulogenesis yang terganggu, peningkatan stres oksidatif, perubahan fungsi sistem imun, perubahan lingkungan hormonal dalam folikel dan lingkungan peritoneum, dan penurunan reseptivitas endometrium. Faktor-faktor tersebut menyebabkan rendahnya kualitas oosit, gangguan fertilisasi dan implantasi (Gupta *et al.*, 2008).

Lingkungan mikro peritoneum wanita dengan endometriosis yang mengandung faktor pro-inflamasi dan ROS memiliki peran penting melalui

perubahan komunikasi autokrin-parakrin dalam mekanisme perlengketan pelvis, folikulogenesis yang abnormal, berkurangnya kualitas oosit/embrio, berkurangnya fungsi sperma, dan gangguan implantasi (Hendarto, 2012).

Secara normal, Endometrium yang berasal dari kavum uteri bisa mencapai lingkungan ektopik atau keluar dari kavum uteri diduga dengan berbagai cara, dan dapat tumbuh di tempat yang baru. Yang banyak disebut ialah secara refluks atau *retrograde* melalui tuba falopi saat menstruasi, yang sudah disampaikan dalam teori Sampson. Cara lain yang dapat terjadi saat dilakukan seksio sesarea ke jaringan luka (insisi), saat persalinan ke perineum (robekan, episotomi). Selain itu juga diduga dapat melalui aliran darah dan limfe ke organ yang jauh, seperti paru. Namun endometrium yang berada di jaringan lain tidak otomatis tumbuh menjadi endometriosis (Azinar, 2003).

Walaupun kejadian *retrograde* terjadi pada 76-90% wanita, kejadian endometriosis hanya sekitar 10-15%. Tentu ada keadaan tertentu yang mempermudah atau memungkinkan endometrium ini untuk hidup dan berkembang pada jaringan lain. Prosesnya diterangkan berdasarkan temuan perbedaan kadar, respon biologis hormon seks, *growth factors*, sitokin dan enzim antara penderita endometriosis dan non endometriosis di endometrium, endometrium ektopik/jaringan endometriosis (Azinar, 2003).

Penanganan endometriosis dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu terapi medis dan tindakan bedah. Akan tetapi, angka kekambuhan setelah pengobatan endometriosis cukup tinggi, yaitu sekitar 35% pada endometriosis ringan dan 74% pada endometriosis berat (Speroff, 2011). Hal ini dikarenakan endometriosis

merupakan penyakit yang progresif sehingga kemungkinan memerlukan terapi dalam jangka panjang (Annas *et al.*, 2014).

Salah satu mekanisme infertilitas yang diduga terkait dengan endometriosis yaitu adanya peningkatan stress oksidatif, perubahan fungsi sistem imun, perubahan hormonal di dalam zalir folikel dan zalir peritoneum, dan penurunan reseptivitas endometrium (Gupta *et al.*, 2008).

Perubahan cairan peritoneum yang menunjukkan peningkatan aktivitas makrofag, sekresinya adalah beberapa sitokin yang menyebabkan terjadinya proses apoptosis patologis. Hal ini terutama ditemukan pada endometriosis berat dengan infertilitas, dimana terjadi proses tersebut pada sel granulosa ovarium dengan ditemukan kadar *Interleukin-6 (IL-6)* dan *IL-8* yang tinggi pada cairan peritoneum. Pertumbuhan lebih lanjut dari sel endometrium akibat menstruasi *retrograde* kemungkinan juga melibatkan sistem imun penderita endometriosis. Lingkungan mikro peritoneum wanita dengan endometriosis yang mengandung faktor pro-inflamasi dan ROS memiliki peran penting melalui perubahan komunikasi autokrin-parakrin dalam mekanisme perlengketan pelvis, folikulogenesis yang abnormal, berkurangnya kualitas oosit/embrio, berkurangnya fungsi sperma, dan gangguan implantasi (Hendarto, 2012). Respon imun pada zalir peritoneum endometriosis berupa peningkatan aktivitas makrofag peritoneum, dilanjutkan terjadinya sekresi berlebihan beberapa sitokin oleh makrofag aktif yaitu *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, dan *TNF- α* (Bedaiwy *et al.*, 2002).

Interleukin-6 juga terlibat dalam fisiologi reproduksi, termasuk pengaturan produksi steroid ovarium, folikulogenesis dan peristiwa awal yang berhubungan

dengan implantasi. *Interleukin-6* dihasilkan oleh kedua endometrium eutopik dan ektopik. *Interleukin-6* disekresikan oleh sel-sel endometrium yang memiliki peran penting dalam patogenesis endometriosis (Ilie and Ilie, 2013). *Interleukin-6* sebagai pengatur peradangan dan kekebalan memodulasi sekresi sitokin lain, mempromosikan aktivasi sel T dan diferensiasi sel B dan menghambat pertumbuhan berbagai lini sel monosit, makrofag, fibroblas, sel endotel, sel otot polos pembuluh darah, epitel endometrium, sel stroma dan beberapa kelenjar endokrin termasuk hipofisis dan pankreas (Bedaiwy *et al.*, 2002).

Protein *Interleukin-6* dipicu oleh *IL-1 α* atau β , *TNF- α* , PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) dan IFN- γ (Wahyu, 2012). Terdapat peningkatan jumlah makrofag pada wanita dengan endometriosis sepanjang siklus menstruasi. Endometrium ektopik wanita dengan endometriosis menunjukkan peningkatan produksi *Interleukin-6*. *Interleukin-6* berperan dalam kondisi inflamasi kronis dan disekresikan oleh makrofag serta sel epitel endometrium. *Interleukin-6* diketahui secara signifikan menstimulasi ekspresi aromatase dalam kultur sel stroma endometriosis (Burney and Guidice, 2012).

Interleukin-6 diinisiasi oleh ikatan sitokin terhadap reseptor yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi yaitu NF- κ B (*nuclear factor kappa beta*) di sel granulosa yang kemudian akan menginduksi gen yang terlibat dalam respon inflamasi dan apoptosis (Kim *et al.*, 2006). Jalur ekstrinsik apoptosis dimulai dari perekrutan *adapter protein*, seperti FADD (*Fas associated death domain*), membentuk *death inducing signaling complex* (DISC) untuk mengaktifasi *caspase-8* dan *caspase-10*, yang nantinya

mengaktifkan *caspase-3*. *Caspase 3* merupakan *caspase* yang bertanggung jawab terhadap terjadinya apoptosis pada sel (Kalimuthu, 2013). Adanya *Caspase 3* dapat merangsang kebocoran dari membran plasma dan kerusakan *Deoxiribonucleic acid* (DNA) sehingga sel akan menjadi apoptosis. Apoptosis pada sel granulosa menyebabkan sel menjadi atrofi dan akhirnya terjadi kematian sel. Sehingga jumlah folikel berkurang (Wu *et al.*, 2014; Shalini *et al.*, 2015).

Tinggi rendahnya kadar sitokin dalam zair peritoneum di duga berhubungan erat dengan berat ringannya endometriosis. Perubahan respon imun yang menyimpang di dalam zair peritoneum juga berpengaruh pada folikel ovarium. Aktivitas *caspase*, yaitu suatu protease yang memperantarai terjadinya apoptosis, akan meningkat pada sel granulosa di dalam folikel ovarium penderita endometriosis jika dibandingkan dengan penderita non endometriosis (Oepomo, 2003). Dengan adanya apoptosis yang meningkat, penderita dengan endometrioma memiliki jumlah folikel berkembang, oosit yang dipanen, dan oosit matang yang lebih sedikit (Hendarto, 2012).

Sekresi *TNF- α* oleh makrofag, dan *IL-6* serta *MCP-1* oleh sel endometriosis ini dapat dihambat dengan mencegah aktivasi *NF- κ B*. Selain kurkumin, salah satu tanaman yang telah diketahui mampu menghambat *NF- κ B* adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (Falconer, 2008). Buah naga merah merupakan tanaman yang termasuk dalam kelompok tanaman kaktus atau famili *Cactaceae* dan subfamili *Hylocereanae*. Sebesar 30-35% bagian dari buah naga merah adalah kulitnya dimana kulit buah naga merah mengandung betasianin atau pigmen betalain yang memberi warna kuning,

jingga, merah, dan ungu (Nurliyana *et al.*, 2010; Wybraniec, 2007).

Ekstrak kulit buah naga merah yang mengandung betalain diketahui mampu menghambat aktivasi IKK (*I κ B Kinase*) pada kultur sel karsinoma mammae MCF-7 (Sarasmita dan Laksmiani, 2015). Selain itu, penelitian Martinez *et al.*, 2014 juga membuktikan efek betalain dalam menurunkan migrasi leukosit dan kadar TNF- α peritoneum pada mencit model peritonitis (Martinez *et al.*, 2014). Keuntungan penggunaan ekstrak kulit buah naga merah ini adalah tidak bersifat menekan ovulasi sehingga dapat digunakan bersamaan dengan penanganan infertilitas.

Untuk itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap kadar *Interleukin-6* cairan peritoneum pada hewan coba mencit model endometriosis. Pada penelitian ini akan diujikan tiga sampel mencit endometriosis dengan kadar dosis kulit naga merah 0,25 mg/g BB mencit selama 14 hari untuk uji mencit pertama, 0,5 mg/g BB mencit selama 14 hari pada mencit kedua, dan 1 mg/g BB mencit selama 14 hari pada mencit ke ketiga, dosis ekstrak kulit buah naga merah yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Nugrahaini dan Azizah (2015) tentang uji efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit buah naga merah pada mencit jantan galur Webster Strain.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian *true experimental* dengan menggunakan rancangan acak lengkap *randomized post test only control group design*. kriteria inklusi pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) untuk model endometriosis,

memiliki ukuran berat badan 20-25 gram, mempunyai bulu yang bersih dan tidak mudah rontok, tidak cacat, tidak ada luka. Sedangkan kriteria eksklusi adalah mencit yang mati pada saat pemberian perlakuan, perilaku mencit berubah saat penelitian (lemas dan tidak lincah).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cairan peritoneum dari mencit model endometriosis, ekstrak kulit buah naga merah yang buahnya diperoleh dari kebun Agro Wisata Buah Naga Rembangan Kabupaten Jember, siklosporin A (*Sandimmun*), *water fluid injection*, jaringan endometrium dari operasi tumor jinak pada uterus, *ethynil estradiol*, *ELISA Kit* untuk *Interleukin-6* dan bahan pembuatan sediaan histopatologis. Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba dan laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, mulai bulan Juni sampai Juli 2017, dengan rincian: 1 minggu dilakukan aklimatisasi, 2 minggu untuk pembuatan mencit model endometriosis, 2 minggu perlakuan pemberian ekstrak kulit buah naga merah, dan 3 minggu untuk pemeriksaan *ELISA*, dan pembacaan data statistik.

Pembuatan mencit model endometriosis meliputi beberapa tahapan, yaitu mencit betina yang sudah dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu diberi makan 2 kali sehari dengan pellet ayam, dan diberi minum secara *ad libitum*. Mencit ini kemudian dibagi menjadi kelompok kontrol negatif (K1), kelompok kontrol positif (K2) dan kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5). Kelompok kontrol positif diberikan injeksi plasebo, kelompok kontrol positif (K2) dan kelompok perlakuan (K3, K4, K5) diberikan injeksi siklosporin A (*Sandimmun*) pada hari pertama. Dosis siklosporin A 10 mg/kgBB dikonversi

pada dosis mencit 1,82 mg/mencit. Satu ampul siklosporin A setara 50 mg/ml diencerkan dengan *Water Fluid Injection* sebanyak 4 ml, sehingga siklosporin A diinjeksikan sebanyak 0,2 ml/mencit secara intramuskuler (IM) untuk membuat mencit imunodefisiensi.

Cara penyuntikan secara intramuskuler dilakukan pada otot paha mencit bagian posterior dengan *sprit* 1 ml dan jarum 1 ml. Penyuntikan tidak boleh terlalu dalam agar tidak terkena pembuluh darah mencit. Pada hari pertama perlakuan, mencit kelompok K2, K3, K4, dan K5 juga mendapat injeksi jaringan endometrium secara intraperitoneal. Jaringan endometrium yang akan diinjeksikan pada mencit diambil dari hasil biopsi uterus wanita penderita tumor jinak atau kelainan lain pada uterus selain keganasan, yang tidak menggunakan terapi hormonal selama minimal 3 bulan. Jaringan endometrium yang diperlukan untuk membuat sediaan bagi mencit adalah sebanyak 1 cm³. Jaringan endometrium ini disimpan dalam *phosphate buffer saline* (PBS). Sebelum diinjeksikan pada mencit, dilakukan *washing* sebanyak 2 kali dengan *sentrifuse* 2.500 rpm. Supernatan kemudian dibuang dan ditambahkan PBS, penisilin 200 IU/ml, dan streptomisin 200 µg/ml.

Jaringan basah endometrium ini kemudian diambil dengan *sprit* 3 ml. Setiap mencit akan mendapatkan injeksi intraperitoneal sebanyak 0,1 ml menggunakan *sprit* 1 ml dengan jarum 16G agar jaringan endometrium dapat masuk. Cara penyuntikan secara intraperitoneal pada mencit adalah sebagai berikut: (1) mencit diposisikan agar kepala lebih rendah dari abdomen, (2) abdomen mencit dijepit dengan pinset dan diarahkan ke atas agar rongga peritoneum tampak jelas, (3) *sprit* yang berisi jaringan endometrium kemudian disuntikkan

dengan sudut sekitar 10° dari abdomen pada daerah yang sedikit menepi dari garis tengah agar tidak mengenai kandung kemih, dan tidak terlalu tinggi supaya tidak mengenai hepar mencit. Setelah penyuntikan mencit akan di evaluasi apakah masuk kriteria putus uji atau tidak.

Selanjutnya dilakukan penyuntikan *ethinyl estradiol* secara intramuskular pada hari ke-1 dan ke-5. Sediaan *ethinyl estradiol* dengan dosis 30 µg/kgBB setelah dikonversi ke mencit menjadi 5,4 µg/mencit. Oleh karena sediaan 30 ml mengandung 20.000 IU yang setara dengan 2 mg estradiol, setiap mencit akan mendapatkan injeksi sebanyak 0,1 ml. Penyuntikan secara intramuskuler dilakukan pada otot paha mencit bagian posterior. Apabila pada hari pertama siklosporin A disuntikkan pada paha kanan, maka penyuntikan *ethinyl estradiol* dilakukan pada paha kiri mencit.

Kemudian mencit ditunggu sampai hari ke-14 dengan perawatan pemberian makan dan minum seperti biasa. Setelah hari ke-15, beberapa mencit akan dikorbankan untuk mengetahui terjadi endometriosis, dan kemudian dipapar dengan ekstrak kulit buah naga merah, mencit dipapar ekstrak kulit buah naga merah dosis 0,25 mg/g BB, 0,5 mg/g BB dan 1 mg/gram BB selama 14 hari sebanyak 0,5 ml/mencit. Oleh karena ekstrak kulit buah naga merah tidak larut dalam air, sediaan ekstrak kulit buah naga merah yang diberikan secara per oral pada mencit perlu disuspensikan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%.

Proses ekstraksi kulit buah naga merah dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Kulit buah naga merah digrinder hingga berbentuk bubuk kulit buah naga merah, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan pelarut etanol 96%, dan dikocok selama 2-3 jam.

Selanjutnya, dilakukan perendaman dan ditutup dengan *aluminium foil*. Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi selama 1x24 jam. Kemudian dilakukan penyaringan dan didapatkan filtratnya. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstraksi kental yang bebas dari pelarut.

Pemberian ekstrak kulit buah naga merah per oral pada mencit dilakukan dengan menggunakan sonde lambung. Sonde lambung yang digunakan adalah modifikasi jarum khusus ukuran 20 dengan panjang ± 5 cm. Jarum ini memiliki ujung bulat dan berlubang ke samping. Cara pemberian menggunakan sonde lambung adalah sebagai berikut: (1) sonde lambung ditempelkan pada langit-langit mulut atas mencit, (2) kemudian sonde dimasukkan perlahan-lahan sampai ke esophagus mencit, (3) ekstrak kemudian dimasukkan. Waktu pemberian ekstrak adalah pada pagi hari sebelum mencit diberi makan agar seluruh ekstrak dapat diabsorpsi oleh mencit.

Selanjutnya pengambilan bahan pemeriksaan dilakukan pada hari ke-29 masa perlakuan. Mencit terlebih dahulu dikorbankan dengan anastesi Ketamin dan ACP (Acepromazin) karena pengambilan cairan peritoneum harus dilakukan ketika mencit masih hidup. Dosis ketamin yang digunakan adalah 22-44 mg/kgBB mencit dan dosis acepromazin adalah 0,75 mg/kgBB mencit.

Kemudian untuk memudahkan pengambilan cairan peritoneum, dilakukan *flushing* dengan PBS. Cara *flushing* adalah sebagai berikut: (1) mencit yang telah teranastesi dibuka kulit abdomennya, (2) PBS diambil dengan *sprit* 1 ml sebanyak 1 ml, (3) PBS disuntikkan ke rongga peritoneum mencit. Kemudian, cairan peritoneum mencit yang telah di-*flushing*

diaspirasi menggunakan *sprit* 1 ml. Setelah selesai, mencit kemudian dikuburkan.

Untuk melihat normalitas data, digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila data yang didapatkan berdistribusi normal, akan dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan Uji Tukey (HSD). Apabila data yang didapatkan tidak berdistribusi normal, akan dilanjutkan dengan uji *Kruskall Wallis*, uji *Mann Whitney*. Penelitian ini menggunakan tingkat kemaknaan sebesar 0,05. Menggunakan spss 16.

HASIL

Kadar *interleukin-6* diukur dengan metode *ELISA* menggunakan *ELISA kit Bt. Lab*. Konsentrasi *interleukin-6* pada sampel dapat diketahui dengan membandingkan nilai absorbansi yang didapat pada tiap sampel dengan tabel standar. Kemudian hasilnya dilakukan analisis statistik pada variabel *interleukin-6* dilakukan untuk membuktikan bahwa kadar *interleukin-6* mencit model endometriosis yang diberi Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan dosis 0,25 mg/g BB, 0,5 mg/g BB dan 1 mg/g BB lebih rendah dibandingkan yang tidak diberi.

Tabel 5.1 mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan distribusi kadar *IL-6* dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan dosis 0,25 mg/g BB, kelompok perlakuan dosis 0,5 mg/g BB, dan kelompok perlakuan dosis 1 mg/g BB. Perbedaan tersebut ditunjukkan oleh adanya penurunan dari kadar *IL-6* seiring dosis terapi pemberian ekstrak kulit buah naga merah yang meningkat.

Perbandingan Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Naga Merah Terhadap Kadar Interleukin-6

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku kadar *Interleukin-6* mencit model endometriosis antara kelompok kontrol dan kelompok yang mendapat terapi ekstrak kulit buah naga merah

Rerata Kadar IL-6 (ng/L)					
	K1	K2	K3	K4	K5
IL-6	4,14±2,96	46,71±11,57	56,14±23,39	27,85±22,76	19,28±15,18

Keterangan :

- K1 : Kelompok kontrol negatif
- K2 : Kelompok kontrol positif
- K3 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak kulit buah naga merah dosis 0,25 mg/g BB Mencit
- K4 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak kulit buah naga merah dosis 0,5 mg/g BB Mencit
- K5 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak kulit buah naga merah dosis 1 mg/g BB Mencit

Analisis statistik yang digunakan adalah uji *One Way Anova*. Pada uji one way anova terdapat dua asumsi yang harus dipenuhi yaitu data berdistribusi normal dan varian data homogen. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena sampel dalam penelitian kurang dari 50. Asumsi kenormalan data terpenuhi apabila nilai

signifikansi setiap kelompok lebih besar dari tingkat kesalahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 5% (0,05).

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil uji *Shapiro Wilk* adalah asumsi kenormalan data tidak terpenuhi karena nilai signifikan pada K4 menunjukkan hasil 0,010. $p < 0,05$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna kadar *Interleukin-6* antara kelompok kontrol dan yang mendapat terapi ekstrak kulit buah naga merah. Asumsi yang kedua adalah uji homogenitas varian dengan uji *Levenue* dengan hasil nilai signifikan yang dihasilkan berdasarkan uji *Levenue* sebesar 0,069. Nilai ini lebih besar dari $p > 0,05$ sehingga kesimpulan yang dapat diambil adalah varian data homogen. Karena asumsi kenormalan data tidak terpenuhi, maka kondisi ini menyebabkan uji *One Way Anova* tidak memenuhi syarat sehingga harus digunakan uji *Kruskal Wallis* dengan hasil nilai signifikan yang dihasilkan sebesar 0,004. Nilai ini lebih kecil dari $p < 0,05$ sehingga kesimpulan yang dapat diambil adalah terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai *Interleukin-6* pada semua kelompok.

Untuk menentukan kelompok yang memiliki perbedaan, pengujian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD (Least Square Differences)* dengan hasil nilai signifikansi antara K2 dengan K5 memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang signifikansi antara K2 dengan K5. Nilai signifikansi untuk K2 dengan K3 memiliki nilai lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Kesimpulan yang dapat diambil adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara K2 dengan K3. Data tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan tanpa diberikan terapi

dengan kelompok perlakuan diberikan ekstrak kulit buah naga merah.

PEMBAHASAN

Interleukin-6 adalah sitokin proteolitik yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel, termasuk monosit, limfosit, fibroblast, dan sel endotel. *Interleukin-6* juga mungkin terlibat dalam fisiologi reproduksi, termasuk pengaturan produksi steroid ovarium, folikulogenesis dan peristiwa awal yang berhubungan dengan implantasi. *Interleukin-6* dihasilkan oleh kedua endometrium eutopik dan ectopik. *Interleukin-6* disekresikan oleh sel-sel endometrium yang memiliki peran penting dalam patogenesis endometriosis (Ilie and Ilie, 2013). *Interleukin-6* sebagai pengatur peradangan dan kekebalan memodulasi sekresi sitokin lain, mempromosikan aktivasi sel T dan diferensiasi sel B dan menghambat pertumbuhan berbagai lini sel monosit, makrofag, fibroblas, sel endotel, sel otot polos pembuluh darah, epitel endometrium, sel stroma dan beberapa kelenjar endokrin termasuk hipofisis dan pankreas (Bedaiwy *et al.*, 2002).

Pada penderita endometriosis terjadi gangguan regulasi *interleukin-6* oleh makrograf peritoneum, stroma sel endometrial dan makrofag darah tepi. Implantasi sel endometrial resisten terhadap kerja dari *interleukin-6* yang mengakibatkan terjadi pertumbuhan endometriosis. Tingginya kadar *interleukin-6* dalam zaliir peritoneal penderita endometriosis terbukti pada beberapa penelitian (Martinez *et al.*, 2014).

Pada kandungan ekstrak kulit buah naga juga dapat menghambat enzim IKK yang berdampak pada penurunan ekspresi *nuclear factor kappa β* (NF- κ B) beserta ekspresi gen yang berkaitan dengan sel

endometriosis (seperti *IL-6*) yang dapat menghambat proliferasi sel endometriosis (Falconer, 2008).

Nuclear Factor Kappa Beta merupakan faktor transkripsi penting yang terlibat dalam regulasi respon imun bawaan. Aktivasinya dikontrol oleh beberapa mekanisme umpan balik negatif. Mekanisme pertama melibatkan NF- κ B *responsive inhibitors* I κ B α , yang berikatan langsung dengan NF- κ B dan beredar dalam sitoplasma, mekanisme kedua dimediasi oleh A20, yang merubah aktivitas IKK. Mekanisme umpan balik positif, timbul melalui mekanisme parakrin dan autokrin melalui *TNF- α* , *IL-6* dan sitokin lainnya (Pekalski *et al.*, 2013).

IKB Kinase adalah bagian dari kompleks multiprotein yang terdiri dari subunit IKK- α dan IKK- β yang secara invitro penting dalam fosforilasi I κ B yang diinduksi sitokin. Aktivasi kompleks IKK mengakibatkan fosforilasi dan degradasi I κ B α dan selanjutnya diikuti dengan terlepasnya NF- κ B yang kemudian akan bertranslokasi ke dalam *nucleus* dan mengaktifkan transkripsi berbagai gen yang tergantung - κ B (*κ B-dependent genes*), termasuk *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8* dan berbagai sitokin lainnya (Jobin *et al.*, 1999).

Hasil perhitungan rerata kadar *IL-6* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari kadar *interleukin-6* yang diberikan dosis ekstrak kulit buah naga merah yang semakin meningkat pada K4 dosis 0,5 mg/g BB mencit dan K5 dosis 1 mg/g BB mencit dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K2). Dari tabel 5.1 dapat diketahui kadar *interleukin-6* pada K3, K4 dan K5 mendekati kelompok kontrol negatif (K1) walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini dikarenakan ekstrak kulit buah naga merah memiliki kandungan flavonoid. Semakin tinggi

konsentrasi ekstrak kulit buah naga yang diberikan maka nilai kadar *interleukin-6* mendekati kontrol negatif.

Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan kadar *interleukin-6* kelompok kontrol positif (K2) lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K1). Hal ini didukung penelitian yang dilakukan oleh Martinez *et al.*, (2014) menyatakan bahwa kadar *interleukin-6* pada pasien endometriosis lebih tinggi dibandingkan pasien yang sehat. *Interleukin-6* yang dihasilkan oleh makrofag, secara langsung menginduksi angiogenesis (Ataie-Kachoie *et al.*, 2013). Peran *interleukin-6* adalah sebagai pengatur peradangan pada tumor. Selain itu, *interleukin-6* berperan dalam mempromosikan kelangsungan hidup sel tumor, proliferasi, angiogenesis, vaskulogenesis, metastasis dan retensi obat (Ataie-Kachoie *et al.*, 2013). *Interleukin-6* adalah sitokin multifungsi yang terlibat dalam berbagai proses imunologi dan proliferasi (Salmasi *et al.*, 2008). Kadar *interleukin-6* yang tinggi akan mempromosikan pertumbuhan sel endometriosis ektopik dan implantasinya dengan cara proliferasi, angiogenesis, dimana sitokin ini berkontribusi dalam tampilan sel endometrium ke permukaan peritoneum dan membantu invasi sel endometriosis (May *et al.*, 2010). Dari tabel 5.1 didapatkan hasil bahwa dari ketiga dosis memiliki efektifitas sama, namun dapat disimpulkan bahwa dosis yang paling efektif adalah pada K5 yaitu dosis 1 mg/g BB menciit.

Berdasarkan penelitian uji sitotoksik ekstrak kulit buah naga merah, diketahui bahwa potensi sitotoksik dari ekstrak kulit buah naga merah dapat menghambat protein target I κ B, yaitu IKK (Sarasmita dan Lakmiani, 2015). Hambatan aktivasi NF- κ B ini secara tidak langsung juga akan menurunkan kadar

sitokin proinflamasi *IL-6* yang merupakan sitokin proinflamasi dan aktivator *cascade* untuk aktivasi sitokin lainnya. Subowo (2009) menyatakan bahwa *IL-6* memiliki keterkaitan dengan *IL-1* dan TNF- α , karena ketiga sitokin dihasilkan oleh sel makrofag secara terkoordinasi. Keterkaitan ketiga sitokin tersebut juga karena adanya fungsi masing-masing dapat saling menginduksi pelepasan sel lain. Misalnya *IL-1* atau TNF- α dapat menginduksi pelepasan *IL-6*, sehingga dengan meningkatnya kadar TNF- α maka akan menginduksi peningkatan *IL-6*.

Menurut Asti (2016) pemberian genistein untuk kadar *IL-6* dengan dosis tertentu, justru berdampak ada peningkatan kadar *IL-6* karena terdapat faktor lain yang kemungkinan disebabkan oleh tingkat inflamasi dari masing-masing menciit pada model endometriosis berbeda. Penelitian lain mengatakan genistein menekan pengaruh TNF- α untuk transduksi sinyal ke faktor NF- κ B dan mengaktivasi dari AMPK (*Adenosin Monofosfat Protein Kinase*) juga menekan signaling faktor transkripsi. Dengan adanya stimulasi dari TNF- α maka genistein menurunkan *IL-1*, *IL-6* dan *IL-8* sehingga tidak menginduksi inflamasi. (Jinchao *et al.*, 2014). *IL-6* berinteraksi dengan kompleks reseptor yang terdiri dari glikoprotein 130 yang mengikat *IL-6R*. kemudian reseptor tersebut mengikat *IL-6* dan mengarah ke transduksi sinyal. Sinyal transduksi *IL-6* melibatkan aktivasi anggota keluarga *janus kinase* (JAK) tirosin kinase. Aktivasi kinase ini pada gilirannya menyebabkan fosforilasi tirosin dan aktivasi transduksi sinyal dan aktivator transkripsi (STAT3). Setelah fosforilasi, STAT3 membentuk dimer yang kemudian bertranslokasi ke *nucleus* untuk mengirimkan sinyal dari sel membran ke inti jalur *IL-6*-JAK-STAT3 mengatur ekspresi beberapa gen yang

mengarah ke induksi pertumbuhan sel, diferensiasi dan kelangsungan hidup. Selain STAT3, protein ras juga aktif dalam menanggapi *IL-6*. Aktivasi ras mengarah ke *hyperphosphorylation* dari *mitogen activated protein kinase* (MAPK) dan peningkatan aktivitas kinase serin. MAPK kemudian mengaktifkan faktor transkripsi yang memediasi efek beragam tergantung pada jenis sel, termasuk stimulasi pertumbuhan sel, sintesis akut dan sintesis immunoglobulin (Chalaris *et al.*, 2011; Ataie-Kachoie *et al.*, 2013.) Proses dihasilkannya *IL-6* oleh makrofag selain mengaktifkan jalur NF- κ B juga mengaktifkan jalur MAPK (Ataie-Kachoie *et al.*, 2013).

Dari beberapa penelitian diatas menjadikan alasan mengapa dosis pada K3 lebih tinggi daripada K2, kemungkinan *IL-6* tetapi diproduksi oleh makrofag melewati jalur selain NF-KB, namun ada juga yang melewati jalur MAPK. Sehingga, meskipun jalur NF-KB di blokade dalam hal ini kandungan dari ekstrak kulit buah naga merah, tetapi sekresi *IL-6* bisa melewati jalur lain.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dapat menurunkan kadar *interleukin-6* kelompok mencit model endometriosis dengan dosis paling efektif 1mg/g BB.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengevaluasi ekspresi *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) kadar *Interleukin-6* pada mencit model endometriosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Annas, JY., Hendaro, H., Widjiati. 2014. *Khasiat Berbagai Dosis Suplementasi Kurkumin pada Progresivitas Endometriosis di Hewan Coba Mencit. Majalah Obstetri dan Ginekologi.* 22 (3) : 118-125.
- ASRM, Practice. Committee. 2012. *Endometriosis and infertility: a committee opinion.* 98 : 591-8 Fertility Sterility.
- Asti, A. 2016. Pengaruh pemberian Genistein terhadap penurunan ekspresi TNF- α dan *IL-6* pada mencit model endometriosis. Tesis. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, MH., and Morris, DL. 2013. *Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer.* Cytokine and Growth Factor Rev. 24(2): 163-173.
- Azinar, LD. 2003. *Patogenesis Endometriosis.* Kumpulan Kuliah FER PPDS-Obstetri Ginekologi FK Unair Surabaya. Tidak dipublikasikan.
- Bedaiwy, K., Dunsmoor-Su, R. and Coutifaris, C. 2002. *Effect of endometriosis on in vitro fertilization,* Fertility and Sterility 77 : 1148-55.

- Burney, RO., and Giudice, LC. 2012. *Pathogenesis and Endometriosis Breast Cancer* Rev. 4:197-201. 68.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., John, SR., Scheller. 2011. *The soluble interleukin-6 receptor : Generation and role in inflammation and cancer*. European Journal of Cell Biologi 90: 484-494.
- Cheong, YC., Shelton, JB., Laird, SM., Richmond, M., Kudesia, G., Li, TC., and Ledger, WL., 2002. *IL-1, IL-6, and TNF- α concentration in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesion*. Human Reproduction. I(1) : 69-75.
- Falconer, H. 2008. *Endometriosis and ovarian reserve-inflammation and prognostic markers*. Departement of women and child health, Division of obstetrics and gynecology. Karolinska Institutet. Stockholm, Swedia.
- Gupta, S., Goldberg, J.M., Aziz, N., Goldberg, E., Krajcir, N. and Agarwal, A. 2008. *Pathogenic mechanism in endometriosis-associated infertility*. Fertility Sterility 90 : 247-57.
- Harada, T., Iwabe, T., and Terakawa, N. 2001. *Role of cytokines in endometriosis*. Fertil Steril. 76 : 1-10.
- Hendarto, H. 2012. *Pathomechanism of infertility in endometriosis*, in Endometriosis the basic concept and Current Research Trends. Intech : 343-353.
- Jinchao, L., Jun, Li., Ye, Yue., Yiping, Hu., Wenxiang, C., Ruoxi, L., Xiaohua, P., Peng, Z. 2014. *Genistein suppresses tuor necrosis factor a induced inflammation via modulating reactive oxygen species/Akt/nuclear factorNF-KB and adenosine monophosphate activated ptotein kinase signal pathways in human synoviocyte MH7 a cell*. 8 : 315-323.
- Jobin, C., Bradham, CA., Russo, MP., Juma, B., Narula, AS., Brenner, DA., and Sartor, RB. 1999. *Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kB kinase activity*. The Journal of Immunology.163 (6) : 3474-3483.
- Kalimuthu, S. and Se-Kwon, K. 2013. *Cell survival and apoptosis signaling the United States therapeutic target for cancer : Marine bioactive compounds*. International Journal of Molecular Sciences 14 : 2334-2354.
- Kim, Y.S., Ahn, Y., Hong, M.H., Joo, S.Y., Kim, K.H., Sohn, I.S., Park, H.W. 2006. *Curcumin attenuates Nuclear Factor-k*. The Korean Society of circulation. 36 : 482-489.
- Liie, I., and liie, R. 2013. *Cytokines and Endometriosis the Role of Immunological Alterations*. Biotechnology Molecular Biology and Nanomedicine. 1(2).
- Martinez, RM., Longhi-Balbinot, DT., Zarpelon, AC., Staurengo-Ferrari, L., Baracat, MM., Georgetti, SR., Sassonia, RC., Verri, WA.,

- Casagrande, R. 2014. *Anti-inflammatory Activity of Betalain-Rich Dye of Beta vulgaris: Effect on Edema, Leucocyte Recruitment, Superoxide Anion, and Cytokine Production*. Archives of Pharmacol Research. 38 : 494-504.
- May, K., Conduitt-Hulbert, S., Villiar, J., Kirtley, S., Kennedy, S., Becker, C. 2010. *Peripheral Biomarkers of endometriosis : A systemic Review*. Hum Reprod Update. 16 (6): 651-6745.
- Nugrahaini and Azizah. 2015. *Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Hylocereus polyrhizus Dengan Metode Geliat Pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster*. The Muhammadiyah University. Surakarta.
- Nurliyana, SZ., Suleiman, IMK., Aisyah, MR., Rahim, KR. 2010. *Antioxydant Study Of Pulp And Peels Of Dragon Fruits : A Comparative Study*. International Food Research Journal.17 : 367-375.
- Oepomo, TD. 2003. *Peran IL-6 serta IL-8 dalam zilir peritoneum penderita infertilitas disertai endometriosis dalam proses apoptosis sel granulosa ovari yang patologis*. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pekalski, J., Zuk, PJ., Kochanczk, M., Junkin, M., Kellog, R., Tay, S. and Lipniacki, T. 2013. *Spontaneous NF- κ B activation by autocrine TNF- α signaling : A computational study*. PLOS ONE 8(11) : e78887.
- Salmasi, A., Ph, D., Acil, Y., and Schmutzler, G. 2008. *Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium*.
- Sarasmita dan Laksmiani. 2015. *Test the Sitotoksisitas Ethanol Extract Hylocereus polyrhizus Peel on breast cancer cells in vitro and in silico*. The Udayana University. Bali.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. 2015. *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell Death Differ 22 : 526-539.
- Speroff, L. 2011. *Female Infertility*. page 1137-1190. *Endometriosis*. page 1221-1247. *Regulation of the menstrual Cycle*. page 207-208. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins : eighth edition.
- Subowo. 2009. *Imunobiologi*. Ed 2. Sagung Seto. Jakarta. 121-146.
- Veloso, Bryan. 2007. *Endometriosis dapat picu infertilitas*, Diakses tanggal 04 februari 2017.
- Wahyu , 2012. *Kombinasi Petanda Biologis (IL-6, TNF- α , MMP2, VEGF) dan Gejala serta tanda Klinis sebagai model Prediktor Diagnosis Endometriosis Perempuan masa Reproduksi*. Universitas Indonesia.
- Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J., Hong, Y. 2014. *Caspases : a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and*

apoptosis. Int J boil cci. 10 (9):
1072-1083.

Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka,
K. 2007. *Minor Betalain in Fruit of*
Hylocereus species. J Phytochem.
68: 251-259.