

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-17 LESI DAN LUAS
LESI ENDOMETRIOSIS PADA MENCIT MODEL
ENDOMETRIOSIS**



**ALFI RUHAM BURJIAH
012014653001**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**2022
TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-17 LESI DAN LUAS
LESI ENDOMETRIOSIS PADA MENCIT MODEL
ENDOMETRIOSIS**

**ALFI RUHAM BURJIAH
012014653001**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-17 LESI DAN LUAS LESI
ENDOMETRIOSIS PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS**

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister Kesehatan
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

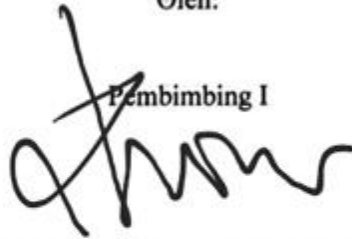
**ALFI RUHAM BURJIAH
012014653001**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

LEMBAR PERSETUJUAN

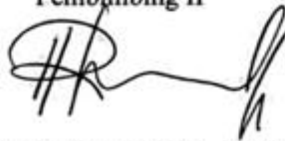
TESIS INI TELAH DISAHKAN PADA TANGGAL
14 OKTOBER 2022

Oleh:

Pembimbing I


Dr. Ashon Sa'adi, dr., Sp. OG (K)
NIP. 196712241997031003

Pembimbing II



Prof. Dr. Widjiati, drh., M. Si
NIP. 196209151990022001

Mengetahui:

Koordinator Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Dr. Ashon Sa'adi, dr., SpOG (K)
NIP. 196712241997031003

LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada Program Studi Ilmu
Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas
Airlangga
pada tanggal 4 Oktober 2022

Panitia penguji,

- Ketua : Dr. Budi Utomo, dr., M. Kes
- Anggota : 1. Dr. Ashon Sa'adi, dr., Sp. OG (K)
2. Prof. Dr. Widjiati, drh., M. Si
3. Dr. Lilik Herawati, dr., M. Kes AIFO
4. Dr. Reny I'tishom, S. Pi, M. Si

Ditetapkan dengan Surat Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas
Airlangga tentang Panitia Penguji Tesis

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis berjudul:

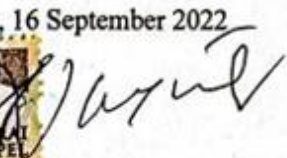
**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-17 LESI DAN LUAS LESI
ENDOMETRIOSIS PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak pernah dipublikasikan atau ditulis oleh individu selain penyusun kecuali bila dituliskan dengan format kutipan dan isi tesis.

Apabila ditemukan bahwa pernyataan saya tidak benar maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 16 September 2022



Alfi Kuham Burjiah
NIM 012014653001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan hidayahNya sehingga saya dapat menyusun dan menyelesaikan tesis dengan judul ‘Pengaruh Pemberian Vitamin D Dosis Bertingkat Terhadap Ekspresi Interleukin-17 Lesi dan Luas Lesi Endometriosis pada Mencit Model Endometriosis’. Tesis ini merupakan tugas akhir dalam menempuh Program Studi Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Bersama ini perkenalkan saya menyampaikan ucapan terima kasih, rasa hormat dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ashon Sa’adi, dr. Sp. OG (K), Ketua Program Studi (KPS) Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan pembimbing ketua pada penelitian saya, atas ilmu, nasehat, bimbingan dan motivasi yang diberikan selama pendidikan dan penelitian.
2. Prof. Dr. Widjiati, drh., M. Si, guru besar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan pembimbing penelitian saya, atas ilmu, nasehat, arahan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan selama penelitian.
3. Dr. Budi Utomo, dr. M. Kes, staf pengajar Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat Kedokteran Pencegahan (IKM-KP) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga selaku dosen dan penguji yang memberikan ilmu, masukan dan arahan dalam penelitian ini.

4. Dr. Lilik Herawati, dr., M. Kes AIFO, staf Departemen Ilmu Faal dan Biokimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga selaku dosen dan penguji yang memberikan ilmu, masukan dan arahan dalam penelitian ini.
5. Dr. Reny I'tishom, S. Pi, M. Si, staf Departemen Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga selaku dosen dan penguji yang memberikan ilmu, masukan dan arahan dalam penelitian ini.
6. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan Program Magister.
7. Semua Dosen dan Staf di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu, bimbingan serta arahan dan dorongan kepada saya selama mengikuti pendidikan.
8. Semua staf Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu selama penelitian berlangsung sampai selesainya penyusunan tesis ini
9. Kedua orang tua saya Drs. H. Ahm. Fanani Ro'is dan Wiwik Sukartinem S. Pd, M.Pd., serta mertua saya R. Munaeni yang telah memberi dukungan moril dan materiil serta memberikan doa tanpa henti.
10. Suami dr Gazali Rusdi Sp. OG atas cinta doa serta dukungan dalam penelitian ini. Putra-putri saya Ahmad Ihsan Gazali, Ahmad Rizal Gazali dan Azkiyah Rahimah Gazali atas pengertian dan pemberian semangat untuk menyelesaikan pendidikan.

11. Semua rekan-rekan program studi Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran angkatan 2019 dan 2020 atas kerjasamanya selama pendidikan.
12. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Saya menyadari penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran yang membangun sangat bermanfaat bagi penelitian ini. Harapan saya adalah semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemajuan dunia kedokteran pada khususnya dan masyarakat pada umumnya. Semoga Allah SWT membalas budi baik semua pihak yang telah memberikan kesempatan, dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan tesis ini, serta melimpahkan petunjuk, rahmat dan hidayahNya. Amin.

Surabaya, 16 September 2022

Penulis



Alfi Ruham Burjiah

RINGKASAN

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-17 LESI DAN LUAS LESI
ENDOMETRIOSIS PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS**

Alfi Ruham Burjiah

Endometriosis merupakan kelainan ginekologis yang cukup sering dijumpai, jinak, estrogen-dependen, dan kronik. Endometriosis tidak hanya berefek secara fisik tetapi juga psikologis, hubungan sosial, kehilangan produktivitas kerja, dan penggunaan sumber daya kesehatan dalam jumlah besar. Tata laksana endometriosis terbagi atas terapi medis, bedah dan non-medis. Berbagai keterbatasan dikaitkan dengan modalitas terapi tersebut sehingga dikembangkan berbagai penelitian tentang alternatif terapi maupun terapi suportif. Adanya gangguan sistem imun dan abnormalitas inflamasi, salah satunya IL-17, pada endometriosis menyebabkan logisnya penggunaan vitamin D sebagai imunomodulator sebagai terapi suportif endometriosis. Pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 pada kondisi endometriosis masih belum diketahui sejauh ini meski logis bila dihipotesiskan suplementasi vitamin D dapat menurunkan pertumbuhan lesi endometriosis melalui modulasi IL-17. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh vitamin D dosis bertingkat 8 IU, 16 IU dan 24 IU terhadap ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis pada peritoneum mencit model endometriosis. Sejauh ini penelitian pengaruh vitamin D pada endometriosis banyak dilakukan secara *in vitro* dan hewan coba, tetapi translasi ke penelitian eksperimental klinis pada manusia masih memiliki kelemahan. Salah satu kelemahan tersebut adalah penggunaan dosis suprafisiologis pada hewan coba berakibat letal, tidak adanya analisis dosis bertingkat serta ketidaksesuaian rute pemberian vitamin D pada penelitian tersebut apabila ditranslasikan ke manusia. Untuk mengatasi kelemahan tersebut penelitian ini menggunakan dosis yang sefisiologis mungkin dengan rute oral. Dosis vitamin D yang digunakan dalam penelitian bertingkat dan dianalisis efektivitasnya dalam modulasi IL-17 dan luas lesi pada endometriosis. Penelitian ini, dengan demikian, memiliki unsur kebaruan yang penting dalam pemahaman mekanisme modulasi vitamin D terhadap IL-17 dan luas lesi endometriosis serta dasar translasional vitamin D sebagai terapi suportif endometriosis pada manusia.

Metode penelitian ini adalah eksperimental rancangan acak lengkap *post test only control group design*. Penelitian ini telah mendapat sertifikasi kelaikan etik dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Mencit (*Mus musculus*) model endometriosis dibagi menjadi empat kelompok masing-masing 6 mencit. Kelompok K sebagai kontrol negatif tidak diberikan perlakuan sedangkan kelompok perlakuan terbagi menjadi 3 yaitu P1, P2 dan P3. Kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 diberikan vitamin D dosis bertingkat perorde lambung berurutan 8 IU, 16 IU dan 24 IU. Mencit diaklimatisasi dan adaptasi setelahnya dilanjutkan dengan pembuatan model. Mencit mulai diberikan perlakuan pada hari kelimabelas selama 21 hari. Mencit diterminasi dan diambil sampel peritoneum pada hari ke-

36. Ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis dari peritoneum selanjutnya diukur dan dianalisis. Uji statistik dilakukan untuk melihat perbedaan rerata luas lesi endometriosis dan ekspresi IL-17 antara kelompok kontrol dan perlakuan, serta korelasi luas lesi endometriosis dan IL-17.

Rerata ekspresi IL-17 pada kelompok perlakuan penelitian ini lebih rendah daripada kontrol yaitu berurutan P1, P2 dan P3 $5,7 \pm 2,8$; $6,3 \pm 2,4$; dan $3,2 \pm 0,3$ vs $6,9 \pm 2,2$. Uji Kruskal Wallis menunjukkan $p = 0,029$ yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan. Uji lanjutan menunjukkan perbedaan signifikan pada kelompok P3 ($p = 0,004$) dan tidak signifikan pada P1 dan P2 ($p = 0,452$ dan $p = 0,645$). Hasil pemeriksaan variabel luas lesi endometriosis menunjukkan rerata pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kontrol yaitu berurutan P1, P2 dan P3 $23,9 \pm 27,6$; $15,8 \pm 16,1$; dan $8,9 \pm 9,6$ vs $63,2 \pm 45,7$. Uji Anova menunjukkan $p = 0,008$ yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan. Uji postHoc Tukey HSD menunjukkan perbedaan signifikan pada P2 dan P3 ($p = 0,023$ dan $p = 0,009$). Uji Korelasi Spearman antara ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis menghasilkan $p = 0,012$ dan $r = 0,505$. Uji rerata antar tingkat dosis terhadap variabel ekspresi IL-17 menunjukkan $p = 0,004$ untuk perbedaan antara P2 vs P3 dan $p > 0,05$ untuk perbedaan antara P1 vs P2 serta P1 vs P3. Uji rerata antar tingkat dosis terhadap variabel luas lesi endometriosis menunjukkan $p > 0,05$ untuk perbedaan antara P1 vs P2, P1 vs P3 serta P2 vs P3.

Pemberian vitamin D pada penelitian ini dapat menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Kecenderungan penurunan ekspresi IL-17 secara konsisten didapatkan pada semua kelompok yang diberikan vitamin D. Analisis statistik menunjukkan perbedaan ekspresi IL-17 yang bermakna antara mencit model endometriosis yang mendapat vitamin D terjadi pada dosis 24 IU bila dibandingkan dengan mencit yang tidak mendapat perlakuan. Sejauh ini penelitian ini merupakan penelitian pertama pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 pada endometriosis. Suplementasi vitamin D diketahui meregulasi IL-17 dan memperbaiki profil berbagai penyakit autoimun pada kadar serum vitamin D lebih dari 20 ng/ml. Mekanisme imunomodulasi IL-17 oleh vitamin D dapat terjadi melalui penurunan jumlah sel penghasil IL-17, hambatan diferensiasi sel T CD4+ menjadi sel Th17 maupun efek represif terhadap ekspresi IL-17. Efek represif terjadi akibat hambatan jalur IL-17/IL-17R melalui mekanisme penekanan transkripsi oleh reseptor vitamin D.

Luas lesi endometriosis yang lebih kecil secara konsisten ditemukan pada kelompok mencit model endometriosis yang mendapat vitamin D. Rerata luas lesi paling kecil ke besar pada mencit model endometriosis yang mendapatkan vitamin D secara berurutan didapatkan pada pemberian dosis 24 IU, 16 IU dan 8 IU. Analisis menunjukkan signifikansi data tersebut secara statistik pada pemberian dosis 16 IU dan 24 IU. Vitamin D memperlihatkan efek anti mitogenik pada sel endometrium ektopik melalui aktivitas hambatan aktivasi nf- κ B, menurunkan jumlah dan sintesis DNA sel endometrium ektopik. Vitamin D selain itu juga dapat mengurangi luas area endometriosis melalui hambatan ekspresi gen VEGF-A dan MMP-9 sehingga kapasitas angiogenesis dan kapasitas invasif lesi endometriosis terhambat.

Penelitian ini menunjukkan hubungan antara ekspresi IL-17 dengan luas lesi endometriosis. Secara statistik, korelasi yang ada signifikan dengan arah positif

yang sedang. Penurunan IL-17 dengan demikian berhubungan dengan penurunan luas lesi endometriosis dan sebaliknya. Jalur pengaturan luas lesi endometriosis melalui modulasi IL-17 oleh vitamin D dengan demikian terbukti pada penelitian ini.

Perbedaan ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis antar tingkatan dosis perlakuan menunjukkan adanya dosis optimal vitamin D. Perbedaan bermakna didapati antara dosis 16 IU dan 24 IU pada variabel ekspresi IL-17. Fungsi regulasi ekspresi IL-17 dengan demikian tergantung dosis vitamin D (*dose-dependent*). Perbedaan antar dosis pada variabel luas lesi endometriosis juga didapati utamanya pada dosis 8 dan 24 IU meski tidak signifikan. Faktor yang mungkin mempengaruhi antara lain bioavailabilitas vitamin D, berbagai mediator inflamasi lain, serta pengaruh vitamin D terhadap estrogen.

Kesimpulan penelitian ini, vitamin D dosis 24 IU dapat menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah dan area lesi endometriosis lebih kecil pada model endometriosis. Terdapat hubungan antara ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis. Kedua variabel tersebut memiliki korelasi positif sedang pada penelitian ini. Terdapat hubungan antara tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis. Dosis optimal dalam menurunkan ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis pada penelitian ini adalah 24 IU. Potensi vitamin D sebagai terapi suportif endometriosis perlu diteliti lebih lanjut di level klinis.

SUMMARY

THE EFFECT OF VITAMIN D ADMINISTRATION ON INTERLEUKIN-17 EXPRESSION AND ENDOMETRIOSIS IMPLANT AREA

Alfi Ruham Burjiah

Endometriosis is a common, benign, estrogen-dependent, and chronic gynaecological disorder. This disease has physical, psychological, and social effects. Financially, endometriosis causes lost productivity and the use of extensive health resources. The treatment is divided into medical, surgical, and non-medical therapies. Various limitations are associated with these therapeutic modalities, so research is developed for alternative treatments and supportive therapies. The presence of immune system disorders and inflammatory abnormalities in endometriosis makes it logical to use vitamin D as an immunomodulator as supportive therapy for endometriosis.

Vitamin D's effect on IL-17 expression in endometriosis is still unknown, although its impact on other diseases has been known. However, it is logical to hypothesize that vitamin D can reduce the growth of endometrial lesions through the modulation of IL-17. This study aims to analyze the effect of vitamin D in graded doses of 8 IU, 16 IU, and 24 IU on the expression of IL-17 and the extent of endometriosis lesions in the peritoneum of endometriosis models of mice. Experimental research in humans still has drawbacks. One of the weaknesses is that the use of supraphysiological doses in experimental animals is fatal, there is no stratified dose analysis, and the inappropriateness of the route of vitamin D administration in this study when translated into humans. This study used a physiological dose orally to overcome these weaknesses. The dose used in this study was stratified and analyzed for its effectiveness in modulating IL-17 and lesion areas in endometriosis. Therefore, this study has an important novelty in understanding the mechanism of vitamin D modulation of IL-17, the extent of endometrial lesions, and as the basis of vitamin D clinical research as supportive therapy for endometriosis in humans.

This study is a randomized post-test-only control group research using mice (*Mus musculus*) as an endometriosis model. The Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, has ethically approved the study. Twenty-four mice were divided equally into four groups. Group K, as a negative control, was not given any treatment. Groups P1, P2, and P3 were given stratified doses of vitamin D as follows 8 IU, 16 IU, and 24 IU. Mice were acclimatized after adaptation, followed by modelling. Mice were given treatment on the fifteenth day for 21 days. Mice were terminated, and peritoneal samples were taken on the 36th day. Interleukin-17 expression and the extent of endometriotic lesions of the peritoneum were further measured and analyzed. We performed statistical tests to see the difference in the mean area of endometriosis lesions and IL-17 expression between the control and treatment groups, as well as the correlation between the extent of endometriosis lesions and IL-17. We also performed a statistical test to find out whether stratified doses have different IL-17 and endometriosis area outcomes.

The mean IL-17 expression was significantly lower after Vitamin D administration, namely P1, P2, and P3 5.7 ± 2.8 ; 6.3 ± 2.4 ; and 3.2 ± 0.3 vs 6.9 ± 2.2 (p: 0.029). there was a significant difference in the P3 group (p: 0.004) but not in P1 and P2 (p: 0.452 and p: 0.645). The mean area of endometriosis in the treatment group was lower, namely P1, P2, and P3, respectively 23.9 ± 27.6 ; 15.8 ± 16.1 ; and 8.9 ± 9.6 vs 63.2 ± 45.7 . Annova test showed p: 0.008, meaning a significant difference between the control and treatment groups. The Tukey HSD postHoc test showed significant differences at P2 and P3 (p: 0.023 and p 0.009). Correlation between IL-17 expression and area of endometriosis tested with The Spearman Correlation Test resulted in p p 0.012 and r 0.505. Various doses of vitamin D showed different outcomes for each variable. The mean difference in IL-17 expression is significant between P2 vs P3 (p 0.004) but not for P1 vs P2 and P1 vs P3 (p > 0.05). The mean difference in endometriosis implant area is found between P1 vs P2, P1 vs P3, and P2 vs P3, although not significant (p > 0.05).

The administration of vitamin D thus resulted in a lower expression of IL-17 compared to the control. Furthermore, we found a decreasing tendency in IL-17 expression in all groups given vitamin D. Statistical analysis showed a significant difference in IL-17 expression between endometriosis-associated mice that received vitamin D at a dose of 24 IU compared to mice that did not receive treatment. So far, this study is the first study of the effect of vitamin D on IL-17 expression in endometriosis. Vitamin D supplementation is known to regulate IL-17 and improve the profile of various autoimmune diseases at serum vitamin D levels of more than 20 ng/ml. The mechanism of IL-17 immunomodulation by vitamin D can occur through a decrease in the number of IL-17-producing cells, inhibition of differentiation of CD4+ T cells into Th17 cells, and a repressive effect on IL-17 expression. 17. The repressive effect occurs due to inhibition of the IL-17/IL-17R pathway through the mechanism of transcription suppression by the vitamin D receptor. We found a tendency for a smaller area of endometriosis lesions when given vitamin D. The smallest to largest mean lesion areas in endometriosis model mice that received vitamin D, respectively, were obtained at doses of 24 IU, 16 IU, and 8 IU. The analysis showed the statistical significance of the data at 16 IU and 24 IU doses. Vitamin D exhibits anti-mitogenic effects on ectopic endometrial cells by inhibiting nf- κ B activation, reducing the number and DNA synthesis of ectopic endometrial cells. Vitamin D can also reduce the area of endometriosis by inhibiting VEGF-A and MMP-9 gene expression, inhibiting the angiogenesis capacity and invasive capacity of endometrial lesions. This study showed a relationship between IL-17 expression and the extent of endometriosis lesions. Statistically, the correlation is significant with a moderate positive direction. A decrease in IL-17 is thus associated with reducing endometrial lesions and vice versa. The pathway for broad regulation of endometrial lesions through the modulation of IL-17 by vitamin D was thus evident in this study.

Differences in the expression of IL-17 and the extent of endometriosis lesions between treatment doses indicated the optimal dose of vitamin D. Significant differences were found between 16 IU and 24 IU doses in the IL-17 expression variable. The regulatory function of IL-17 expression is thus dose-dependent. Differences between doses on the variable area of endometriosis lesions were found mainly at doses of 8 and 24 IU, although not significant. Factors that

may influence these outcomes are the bioavailability of vitamin D, various other inflammatory mediators, and the effect of vitamin D on estrogen.

This study concludes that vitamin D can cause lower IL-17 expression and smaller endometriosis lesion areas in endometriosis model mice. The expression of IL-17 and the extent of endometriosis lesions had a moderately positive correlation in this study. Furthermore, these outcomes are modulated depending on the optimal dose of 24 IU. Further research on vitamin D as supportive therapy for endometriosis potency is warranted.

ABSTRAK

Pengaruh Pemberian Vitamin D Dosis Bertingkat terhadap Ekspresi Interleukin-17 Lesi dan Luas Lesi Endometriosis pada Mencit Model Endometriosis

Alfi Ruham Burjiah

Latar Belakang. Gangguan imunologi dan inflamasi pada endometriosis merupakan dasar ilmiah penggunaan vitamin D sebagai terapi suportif. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh vitamin D dosis bertingkat terhadap ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis pada peritoneum mencit model endometriosis

Metode. Mencit model endometriosis sejumlah 24 ekor dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok K sebagai kontrol negatif, serta P1, P2 dan P3 sebagai perlakuan pemberian vitamin D. Vitamin D diberikan pada P1, P2 dan P3 secara oral dengan dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU selama 3 minggu. Luas lesi endometriosis dari peritoneum diukur dengan *motic images* setelah terminasi. Ekspresi IL-17 diukur dengan imunohistokimia.

Hasil. Ekspresi IL-17 lebih rendah secara signifikan dengan pemberian 24 IU vitamin D ($p = 0,004$). Dosis 8 dan 16 IU menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah, meski tidak bermakna ($p = 0,452$ dan $p = 0,645$). Vitamin D dosis 16 IU dan 24 IU menyebabkan lesi endometriosis lebih kecil ($p = 0,023$ dan $0,009$). Luas lesi endometriosis lebih kecil dengan dosis 8 IU tetapi tidak signifikan ($p > 0,05$). Pengaturan ekspresi IL-17 secara signifikan tergantung pada tingkat dosis vitamin D, yaitu 24 IU ($p = 0,004$). Dosis serupa menyebabkan lesi endometriosis paling kecil meski belum optimal ($p > 0,05$). Ekspresi IL-17 berkorelasi positif sedang dengan luas lesi endometriosis ($p = 0,012$, $\rho = 0,505$).

Kesimpulan. Vitamin D dosis 24 IU menyebabkan luas lesi endometriosis secara lebih kecil melalui penurunan ekspresi IL-17. Penelitian klinis potensi vitamin D sebagai terapi suportif endometriosis perlu dikembangkan.

Kata Kunci: Vitamin D, Interleukin-17, Endometriosis, SDG.

Abstract

The Effect of Vitamin D Administration on Interleukin-17 Expression and Endometriosis Implant Area

Alfi Ruham Burjiah

Introduction. Endometriosis's immunological and inflammatory disorders are the scientific basis for using vitamin D as supportive therapy. Therefore, this study aimed to analyze the effect of multi-dose vitamin D on the expression of IL-17 and the extent of endometriosis lesions in the peritoneum of endometriosis model mice.

Method. Endometriosis was induced in twenty-four mice by injecting human endometrial cells into the peritoneum. Three groups of mice were given vitamin D 8 IU, 16 IU, and 24 IU for 21 days. The Control group had no treatment. On day 36, the mice were terminated. Motoc images measured the extent of the endometriotic lesion of the peritoneum after termination. Interleukin-17 expression was measured using immunohistochemistry.

Results. Interleukin-17 expression was significantly lower after 24 IU of vitamin D administration ($p = 0.004$). Vitamin D doses of 8 IU and 16 IU caused lower IL-17 expression, although not significant ($p = 0.452$ and $p = 0.645$). The area of endometriosis lesions was smaller after 16 IU and 24 IU of vitamin D administration ($p = 0.023$ and 0.009). Endometriosis lesion also tends to be smaller after 8 IU of vitamin D supplementation, although insignificant ($p > 0.05$). The regulation of IL-17 expression was significantly dependent on the dose level of vitamin D with an optimal dose of 24 IU ($p = 0.004$). This dose also caused the smallest endometriosis lesion, although not optimal ($p > 0.05$). IL-17 expression was moderately and positively correlated with the extent of endometriosis lesions ($p = 0.012$, $\rho = 0.505$).

Conclusion. Vitamin D caused a significantly smaller endometriosis lesion area by modulating IL-17 expression. The optimal dose level for vitamin D is 24 IU. Further clinical research on vitamin D's therapeutic potential is warranted.

Keywords: Vitamin D, Interleukin-17, Endometriosis, SDG

DAFTAR ISI

Halaman Prasyarat Gelar.....	iii
Lembar Persetujuan.....	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji.....	v
Pernyataan Keaslian Penelitian	vi
Ucapan Terima Kasih.....	vii
Ringkasan.....	x
<i>Summary</i>	xiii
Abstrak	xvi
<i>Abstract</i>	xvii
DAFTAR ISI.....	xviii
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat teoretis.....	6
1.4.2 Manfaat praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Endometriosis	7
2.1.1 Definisi.....	7
2.1.2 Epidemiologi.....	7
2.1.3 Patogenesis.....	8
2.1.4 Diagnosis.....	10
2.2 Imunologi pada Patogenesis Endometriosis	12
2.2.1 Makrofag dan monosit	13
2.2.2 Neutrofil dan eosinofil	16
2.2.3 Sel dendritik	17
2.2.4 Sel <i>Uterine Natural Killer</i> (uNK)	17
2.2.5 Sel mast	18
2.2.6 Limfosit.....	18
2.3 Interleukin-17 pada Endometriosis.....	22
2.4 Vitamin D	25
2.4.1 Sumber vitamin D	26
2.4.2 Absorpsi, metabolisme dan mekanisme kerja vitamin D.....	27
2.4.3 Defisiensi vitamin D	30
2.4.4 Dosis dan toksisitas vitamin D.....	31

2.4.5	Vitamin D dan sistem imun	33
2.4.6	Vitamin D dan sistem reproduksi perempuan	34
2.4.7	Vitamin D dan endometriosis.....	35
2.4.8	Vitamin D dan Interleukin-17	38
BAB 3	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	41
3.1	Kerangka Konsep	41
3.2	Hipotesis Penelitian.....	45
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	46
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	46
4.2	Lokasi dan Waktu	46
4.3	Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel.....	47
4.3.1	Sampel.....	47
4.3.2	Estimasi besar sampel	47
4.3.3	Teknik pengambilan sampel	48
4.4	Variabel Penelitian	48
4.4.1	Variabel terikat.....	48
4.4.2	Variabel bebas	49
4.4.3	Variabel Kendali	49
4.5	Definisi Operasional.....	49
4.6	Bahan dan Instrumen Penelitian.....	49
4.6.1.	Bahan penelitian.....	49
4.6.2.	Instrumen penelitian.....	51
4.7	Prosedur dan Tahapan Penelitian	51
4.7.1	Persiapan hewan coba	51
4.7.2	Randomisasi dan alokasi hewan coba	51
4.7.3	Aklimatisasi dan adaptasi.....	52
4.7.4	Persiapan pembuatan model.....	52
4.7.5	Pembuatan suplementasi vitamin D	53
4.7.6	Pemberian perlakuan sesuai kelompok	53
4.7.7	Pengambilan bahan pemeriksaan dan pengukuran variabel.....	54
4.8	Pengolahan dan Analisa Data.....	55
4.9	Kerangka Operasional Penelitian.....	56
4.10	Uji Kelayakan Etik.....	56
BAB 5	HASIL PENELITIAN	58
5.1	Gambaran Umum Penelitian	58
5.2	Pengaruh Vitamin D terhadap Ekspresi IL – 17	59
5.3	Pengaruh Vitamin D terhadap Luas Lesi Endometriosis	63
5.4	Hubungan Ekspresi Interleukin-17 dengan Luas Lesi Endometriosis	66
5.5	Hubungan Tingkat Dosis dengan Luas Lesi dan Ekspresi IL-17.....	66
5.6.1	Hubungan tingkat dosis vitamin D dan ekspresi Interleukin-17	66
5.6.2	Hubungan tingkat dosis vitamin d dan luas lesi endometriosis	67
BAB 6	PEMBAHASAN	68
6.1	Mencit sebagai Model Endometriosis	68
6.2	Hubungan Vitamin D dengan Interleukin-17.....	69

6.3	Hubungan Vitamin D dengan Luas Lesi Endometriosis.....	72
6.4	Hubungan Ekspresi Interleukin-17 dengan Luas Lesi Endometriosis.	74
6.5	Hubungan Tingkat Dosis dengan Ekspresi IL-17 dan Luas Lesi.....	75
6.5.1	Hubungan tingkat dosis dengan ekspresi IL-17	75
6.5.2	Hubungan tingkatan dosis vitamin D dengan luas lesi endometriosis.....	78
6.6	Keunggulan dan Kebaruan Penelitian.....	79
6.7	Keterbatasan Penelitian.....	80
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		83
7.1	Kesimpulan	83
7.2	Saran.....	83
DAFTAR PUSTAKA		85

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1	Berbagai subset sel T dan sifat-sifatnya	19
Tabel 4. 1	Definisi operasional variabel	50
Tabel 5.1	Rerata dan simpang baku skor ekspresi IL-17 antar kelompok.....	61
Tabel 5. 2	Perbandingan skor ekspresi IL-17 antar kelompok..	62
Tabel 5.3	Rerata dan simpang baku luas lesi endometriosis..	64
Tabel 5. 4	Perbandingan luas lesi endometriosis antar kelompok.	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Patogenesis dan patofisiologi Endometriosis.....	8
Gambar 2. 2	Pengaruh IL-17 pada polarisasi Makrofag endometriosis	25
Gambar 2. 3	Biosintesa dan metabolisme vitamin D.	29
Gambar 3. 1	Kerangka konsep penelitian	41
Gambar 4. 1	Skema rancangan penelitian.....	46
Gambar 4. 2	Kerangka operasional penelitian	57
Gambar 5. 1	Perbandingan gambaran ekspresi IL-17 pada sel endometriosis	60
Gambar 5. 2	Grafik box-plot distribusi ekspresi IL-17	60
Gambar 5. 3	Lesi endometriosis pada mencit model endometriosis.....	63
Gambar 5. 4	Distribusi data luas lesi endometriosis.....	64
Gambar 5. 5	Grafik hubungan antara IL-17 dan luas lesi endometriosis.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik Penelitian.....	94
Lampiran 2 Olah Data dan Analisis Statistik.....	95

DAFTAR ARTI, LAMBANG, DAN SINGKATAN

1,25(OH) ₂ D ₃	: 1,25-dihidroxycholecalciferol
25(OH)D	: 25 hidroksi vitamin D
AKG	: Angka Kecukupan Gizi
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BCL6	: <i>B-cell lymphoma 6</i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
COUP-TFII	: <i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase 2</i>
CTLA	: <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated</i>
CYP27B1	: enzim 1-1- α -hydroxylase
CXCL	: <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
DC	: <i>Dendritic cell</i>
DEFB	: Defensin β 2
DM	: Diabetes Mellitus
ESHRE	: <i>European Society for Human Reproduction and Embriology</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
G-CSF	: <i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GLI1	: <i>Gli family zinc finger 1</i>
GWAS	: <i>Genome wide associaton study</i>
hCAP18	: <i>cathelicidin antimicrobial peptide</i>
hs-CRP	: <i>high sensitivity C Reactive Protein</i>
HIF1 α	: <i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha</i>
IFN- γ	: interferon gamma
IGF	: <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IHH	: <i>Indian Hedgehog</i>
IHK	: Imunohistokimia
IL-4	: Interleukin - 4
IL-6	: Interleukin - 6
IL-8	: Interleukin - 8
IL-9	: Interleukin - 9
IL-17	: Interleukin - 17
IL-22	: Interleukin - 22
IL-1 β	: Interleukin - 1 Beta
IL-17R	: Reseptor Interleukin - 17
IRS	: <i>Imunoreactive Score</i>
IU	: <i>International Unit</i>
LPS	: lipopolisakarida
M ϕ	: makrofag
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCG	: Mikrogram
MCP	: <i>monocyte chemotactic protein</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Class</i>
MIF	: <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MMP	: <i>Matrix Metallo Proteinase</i>
MS	: <i>multiple sclerosis</i>
mTOR	: <i>the mammalian target of rapamycin</i>

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor- Kappa B</i>
NGF	: <i>Neural Growht Factor</i>
NK	: <i>sel Natural Killer</i>
ng	: <i>nano gram</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCOS	: <i>polycystic ovarian syndrome</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PG	: <i>Prostaglandin</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphatidylinositide-3-Kinase/ Protein Kinase B</i>
PR	: <i>Progesteron Receptor</i>
Rantes	: <i>Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted</i>
RNA	: <i>Ribonukleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
R-VD	: <i>Reseptor Vitamin D</i>
RXR	: <i>Retinoid X Receptor</i>
SPM	: <i>Small Peritoneal Macrophage</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Star	: <i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TCR	: <i>T cell Receptor</i>
TGF-1 β	: <i>Transforming Growth Factor- 1β</i>
Th	: <i>sel T helper</i>
Treg	: <i>sel T regulatory</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>
uNK	: <i>Uterine Natural Killer Cell</i>
UV	: <i>Ultra violet</i>
VDR	: <i>Vitamin D Receptor</i>
VDRE	: <i>Vitamin D response element</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vit D	: <i>Vitamin D</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endometriosis merupakan kelainan ginekologis yang cukup sering dijumpai, jinak, estrogen-dependen, dan kronik (Giudice dan Kao, 2004; Zondervan *et al.*, 2020). Adanya jaringan mirip endometrium yang berada di luar kavum uteri dan menginduksi reaksi inflamasi kronis merupakan ciri kelainan ini (Giudice dan Kao, 2004; Hendarto, 2015). Nyeri, termasuk dismenorea, dispareuni, dischezia, dan nyeri pelvik kronik serta infertilitas merupakan manifestasi klinis endometriosis. Kondisi nyeri ini tidak hanya berefek secara fisik tetapi juga psikologis, antara lain menyebabkan kondisi depresi, ansietas dan hubungan sosial. Endometriosis juga menyebabkan kehilangan produktivitas kerja akibat *fatigue*, beban psikis dan penggunaan sumber daya kesehatan dalam jumlah besar (Della Corte *et al.*, 2020; Mińko *et al.*, 2021).

Prevalensi pasti endometriosis sulit diketahui. Prevalensi endometriosis diestimasikan sebesar 10% pada populasi wanita usia reproduksi secara global (Zondervan *et al.*, 2020). Kejadian pada populasi perempuan dengan infertilitas berdasar data Klinik Fertilitas RS Dr. Soetomo Surabaya mencapai hingga 50% (Hendarto, 2015). Ketidakpastian jumlah kejadian disebabkan berbagai hal antara lain kondisi asimtomatis, modalitas pencitraan memiliki sensitivitas rendah, dan diagnosis definitif memerlukan visualisasi melalui pembedahan (Hendarto, 2015; Zondervan *et al.*, 2020). Kondisi ini juga menyebabkan keterlambatan penegakan diagnosis. Penanganan endometriosis yang suboptimal akibat keterlambatan

diagnosis dapat menyebabkan penurunan kualitas hidup pasien dalam aspek fisik, seksual, psikologis dan sosial (Nnoaham *et al.*, 2011; Namazi *et al.*, 2021).

Patogenesis dan patofisiologi pasti dari endometriosis masih sulit dijelaskan, meski berbagai mekanisme telah dikemukakan. Teori menstruasi retrograde, metaplasia selomik dan sirkulasi sel punca melalui aliran vaskular dan limfatik berupaya menjelaskan asal sel endometrium di lokasi ektopik. Mekanisme hormonal, inflamasi ataupun *milieu* imunologik, serta kerentanan genetik memungkinkan sel endometrium terimplantasi, dan tumbuh di lokasi ektopik (Parasar *et al.*, 2017). Sistem imun diketahui terlibat pada patogenesis endometriosis melalui kurangnya surveillance imun di peritoneum (Giudice dan Kao, 2004). Salah satu sitokin yang berperan dalam perkembangan lesi endometriosis adalah interleukin-17 (IL-17). Jumlah sel Th17 dan Kadar IL-17 diketahui berkorelasi dengan derajat keparahan endometriosis (Izumi *et al.*, 2018). Berbagai peran IL-17 yang telah diketahui pada patogenesis endometriosis antara lain kemotaktik makrofag, induksi polarisasi makrofag menjadi fenotip M2 patogenik, dan stimulasi faktor-faktor inflamasi seperti IL-8, COX-2, VEGF (Hirata *et al.*, 2008; Kuwabara *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2020).

Endometriosis merupakan penyakit yang progresif dengan angka rekurensi tinggi (Brosens, *et al.*, 2013). Tata laksana endometriosis terbagi atas terapi medis, bedah dan non-medis (Becker *et al.*, 2022). Berbagai keterbatasan dikaitkan dengan modalitas terapi tersebut sehingga dikembangkan pemikiran untuk pengembangan alternatif terapi maupun terapi suportif (Bedaiwy *et al.*, 2017). Adanya gangguan sistem imun dan abnormalitas inflamasi pada endometriosis menyebabkan logisnya penggunaan suatu imunomodulator sebagai terapi suportif endometriosis.

Vitamin D diketahui berperan dalam imunomodulasi karena adanya ekspresi reseptor vitamin D (VDR) dan enzim pengaktif vitamin D pada sel-sel imun. Defisiensi vitamin D juga dikaitkan dengan berbagai risiko gangguan sistem imun, seperti yang terjadi pada endometriosis. (Prietl *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Endometriosis dihubungkan dengan kondisi defisiensi vitamin D serta berkorelasi terbalik dengan derajat penyakit dan luas area endometriosis (Miyashita *et al.*, 2016; Ciavattini *et al.*, 2017). Endometrium eutopik dan ectopik serta sel-sel imun teraktivasi pada lesi endometriosis seperti sel Th17 memiliki reseptor vitamin dan enzim untuk metabolisme vitamin D (Cermisoni *et al.*, 2018; Soave *et al.*, 2018; Giampaolino *et al.*, 2019). Vitamin D juga diketahui berperan dalam memodulasi kondisi inflamasi, proliferasi sel, angiogenesis dan luas lesi endometriosis (Yildirim *et al.*, 2014; Delbandi *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2016; Cermisoni *et al.*, 2018). Modulasi perkembangan endometriosis oleh vitamin D diperkirakan dapat melalui jalur regulasi lain (Abbas *et al.*, 2013; Delbandi *et al.*, 2016; Cermisoni *et al.*, 2018).

Jalur modulasi lain yang diusulkan oleh peneliti adalah modulasi ekspresi IL-17 oleh Vitamin D. Suplementasi vitamin D diketahui meregulasi IL-17 dan memperbaiki profil berbagai penyakit autoimun pada kadar serum vitamin D lebih dari 20 ng/ml (Bruce *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011; Bhargava *et al.*, 2015; Aly *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2019; Ghorbani *et al.*, 2021; Mahmoud *et al.*, 2021). Pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 pada kondisi endometriosis masih belum diketahui sejauh ini, meski logis bila dihipotesiskan suplementasi vitamin D dapat menurunkan pertumbuhan lesi endometriosis melalui modulasi IL-17.

Sejauh ini penelitian pengaruh vitamin D pada endometriosis banyak dilakukan secara *in vitro* dan hewan coba, tetapi translasi ke penelitian

eksperimental klinis pada manusia masih memiliki kelemahan. Salah satu kelemahan tersebut adalah penggunaan dosis suprafisiologis secara *in vitro* dan pada hewan coba berakibat letal serta ketidaksesuaian rute pemberian vitamin D pada penelitian tersebut apabila ditranslasikan ke manusia. Peneliti memikirkan solusi kelemahan tersebut yaitu penggunaan dosis yang fisiologis mungkin dengan rute oral pada penelitian ini.

Endometriosis diketahui erat hubungannya dengan kondisi defisiensi vitamin D (Miyashita *et al.*, 2016; Anastasi *et al.*, 2017; Ciavattini *et al.*, 2017; Delbandi *et al.*, 2021). Dosis suplementasi yang efektif untuk modulasi IL-17 pada endometriosis dalam penelitian ini sesuai dengan suplementasi untuk koreksi defisiensi vitamin D. *Endocrine Society* merekomendasikan penanganan defisiensi vitamin D dengan pemberian 6000 IU harian hingga 12 minggu (Holick *et al.*, 2011). Dosis optimal untuk modulasi sistem imun sayangnya belum diketahui dengan jelas. Kedua faktor tersebut menjadi dasar penggunaan dosis bertingkat vitamin D terhadap ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis serta hubungan antara variabel tersebut. Hal tersebut menjadikan penelitian ini penting dalam pemahaman mekanisme modulasi vitamin D pada endometriosis dan dasar translasional vitamin D sebagai terapi suportif endometriosis pada manusia.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah suplementasi vitamin D dengan dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah pada lesi peritoneum mencit model endometriosis?

2. Apakah suplementasi vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU menyebabkan area lesi endometriosis lebih kecil pada mencit model endometriosis?
3. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi IL-17 pada lesi endometriosis dengan luas lesi endometriosis?
4. Apakah ada hubungan antara tingkatan dosis vitamin D dalam ekspresi IL-17 dan luas area lesi endometriosis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menganalisis pengaruh vitamin D dosis bertingkat 8 IU, 16 IU dan 24 IU terhadap ekspresi IL-17 lesi endometriosis dan luas lesi endometriosis pada peritoneum mencit model endometriosis.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan suplementasi vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU dapat menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah pada lesi endometriosis peritoneum pada mencit model endometriosis.
2. Membuktikan suplementasi vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU dapat menyebabkan luas area endometriosis lebih kecil pada mencit model endometriosis.
3. Menganalisis hubungan antara ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis.
4. Menganalisis hubungan tingkatan dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17 dan luas area lesi endometriosis.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoretis

1. Sebagai informasi ilmiah mekanisme vitamin D terhadap *milieu* imunologi cairan peritoneum pada mencit model endometriosis terutama pada ekspresi IL-17 lesi dan area lesi endometriosis pada mencit model endometriosis.
2. Sebagai informasi ilmiah hubungan antara ekspresi IL-17 lesi dan area lesi endometriosis di bawah pengaruh berbagai dosis vitamin D mencit model endometriosis.
3. Sebagai referensi ilmiah untuk penentuan dosis suplementasi vitamin D untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat praktis

Menjadi referensi atau dasar penelitian translasional pada manusia berupa penelitian klinis suplementasi vitamin D pada endometriosis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endometriosis

2.1.1 Definisi

Endometriosis didefinisikan sebagai adanya jaringan endometrium baik epitel kelenjar maupun stroma di luar lokasi normalnya di endometrium (Giudice dan Kao, 2004). Inflamasi sebagai respon imun terhadap endometrium ektopik menciptakan fenomena autoimun pada endometriosis. Perubahan kemokin dapat secara langsung menarget sel T, monosit, dan leukosit lain (Lessey dan Young, 2019). Reaksi inflamasi semakin tinggi seiring dengan peningkatan stadium endometriosis, ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α (Hendarto, 2015). Endometriosis dicirikan dengan perkembangan jaringan endometrium ektopik yang mengalami siklus serupa dengan endometrium eutopik, mengalami inflamasi, peluruhan dan regenerasi sepanjang siklus menstruasi (Evans *et al.*, 2016). Lokasi-lokasi jaringan endometrium di luar kavum uteri dapat di peritoneum panggul, ovarium, dinding uterus, kavum douglasi, septum rektovagina, ureter, vesica urinaria, bahkan usus, apendiks, pleura dan sebagainya (Hendarto, 2015).

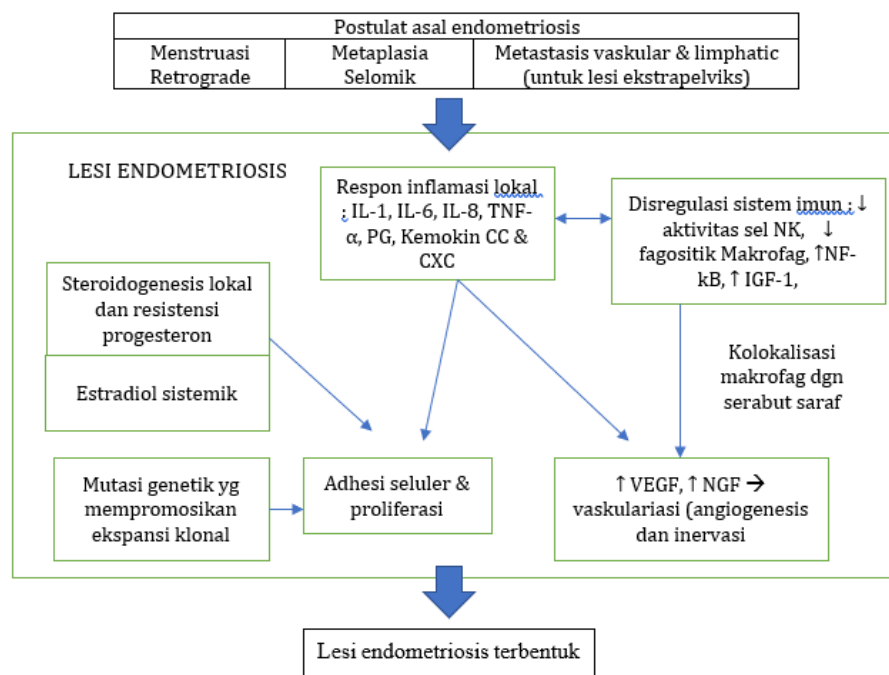
2.1.2 Epidemiologi

Endometriosis secara umum diestimasikan terjadi pada 10% wanita usia reproduksi. Prevalensi bervariasi tergantung populasi yang dipelajari, pada populasi wanita usia subur hingga mencapai 10% dan pada perempuan dengan infertilitas bahkan hingga 50% (Hendarto, 2015; Zondervan *et al.*, 2020). Jumlah pastinya tidak jelas karena adanya endometriosis yang asimtomatis, modalitas pencitraan

memiliki sensitivitas rendah, dan diagnosis definitif memerlukan visualisasi (Hendarto, 2015; Zondervan *et al.*, 2020).

2.1.3 Patogenesis

Patogenesis dan patofisiologi endometriosis sangat kompleks, dengan berbagai teori terkait dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Patogenesis dan patofisiologi Endometriosis (Zondervan *et al.*, 2020)

Perkembangan endometriosis melibatkan interaksi proses endokrin, imunologi, proinflamasi, dan proangiogenik. Postulasi asal jaringan endometriosis adalah dari menstruasi retrograd, metaplasia selomik, dan metastasis limfatik dan vaskular (Zondervan *et al.*, 2020). Sel punca endometrium bersama sel - sel niche , pada kondisi menstruasi retrograd, akan memicu perkembangan jaringan endometrium ektopik (Hendarto, 2015; Evans *et al.*, 2016). Berdasarkan teori metaplasia selomik, endometriosis berasal dari metaplasia sel-sel yang sudah terspesialisasi di lapisan mesotel peritoneum dan organ visera abdomen. Faktor

biokimia dan imunologi endogen berperan menginduksi sel-sel tersebut menjadi sel mirip endometrium.

Endometriosis merupakan penyakit yang dependen estrogen, dimana terdapat estrogen yang tinggi dari tiga sumber, ovarium, jaringan ekstraovarium dan lesi endometriosis (Hendarto, 2015). Wanita dengan endometriosis mungkin memiliki kerentanan secara genetik, seperti yang diidentifikasi oleh GWAS, maupun mengalami alterasi epigenetik (Zondervan *et al*, 2020). Mekanisme hormonal yang terlibat adalah resistensi progesteron dan dominasi estrogen. Ketidakseimbangan hormonal ini mengaktifkan faktor yang mengganggu pensinyalan progesteron melalui jalur IHH (*Indian Hedgehog*). Progesteron pada endometrium normal bekerja melalui reseptor progesteron (*Progesteron Receptor / PR*) yang bergantung pada faktor transkripsi epitel GATA-2. Progesteron menginduksi jalur IHH dan memulai kerja *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II* (COUP-TFII). Faktor transkripsi ini menekan aksi inflamasi estrogen. Kondisi resistensi progesteron menyebabkan estrogen mendominasi dan terjadi reaksi inflamasi terus menerus (Lessey and Young, 2019)

Sitokin seperti IL-6 dan IL-17 meningkat secara sistemik maupun lokal pada kondisi inflamasi seperti endometriosis. Peningkatan IL-6 memicu fosforilasi dan aktivasi STAT3 yang merupakan penginduksi angiogenesis yang poten. Mekanisme deaktivasi STAT3 dibatasi pada kondisi inflamasi. Ekspresi STAT3 berkepanjangan menyebabkan overekspresi protein onkogen BCL6. BCL6 bersama *histone deacetylase* SIRT1 mengganggu ekspresi GLI1. Molekul GLI1 diketahui berperan penting dalam jalur IHH. Respon estrogen berlebihan juga merupakan suatu respon terhadap inflamasi. Respon ini diakibatkan antara lain adanya

peningkatan COX2 dan prostaglandin yang menyebabkan penyimpangan ekspresi aromatase. Penyimpangan ekspresi aromatase menyebabkan peningkatan estrogen (Lessey dan Young, 2019).

Kondisi inflamasi dan stres oksidatif terjadi secara kronis secara sistemik maupun lokal pada wanita dengan endometriosis. Makrofag peritoneum yang berikatan dengan suatu protein dengan struktur seperti haptoglobin mengalami peningkatan jumlah. Ikatan ini mengganggu kemampuan fagositik dan meningkatkan produksi sitokin Interleukin-6. Kemokin lain yang meningkat pada cairan peritoneum lesi endometriosis adalah *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8, *Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted* (RANTES) dan *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1). Tiga terakhir adalah kemoatraktan makrofag yang memfasilitasi rekrutmen makrofag (Burney dan Giudice, 2012; Hendarto, 2015). *Tumor Necrotizing Factor- α* ($\text{TNF-}\alpha$) merangsang produksi prostaglandin (PG) $\text{F2-}\alpha$ dan PGE2. Makrofag mensekresi enzim *cyclo-oxygenase* (COX)-2 yang memproduksi PGE2 pada lesi endometriosis. Prostaglandin E2 (PGE2) selanjutnya akan mengaktivasi *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* (Star) dan aromatase sehingga terjadi peningkatan estradiol lokal di jaringan endometriosis (Hendarto, 2015).

2.1.4 Diagnosis

Diagnosis endometriosis cukup sulit ditegakkan. Belum ada penanda biologis (biomarker) untuk mendeteksi atau menyingkirkan endometriosis hingga saat ini. Baku emas diagnosis tetap menggunakan visualisasi lesi dengan pembedahan dan idealnya disertai verifikasi histologis. Lesi yang sebagian besar berada di dalam abdomen dan berukuran kecil menyebabkan terbatasnya penanda

biologis tersebut (Zondervan *et al*, 2020). Pencitraan kurang bermanfaat dalam deteksi lesi peritoneal superfisial. Pencitraan seperti USG transvaginal atau MRI mampu mengidentifikasi endometrioma secara sensitif dan spesifik. ESHRE merekomendasikan klinisi untuk menggunakan USG transvaginal untuk diagnosis atau eksklusi endometrioma ovarium. Penggunaan MRI juga tidak *cost-effective* sehingga perlu kehati-hatian para klinisi (Dunselman *et al.*, 2014; Hendarto, 2015).

Tantangan diagnostik dalam endometriosis adalah gejala yang kurang spesifik, anggapan gejala-gejala endometriosis adalah hal yang biasa, kurangnya kesadaran pasien terhadap gejala tersebut, dan belum ada penanda yang spesifik. Tantangan tersebut menyebabkan keterlambatan penegakan diagnosis hingga 4 sampai 10 tahun (Dunselman *et al.*, 2014; Zondervan, Becker dan Missmer, 2020; Becker *et al.*, 2022).

Klinisi sebaiknya mempertimbangkan diagnosis endometriosis pada pasien dengan tanda dan gejala nyeri haid, nyeri panggul di luar haid, dispareuni, infertilitas dan kelelahan yang menyertai gejala tersebut. Klinisi juga sebaiknya mempertimbangkan adanya endometriosis pada wanita usia reproduksi dengan keluhan non-ginekologis yang siklik seperti dischezia, disuria, hematuria, *catamenial pneumotorax*, hemoptisis, perdarahan rektum, dan nyeri bahu (Dunselman *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2022). Penggunaan aplikasi/kuesioner/jurnal yang mencatat tanda dan gejala pasien berpotensi mengenali nyeri endometriosis serta membantu melengkapi anamnesis konvensional dalam penegakan diagnosis (Becker *et al.*, 2022).

Pemeriksaan fisik direkomendasikan ESHRE pada pasien yang diduga mengalami endometriosis. Pemeriksaan fisik berupa pemeriksaan vaginal atau

colok dubur pada pasien remaja atau yang belum aktif secara seksual. Diagnosis *deep endometriosis* dipertimbangkan pada pasien dengan indurasi yang nyeri dan/atau nodul pada dinding rektovagina atau nodul vagina yang terlihat di fornix posterior vagina. Klinisi dapat mempertimbangkan diagnosis Endometrioma pada wanita dengan masa adneksa (Dunselman *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2022). Pemeriksaan diagnostik lanjutan termasuk pencitraan sebaiknya dipertimbangkan bila hasil pemeriksaan fisik normal pada pasien dengan keluhan mengarah ke endometriosis (Becker *et al.*, 2022)

Pencitraan seperti USG atau MRI sebaiknya digunakan dalam penegakan diagnosis meski hasil negatif tidak menyingkirkan endometriosis. Rekomendasi ESHRE terbaru menyatakan bahwa laparoskopi perlu ditawarkan pada pasien dengan hasil pencitraan negatif atau terapi empiris tidak berhasil (Becker *et al.*, 2022).

2.2 Imunologi pada Patogenesis Endometriosis

Endometriosis dicirikan oleh implantasi dan pertumbuhan jaringan endometriosis di luar kavum uterus, antara lain di rongga peritoneum. Berbagai penelitian menunjukkan hubungan antara berbagai sel imun dan patogenesis endometriosis (Izumi *et al.*, 2018). Perkembangan endometriosis melibatkan rekrutmen sel-sel imun, adesi sel, dan peningkatan proses inflamasi. Kondisi tersebut memfasilitasi implantasi dan *survival* lesi endometriosis (Agostinis *et al.*, 2021).

Kemampuan sel endomerium ektopik untuk menginvasi membran basal penting dalam perkembangan endometriosis. Adesi sel endometrium di lokasi

ektopik memerlukan waktu yang relatif pendek dan didukung oleh sel mesotelial di peritoneum pada model *in vitro*. Angiogenesis yang berasal dari vaskularisasi terdekat atau inkorporasi sel prekursor endotel yang bersirkulasi di dekat lokasi vaskularisasi juga berperan penting dalam perkembangan lesi (Burney dan Giudice, 2012; Capobianco, 2013). Jaringan ektopik endometrium ini dihubungkan dengan pertumbuhan tidak terkontrol, invasi jaringan sekitar, defek apoptosis, neoangiogenesis, dan respon inflamasi terus-menerus. Semua hal tersebut menunjukkan inflamasi lingkungan peritoneal mempengaruhi perilaku sel endometrium ektopik.

2.2.1 Makrofag dan monosit

Makrofag awalnya adalah komponen integral dari *Monocyte Phagocyte System* (MPS) yang berasal dari sumsum tulang belakang. *Monocyte Phagocyte System* (MPS) setelah bermigrasi ke pembuluh darah perifer akan menjadi makrofag residen atau *Antigen Presenting Cell* (APC) antara lain sel dendritik. Makrofag memiliki kemampuan memfagosit dan membuang substrat partikulat ekstrasel seperti mikroba, sel apoptotik, maupun eritrosit yang sudah tua. Reseptor *Pattern Recognition Receptor* (PRR) penting dalam kemampuan fagosit makrofag. *Pattern Recognition Receptor* (PRR) berinteraksi dengan substrat dan mengaktifkan kaskade sinyal dalam proses fagosit. *Toll Like Receptor* (TLR) merupakan salah satu anggota PRR yang paling dikenal. *Toll Like Receptor* (TLR) 3, 7, 9 mengaktifkan jalur *phosphoinositol-3-kinase/mammalian target of rapamycin/p70S6 kinase 1* (PI3K/mTOR/S6K) yang selanjutnya memproduksi sitokin anti viral dan proinflamatorik seperti interferon tipe I. *Toll Like Receptor* (TLR) 4, yang ada di membran plasma, mengenali LPS dan selanjutnya mengaktifkan translokasi

NF- κ B dan rekrutmen jalur kinase. Hal ini menyebabkan produksi sitokin inflamatorik seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α dan interleukin (IL)-6, yang penting dalam pengendalian infeksi (Capobianco, 2013).

Makrofag merupakan sel yang memiliki berbagai fungsi vital dalam tubuh untuk imunitas, perkembangan, homeostasis dan repair jaringan setelah perlukaan. Makrofag memodifikasi perannya tergantung pada sinyal yang diterima pada lingkungan mikronya dan menunjukkan heterogenitas transkripsi dan fenotipik serta fungsi yang spesifik pada jaringan tertentu. Terdapat perbedaan ontogenitas dan fungsi makrofag. Makrofag residen pada jaringan dan makrofag yang berasal dari monosit memiliki fungsi tertentu pada kondisi sehat maupun pada perkembangan penyakit. Biasanya makrofag residen pada jaringan berperan dalam homeostasis jaringan dan fungsi dasar seperti pembersihan sel apoptotik. Makrofag yang berasal dari monosit direkrut oleh jaringan yang mengalami inflamasi dan menghasilkan sitokin proinflamasi, membantu membersihkan infeksi dan meregulasi respon imun. Berbagai penelitian menunjukkan pada kondisi sakit, kedua jenis makrofag berada pada jaringan, dan dapat berdiferensiasi dan beradaptasi (Hogg *et al.*, 2021).

Makrofag berperan sebagai *scavenger* pada cairan peritoneum normal, yang membersihkan sel endometrium yang terengurgitasi bersama darah menstruasi. Makrofag pada kondisi endometriosis tidak mampu melakukan pembersihan ini, melainkan terjadi peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi yang mendukung perkembangan lesi endometriosis (Burney dan Giudice, 2012; Capobianco, 2013). Penurunan kapasitas fagositosis kemungkinan diakibatkan oleh penurunan ekspresi reseptor scavenger *Cluster of differentiation* 36 (CD36). Hambatan terhadap CD36 menyebabkan penurunan kapasitas fagositik makrofag dan pembentukan lesi

endometriosis pada hewan coba. Penurunan ekspresi Annexin A2 pada makrofag juga menurunkan kapasitas fagositik makrofag peritoneum (Izumi *et al.*, 2018).

Jumlah makrofag meningkat dalam cairan peritoneum pasien endometriosis maupun pada endometrium eutopik. Makrofag peritoneum pada pasien endometriosis juga sangat teraktivasi melalui jalur *nuclear factor- κ B* dan menghasilkan sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), IL-6, dan IL-1 β dengan jumlah lebih banyak. Dengan mensekresi sitokin proinflamasi ini, makrofag menciptakan lingkungan inflamatorik yang mendukung perkembangan lesi endometriosis (Izumi *et al.*, 2018; Ramírez-Pavez *et al.*, 2021).

Makrofag secara langsung mempengaruhi sel endometriotik dan merangsang perkembangan penyakit. Kultur sel stroma endometriosis bersama makrofag dapat meningkatkan proliferasi sel, produksi *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES), *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), *Interleukin 1 receptor alpha chain* (IL-1-RA), klonogenisitas, kemampuan invasi, dan aktivasi Stat3 (Izumi *et al.*, 2018).

Makrofag mengalami polarisasi dan perubahan struktur populasi seiring perjalanan penyakit endometriosis. Rekrutmen dan diferensiasi monosit terjadi terus menerus. Hogg *et al* (2021) menyimpulkan bahwa makrofag pada endometriosis di peritoneum memiliki ontogeni dan jenis yang berbeda. Jenis pertama yaitu *Large Peritoneal Macrophage* (LPM) merupakan makrofag residen yang menginfiltrasi lesi endometriosis. Jenis kedua yaitu makrofag residen dari endometrium eutopik yang mengalir balik ke rongga peritoneum. Jenis ketiga yaitu *Small Peritoneal Macrophage* (SPM) yang berasal dari monosit (Hogg *et al.*, 2021). Fenotip dan peran Makrofag menunjukkan versatilitas, dimana polarisasi ke

arah M1 memicu dan meningkatkan respon inflamasi dan M2 merangsang perbaikan jaringan, angiogenesis dan pertumbuhan sel. Polarisasi makrofag peritoneum pada endometriosis cenderung ke arah tipe M2, salah satunya melalui mekanisme survival sel endometrium ektopik, induksi angiogenesis dan invasi lesi. Perubahan polarisasi makrofag ke M1 terjadi seiring perjalanan penyakit sehingga terjadi kondisi proinflamasi yang menyebabkan *maintenance* lesi, adesi, fibrosis dan angiogenesis (Ramírez-Pavez *et al.*, 2021).

2.2.2 Neutrofil dan eosinofil

Neutrofil hanya meningkat saat fase menstruasi pada kondisi normal. Jumlah neutrofil melebihi normal pada endometrium ektopik pasien endometriosis dan dalam kondisi teraktivasi. Peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan ekspresi CD11b merupakan tanda aktivasi neutrofil pada endometriosis (Agostinis *et al.*, 2021). Kondisi ini juga didapatkan pada cairan peritoneum pasien endometriosis, khususnya pada stadium lanjut.

Neutrofil pada lesi endometriosis menghasilkan berbagai substansi (Izumi *et al.*, 2018; Agostinis *et al.*, 2021). *Neutrophil chemotactic factors* antara lain *growth-regulated gene-α*, interleukin (IL)-8, *neutrophil-activating peptide-78*, dan *human neutrophil peptides 1, 2, dan 3,4* juga meningkat. Hal ini menyebabkan peningkatan influks neutrofil pada rongga peritoneum. Neutrofil memproduksi sitokin proinflamasi seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), IL-8, dan CXCL10, yang mendukung patogenesis endometriosis. Neutrofil juga mengekspresikan IL-17A yang menstimulasi stroma endometriosis menghasilkan CXCL1, meningkatkan kondisi inflamasi pada lesi (Izumi *et al.*, 2018).

Jumlah eosinofil meningkat saat fase sekretorik dan menstruasi pada kondisi normal, meski dalam jumlah sedikit. *Eotaxin*, suatu kemoatraktan eosinofil, ditemukan dalam kadar yang melebihi normal pada endometrium eutopik maupun ektopik pada pasien endometriosis, dan pada cairan peritoneum pada pasien endometriosis berat (Agostinis *et al.*, 2021).

2.2.3 Sel dendritik

Sel dendritik merupakan sel yang berasal dari monosit dengan fungsi presentasi antigen. Sel dendritik memiliki kemampuan memproses antigen untuk dipresentasikan ke sel T lebih besar daripada makrofag. Sel dendritik juga mengekspresikan molekul *co-stimulatory* dan *co-inhibitory* lebih banyak dari makrofag. Hal ini menyebabkan sel dendritik dapat menentukan aktivasi atau anergi sistem imun. Peran sel dendritik dalam patogenesis endometriosis masih belum banyak dipelajari. Sel dendritik pada hewan coba menginduksi pembentukan lesi melalui peningkatan proses angiogenesis. Peningkatan jumlah sel dendritik di lesi endometriosis maupun rongga peritoneum dijumpai meski belum pasti subset yang dominan (Izumi *et al.*, 2018).

2.2.4 Sel Uterine Natural Killer (uNK)

Sel *Natural Killer* (NK) merupakan salah satu sel imunitas non spesifik yang dihubungkan dengan pengendalian imunitas tumor dan infeksi mikroba. Sel NK di darah tepi terbagi menjadi dua tipe berdasarkan penandanya. Tipe pertama adalah $CD^{56bright}CD^{16-}$ dengan karakter menghasilkan sitokin dengan jumlah tinggi. Tipe kedua adalah $CD^{56dim}CD^{16+}$ yang sangat sitotoksik. Sel *uterine Natural Killer* (uNK) diketahui termasuk jenis $CD^{56bright}CD^{16-}$. Sel uNK meningkat jumlah saat fase sekretorik dan menstruasi. Fluktuasi ini juga terjadi pada endometrium pasien

endometriosis, meski terjadi penurunan aktivitas dan persentase sel uNK (Agostinis *et al.*, 2021). Aktivitas sitotoksik sel NK pada endometriosis juga menurun pada darah tepi maupun cairan peritoneum. Salah satu penyebab sel endometrium retrograde dapat bertahan di rongga peritoneum adalah akibat penurunan aktivitas sitotoksitas sel NK. Penyebab penurunan sitotoksitas ini belum jelas, meski pada beberapa penelitian menunjukkan IL-6, IL-15 dan *Transforming growth factor-β1* menekan aktivitas sitotoksi sel NK (Izumi *et al.*, 2018).

2.2.5 Sel mast

Peningkatan jumlah sel Mast biasanya didapatkan pada jaringan endometrium normal saat menstruasi. Kondisi ini disebabkan oleh peran sel mast dalam angiogenesis dan regenerasi jaringan. Sel Mast yang terdegranulasi dalam jumlah besar dijumpai pada lesi endometriosis. Sel Mast meningkatkan produksi mediator proinflamasi, khususnya triptase. Sel Mast juga sangat teraktivasi dan terdegranulasi pada *deep endometriosis* dan terdapat kaitan histologis dengan saraf. Sel mast diperkirakan berperan dalam terjadinya nyeri dan hiperalgesia melalui efek terhadap ujung saraf. Secara histologis, terlihat sebaran sel mast di stroma lesi endometriosis. Sel ini menunjukkan degranulasi dan granul-granul yang tersebar di sekitar sel. Adanya sel mast berkaitan kuat dengan adesi dan fibrosis lesi (Agostinis *et al.*, 2021).

2.2.6 Limfosit

Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi sel *T-helper* dan menginduksi respon imun tertentu. Secara klasik sel T helper terdiri dari dua subset, sel Th1 yang mensekresikan IFN γ dan Th2 yang mensekresikan IL-4. Baru-baru ini, sel Th17 diidentifikasi sebagai subset baru sel T-helper. Subset sel T dan sifatnya terangkum

di tabel 2.1 (Abbas *et al.*, 2018). Diferensiasi berbagai subset sel T memiliki fitur penting yaitu:

1. Sitokin yang menyebabkan diferensiasi sel T diproduksi oleh APC (utamanya sel dendritik dan makrofag) dan sel imun lain (misalnya sel NK dan sel Mast) yang ada pada organ limfoid tempat respon imun dimulai (Abbas *et al.*, 2018).
2. Stimulus selain sitokin juga berpotensi mempengaruhi pola diferensiasi sel T-Helper. Stimulus ini antara lain afinitas reseptor sel T terhadap antigen, jumlah antigen dan sifat APC.
3. Profil sitokin yang dihasilkan oleh subset-subset sel Th dikendalikan oleh faktor transkripsi tertentu yang mengaktifkan ekspresi gen sitokin dan modifikasi kromatin yang mempengaruhi kemampuan faktor ini mengakses elemen promotor dan regulator gen.
4. Setiap subset menghasilkan sitokin yang merangsang pertumbuhannya sendiri dan dapat menekan perkembangan subset lain.

Tabel 2. 1 Berbagai subset sel T dan sifat-sifatnya (Abbas *et al.*, 2018)

Subset	Sitokin	Sel target utama	Reaksi imun utama	Peran dalam penyakit
Th1	IFN- γ	Makrofag	Aktifasi makrofag	Penyakit autoimun; inflamasi kronik
Th2	IL-4 IL-5 IL-13	Eosinofil	Aktivasi eosinofil dan sel mast Aktivasi makrofag jalur alternatif	Alergi
Th17	IL-17 IL-22	Neutrofil	Rekrutmen dan aktivasi neutrofil	Penyakit autoimun Inflamasi
Tfh	IL-21 (IFN- γ dan IL-4)	Sel B	Produksi antibodi	Penyakit autoimun /autoantibodi

Diferensiasi sel Th1 utamanya terjadi karena sitokin IFN- γ dan IL-12 sebagai respon terhadap sel dendritik, makrofag dan sel NK. IFN- γ dan IL-12 menginduksi dan mengaktivasi faktor transkripsi T-bet, STAT1 dan STAT4. Fungsi utama sel Th1 adalah mengaktivasi makrofag untuk mampu melakukan fagosit. Sel Th1 juga menghasilkan TNF dan kemokin lain yang berkontribusi dalam rekrutmen leukosit dan meningkatkan inflamasi (Abbas *et al.*, 2018).

Subset Th2 adalah mediator pertahanan yang tidak tergantung proses fagositosis. Tipe pertahanan tubuh ini melibatkan peran sel mast dan eosinofil berperan penting. Sitokin IL-4 menstimulasi diferensiasi dengan mengaktifkan faktor transkripsi STAT6. Faktor transkripsi STAT6 bersama sinyal reseptor sel T menginduksi ekspresi GATA-3. GATA-3 adalah faktor transkripsi yang menstimulasi gen sitokin IL-4, IL-5 dan IL-13 yang terletak pada lokus gen yang sama. Sel Th2 menstimulasi IgE, sel mast dan reaksi yang dimediasi eosinofil dan berperan memperbaiki jaringan dengan cara pengaktifan makrofag melalui jalur alternatif (Abbas *et al.*, 2018).

Subset sel Th17 utamanya terlibat dalam rekrutmen neutrofil dan monosit ke lokasi infeksi dan inflamasi. Subset Th17 merupakan sel *T-helper* yang menghasilkan sitokin IL-17 dan IL-22. Subset ini utamanya terlibat dalam rekrutmen neutrofil serta monosit ke lokasi infeksi dan inflamasi. Perkembangan sel Th17 distimulasi oleh sitokin proinflamasi sebagai respon infeksi bakteri dan jamur atau inflamasi. Berbagai patogen bekerja pada sel dendritik dan menstimulasi sitokin antara lain IL-6, IL-1 dan IL-23. Sitokin-sitokin ini merangsang diferensiasi sel CD4⁺ menjadi sel Th17. Interleukin-1 (IL-1) dan IL-6 yang dihasilkan oleh sel-

sel APC dan TGF- β mengaktivasi faktor transkripsi ROR γ t dan STAT3 (Abbas *et al.*, 2018).

Mekanisme sel Th dalam patogenesis endometriosis dapat dijelaskan melalui beberapa hal sebagai berikut:

1. Ketidakseimbangan Th1 dan Th2 pada endometriosis. Th2 menyebabkan polarisasi makrofag M2, dan dikaitkan dengan perkembangan lesi endometriosis. Penelitian tentang kadar sitokin di peritoneum menunjukkan peningkatan IL-10, penurunan IFN γ , dan peningkatan rasio IL-4/ IFN γ . Sekresi sitokin oleh sel T peritoneum didominasi oleh sel Th2, dan terjadi penurunan jumlah sel Th1. Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2 seperti IL-4 dan IL-10 berkontribusi pada pertumbuhan lesi endometriosis (Izumi *et al.*, 2018).

2. T-regulator dan Th17

Jumlah sel Th17 di lesi endometriosis lebih tinggi dibandingkan pada endometrium normal dan dikaitkan dengan peningkatan derajat keparahan penyakit. IL-17A juga memperberat kondisi inflamasi dan meningkatkan proliferasi sel endometriotik. Riset lanjutan masih diperlukan untuk lebih memperjelas peran Th17 pada perkembangan penyakit (Izumi *et al.*, 2018). Sel T-regulator (Treg) merupakan subset *T-helper* lain dan diketahui berfungsi dalam menjaga kondisi imunotoleransi. Berbagai studi menunjukkan peringkat Treg pada rongga peritoneal pasien endometriosis. Pada hewan coba, hambatan atas diferensiasi sel Treg menurunkan jumlah dan berat lesi endometriosis. Temuan ini menunjukkan peran sel Treg pada

perkembangan endometriosis meski belum jelas mekanismenya dan potensi terapi targetnya (Izumi *et al.*, 2018).

3. T sitotoksik

Populasi sel T sitotoksik dan rasio CD8/CD4 meningkat pada cairan peritoneum pasien endometriosis. Penelitian terkini menunjukkan bukti disregulasi sel T sitotoksik pada pasien endometriosis (Izumi *et al.*, 2018).

2.3 Interleukin-17 pada Endometriosis

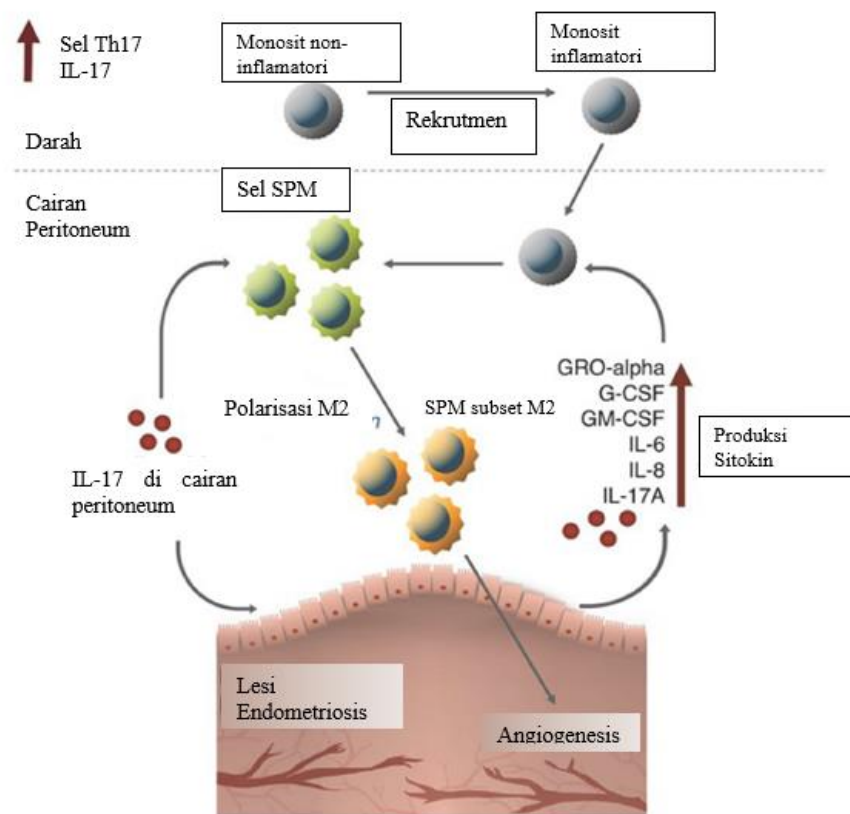
Sel T CD4⁺ merupakan salah satu subset sel T. Sel ini disebut juga sel T helper karena mengatur fungsi sel imun lainnya. Perannya dalam sistem imunitas antara lain eliminasi patogen, proses toleransi imun dan produksi sitokin yang mengaktifasi sel imun pada lingkungan mikro. Sel T berkembang dari sel progenitor di timus. Sel T selama proses perkembangan ini mengekspresikan reseptor antigen (*T cell Receptor*/TCR) dan sebagian besar berdiferensiasi menjadi sel T CD4⁺ atau sel T CD8⁺. Sel T CD8⁺ setelah proses maturasi, bersirkulasi di seluruh tubuh dan memperoleh fungsi sitotoksik. Sel-sel ini berkontribusi pada homeostasis imunologi dengan cara membunuh sel yang telah terinfeksi virus maupun sel kanker. Sel T CD4⁺ merupakan sel T helper yang menunjukkan fungsi regulasi. Dahulu sel *T-helper* terbagi atas dua subset, sel *T-helper* 1 (Th1) dan sel *T-helper* 2 (Th2). Sel Th1 berdiferensiasi dibawah pengaruh IL-12 dan memproduksi utamanya interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ mengaktifasi makrofag, mendorong eliminasi patogen intraseluler. Sel Th2 berdiferensiasi dibawah pengaruh IL-4 dan mempengaruhi sel B melalui IL-4. Subset Sel *T-helper* lain diidentifikasi baru-baru ini, salah satunya adalah sel Th17 (Abbas *et al.*, 2018). Sel

Th17 menghasilkan sitokin Interleukin-17 (IL-17) yang berkontribusi pada reaksi inflamasi dan gangguan imunitas kronik antara lain pada penyakit autoimun. Sel Th17 diketahui berkontribusi pada patogenesis berbagai penyakit inflamasi kronik. Beberapa jenis obat yang menghambat diferensiasi atau fungsi sel Th17 telah disetujui untuk penatalaksanaan penyakit seperti psoriasis (Kuwabara *et al.*, 2017).

Interleukin17 (IL-17) merupakan suatu sitokin yang penting dalam imunitas terhadap patogen ekstraseluler dan proses pembersihan patogen intraseluler. Sitokin ini diperkirakan termasuk keluarga protein *cytotoxic T-lymphocyte-associated* (CTLA)-8. Penghasil utama sitokin ini adalah Th17. Interleukin-17 terdiri dari 6 molekul homolog dinamakan IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E dan IL-17F. Reseptor IL-17 (IL-17R) terdiri dari lima anggota (IL-17Ra, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, dan IL-17RE) dengan sekuen yang homolog. Semua reseptor ini memiliki domain menyerupai fibronectin-III ekstraseluler dan domain SEF/IL-17 intraseluler. Interleukin-17A dan interleukin-17F dapat menginduksi ekspresi gen baik berdiri sendiri maupun sinergi dengan TNF- α IL-6, G-CSF, IL-1, CXCL1, CCL20, dan *matrix metalloprotease*. Sitokin ini juga mengatur gen pro-inflamasi melalui aktivasi jalur NF- κ B, MAPK, dan C/EBP. Kemampuan mengubah ekspresi gen dan menstabilkan mRNA juga dimiliki oleh IL-17 (Kuwabara *et al.*, 2017).

Interleukin-17 merupakan mata rantai penting yang menghubungkan imunitas adaptif yang diperantarai sel T dengan respon inflamasi akut. Peran IL-17 antara lain merangsang inflamasi dengan cara rekrutmen neutrofil dan monosit, meningkatkan produksi G-CSF dan ekspresi reseptornya (Abbas *et al.*, 2018).

Sel Th17 dan IL-17 dikaitkan dengan berbagai kelainan autoimun seperti rheumatoid arthritis, psoriasis, *multiple sclerosis*, dan *systemic lupus eritematosus*. Sel Th17 dan IL-17 juga berperan dalam gangguan inflamasi kronik, salah satunya pada endometriosis (Kuwabara *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2020). Jumlah sel Th17 meningkat pada jaringan endometriosis, begitu pula kadar IL-17 pada plasma dan cairan peritoneum pasien endometriosis. Faktor kemotaktik yang dihasilkan oleh IL-17 antara lain *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12), CXCL1 dan CX3CL1 (Ahn *et al.*, 2015). Polarisasi *Small Peritoneal Macrophage* (SPM) ke fenotip M2 yang patogenik pada lesi endometriosis terjadi di bawah pengaruh IL-17. Diagramatik rekrutmen dan induksi polarisasi makrofag oleh IL-17 terlihat pada gambar 2.2 (Miller *et al.*, 2020). Sitokin IL-17 juga merangsang sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-8 dan IL-1 β (Ahn *et al.*, 2015). Efek proliferasi IL-17 bersama IL-8 pada sel endometrium ektopik menyebabkan pertumbuhan lesi endometriosis (Hirata *et al.*, 2008).



Gambar 2. 2 Pengaruh IL-17 pada polarisasi Makrofag endometriosis (Miller *et al.*, 2020)

2.4 Vitamin D

Vitamin D adalah turunan steroid yang larut air, dengan fungsi klasik penting dalam pengaturan homeostasis kalsium dan metabolisme tulang melalui kerjanya di intestinal, tulang, ginjal dan kelenjar paratiroid (Prietl *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Bentuk utama vitamin D (25(OH)D) pada manusia adalah vitamin D3 atau kolekalsiferol. Vitamin D meningkatkan penyerapan kalsium dan fosfat pada intestinal, stimulasi diferensiasi osteoklas dan reabsorpsi kalsium dari tulang serta mineralisasi matriks tulang. Defisiensi vitamin D juga dikaitkan dengan berbagai penyakit kardiovaskular, berbagai jenis kanker dan kelainan autoimun seperti DM tipe I, *Multiple Sclerosis* (MS), dan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Sel-sel

imun mengekspresikan reseptor vitamin D (VDR) dan enzim pengaktif vitamin D (enzim 1- α -hydroxylase / CYP27B1) sehingga diperkirakan vitamin D memiliki fungsi imunomodulasi (Prietl *et al.*, 2013).

2.4.1 Sumber vitamin D

Vitamin D dapat berasal dari produksi endogen oleh tubuh manusia dan secara eksogen dari diet atau suplemen. Sintesis vitamin D endogen pada manusia terjadi di kulit setelah paparan UVB, sehingga sangat berkaitan dengan kondisi geografis. Produksi endogen saja tidak mencukupi kadar plasma optimal vitamin D Pada kondisi tertentu. Faktor seperti genetik, usia, pigmentasi kulit dan kebiasaan penggunaan tabir surya atau jenis baju juga mempengaruhi sintesis vitamin D endogen (Prietl *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018)

Sumber vitamin D eksogen dapat berasal dari makanan atau suplemen. Sumber makanan kaya Vitamin D tidak banyak antara lain salmon, makarel, sarden, minyak ikan kod atau beberapa jenis jamur seperti Shiitake. Sumber makanan ini mengandung kolekalsiferol (vitamin D3) atau ergokalsiferol (vitamin D2) (Prietl *et al.*, 2013; Bikle, 2014). Kolekalsiferol merupakan bentuk vitamin D yang berasal dari hewan sedangkan ergokalsiferol dari tumbuhan. Ergokalsiferol terjadi saat ergosterol pada jamur teradiasi oleh sinar UV B. Kedua bentuk ini memiliki struktur yang serupa dan menjalani metabolisme yang sama.

Faktor endogen yang membatasi sintesis dan kurang asupan diet kaya vitamin D rentan menyebabkan defisiensi. Beberapa negara mengambil kebijakan pencegahan defisiensi vitamin D dengan cara memperkaya beberapa produk makanan seperti susu dengan vitamin D (Bikle, 2014). *Endocrine Society* merekomendasikan suplementasi harian sesuai usia dan kondisi klinis karena

lazimnya defisiensi vitamin D di berbagai kelompok umur (Holick *et al.*, 2011). Kadar vitamin D seseorang dengan demikian tergantung pada paparan sinar matahari, pola makan dan kebijakan fortifikasi makanan, serta pola suplementasi vitamin D.

2.4.2 Absorpsi, metabolisme dan mekanisme kerja vitamin D

Vitamin D dapat disintesis secara endogen oleh tubuh. Proses sintesis endogen diawali dari oksidasi kolesterol yang bersumber dari makanan di epitel saluran cerna menjadi *7-dehydrocholesterol* (7-DHC) atau pro-vitamin D3. Pro-vitamin D3 atau *7-dehydrocholesterol* yang berada di sirkulasi selanjutnya ditransportasi ke kulit. Pro-vitamin D3 yang berada di epidermis ketika terpapar UVB terisomerisasi menjadi pre-vitamin D3 atau kolekalsiferol. (Colonese *et al.*, 2015).

Tubuh juga bisa mendapatkan vitamin D secara eksogen dari diet atau suplemen. Vitamin D yang berasal dari diet atau suplemen oral, baik kolekalsiferol maupun ergokalsiferol, diserap dengan cepat di saluran cerna. Setelah pemberian oral, kadar plasma meningkat paling tinggi sekitar 24 jam setelahnya. Kadar vitamin D dalam 7 hingga 14 hari meningkat perlahan dan stabil dalam tubuh. Kadar ini tergantung dosis suplementasi atau diet seseorang (Silva dan Furlanetto, 2018).

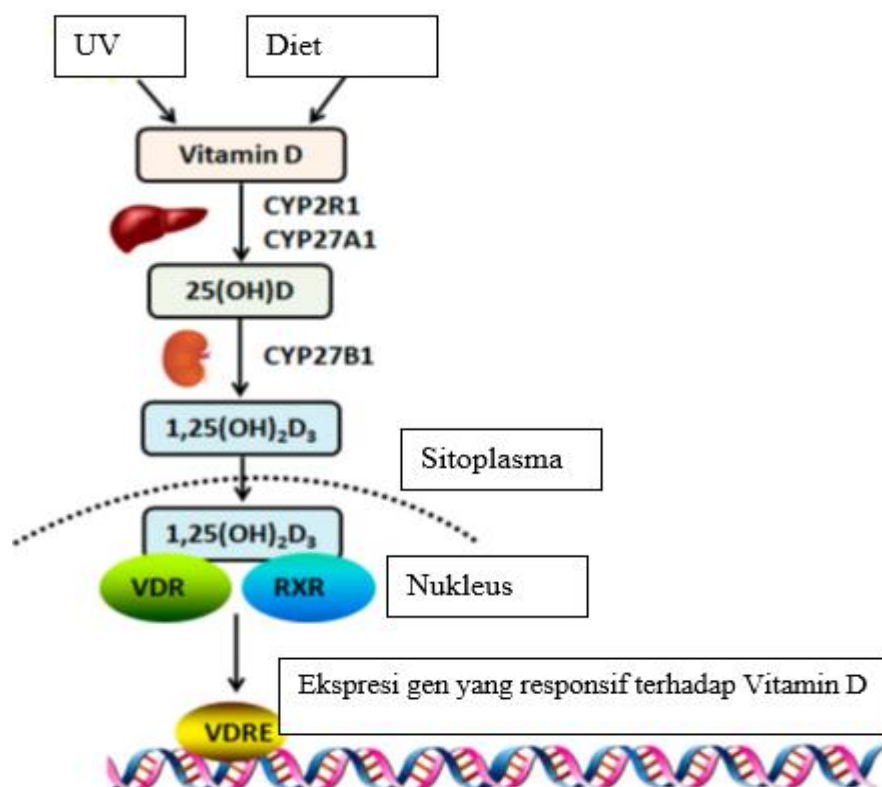
Penyerapan vitamin D pada saluran cerna merupakan mekanisme kompleks dengan melibatkan protein pembawa pada membran sel. Transfer vitamin D ke sitosol terjadi dengan bantuan protein pengikat tertentu. Berbagai kondisi mempengaruhi tingkat penyerapan vitamin D. Penyerapan vitamin D di saluran cerna lebih baik apabila bersama makanan yang mengandung lemak. Vitamin D

tetap dapat diserap walau diberikan bersama makanan tidak berlemak, vehikulum berbahan dasar bukan minyak, atau saat puasa. Penyerapan dapat terganggu bila terjadi gangguan penyerapan lemak pada saluran cerna (Silva dan Furlanetto, 2018). Penyerapan vitamin D lebih besar pada kondisi defisiensi vitamin D. Silva dan Furlanetto (2018) juga menyimpulkan dari berbagai penelitian bahwa asam lemak rantai panjang mengganggu penyerapan vitamin D melalui kompetisi pada ikatan protein pembawa ke sitosol.

Mayoritas vitamin D (25(OH)D) di sirkulasi terikat dengan vitamin D *binding protein* (VDBP). VDBP berperan penting dalam pengaturan konsentrasi vitamin D bebas dan terikat. Albumin juga merupakan protein pembawa vitamin D tetapi dengan afinitas yang lebih rendah. Vitamin D secara fisiologis hanya aktif dalam bentuk yang tidak terikat, tetapi status vitamin D seseorang ditentukan dari kadar 25(OH)D total. Hal ini disebabkan karena vitamin D bebas hanya sebesar 0,1% dari total vitamin D dalam sirkulasi (Baek *et al.*, 2019).

Kolekalsiferol endogen atau dari diet dan suplementasi dimetabolisme menjadi dua substrat yang berbeda yaitu calcidiol 25(OH)D₃ (calcidiol) dan 1,25(OH)D₃ (calcitriol) (Colonese *et al.*, 2015). Terdapat tiga tahapan utama metabolisme vitamin D yaitu 25-hidroksilasi, 1- α -hidroksilasi, dan 24-hidroksilasi. Enzim yang terlibat terletak di retikulum endoplasma atau mitokondria sel (Bikle, 2014). Berbagai enzim hidroksilase ini termasuk keluarga protein yang dikenal sebagai *cytochrome P450 mixed function monooxidases* (Colonese *et al.*, 2015). Langkah pertama yaitu 25-hidroksilasi terjadi di Liver. Liver merupakan lokasi utama produksi 25(OH)D dari vitamin D. Berbagai enzim diketahui terlibat dalam proses 25-hidroksilasi antara lain CYP2R1 sebagai enzim utama, CYP27A1 dan

CYP3A4 (Bikle, 2014). Tahap selanjutnya yaitu 1- α -hidroksilasi terjadi karena aktivitas enzim CYP27B1. Ginjal merupakan sumber utama 1,25(OH)₂D, meski berbagai sel di jaringan lain juga memiliki ekspresi enzim CYP27B1 antara lain kelenjar paratiroid, payudara, ovarium, dan sel-sel sistem imun (Bikle, 2014; Colonese *et al.*, 2015). Aktivitas 1- α -hidroksilase di ginjal diatur oleh hormon paratiroid, *fibroblast growth factor* 23 (FGF23) dan 1,25(OH)₂D (Bikle, 2014). Proses 24-hidroksilasi terjadi akibat aktivitas 24-hidroksilase (CYP24A1). Jalur ini menginaktifkan metabolit aktif dan menghasilkan asam kalsitroat yang tidak aktif. Fungsi primer enzim ini adalah mencegah akumulasi toksik 1,25(OH)₂D dan 25(OH)D (Bikle, 2014). Metabolisme secara diagram dapat dilihat pada gambar 2.3 di bawah ini (Liu *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Biosintesa dan metabolisme vitamin D. (adaptasi dari Liu *et al.*, 2018)

Mekanisme kerja vitamin D secara genomik dimediasi oleh reseptor vitamin D (R-VD). Reseptor ini merupakan *final common pathway* kerja vitamin D pada jaringan. Reseptor vitamin D tersebar pada berbagai jaringan. Distribusi reseptor vitamin D ini menunjukkan potensi aksi fisiologisnya pada jaringan tersebut (Colonese *et al.*, 2015). Reseptor Vitamin D termasuk dalam jenis faktor transkripsi dan anggota kelompok reseptor inti sel untuk hormon steroid dan dikode oleh sekelompok gen pada kromosom 12q12-14 (Bikle, 2014; Colonese *et al.*, 2015).

Reseptor vitamin D terdiri dari tiga domain yaitu ujung N yang berikatan dengan lekukan DNA pada lokasi tertentu yaitu *Vitamin D Response Element* (VDRE), ujung C yang berikatan dengan ligan, dan area yang menghubungkan kedua ujung ini (Bikle, 2014). Ujung reseptor bekerja sebagai gerbang yang menyelubungi ligan dan memfasilitasi interaksi dengan pasangan heterodimer misalnya *Retinoid X Receptor* (RXR). Ikatan R VD dengan VDRE merekrut kompleks koregulator yang diperlukan dalam aktivitas genomik sel (Bikle, 2014). Kompleks ini spesifik terhadap gen dan sel, sehingga efek vitamin D selektif bagi tiap sel. *Vitamin D Response Element* (VDRE) telah teridentifikasi pada berbagai gen yang mengatur aktivitas antara lain pertumbuhan sel, diferensiasi, apoptosis, dan invasi sel (Bikle, 2014; Colonese *et al.*, 2015). Vitamin D juga menunjukkan efek non-genomik seperti stimulasi transpor kalsium pada usus secara cepat (Bikle, 2014).

2.4.3 Defisiensi vitamin D

Status vitamin D dihitung berdasarkan kadar serum 25(OH)D berdasarkan rekomendasi *Endocrine Society*. Defisiensi vitamin D adalah bila kadar 25(OH)D

dibawah 20 ng/ml (50 nmol/liter) dan insufisiensi bila kadarnya 21-29 ng/ml (Holick *et al.*, 2011). Berbagai data prevalensi defisiensi vitamin D pada wanita usia reproduktif di negara-negara Eropa, Amerika, dan Asia (Malaysia, Singapura, Thailand, Vietnam, India, Jepang dan Hongkong) bervariasi dari 42%-90% (Oemardi *et al.*, 2007). Setiati dkk meneliti status vitamin D pada wanita lanjut usia menunjukkan 35.1% mengalami defisiensi vitamin D (Setiati, 2008). Selain itu, hasil penelitian kolaborasi Malaysia dan Indonesia yang dilakukan di Kuala Lumpur dan Jakarta menemukan peserta mempunyai rata-rata konsentrasi serum 25(OH)D sebesar 48 nmol/L sedangkan defisiensi vitamin ini di Indonesia sebesar 63%. Defisiensi vitamin D dapat mengakibatkan kelainan tulang dan meningkatkan risiko dari berbagai penyakit kronis termasuk pada kondisi organ non-skeletal yaitu dapat meningkatkan terjadinya risiko diabetes melitus tipe 2, gangguan kardiovaskular yang disebabkan hipertensi, obesitas dan gangguan profil lipid, kanker, infeksi dan gangguan autoimun. (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018)

2.4.4 Dosis dan toksisitas vitamin D

Endocrine Society merekomendasikan asupan vitamin D untuk dewasa usia 19-50 tahun adalah minimal 600 IU tiap hari untuk optimalisasi kesehatan tulang dan fungsi otot, tetapi dosis yang diperlukan untuk modulasi imunitas masih belum jelas. Rekomendasi dosis untuk mengatasi defisiensi vitamin D adalah 6.000 IU vitamin D3 tiap hari atau 50.000 IU sekali seminggu, selama 12 minggu hingga kadar serum vitamin D mencapai 30ng/ml. Dosis ini dilanjutkan dengan 1500-2000 IU vitamin D tiap hari untuk *maintenance* (Holick *et al.*, 2011).

Toksisitas atau hipervitaminosis vitamin D merupakan kondisi klinis yang dicirikan dengan hiperkalsemia berat untuk jangka waktu lama, yang menyebabkan

terjadinya gangguan kesehatan. Toksisitas tersebut dapat dibagi menjadi toksisitas eksogen dan endogen. Toksisitas eksogen didefinisikan sebagai toksisitas akibat kelebihan asupan vitamin D atau analognya. Toksisitas endogen didefinisikan toksisitas akibat hipersensitivitas pada jalur sintesa atau metabolisme vitamin D (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018).

Toksisitas eksogen biasanya terjadi akibat suplementasi vitamin D dengan dosis sangat besar dalam jangka waktu lama. Paparan sinar matahari dalam jumlah besar atau diet yang beragam tidak menyebabkan toksisitas. Toksisitas merupakan kondisi dimana kadar vitamin D darah lebih dari 150 ng/ml disertai dengan hiperkalsemia berat, hiperkalsiuria, dan aktivitas PTH sangat rendah. (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018)

Institute of medicine (IOM) dan *Endocrine Society* sebagaimana dituliskan oleh Marcinowska-Suchowierska *et al* menyimpulkan hipervitaminosis akut vitamin D sangat jarang terjadi. Vitamin D juga merupakan vitamin larut lemak kurang toksik dibandingkan dengan vitamin lainnya. Berbagai penelitian seperti direview oleh Marcinowska-Suchowierska *et al* menunjukkan konsumsi vitamin D sebesar 3000 hingga 20000 IU tiap hari dalam jangka panjang dapat meningkatkan kadar vitamin D darah hingga 60 ng/ml tanpa bukti toksisitas. (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018)

Manifestasi klinis hipervitaminosis berhubungan dengan kondisi hiperkalsemia, termasuk manifestasi neuropsikiatrik seperti gangguan konsentrasi, bingung, apatis, depresi, mengantuk, psikosis dan stupor hingga koma. Manifestasi saluran cerna termasuk muntah, nyeri abdomen, anoreksia konstipasi, dan pankreatitis. Hipertensi, gangguan kelistrikan jantung dan bradiaritmia merupakan

manifestasi kardiovaskular. Gangguan ginjal yang dapat terjadi adalah hiperkalsiuria, poliuria, polidipsia, dehidrasi, nefrokalsinosis, dan gagal ginjal. Kalsinosis periartikular disertai nyeri, hilangnya pendengaran dan keratopati juga dapat terjadi pada hipervitaminosis. (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018)

2.4.5 Vitamin D dan sistem imun

Terkait dengan pengaruh vitamin D sebagai suatu imunomodulator, berbagai studi menunjukkan bukti tersebut. Vitamin D dapat meningkatkan efek antimikrobal makrofag dan monosit terhadap patogen. Selain meningkatkan kemotaksis dan kemampuan fagositik sel imun non spesifik, kompleks kalsitriol, VDR dan reseptor retinoid X secara langsung mengaktivasi transkripsi peptida antimikrobia seperti defensin $\beta 2$ (DEFB) dan *cathelicidin antimicrobial peptide* (hCAP18). Secara detil monosit yang terpapar patogen seperti *M. tuberculosis*, menunjukkan induksi kuat *1 α -hydroxylase* CYP27B1 dan reseptor vitamin D, menyebabkan modulasi langsung ekspresi gen, merangsang produksi cathelicidin. Cathelicidin manusia meningkat sebagai respon infeksi bakteri, virus dan jamur (Prietl *et al.*, 2013). Monosit dan sel AC lain merupakan target penting dalam modulasi sistem imun oleh vitamin D. APC bertanggung jawab memulai respon adaptif karena APC mempresentasikan antigen ke sel T dan sel B. Berbagai penelitian menunjukkan kalsitriol dan analognya dapat mempengaruhi fungsi dan morfologi DC untuk menginduksi kondisi imatur yang lebih imunotoleran. DC imatur dicirikan dengan penurunan level MHC kelas II dan ekspresi molekul kostimulator seperti CD40, CD80, dan CD86. Hal ini menyebabkan penurunan antigen yang dipresentasikan diikuti dengan penurunan sekresi IL-12 dan peningkatan IL-1. Kalsitriol juga menghambat sitokin sel T antara lain IL-2 dan IL-

17 dan TLR pada manusia. Suplementasi dosis tinggi pada manusia menurunkan sitokin proinflamasi IL-6 secara signifikan. Sangat dimungkinkan kombinasi efek ini menyebabkan induksi sel T-regulator yang penting dalam pengendalian respon imun dan perkembangan autoreaktivitas (Liu *et al.*, 2018).

Pada sistem imun adaptif, Sel T dan sel B mengekspresikan VDR dan enzim aktivator vitamin D. Ekspresi ini pada kondisi *resting* sangat rendah, tetapi meningkat secara signifikan bila terjadi aktivasi dan proliferasi. Pada kondisi ini, sel T dan sel B melakukan peningkatan regulasi ekspresi VDR hingga pada 500 gen responsif vitamin D yang mempengaruhi diferensiasi dan proliferasi sel-sel tersebut. Pada sel B, efek antiproliferasi kalsitriol seperti inhibisi diferensiasi, proliferasi, inisiasi apoptosis dan penurunan produksi imunoglobulin awalnya diperkirakan dimediasi hanya oleh sel T-Helper. Namun, penelitian terbaru menunjukkan efek vitamin D pada homeostasis, antara lain inhibisi pembentukan sel memori dan sel plasma serta rangsangan apoptosis sel B yang menghasilkan imunoglobulin. Pengendalian aktivasi dan proliferasi sel B mungkin secara klinis penting pada kelainan autoimun, karena sel B menghasilkan antibodi autoreaktif yang berperan penting pada patofisiologi autoimun (Prietl *et al.*, 2013).

2.4.6 Vitamin D dan sistem reproduksi perempuan

Enzim yang memetabolisme vitamin D dan reseptor vitamin D didapatkan di organ reproduksi perempuan. Pagliardini dkk melakukan penelitian potong lintang pada perempuan dengan infertilitas yang menjalani proses teknologi reproduksi berbantu. Hasil penelitiannya menunjukkan kadar serum vitamin D berbanding terbalik dengan indeks masa tubuh. Defisiensi vitamin D juga dikaitkan

dengan komplikasi kehamilan yang lebih berat pada kasus tersebut (Pagliardini *et al.*, 2015).

Vitamin D mempengaruhi steroidogenesis estradiol dan progesteron pada wanita sehat (Kinuta *et al.*, 2000; Lerchbaum dan Obermayer-Pietsch, 2012). Hong *et.al* (2017) meneliti pengaruh vitamin D terhadap biosintesis estrogen pada kultur sel granulosa babi. Vitamin D dosis 100 nM pada penelitian tersebut meningkatkan produksi estrogen, kemungkinan melalui pengaturan peningkatan ekspresi enzim steroidogenesis seperti CYP17A1 dan CYP19A1 (Hong *et al.*, 2017). Vitamin D menstimulasi produksi progesteron hingga 13%, produksi estradiol hingga 9%, dan produksi estron hingga 21% pada jaringan ovarium. Ekspresi hormon HCG pada sinsitiotrofoblas dan ekspresi H0XA10 pada sel stroma endometrium salah satunya diatur oleh vitamin D. H0XA10 penting dalam perkembangan uterus dan reseptivitas endometrium (Lerchbaum dan Obermayer-Pietsch, 2012).

2.4.7 Vitamin D dan endometriosis

Endometriosis merupakan suatu kondisi dimana terjadi disregulasi sistem imun dan respon inflamasi kronik. Endometriosis memenuhi kriteia penyakit autoimun, termasuk peningkatan risiko dengan penyakit autoimun lain, familial, disfungsi sel imun, serta kemungkinan kerentanan genetik. Gangguan sistem imun dalam mengenali dan membersihkan sel endometrium di lokasi ektopik juga berperan penting dalam patogenesis endometriosis. Gangguan keseimbangan sistem imun ini menyebabkan logis bila penyakit ini dikaitkan dengan vitamin D sebagai senyawa dengan aktivitas antiinflamasi, antiproliferasi dan imunomodulasi (Colonese *et al.*, 2015).

Berbagai bukti keterkaitan vitamin D dengan endometriosis telah didapatkan hingga saat ini. Kadar serum 25(OH)D secara signifikan lebih rendah pada pasien dengan endometriosis dan berkorelasi dengan derajat penyakit serta area lesi (Miyashita *et al.*, 2016; Ciavattini *et al.*, 2017). Meta analisis menunjukkan bahwa wanita dengan endometriosis memiliki status vitamin D lebih rendah dari normal. Derajat keparahan endometriosis memiliki hubungan negatif dengan kadar vitamin D. Meta analisis tersebut juga menyimpulkan bahwa hipovitaminosis vitamin D merupakan faktor risiko potensial terjadinya endometriosis (Qiu, Yuan dan Wang, 2020).

Sel imun teraktivasi pada endometriosis seperti makrofag, sel dendritik dan limfosit CD4+ dan CD8+ mensintesa enzim yang diperlukan untuk 2 langkah hidroksilasi vitamin D3, serta mengekspresikan reseptor VD. Sel-sel stroma endometrium naik eutopik maupun ektopik mengekspresikan enzim 1 alfa hidroksilase dan VDR, sehingga mampu menjadi lokasi sintesa kalsitriol ekstra renal dan sekaligus sel target (Soave *et al.*, 2018; Giampaolino *et al.*, 2019).

Vitamin D juga diketahui dapat mempengaruhi berbagai sitokin. Sitokin diketahui berperan penting dalam patogenesis endometriosis. Vitamin D dilaporkan dapat menghambat produksi IL-2, IL-12, TNF- α dan interferon pada endometriosis, serta menurunkan fungsi Th1. Vitamin D dapat menekan ekspresi *cyclooxygenase 2* (COX2) di endometrium, sehingga menurunkan kadar IL-6, TNF dan PG (Delbandi *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2016; Soave *et al.*, 2018; Giampaolino *et al.*, 2019). Hasil serupa didapatkan oleh Akyol *et al* dimana vitamin D dapat menurunkan IL-6 secara signifikan, meski IL-8, TNF- α dan VEGF tidak turun bermakna (Akyol *et al.*, 2016).

Vitamin D memperlihatkan efek anti mitogenik pada sel endometrium ektopik. Miyashita dkk menunjukkan bukti vitamin D menghambat aktivasi $\text{nf-}\kappa\text{B}$, menurunkan jumlah dan sintesis DNA sel endometrium ektopik (Miyashita *et al.*, 2016). Vitamin D juga dapat mengurangi luas area endometriosis. Berbagai mekanisme pengurangan area endometriosis dihubungkan dengan vitamin D. Hambatan ekspresi gen VEGF-A, ekspresi VEGF dan MMP-9 pada stroma endometrium ektopik terjadi pada pemberian vitamin D sehingga kapasitas angiogenesis dan pertumbuhan lesi endometriosis terhambat (Yildirim *et al.*, 2014; Delbandi *et al.*, 2016). Delbandi *et al* juga membuktikan manfaat vitamin D pada sel stroma endometriosis. Pemberian vitamin D pada penelitian ini menurunkan tingkat invasi dan tingkat proliferasi sel endometrium ektopik (Delbandi *et al.*, 2016). Abbas dkk menyimpulkan bahwa vitamin D meregresi luas lesi endometriosis melalui modulasi angiogenesis dengan penurunan ekspresi VEGF dan penurunan aktivitas MMP-9 (Abbas *et al.*, 2013). Hasil yang berbeda didapatkan oleh Akyol *et al* (2016) dimana vitamin D meregresi implan endometriosis tetapi tidak berbeda signifikan.

Ingles *et al* (2017) meneliti tentang pengaruh vitamin D terhadap sel stroma endometriosis pada level genomik. Vitamin D didapatkan mengatur jalur *axonal guidance* melalui gen SLIT3. Jalur *axonal guidance* mengatur neuroangiogenesis dan berperan penting dalam pembentukan lesi serta nyeri endometriosis. Gen SLIT3 diekspresikan berlebih pada lesi endometriosis peritoneum dibandingkan normal. Selain jalur tersebut, vitamin D juga mengatur jalur *Rho GDP-Dissociation Inhibitor* (RhoGDI) yang berperan dalam pembentukan dan dinamika aktin. Jalur ini berkaitan dengan motilitas seluler sel-

sel stroma endometriosis. Jalur matriks metaloproteinase yang berperan dalam invasi sel endometriosis di lokasi ektopik juga merupakan jalur yang dihambat oleh vitamin D pada level genomik (Ingles *et al.*, 2017).

Penelitian eksperimental klinis vitamin D sejauh ini masih terbatas. Almassokiani dkk (2016) meneliti pemberian vitamin D pasca operasi ablasi endometriosis. Vitamin D 50.000 IU diberikan seminggu sekali selama 12 minggu. Nyeri panggul dan dismenorea pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol tetapi tidak signifikan (Almassinokiani *et al.*, 2016). Nodler *et al* (2020) meneliti efek pemberian Vitamin D pada wanita usia muda yang mengalami nyeri panggul endometriosis. Pasien usia 12-25 tahun diberikan vitamin D 2000 IU sekali/hari, 1000 mg minyak ikan sekali/hari atau plasebo sekali/hari selama 6 bulan. Vitamin D didapati mengurangi nyeri panggul secara signifikan, meski dengan hasil yang serupa dengan plasebo (Nodler *et al.*, 2020). Panduan terbaru ESHRE menyarankan klinisi untuk mempertimbangkan menangani nyeri endometriosis secara komprehensif dan mendiskusikan alternatif terapi non medis, salah satunya adalah dengan pemberian vitamin D (Becker *et al.*, 2022).

2.4.8 Vitamin D dan Interleukin-17

Hubungan vitamin D dengan IL-17 banyak diteliti pada kasus-kasus penyakit autoimun maupun inflamasi kronik, dengan hasil yang bervariasi. Ekspresi berlebih sel Th17 didapatkan pada kondisi gangguan pensinyalan vitamin D. Tikus tanpa vitamin D dan reseptor vitamin D memiliki fenotip sel T CD4⁺ yang lebih aktif. Sel T pada kondisi ini juga lebih banyak berdiferensiasi menjadi subset Th17 dan lebih banyak memproduksi IL-17 (Bruce *et al.*, 2011). 1,25(OH₂)D₃ memiliki efek represif terhadap ekspresi IL-17A (Joshi *et al.*, 2011). Pemberian vitamin D

pada tikus dengan ensefalomielitis autoimun eksperimental, menghilangkan paralisis dan mengurangi progresi penyakit serta menurunkan jumlah sel penghasil IL-17 A di sistem saraf pusat dan tepi. Kultur sel T CD4⁺ bersama dengan 1,25(OH)₂D₃ menghambat juga diferensiasi sel T menjadi sel Th17 (Bruce *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011). Mekanisme represi adalah melalui penekanan transkripsi melalui reseptor vitamin D. Penekanan transkripsi ini terjadi melalui penghambatan *nuclear factor for activated T cells* (NFAT), rekrutmen *histone deacetylase* (HDAC), sekuestrasi *Runt-related transcription factor 1* (Runx1) by 1,25(OH)₂D₃/VDR, dan efek langsung terhadap induksi Foxp3 (Joshi *et al.*, 2011).

Kadar serum vitamin D berbanding terbalik dengan kadar IL-17 pada pasien vitiligo (Aly *et al.*, 2017). Kadar vitamin D dan bentuk aktifnya menurun pada pasien dengan penyakit liver stadium lanjut. Kadar IL-17, sebaliknya, sangat meningkat pada kondisi serupa (Schaalan, 2012). defisiensi vitamin D dan peningkatan kadar IL-17 serum dan jaringan juga dijumpai pada Lichen Planus serta berkorelasi dengan derajat keparahan dan durasi penyakit (Mahmoud *et al.*, 2021).

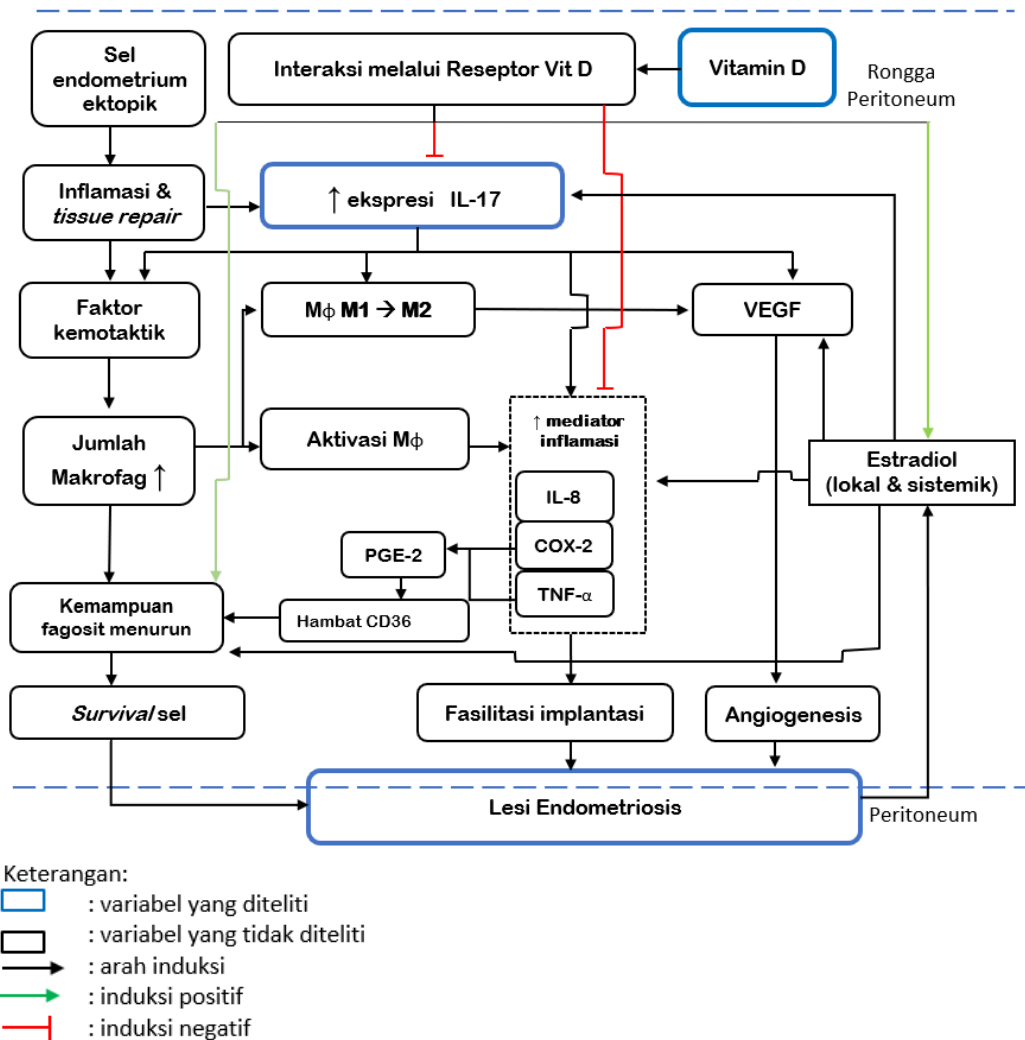
Suplementasi vitamin D₃ pada penyakit autoimun seperti penyakit Crohn, dapat menghambat jalur IL-17/IL-17R, memperbaiki fungsi imun dan menurunkan derajat keparahan penyakit (Xia *et al.*, 2019). IL-17 pada pasien Multiple Sclerosis menunjukkan penurunan saat kadar 25-hidroksivitamin D dalam serum di atas 20ng/ml (Bhargava *et al.*, 2015). Pemberian suplementasi Vitamin D dengan dosis 2000IU/hari selama 12 minggu mencegah peningkatan kadar serum TGF- β dan IL-17 pada pasien migrain. Profil Th17/Treg juga membaik pada kasus ini (Mahmoud *et al.*, 2021). Suplementasi vitamin D tidak selalu menurunkan kadar IL-17. Hasil

bertentangan didapatkan pada penelitian lain. Penelitian klinis yang dilakukan oleh Toghiafar *et al* berupa pemberian 50.000 IU Vitamin D3 tiap 5 hari selama 12 minggu menunjukkan hubungan yang positif dengan kadar IL-17 dibandingkan dengan plasebo (Toghianifar *et al.*, 2015).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka konsep penelitian

Sel endometrium ektopik di rongga peritoneum menyebabkan tubuh memulai respon imunitas non-spesifik dan spesifik sebagai bagian proses pembersihan oleh sistem imun. Reaksi inflamasi dan *tissue repair* yang terjadi menyebabkan peningkatan sitokin dan kemotaktik, salah satunya adalah peningkatan sel Th 17. IL-17 merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan oleh

Th17. IL-17 merupakan salah satu kemotaktik makrofag melalui reseptornya IL-17RA. Faktor kemotaktik menyebabkan rekrutmen monosit dari darah tepi ke peritoneum. Monosit berdiferensiasi menjadi *Small Peritoneal Macrophage* (SPM). Kondisi ini menyebabkan peningkatan jumlah makrofag di peritoneum. Peningkatan makrofag di peritoneum tetapi tidak diiringi dengan kemampuan *scavenging*. Makrofag pada endometriosis mengalami gangguan, salah satunya hambatan CD36 oleh Prostaglandin E2 melalui EP-2. Hambatan ini menyebabkan makrofag tidak dapat melakukan fungsi pembersihan dengan baik. Gangguan kapasitas fagosit ini menyebabkan sel-sel endometrium ektopik berhasil bertahan di rongga peritoneum.

Interleukin-17 (IL-17) menstimulasi produksi berbagai sitokin, antara lain IL-8 dan sekresi enzim COX-2. Makrofag juga merangsang peningkatan aktivitas sekresi sitokin, antara lain IL-8, IL-10, dan TNF- α serta mensekresi enzim COX-2. Enzim COX-2 dan TNF- α memproduksi PGE2. Sekresi sitokin dan enzim ini juga memfasilitasi lingkungan mikro peritoneum menjadi lingkungan yang mendukung implantasi dan proliferasi sel-sel stroma endometrium ektopik.

Interleukin-17 (IL-17) menstimulasi produksi faktor angiogenik, VEGF *platelet derived growth factor* (PDGF)-AA, *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12), dan *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). IL-17 juga mempengaruhi polarisasi makrofag menjadi tipe makrofag M2 secara tidak langsung. Faktor-faktor proangiogenik dan makrofag tipe M2 menstimulasi angiogenesis dan menjaga kondisi inflamatorik *milieu* peritoneum, memfasilitasi terbentuknya lesi endometriosis.

Lesi endometriosis mampu memproduksi estrogen secara lokal. Estrogen di rongga peritoneum baik yang dihasilkan secara lokal atau sistemik merupakan kunci dari perkembangan lesi endometriosis. Estrogen merangsang berbagai mediator inflamasi termasuk IL-17. Estrogen juga meningkatkan ekspresi VEGF-A dan merangsang proses angiogenesis. Hormon ini juga menyebabkan gangguan fagositosis makrofag sehingga menyebabkan gangguan bersihan sel endometrium di peritoneum.

Penelitian ini berhipotesis bahwa pemberian vitamin D akan menurunkan ekspresi IL-17 pada lesi endometriosis. Penurunan ini terjadi melalui interaksi dengan reseptor IL-17 (IL-17R). Interaksi ini diharapkan akan menurunkan kadar IL-17 pada cairan peritoneum. Penurunan kadar IL-17 akan berkontribusi pada penurunan faktor kemoatraktan monosit - makrofag ke rongga peritoneum. Kondisi ini akan menurunkan rekrutmen makrofag peritoneum. Penurunan kadar IL-17 juga berkontribusi pada penurunan faktor yang mempengaruhi polarisasi makrofag ke arah M2. Faktor ini menyebabkan penurunan derajat inflamasi peritoneum yang mengakibatkan penurunan fasilitasi implantasi sel endometrium ektopik. Penurunan kadar IL-17 juga menyebabkan penurunan faktor proangiogenik. Penurunan kondisi-kondisi tersebut akan mengurangi luas area endometriosis yang terbentuk. Vitamin D diketahui memiliki efek modulasi pada sistem imun selain IL-17. Interaksi reseptor vitamin D pada makrofag diketahui dapat memperbaiki fungsi fagositosis makrofag. Perbaikan fungsi fagosit ini dapat meningkatkan *clearance* sel endometrium ektopik. Vitamin D juga menghambat produksi TNF- α dan sekresi enzim COX-2. Proliferasi sel endometrium ektopik juga dihambat oleh vitamin D. Hal ini menyebabkan penurunan kondisi inflamasi yang memfasilitasi

establishment lesi endometriosis. Ekspresi gen VEGF juga dihambat sehingga angiogenesis berkurang. Hambatan angiogenesis ini mengganggu terbentuknya lesi endometriosis di rongga peritoneum. Vitamin D juga mempengaruhi kadar estrogen baik melalui perbaikan kualitas sel granulosa maupun proses steroidogenesis. Estrogen diketahui merupakan faktor kunci perkembangan endometriosis, termasuk merangsang ekspresi IL-17. Kondisi ini dapat berpotensi mempengaruhi hasil ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis pada penelitian ini. Tidak semua variabel-variabel ini akan diteliti pada penelitian ini, karena peneliti memfokuskan pada IL-17 dan luas lesi endometriosis. Faktor-faktor ini akan dibahas sebagai faktor yang berpotensi mempengaruhi hasil penelitian pada bagian pembahasan tesis ini.

Endometriosis dikaitkan dengan kondisi defisiensi vitamin D. Rekomendasi suplementasi vitamin D untuk penanganan defisiensi adalah 6000 IU/hari. Dosis suplementasi yang optimal untuk modulasi IL-17 belum diketahui, meski diketahui kadar Vitamin D serum minimal untuk modulasi adalah 20 ng/ml. Suplementasi vitamin D dalam berbagai tingkatan berdasarkan hal tersebut kemungkinan akan menunjukkan perbedaan dan dapat dianalisis untuk mencari dosis optimal penurunan IL-17. Penelitian ini dengan demikian berhipotesis bahwa terdapat hubungan antara tingkatan dosis dalam penurunan ekspresi IL-17 dan pengurangan luas area endometriosis.

3.2 Hipotesis Penelitian

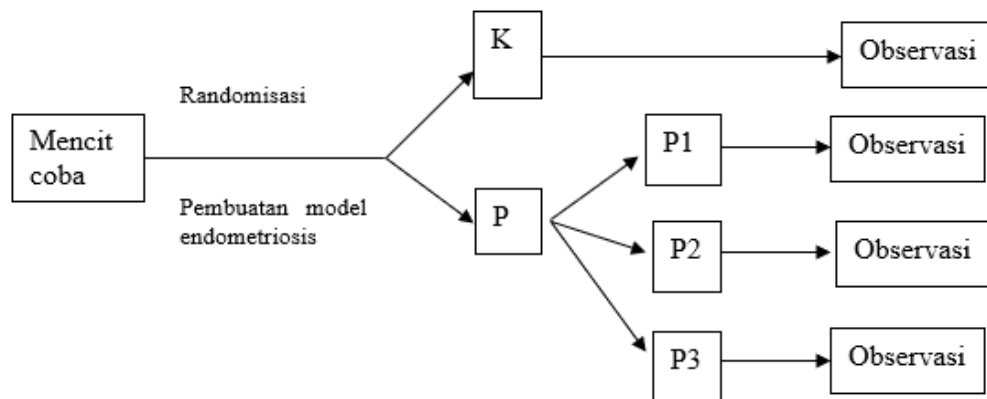
1. Suplementasi Vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU dapat menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah pada lesi endometriosis peritoneum mencit model endometriosis.
2. Suplementasi Vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU dapat menyebabkan area lesi endometriosis lebih kecil pada mencit model endometriosis.
3. Terdapat hubungan antara ekspresi IL-17 dengan luas lesi endometriosis.
4. Terdapat hubungan antara tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17 dan luas area endometriosis.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* pada hewan coba yaitu mencit, dengan menggunakan rancangan acak lengkap *post test only control group design*. Rancangan penelitian bila digambarkan secara skematis adalah sebagai berikut



Gambar 4. 1 Rancangan penelitian

Keterangan :

- K : kelompok mencit model endometriosis yang tidak mendapat perlakuan
- P1 : kelompok mencit model endometriosis yang mendapat perlakuan pemberian vitamin D dosis 8 IU
- P2 : kelompok mencit model endometriosis yang mendapat perlakuan pemberian vitamin D dosis 16 IU
- P3 : kelompok mencit model endometriosis yang mendapat perlakuan pemberian vitamin D dosis 24 IU

4.2 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga bulan Januari 2022 sampai selesai. Total waktu penelitian diperkirakan 8 minggu.

Rincian waktu pelaksanaan penelitian yaitu 1 minggu untuk aklimatisasi dan adaptasi, 2 minggu untuk pembuatan model endometriosis, 3 minggu untuk perlakuan dan 2 minggu untuk pemeriksaan imunohistokimia, luas lesi endometriosis dan analisis data statistik

4.3 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina usia reproduksi. Sampel penelitian ini adalah mencit coba (*Mus musculus*) laboratorium yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusi penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*) betina yang sehat berusia 3 bulan dan belum pernah kawin. Berat badan mencit berkisar antara 20-25 gram. Mencit dalam kondisi sehat yang ditandai dengan bulu bersih dan tidak mudah rontok, tidak cacat, dan tidak ada luka.

Kriteria eksklusi penelitian ini yaitu mencit yang cacat akibat pemberian perlakuan ataupun yang lemah setelah pemberian perlakuan. Mencit yang mati selama tahap pengumpulan data akan di-*drop out*.

4.3.2 Estimasi besar sampel

Sampel dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan dosis I (P1), dosis II (P2) dan dosis III (P3). Besar sampel untuk uji hipotesis terhadap rerata dua populasi dapat dihitung dengan rumus berikut (Madiyono *et al.*, 2014).

$$n = \frac{[SD \times (Z\alpha + Z\beta)]^2}{(\mu_1 - \mu_0)^2}$$

Keterangan :

- n : besar sampel tiap kelompok
- SD : Simpang baku kedua kelompok.
- $Z\alpha$: nilai pada Z pada α 0,05 didapatkan 1,96
- $Z\beta$: nilai Z pada β 0.1 didapatkan 1,28
- μ_1 : mean outcome kelompok yang tidak terpapar
- μ_0 : mean outcome kelompok yang terpapar

Nilai SD, μ_1 dan μ_0 didapatkan dari penelitian Abbas *et.al* dengan perhitungan sebagai berikut (Abbas *et al.*, 2013).

$$n = \frac{[4 \times (1,96 + 1,28)]^2}{(6)^2}$$

Didapatkan n sebesar 4,7. Besar sampel minimal untuk tiap kelompok dibulatkan menjadi 5. Sampel ditambahkan dengan faktor koreksi sebesar 0,2 untukantisipasi apabila terdapat kejadian yang tidak diinginkan sehingga didapatkan sampel tiap kelompok sejumlah 6.

4.3.3 Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara randomisasi. Randomisasi dilakukan dengan dengan menandai mencit dengan nomer, lalu secara acak memilih nomer mencit untuk dimasukkan dalam kelompok tertentu.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu ekspresi IL-17 pada lesi Peritoneum dan luas Lesi endometriosis

4.4.2 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu pemberian Vitamin D dosis 8 IU, 16 IU, dan 24 IU.

4.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini yaitu lingkungan, sanitasi dan pemeliharaan hewan coba (termasuk pemberian makanan dan minuman, pembersihan kandang, menjaga kondisi lingkungan kandang), serta cara pemberian perlakuan.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional variabel bebas dan terikat pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 4.1.

4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.6.1. Bahan penelitian

Bahan perawatan dan perlakuan hewan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi pelet makanan hewan sebanyak 4-5 gram/ 100 gram BB/ ekor, air minum ad libitum, dan suplementasi vitamin D sesuai kelompok. Bahan untuk pembuatan model endometriosis yang digunakan yaitu siklosporin A 10 mg/kg BB, biopsi endometrium dari pasien yang menjalani operasi tumor jinak uterus, dan hormon estrogen 20.000 IU 0,1 ml/mencit. Bahan pemeriksaan yang digunakan yaitu lesi endometriosis peritoneum dan antibodi untuk pemeriksaan imunohistokimia Interleukin-17.

Tabel 4. 1 Definisi operasional variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur data	Satuan	Skala data
1.	Variabel Bebas Vitamin D	produk suplemen vitamin D dengan kandungan bahan aktif vitamin D3 400 IU/ kapsul. Vitamin D akan diberikan dengan dosis yang berbeda pada 3 kelompok perlakuan yaitu 8 IU, 16 IU dan 24 IU selama 21 hari per oral dengan sonde lambung	Neraca, mikropipet	IU	Ordinal
2	Variabel terikat Ekspresi IL-17	Ekspresi IL-17 adalah hasil pemeriksaan yang diukur dengan metode imunohistokimia dari lesi endometriosis. Preparat untuk pemeriksaan IHK disiapkan dengan mengiris lesi dengan ketebalan tertentu, lalu dilakukan preparasi dan fiksasi spesimen. Penilaian dilakukan dengan skor IRS yaitu perkalian skor persentase sel yang imunoreaktif dengan intensitas warna. Pemeriksaan akan dilakukan dengan mikroskop cahaya Nikon H600 dan pembesaran digunakan 400x	Skor imunoreaktif dari pemeriksaan imunohistokimia	-	Interval
	Luas Lesi endometriosis	Luas area endometriosis yang superfisial pada peritoneum mencit, diasumsikan berupa nodul atau lesi dengan hipervaskularisasi. Lesi maupun nodul difoto dengan standar tertentu. hasil akan dimasukkan dan dihitung dengan analisa terkomputerisasi Motic software (Sauqi <i>et al.</i> , 2020).	<i>Motic software</i>	mm ²	Rasio

4.6.2. Instrumen penelitian

Instrumen yang digunakan dalam perawatan hewan coba yaitu kandang hewan coba dengan tutup kandang dari kawat, tempat makan dan minum, serta sekam. Alat suntik diperlukan untuk pembentukan model endometriosis. Peralatan yang diperlukan untuk pembedahan hewan coba meliputi sarung tangan, skalpel, pinset, gunting, kassa, tabung spesimen dengan penutup, dan meja diseksi yang ada di laboratorium hewan Fakultas Kedokteran Hewan Fakultas Airlangga. Instrumen untuk persiapan pemberian perlakuan yaitu timbangan, pipet, dan sonde. Instrumen yang diperlukan dalam pembuatan sediaan histologi yaitu *blade*, kaca obyek, kaca penutup, pipet, peralatan pemulasan dan, peralatan fiksasi, serta mikroskop. Kamera, komputer dan program *motic images* digunakan untuk pengukuran luas lesi endometriosis.

4.7 Prosedur dan Tahapan Penelitian

4.7.1 Persiapan hewan coba

Mus musculus betina yang memenuhi kriteria inklusi didapatkan dari otoritas resmi yang menyediakan hewan coba laboratorium.

4.7.2 Randomisasi dan Alokasi hewan coba

Mencit diacak dan dialokasikan ke masing-masing kelompok. Mencit akan dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok Kontrol negatif (K), kelompok perlakuan dosis I (P1), kelompok perlakuan dosis II (P2) dan kelompok perlakuan dosis III (P3). Kelompok kontrol negatif adalah kelompok mencit model endometriosis yang tidak mendapat perlakuan. Kelompok perlakuan adalah kelompok mencit model endometriosis yang mendapatkan vitamin D dalam dosis bertingkat. Mencit

ditandai dengan nomor sesuai kelompok dan kandang dilabel dengan nama kelompok.

4.7.3 Aklimatisasi dan adaptasi

Mencit diaklimatisasi di kandang sesuai kelompok dan mendapatkan makanan dan minuman serupa selama 1 minggu. Pakan yang diberikan adalah pakan standar dan minum *ad libitum*. Mencit dianggap sehat bila perubahan berat badan tidak lebih dari 10 % dari kriteria inklusi sampel dan perilaku normal. Mencit dikeluarkan dari penelitian bila sakit.

4.7.4 Persiapan pembuatan model.

Mencit akan diinjeksi siklosporin A 10mg/kgBB yang dikonversi menjadi 1,82 mg/mencit. Satu ampul siklosporin A setara dengan 50mg/ml diencerkan dengan *water for injection* sebanyak 4 ml. Dosis injeksi siklosporin didapatkan 0,2 ml/ mencit. Penyuntikan siklosporin dilakukan secara intramuskular pada femur bagian posterior dengan spuit 1 ml.

Mencit lalu diinjeksi dengan jaringan biopsi endometrium 0,1 cc intraperitoneal secara membuta selama 60 detik. Jaringan endometrium diambil dari bahan endometrium uterus tumor jinak yang disimpan di PBS. Bahan dicuci dua kali dengan sentrifugasi 2500 rpm. Supernatan dibuang lalu ditambah PBS, penisilin 200 IU/ml dan streptomisin 200 mikrogram/ml. Bahan diambil dengan spuit sebanyak 0,1 ml dan disuntikkan secara intraperitoneal secara membuta. Mencit lalu diinjeksi estrogen 20.000 IU sebanyak 0.1 ml/mencit secara intramuskular di femur pada hari kesatu dan kelima. Hewan coba diharapkan menjadi model endometriosis pada hari keempat belas.

4.7.5 Pembuatan suplementasi vitamin D

Suplementasi vitamin D yang digunakan pada penelitian ini menggunakan sediaan vitamin D3 yang ada di pasaran berupa kapsul atau tablet salut selaput 400 IU.

Endometriosis dikaitkan dengan defisiensi vitamin D sehingga penentuan dosis mengacu pada kecukupan vitamin D menurut *Endocrine Society* untuk mengatasi defisiensi-insufisiensi yaitu 6.000 IU (Holick *et al.*, 2011). Koefisien perkalian untuk mencit 20 gram adalah 0,0026 sehingga dosis untuk mencit 20 gram adalah $6000 \times 0,0026 = 15,6$ IU dibulatkan menjadi 16 IU. Dosis ini akan menjadi dosis perlakuan kelompok P2. Dosis tersebut akan dinaikkan 50% menjadi 9000 IU sebagai dosis perlakuan P3 dan diturunkan 50% menjadi 3000 IU sebagai dosis perlakuan P1. Untuk dosis 9000 IU, maka dosis untuk mencit adalah 23,4 dibulatkan menjadi 24 IU. Untuk dosis 3000 IU maka vitamin D yang diberikan adalah 7,8 dibulatkan menjadi 8 IU.

4.7.6 Pemberian perlakuan sesuai kelompok

Perlakuan dimulai setelah 14 hari sesuai kelompok. Kelompok K sebagai kontrol negatif tidak diberi perlakuan. Kelompok P1, P2 dan P3 diberikan suplementasi vitamin D sebesar 8 IU, 16 IU dan 24 IU selama 21 hari. Vitamin D akan diberikan oral per sonde. Sonde lambung yang digunakan adalah modifikasi jarum khusus dengan ujung bulat dan berukuran 20 dengan panjang 5 cm. mencit dipegang dengan baik saat menyonde. cara pemberian per sonde yaitu (1) sonde lambung ditempelkan pada langit-langit atas mulut mencit (2) kemudian sonde dimasukkan perlahan hingga esofagus, (3) vitamin D disemprotkan perlahan. Pemberian perlakuan dilakukan pada pagi hari setelah makan agar absorpsi

sempurna. Kadar serum vitamin D akan diperiksa untuk mengetahui korelasi dosis dengan kadar serum dan dapat digunakan sebagai data tambahan untuk analisa hasil penelitian.

4.7.7 Pengambilan bahan pemeriksaan dan pengukuran variabel

Pengambilan bahan pemeriksaan dilakukan pada hari ke 37. Mencit dianestesi dahulu agar tenang. Mencit selanjutnya dikorbankan dengan cara dislokasi os cervikalis. Mencit yang mati dicirikan dengan mata redup, refleks pupil negatif dan denyut jantung negatif.

Luas lesi endometriosis diukur dengan pembedahan abdomen mencit lalu dilanjutkan dengan pembukaan peritoneum. Tujuannya adalah untuk melihat penampang peritoneum. Penampang peritoneum diletakkan kaca obyek besar dan difoto menggunakan kamera DS Fi2 300 megapiksel. Pengambilan foto dilakukan dengan standar tertentu dan dilakukan dokumentasi. Hasil dihitung dengan program *motic image*.

Langkah selanjutnya adalah persiapan pembuatan preparat histologis. Sediaan lesi endometriosis difiksasi dalam formalin 10% minimal 2 jam. Jaringan dimasukkan ke dalam *casette tissue* dan direndam alkohol (70%, 80% dan 96%). Jaringan dilakukan *clearing* menggunakan xylol 3 kali masing-masing 60 menit. Jaringan lalu direndam dalam parafin cair dengan titik lebur 58° C pada suhu 45° C dalam inkubator selama 24 jam. Blok parafin jaringan lalu dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 5-7 µm. Jaringan yang telah dipotong diletakkan pada *slide* poly L-lysine dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 malam. *Slide* yang telah diinkubasi dilakukan mounting dengan gelatin 5%. Gelas obyek tersebut direndam dalam xylol 4 kali masing-masing selama 5 menit. *Slide* selanjutnya

direhidrasi dengan alkohol (70%, 80% dan 96%) lalu dibilas dengan aquades selama 5 menit.

Slide selanjutnya dicuci dengan PBS dua kali selama 5 menit. *Slide* ditetesi dengan H₂O₂ 0,3% selama 15 menit dan dicuci dengan aquades selama 5 menit. Selanjutnya *slide* dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing 5 menit dan ditetesi dengan *blocking serum* dan ditiriskan. Setelah itu *slide* ditetesi dengan antibodi IL-17 yang telah disiapkan. *Slide* diinkubasi pada suhu 4° C semalam. Selanjutnya *slide* dicuci 2 kali 5 menit dengan PBS. Antibodi sekunder ditetaskan ke *slide* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan. Selanjutnya *slide* diberi kromogen dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. *Slide* dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dilanjutkan dengan *counterstaining* bila perlu. *Slide* didehidrasi, *clearing* dan *mounting*. Pemeriksaan *slide* dilakukan dengan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan kamera DSLR. Pengukuran dilakukan dengan skor *immunoreactive scoring*. Setelah penelitian, semua mencit pada penelitian ini akan dikuburkan

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

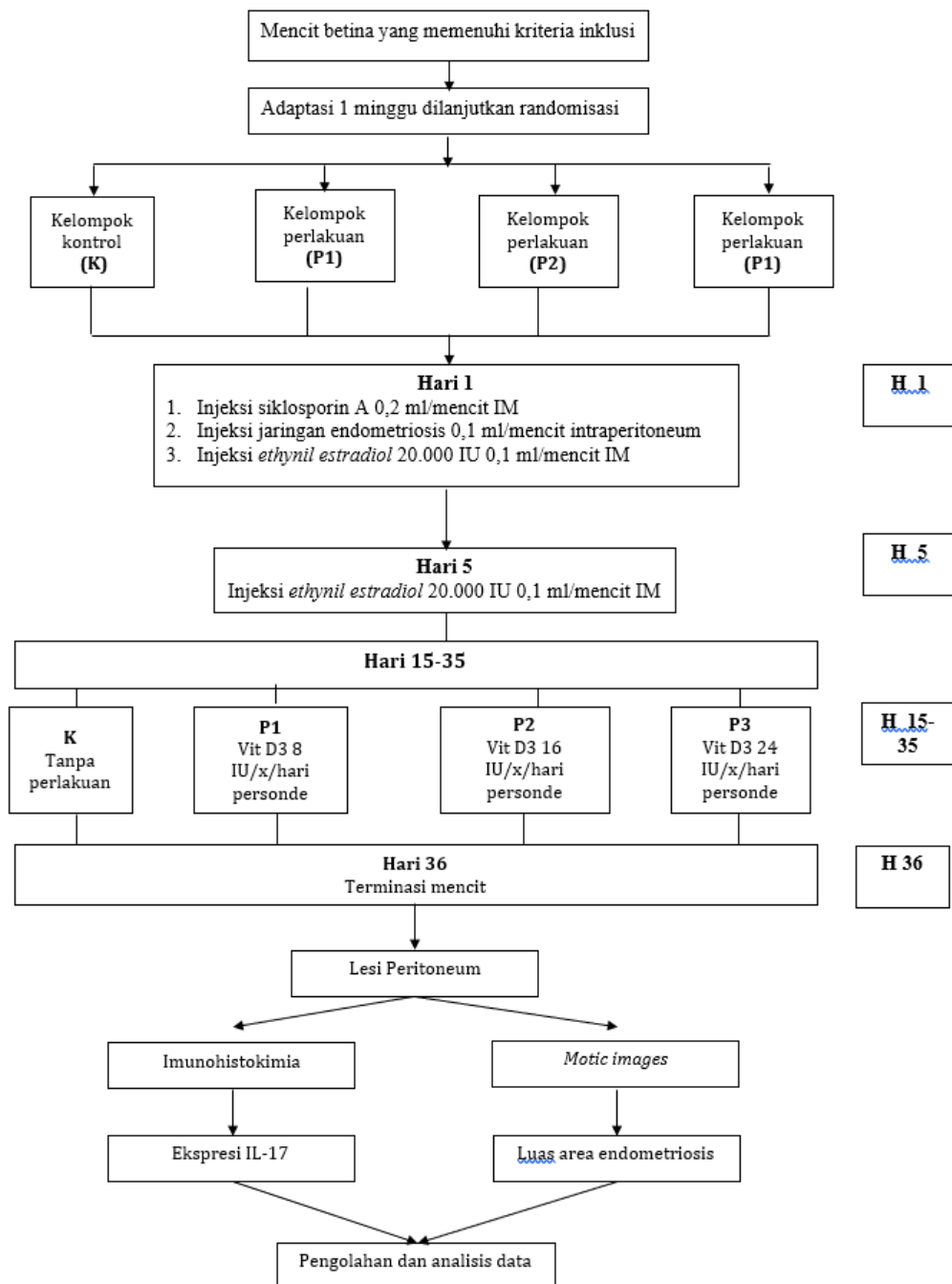
Setelah pengambilan data selesai, data diperiksa kelengkapan, kesinambungan dan kesesuaiannya. Data lalu dikode untuk memudahkan pengolahan dan dimasukkan ke database komputer. Data penelitian akan diolah secara statistik dengan derajat kepercayaan 95%. Pengolahan dan analisa data akan dilakukan dengan program SPSS. Data disajikan dalam bentuk tabel berupa rerata dan simpangan baku.

4.9 Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional penelitian ini dapat dilihat pada gambar 4.2.

4.10 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Komite Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan nomor 2.KE.143.12.2021 pada tanggal 29 Desember 2021.



Gambar 4. 2 Kerangka operasional penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Gambaran Umum Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari 2022 hingga Februari 2022 di laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Sampel penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) sejumlah 24 ekor yang terbagi menjadi empat kelompok. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Komite Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan nomor 2.KE.143.12.2021.

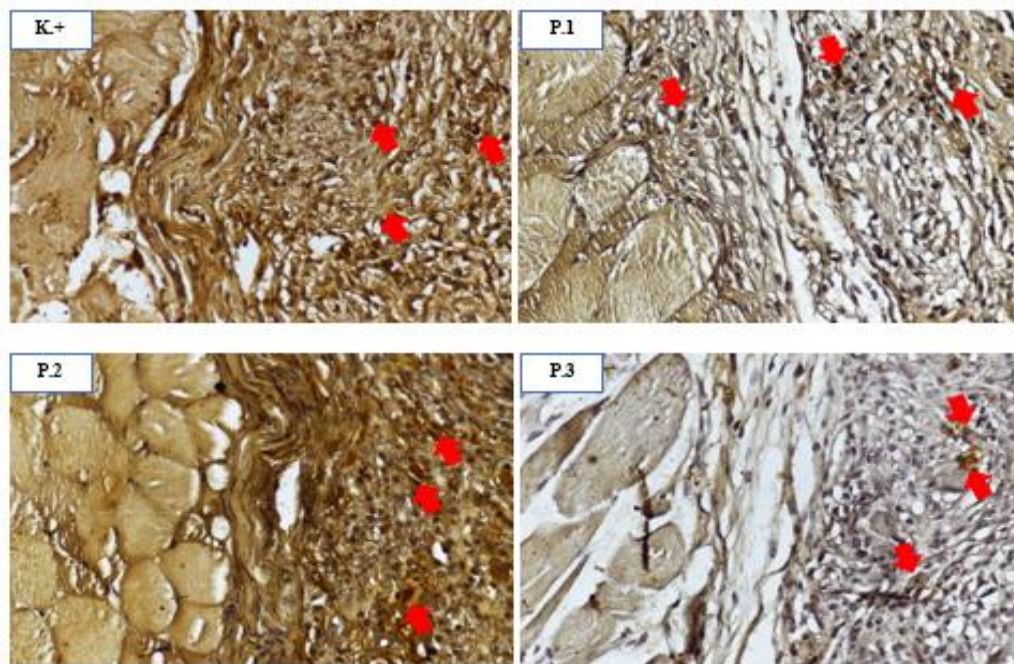
Data dari pemeriksaan sampel luas lesi endometriosis dan ekspresi IL-17 dianalisis. Data disajikan tiap kelompok untuk tiap variabel. Data disajikan secara deskriptif dalam tabel berupa nilai rerata disertai simpang baku. Data selanjutnya dianalisis dengan uji statistik yang sesuai. Tingkat kemaknaan (p) ditetapkan sebesar 0,05. Uji statistik untuk perbandingan rerata antar kelompok akan dilakukan sesuai dengan distribusi data. Uji statistik juga dilakukan untuk mengetahui hubungan antar variabel dependen.

Penelitian ini menggunakan metode induksi endometriosis heterolog dengan dasar model endometriosis ringan. Secara garis besar, lesi yang timbul akibat metode ini berupa lesi kistik berwarna putih atau merah hingga kecoklatan maupun tumor padat berwarna gelap. Lesi yang diamati pada penelitian ini adalah lesi yang ada pada penampang peritoneum mencit.

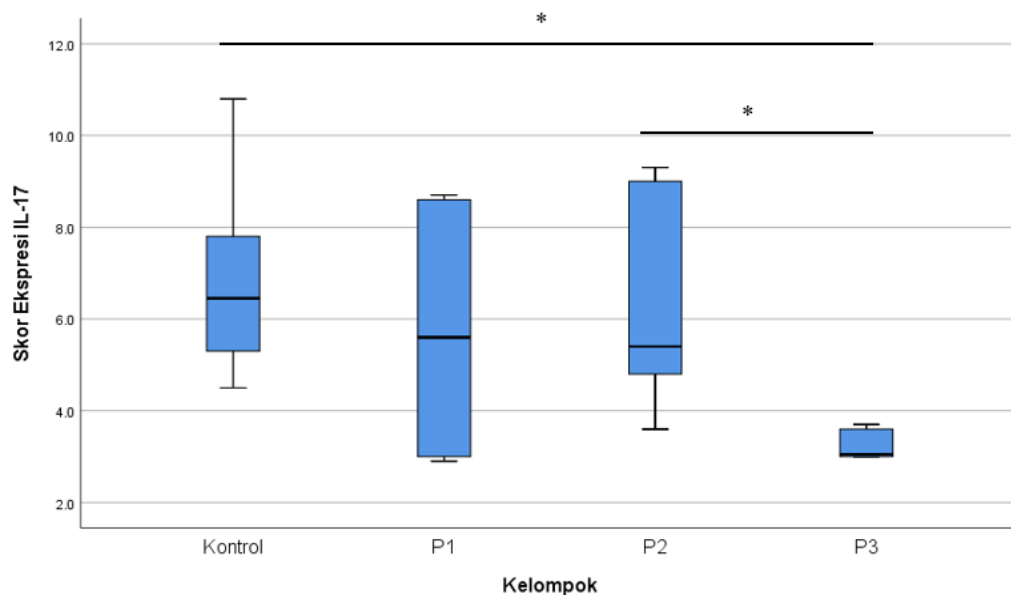
5.2 Pengaruh Vitamin D terhadap Ekspresi IL – 17

Ekspresi IL-17 diukur dengan pemeriksaan histopatologi jaringan peritoneum setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Data setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada sepuluh Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 100x dan 400x.

Gambar 5.1 menunjukkan foto perbandingan imunohistokimia ekspresi IL-17 antar kelompok. Sel-sel endometriosis yang mengekspresikan IL-17 pada preparat tersebut terwarnai coklat kromogen yang ditunjukkan dengan panah merah pada pembesaran 400 kali. Terlihat bahwa semua kelompok mengekspresikan IL-17 dengan ekspresi paling kuat terlihat pada slide kelompok K dan gambaran ekspresi paling lemah pada kelompok P3. Preparat kelompok P2 memberikan gambaran ekspresi yang lebih kuat dibandingkan kelompok perlakuan lain meski lebih lemah dibanding kelompok kontrol. Nilai ekspresi IL-17 dengan skor IRS selanjutnya dihitung dan dianalisis. Hasil skoring ekspresi IL-17 terdistribusi seperti yang dapat dilihat pada gambar 5.2 berikut.



Gambar 5.1 Perbandingan ekspresi IL-17. Pemeriksaan IHK pada sel-sel endometriosis setiap kelompok perlakuan. Panah merah menunjukkan adanya ekspresi IL-17 pada sel-sel endometriosis. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. K : kelompok kontrol; P1 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 8 IU; P2 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 16 IU; P3 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 24 IU.



Gambar 5.2 Distribusi skor ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis. Tanda * menunjukkan beda signifikan ($p < 0,05$).

Perbedaan distribusi skor ekspresi IL-17 antar kelompok dapat terlihat dari grafik tersebut, dengan nilai median tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol dan terendah didapatkan pada kelompok P3. Gambar tersebut juga menunjukkan kecenderungan penurunan ekspresi IL-17 pada semua kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ekspresi IL-17 terendah didapatkan pada kelompok P1 dan P3. Kelompok P2 memiliki median ekspresi IL-17 lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain meski lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol.

Kecenderungan serupa juga ditunjukkan dari nilai rerata ekspresi IL-17 yang terangkum pada tabel 5.1. Kecenderungan penurunan rerata ekspresi IL-17 ditunjukkan oleh rerata pada kelompok kontrol lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3. Grafik dan tabel tersebut menunjukkan bahwa mencit model endometriosis yang diberikan vitamin D dosis 8 IU, 16 IU dan 24 IU memiliki ekspresi IL-17 yang lebih rendah dibandingkan dengan mencit model endometriosis yang tidak diberikan vitamin D. Dosis vitamin D sebesar 24 IU menyebabkan ekspresi IL-17 pada lesi yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Tabel 5.1 Rerata dan simpang baku skor ekspresi IL-17 antar kelompok.

Ekspresi IL-17	Kelompok			
	K (n = 6)	P1 (n=6)	P2 (n=6)	P3 (n=6)
Rerata	6,9 ± 2,2	5,7 ± 2,8 ^a	6,3 ± 2,4 ^a	3,2 ± 0,3 ^{*ab}

Keterangan : Perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol ditandai dengan * (p < 0,05). Perbedaan bermakna antar kelompok ditunjukkan dengan huruf yang berbeda. K : kelompok kontrol; P1 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 8 IU; P2 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 16 IU; P3 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 24 IU.

Analisis statistik selanjutnya dilakukan untuk menguji apakah perbedaan ekspresi IL-17 antar kelompok tersebut bermakna secara statistik. Uji normalitas data dengan Shapiro Wilk dilakukan untuk mengetahui distribusi data. Pengujian data menghasilkan p untuk kelompok P3 sebesar $< 0,05$ sehingga disimpulkan terdapat kelompok dengan data yang tidak terdistribusi normal. Uji Kruskal Wallis digunakan untuk membandingkan rerata skor ekspresi IL-17 dari empat kelompok, dengan nilai p sebesar 0,029. Analisis *post hoc* dilakukan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Tabel 5.2 menyajikan hasil uji statistik tersebut.

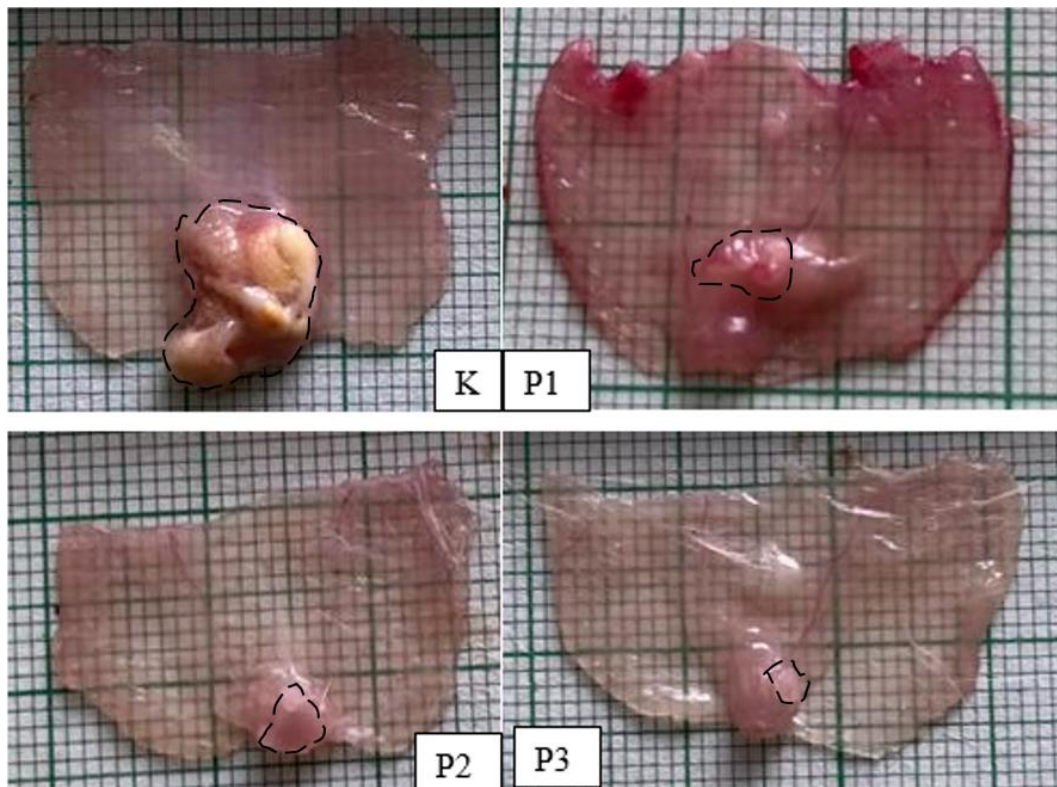
Tabel 5. 2 Perbandingan skor ekspresi IL-17 antar kelompok. Uji Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Nilai p antar kelompok diuji dengan uji Mann-Whitney.

	Beda rerata	Nilai p
K vs P1	1,2	0,522
K vs P2	0,6	0,574
K vs P3	3,7	0,004
P1 vs P2	0,5	0,423
P1 vs P3	2,5	0,253
P2 vs P3	3	0,004

Hasil analisis menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan P3, tetapi tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan P1 maupun P2. Kesimpulan yang dapat diambil adalah secara statistik, terdapat perbedaan ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis yang diberikan vitamin D dosis 24 IU dibandingkan dengan mencit model endometriosis yang tidak diberikan perlakuan. Perbedaan ekspresi IL-17 didapatkan pada mencit model endometriosis yang diberikan vitamin D dosis 8 IU dan 16 IU dibandingkan dengan mencit model endometriosis yang tidak diberikan perlakuan tetapi tidak bermakna.

5.3 Pengaruh Vitamin D terhadap Luas Lesi Endometriosis

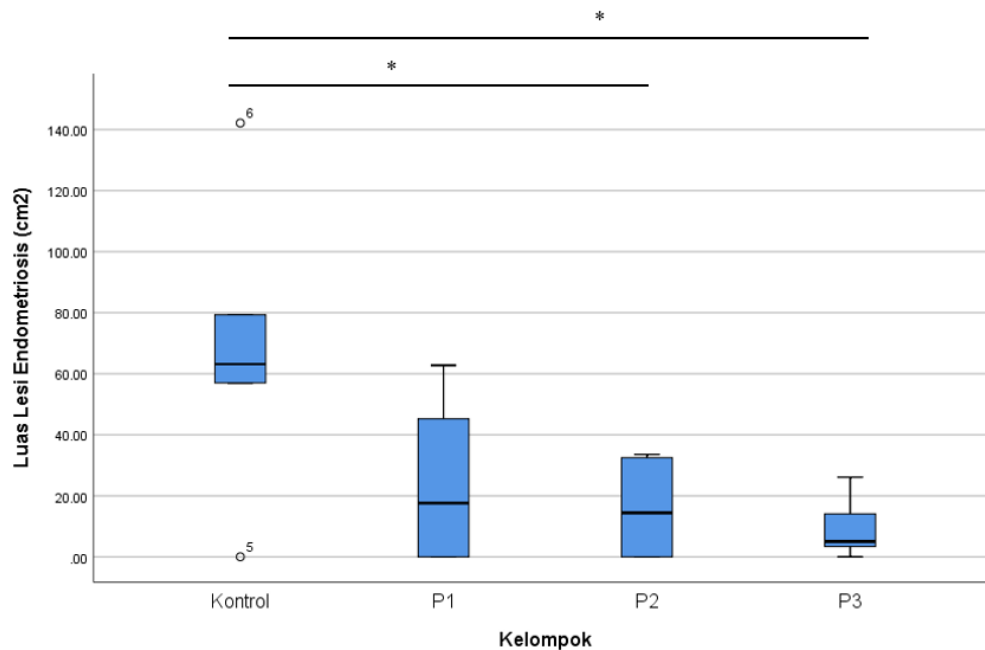
Luas lesi endometriosis superfisial di peritoneum diukur dengan program *motric images*. Semua lesi pada peritoneum didokumentasikan dan dimasukkan dalam program sesuai langkah-langkah tertentu. Gambar 5.3 berikut menunjukkan foto lesi endometriosis pada penampang peritoneum pada saat terminasi.



Gambar 5.3 Lesi endometriosis mencit model endometriosis. Peritoneum kelompok K, P1, P2 dan P3 didokumentasikan saat terminasi. Garis hitam putus-putus menunjukkan lesi endometriosis.

Gambar 5.4 menunjukkan grafik perbandingan luas lesi endometriosis antar kelompok. Data juga dirincikan distribusi reratanya di tabel 5.3. Gambar dan tabel tersebut menunjukkan kecenderungan luas lesi yang lebih kecil pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan luas lesi endometriosis pada kelompok kontrol. Luas lesi yang paling kecil didapatkan pada kelompok P3. Antar kelompok

perlakuan ditemukan kecenderungan penurunan luas lesi endometriosis seiring dengan peningkatan dosis perlakuan Vitamin D.



Gambar 5.4 Distribusi luas lesi endometriosis. Tanda ‘*’ menunjukkan beda bermakna pada $p < 0,05$.

Tabel 5.3 Rerata dan simpang baku luas lesi endometriosis mencit model endometriosis pada kelompok kontrol dan perlakuan pemberian vitamin D.

	Kelompok			
	K (n = 6)	P1 (n=6)	P2 (n=6)	P3 (n=6)
Rerata (mm ²)	63,2 ± 45,7	23,9 ± 27,6 ^a	15,8 ± 16,1 ^{*a}	8,9 ± 9,6 ^{*a}

Keterangan : Perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol ditandai dengan * ($p < 0,05$). Perbedaan bermakna antar kelompok ditandai dengan huruf yang berbeda. K: kelompok kontrol; P1 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 8 IU; P2 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 16 IU; P3 : kelompok perlakuan Vitamin D dosis 24 IU

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui tingkat kemaknaan perbedaan luas lesi endometriosis antar kelompok. Distribusi data diuji dahulu dengan uji Shapiro Wilk dan didapatkan nilai p pada seluruh kelompok sebesar $> 0,05$. Nilai p tersebut menunjukkan data luas lesi endometriosis terdistribusi

normal. Uji untuk mengetahui homogenitas data selanjutnya dilakukan dengan hasil $p > 0,05$ yang diinterpretasikan sebagai data homogen. Uji statistik selanjutnya dilakukan dengan uji ANOVA karena syarat data terdistribusi normal dan homogen terpenuhi. Tabel 5.4 menunjukkan hasil analisis uji ANOVA dan uji *post hoc* dengan Tukey HSD.

Tabel 5. 4 Perbandingan luas lesi endometriosis antar kelompok pada mencit model endometriosis. Uji Anova, $p < 0,05$. Uji Post Hoc Tukey HSD.

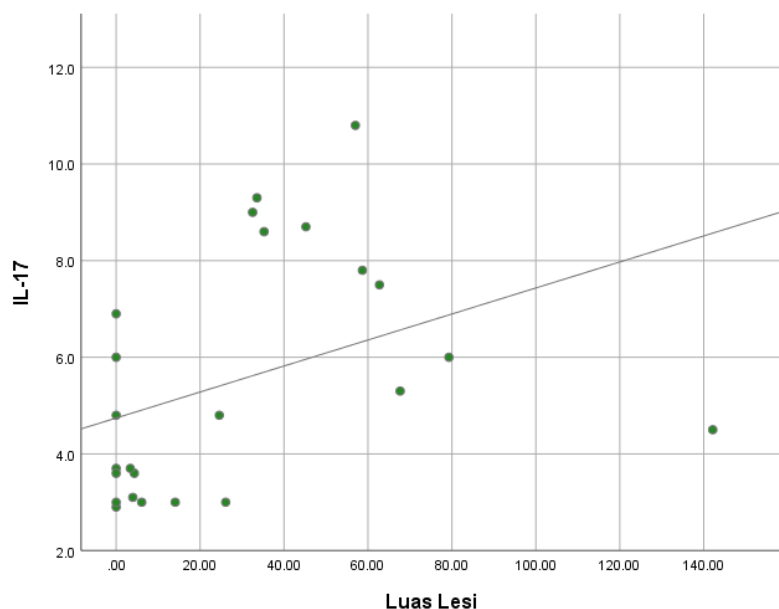
	Beda rerata	Nilai p
K vs P1	43.6	0,065
K vs P2	51,6	0,023
K vs P3	58.5	0,009
P1 vs P2	0,5	0,423
P1 vs P3	2,5	0,253
P2 vs P3	3	0,004

Hasil analisis ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan minimal terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan ekspresi IL-17 yang bermakna. Untuk mengetahui antar kelompok mana yang mempunyai perbedaan maka uji post hoc dengan Tukey HSD dilakukan. Hasil uji post hoc menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan P2 serta kelompok kontrol dan P3. Perbedaan yang tidak signifikan secara statistik didapatkan antara kelompok K dan P1.

Kesimpulannya, secara statistik, terdapat perbedaan rerata luas lesi endometriosis pada mencit model endometriosis yang diberikan vitamin D dosis 16 IU dan dosis 24 IU dibandingkan kontrol. Perbedaan rerata luas endometriosis dengan pemberian vitamin D dosis 8 IU juga ditemukan meski tidak bermakna.

5.4 Hubungan Ekspresi Interleukin-17 dengan Luas Lesi Endometriosis

Hubungan antara variabel ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis diuji dengan uji korelasi. Pengujian asumsi linearitas dilakukan dahulu dan didapatkan nilai *deviation from linearity* sebesar 0,114. Nilai tersebut menunjukkan adanya linearitas antar variabel sehingga dapat dilanjutkan dengan uji Spearman. Uji Spearman dipilih karena salah satu variabel memiliki distribusi data tidak normal. Nilai p yang didapatkan dari uji tersebut adalah 0,012 dan koefisien korelasi sebesar 0,505. Kesimpulannya, secara statistik, ekspresi IL-17 memiliki korelasi positif yang signifikan dengan luas lesi endometriosis pada mencit model endometriosis.



Gambar 5.5 Grafik hubungan antara IL-17 dan luas lesi endometriosis. Uji Spearman diperoleh koefisien korelasi 0,505 (p 0,012).

5.5 Hubungan Tingkat Dosis Vitamin D dengan Luas Lesi dan Ekspresi Interleukin-17

5.6.1 Hubungan tingkat dosis vitamin D dan ekspresi Interleukin-17

Hubungan tingkat dosis Vitamin D dan ekspresi IL-17 diuji dengan membandingkan ekspresi IL-17 antar kelompok perlakuan. Uji dilakukan antar dua

kelompok menggunakan Mann-Whitney. Perbandingan ekspresi IL-17 antar kelompok untuk tingkat dosis yang berbeda dapat dilihat pada tabel 5.2 di atas. Perbandingan antara kelompok P2 dan P3 memberikan hasil yang signifikan, dengan p senilai 0,004. Perbandingan antar kelompok lain tidak bermakna secara statistik.

Kesimpulannya, secara statistik, terdapat hubungan antara tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17. Ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis yang mendapat dosis vitamin D 24 IU secara bermakna lebih rendah bila dibandingkan dengan mencit model endometriosis yang mendapat dosis 16 IU. Ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis yang mendapat dosis 24 IU lebih rendah dibandingkan dengan mencit yang mendapat dosis 8 IU, tetapi tidak didapatkan kemaknaan.

5.6.2 Hubungan tingkat dosis vitamin D dan luas lesi endometriosis

Hubungan tingkat dosis dan luas lesi endometriosis diuji dengan membandingkan luas lesi endometriosis antar dua kelompok perlakuan. Perbandingan luas lesi endometriosis antar kelompok perlakuan disajikan dalam tabel 5.4 di atas. Tabel tersebut menunjukkan nilai $p > 0,05$, sehingga beda dosis tidak bermakna secara statistik. Perbedaan p paling besar didapatkan antara kelompok P1 dengan P3. Hal ini konsisten dengan beda nilai p masing-masing kelompok dengan kelompok Kontrol. Kesimpulan yang dapat diambil adalah tidak terdapat hubungan bermakna antara tingkat dosis vitamin D dengan luas lesi endometriosis. Luas lesi endometriosis pada mencit model endometriosis paling kecil didapatkan pada dosis 24 IU bila dibandingkan dengan dosis lain.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Mencit sebagai Model Endometriosis

Endometriosis masih menjadi penyakit yang belum dipahami secara menyeluruh baik dalam hal diagnosis maupun terapi. Kurangnya pemahaman ini menggambarkan pengetahuan patogenesis penyakit yang masih belum lengkap. Penanda non bedah sebagai metode diagnosis dan surveilans endometriosis belum ada hingga saat ini. Hal ini menyebabkan penelitian hubungan temporal untuk mengetahui dasar patogenesis endometriosis menjadi kurang etis dan tidak praktis bila dilakukan pada manusia. Model binatang merupakan sumber yang potensial dalam penelitian patogenesis, perkembangan penanda dan terapi baru untuk penyakit ini (Burns *et al.*, 2022). Pemilihan jenis hewan sebagai model endometriosis perlu mempertimbangkan berbagai hal, termasuk kemudahan memperoleh dan cara penanganan. Mencit sebagai hewan model memiliki homologi yang tinggi dengan manusia (Widjiati, 2021). Mencit juga merupakan model endometriosis yang lazim digunakan karena perawatan relatif lebih mudah dan murah dibanding model endometriosis lain. Hal-hal tersebut yang menyebabkan penelitian ini menggunakan mencit sebagai model endometriosis.

Penelitian ini menggunakan metode induksi endometriosis heterolog melalui injeksi jaringan endometrium manusia ke rongga intraperitoneal mencit. Model endometriosis pada penelitian ini merupakan model endometriosis ringan. Lesi yang timbul akibat metode ini berupa lesi kistik berwarna putih atau merah hingga kecoklatan maupun tumor padat berwarna gelap pada peritoneum. Metode ini unggul dalam mempelajari tahap awal penyakit termasuk angiogenesis, defek

apoptosis, proliferasi endometrium dan inflamasi. Metode ini juga paling menyerupai patofisiologi menstruasi retrograde pada manusia. Keunggulan lain adalah model heterolog ini didasarkan pada jaringan endometrium manusia sehingga perkembangannya dianggap menyerupai lesi endometriosis pada manusia (Taniguchi *et al.*, 2021). Metode ini memiliki kekurangan dalam hal jumlah, distribusi dan fenotip lesi endometriosis karena tergantung jumlah jaringan dan ukuran fragmen endometrium yang diinjeksikan (Burns *et al.*, 2022). Kekurangan lain adalah mencit sebagai spesies yang tidak mengalami menstruasi mungkin tidak merefleksikan seluruh aspek patofisiologi endometriosis yang sesungguhnya (Taniguchi *et al.*, 2021).

6.2 Hubungan Vitamin D dengan Interleukin-17

Pemberian vitamin D pada kelompok perlakuan penelitian ini menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Kecenderungan penurunan ekspresi IL-17 secara konsisten didapatkan pada semua kelompok yang diberikan vitamin D. Analisis statistik menunjukkan perbedaan ekspresi IL-17 yang bermakna antara mencit model endometriosis yang mendapat vitamin D terjadi pada dosis 24 IU bila dibandingkan dengan mencit yang tidak mendapat perlakuan. Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang menunjukkan pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 pada endometriosis. Hasil penelitian ini sejalan dengan hipotesis bahwa vitamin D menurunkan ekspresi IL-17.

Peran imunomodulasi Vitamin D pada endometriosis didapatkan dari berbagai penelitian. Kadar serum 25(OH)D secara signifikan lebih rendah pada pasien dengan endometriosis dan berkorelasi dengan derajat penyakit serta area lesi

(Miyashita *et al.*, 2016; Ciavattini *et al.*, 2017). Endometriosis juga dikaitkan dengan defisiensi vitamin D (Miyashita *et al.*, 2016). Vitamin D dilaporkan dapat menghambat produksi IL-2, IL-12, TNF- α dan interferon pada endometriosis, serta menurunkan fungsi Th1. Vitamin D dapat menekan ekspresi *cyclooxygenase 2* (COX2) di endometrium, sehingga menurunkan kadar IL-6, TNF dan PG (Delbandi *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2016; Soave *et al.*, 2018; Giampaolino *et al.*, 2019). Vitamin D juga berperan dalam regulasi β -catenin dan CD44 (Pazhohan *et al.*, 2021). Penelitian klinis endometriosis masih terbatas pada pengaruh vitamin D terhadap nyeri panggul, dismenorea dan profil metabolik pasien. Penggunaan vitamin D dapat mengurangi keluhan nyeri serta memperbaiki hs-CRP pada pasien endometriosis (Nodler *et al.*, 2020; Mehdizadehkashi *et al.*, 2021). Sejauh ini belum didapatkan penelitian pengaruh vitamin D terhadap IL-17 pada endometriosis. Panduan terbaru ESHRE menyarankan penelitian lebih dalam untuk menggali potensi terapi suportif non-medis seperti vitamin D pada endometriosis (Becker *et al.*, 2022).

Interleukin-17 (IL-17) merupakan sitokin yang menjadi mata rantai penting dalam menghubungkan imunitas adaptif yang diperantarai sel T dengan respon inflamasi akut (Abbas *et al.*, 2018). Interleukin-17 dikaitkan dengan berbagai kelainan autoimun maupun kondisi inflamasi kronik, termasuk endometriosis (Kuwabara *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2020). Sitokin ini terdiri atas 6 molekul homolog dinamakan IL-17A - IL-17F. Reseptor IL-17 (IL-17R) terdiri dari lima anggota (IL-17Ra, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, dan IL-17RE) dengan sekuen yang homolog (Kuwabara *et al.*, 2017).

Jumlah sel Th17 meningkat pada jaringan endometriosis, begitu pula kadar IL-17 pada plasma dan cairan peritoneum pasien endometriosis. Peran IL-17 pada perkembangan endometriosis antara lain sebagai penghasil faktor kemotaktik. Faktor kemotaktik yang dihasilkan oleh IL-17 antara lain *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12), CXCL1 dan CX3CL1 (Ahn *et al.*, 2015). IL-17 berperan dalam induksi polarisasi *Small Peritoneal Macrophage* (SPM) ke fenotip M2 yang patogenik pada lesi endometriosis. (Miller *et al.*, 2020). IL-17 juga merangsang sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-8 dan IL-1 β (Ahn *et al.*, 2015). Peran mitogenik IL-17 juga didapatkan oleh Hirata (2008). Efek prolifерatif IL-17 bersama IL-8 pada sel endometrium ektopik menyebabkan pertumbuhan lesi endometriosis (Hirata *et al.*, 2008).

Ekspresi IL-17 pada penelitian ini ditemukan paling tinggi pada mencit model endometriosis yang tidak mendapat perlakuan. Hal ini sejalan dengan berbagai penelitian lain yang menunjukkan peningkatan jumlah sel Th 17 dan kadar IL-17 pada endometriosis ((Hirata *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2020). Peningkatan ekspresi IL-17 di awal perjalanan penyakit dikaitkan dengan reaksi inflamasi dan *tissue repair* akibat adanya sel endometrium di lokasi ektopik. Ekspresi IL-17 pada awal penyakit dikaitkan dengan progresi penyakit endometriosis melalui jalur rekrutmen dan induksi polarisasi makrofag serta peningkatan produksi sitokin (Miller *et al.*, 2020).

Penelitian Rofee-Vasquez *et al* (2019) menunjukkan korelasi negatif antara kadar serum vitamin D dengan IL-17A. Hal ini terjadi pada kondisi inflamasi sistemik jangka panjang dan disertai defisiensi vitamin D pada subyek dewasa yang

mengalami gagal jantung (Roffe-Vazquez *et al.*, 2019). Peran regulasi vitamin D terhadap IL-17 dan profil berbagai penyakit autoimun diketahui terjadi pada kadar serum vitamin D lebih dari 20 ng/ml (Bruce *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011; Bhargava *et al.*, 2015; Aly *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2019; Ghorbani *et al.*, 2021; Mahmoud *et al.*, 2021). Hal ini diperkirakan merupakan cara pengendalian respon imun dan perkembangan autoreaktivitas imun oleh vitamin D (Liu *et al.*, 2018). Mekanisme imunomodulasi IL-17 oleh vitamin D dapat terjadi melalui penurunan jumlah sel penghasil IL-17, hambatan diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi sel Th17 maupun efek represif terhadap ekspresi IL-17 (Bruce *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011). Efek represif terjadi akibat hambatan jalur IL-17/IL-17R melalui mekanisme penekanan transkripsi oleh reseptor vitamin D (Joshi *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2019).

6.3 Hubungan Vitamin D dengan Luas Lesi Endometriosis

Luas lesi endometriosis terbesar pada penelitian ini didapatkan pada kelompok mencit model endometriosis kelompok Kontrol. Lesi endometriosis secara konsisten lebih kecil pada kelompok mencit model endometriosis yang mendapat vitamin D. Rerata luas lesi paling kecil ke besar pada mencit model endometriosis yang mendapatkan vitamin D secara berurutan didapatkan pada pemberian dosis 24 IU, 16 IU dan 8 IU. Analisis menunjukkan signifikansi data tersebut secara statistik pada pemberian dosis 16 IU dan 24 IU. Data penelitian tersebut menunjukkan kesesuaian dengan hipotesis Vitamin D dapat menyebabkan luas lesi endometriosis lebih kecil pada kelompok perlakuan dibanding kontrol.

Luas lesi endometriosis pada manusia termasuk dalam penilaian kategori ASRM dalam penilaian derajat keparahan endometriosis. Implantasi dan

pertumbuhan lesi endometriotik di rongga peritoneum erat hubungannya dengan berbagai sel imun (Izumi *et al.*, 2018). Perkembangan lesi endometriosis melibatkan rekrutmen sel-sel imun, adesi sel, dan peningkatan proses inflamasi. Hal tersebut memfasilitasi implantasi dan *survival* lesi endometriosis (Agostinis *et al.*, 2021). Perkembangan lesi endometrium juga dipengaruhi kemampuan sel endometrium ektopik untuk menginvasi membran basal serta angiogenesis angiogenesis yang berasal dari vaskularisasi terdekat atau inkorporasi sel prekursor endotel yang bersirkulasi di dekat lokasi vaskularisasi (Burney dan Giudice, 2012; Capobianco, 2013). Luas lesi endometriosis dengan demikian dikaitkan dengan pertumbuhan tidak terkontrol, invasi jaringan sekitar, defek apoptosis, neoangiogenesis, dan respon inflamasi terus-menerus.

Hal ini juga sejalan dengan berbagai penelitian. Vitamin D memperlihatkan efek anti mitogenik pada sel endometrium ektopik. Miyashita dkk menunjukkan bukti vitamin D menghambat aktivasi nf- κ B, menurunkan jumlah dan sintesis DNA sel endometrium ektopik (Miyashita *et al.*, 2016). Vitamin D juga dapat mengurangi luas area endometriosis. Berbagai mekanisme pengurangan area endometriosis dihubungkan dengan vitamin D. Hambatan ekspresi gen VEGF-A, ekspresi VEGF dan MMP-9 pada stroma endometrium ektopik terjadi pada pemberian vitamin D sehingga kapasitas angiogenesis dan pertumbuhan lesi endometriosis terhambat (Yildirim *et al.*, 2014; Delbandi *et al.*, 2016). Delbandi *et al* juga membuktikan manfaat vitamin D pada sel stroma endometriosis. Pemberian vitamin D menurunkan tingkat invasi dan tingkat proliferasi sel endometrium ektopik (Delbandi *et al.*, 2016). Abbas dkk menyimpulkan bahwa vitamin D

meregresi luas lesi endometriosis melalui modulasi angiogenesis dengan penurunan ekspresi VEGF dan penurunan aktivitas MMP-9 (Abbas *et al.*, 2013).

Mekanisme vitamin D dalam pengaturan luas lesi endometriosis diperkirakan melalui kemampuan imunomodulasinya. Berbagai mekanisme pengurangan area endometriosis dihubungkan dengan vitamin D. Hambatan ekspresi gen VEGF-A, ekspresi VEGF dan MMP-9 pada stroma endometrium ektopik terjadi pada pemberian vitamin D sehingga kapasitas angiogenesis dan pertumbuhan lesi endometriosis terhambat (Yildirim *et al.*, 2014; Delbandi *et al.*, 2016). Delbandi *et al* (2016) juga membuktikan manfaat vitamin D dalam menurunkan tingkat invasi dan tingkat proliferasi sel endometrium ektopik. Abbas *et al* (2013) menyimpulkan bahwa vitamin D meregresi luas lesi endometriosis melalui modulasi angiogenesis dengan penurunan ekspresi VEGF dan penurunan aktivitas MMP-9. Vitamin D melalui reseptornya pada sel imun diketahui berperan dalam modulasi adesi sel endometrium, jumlah makrofag peritoneum, sekresi sitokin serta faktor angiogenik, degradasi matriks ekstra seluler dan invasi sel endometrium di lokasi ektopik (Abbas *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2014). Penelitian Yildirim *et al.* (2014) juga menunjukkan kemampuan vitamin D dalam menginduksi fibrosis dan apoptosis pada jaringan endometriosis yang menyebabkan regresi implan endometriosis.

6.4 Hubungan Ekspresi Interleukin-17 dengan Luas Lesi Endometriosis.

Peran IL-17 dalam patogenesis endometriosis antara lain kemotaktik, induksi polarisasi makrofag, stimulasi sitokin, stimulasi faktor angiogenik, induksi ekspresi COX2, dan proliferasi sel stroma endometriotik (Hirata *et al.*, 2008; Ahn

et al., 2015; Miller *et al.*, 2020). Interleukin-17 dengan demikian berkaitan dengan gangguan bersihan imun, adesi sel endometrium di lokasi ektopik, serta invasi sel tersebut ke jaringan di lokasi ektopik. Hal tersebut memungkinkan progresi area implan endometrium di lokasi ektopik.

Data pada penelitian ini mendukung hipotesis bahwa terdapat hubungan antara ekspresi IL-17 dengan luas lesi endometriosis. Secara statistik, korelasi yang ada signifikan dengan arah positif yang sedang. Penurunan IL-17 dengan demikian berhubungan dengan penurunan luas lesi endometriosis dan sebaliknya.

Korelasi yang didapat pada penelitian ini berada pada tingkat sedang. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh pengaruh faktor lain terhadap luas lesi endometriosis. Pembentukan implan endometriosis diketahui merupakan faktor kompleks yang berkaitan dengan proses gangguan bersihan oleh sistem imun, inflamasi kronik, kemampuan invasi, dan proses angiogenesis di lokasi ektopik.

6.5 Hubungan Tingkatan Dosis Vitamin D dengan Ekspresi Interleukin-17 dan Luas Lesi Endometriosis

Penentuan dosis merupakan hal yang harus diperhatikan dalam pemberian vitamin D karena dosis tinggi tidak otomatis menyebabkan modulasi makin kuat. Vitamin D memiliki sifat *non-monotonic dose-response* terhadap berbagai mediator inflamasi maupun hormon estrogen. Sifat ini menyebabkan adanya kontroversi hasil penelitian klinis pengaruh vitamin D terhadap endometriosis khususnya dalam perbaikan profil nyeri. Perbedaan dosis, frekuensi dan durasi pemberian suplementasi mungkin menyebabkan perbedaan efektivitas vitamin D dalam mengurangi nyeri endometriosis (Almassinokiani *et al.*, 2016; Nodler *et al.*, 2020; Mehdizadehkashi *et al.*, 2021). Hal ini menyebabkan perlunya diketahui dosis

optimal vitamin D. Penelitian ini membandingkan rerata keluaran variabel antar tingkat perlakuan untuk mengetahui dosis yang optimal.

6.5.1 Hubungan tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17

Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan rerata ekspresi IL-17 pada tingkat dosis yang berbeda. Ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis yang diberi vitamin D menunjukkan perbedaan bermakna pada dosis 24 IU dibandingkan dengan dosis 16 IU. Ekspresi IL-17 juga menunjukkan perbedaan pada dosis vitamin D 8 IU dan 16 IU, meski tidak bermakna secara statistik. Hal ini menunjukkan bahwa fungsi regulasi ekspresi IL-17 tergantung dosis vitamin D (*dose-dependent*).

Vitamin D diketahui memiliki fungsi sebagai imunomodulator. Fungsi imunomodulasi ini erat kaitannya dengan kadar serum vitamin D. Kadar serum vitamin D menunjukkan korelasi negatif dengan berbagai sitokin proinflamasi antara lain IL-17A, IL-8 dan IL-6 (Roffe-Vazquez *et al.*, 2019). Defisiensi berat vitamin D dikaitkan dengan kejadian badai sitokin pada pasien COVID-19 (Daneshkhah *et al.*, 2020). Risiko ini berkaitan dengan bioaktivasi IL-6 dan produksi sitokin proinflamasi pada kondisi defisiensi vitamin D (Daneshkhah *et al.*, 2020).

Salah satu faktor yang mempengaruhi kadar serum vitamin D tubuh adalah dosis suplementasi vitamin D. Penggunaan vitamin D sebagai suplementasi atau untuk koreksi defisiensi memberikan hasil yang beragam. Pasien anemia *Sickle Cell* yang diberikan vitamin D dosis 2000 IU menunjukkan penurunan kadar sitokin proinflamasi termasuk IL-17 setelah 3 bulan (Adegoke *et al.*, 2017). Suplementasi vitamin D dosis tinggi hingga 60.000 IU jangka pendek dapat memperbaiki

berbagai sitokin proinflamasi pada pasien COVID-19 (Rastogi *et al.*, 2020). Hasil yang berbeda didapatkan pada pemberian vitamin D dosis tunggal 200.000 IU, dimana tidak didapatkan pengaruh signifikan terhadap IL-17A dan sitokin proinflamasi lainnya pada pasien COVID-19 sedang atau berat (Fernandes *et al.*, 2022). Serupa dengan Fernandez *et al* (2022), Yusupov *et al* (2010) juga mendapati pemberian vitamin D dosis 2000 IU selama 3 bulan pada subyek dewasa sehat tidak menyebabkan perubahan kadar sitokin yang bersirkulasi.

Metode pemberian oral mungkin mempengaruhi *dose-dependent* vitamin D. Bioavailabilitas vitamin D merupakan fungsi berbagai faktor seperti absorpsi, transportasi dan metabolisme. Hal ini disebabkan karena vitamin D melewati proses metabolisme dari bentuk prekursor menjadi bentuk aktif (Maurya dan Aggarwal, 2017). Pemberian oral sendiri berpotensi menyebabkan stres pada mencit. Stres dapat menyebabkan gangguan pada reseptor vitamin D (Lopez *et al.*, 2020).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi hubungan tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17 adalah pengaruh vitamin D terhadap estrogen. Vitamin D diperkirakan mempengaruhi kadar estrogen melalui perbaikan kuantitas dan kualitas oosit. Vitamin D bersama kalsium meningkatkan jumlah DNA, biogenesis dan integritas mitokondria, serta ekspresi gen pengatur kemampuan antioksidan dan anti-apoptotik sel granulosa. Hal ini menyebabkan peningkatan jumlah oosit. Defisiensi vitamin D juga diketahui menyebabkan perubahan kadar serum estradiol (Safari *et al.*, 2022). Selain dapat menurunkan kadar estradiol, vitamin D pada kadar tertentu ternyata dapat meningkatkan kadar estradiol melalui peningkatan ekspresi enzim steroidogenesis (Hong *et al.*, 2017). Estrogen sendiri diketahui merupakan faktor penyebab pertumbuhan endometriosis yang utama (Giudice dan Kao, 2004).

Estradiol merupakan bentuk estrogen yang utama dalam pertumbuhan dan persistensi lesi endometriosis. Lesi endometriosis mampu memproduksi estradiol secara lokal (*de novo*) karena tingginya ekspresi enzim aromatase dan StAR. Estrogen diketahui juga memiliki kapasitas imunomodulasi yang mampu meregulasi mediator proinflamasi seperti IFN- γ , iNOS, dan Cox-2 (Khan *et al.*, 2010). Khan *et al.* (2010) menemukan estrogen meningkatkan produksi IL-17 dan faktor transkripsi *Retino Acid Related Orphan Receptor Gamma T* (ROR γ T). Pemberian vitamin D dengan demikian secara tidak langsung juga dapat meningkatkan ekspresi IL-17 melalui pengaturan profil estrogen.

6.5.2 Hubungan tingkatan dosis vitamin D dengan luas lesi endometriosis

Data penelitian menunjukkan adanya perbedaan rerata luas lesi antar kelompok yang diberikan dosis vitamin D yang berbeda. Dosis vitamin D yang paling efektif dalam modulasi luas lesi endometriosis belum didapatkan karena analisis statistik tidak menunjukkan kemaknaan terhadap perbedaan tersebut. Penelitian ini, meski demikian, merekomendasikan dosis 24 IU sebagai dosis optimal karena memberikan beda nilai p hasil uji rerata terbesar diantara kelompok lain.

Penyerapan vitamin D oleh tubuh mencit dapat menjadi faktor yang mempengaruhi dosis efektif dalam imunomodulasi. Penyerapan vitamin D dipengaruhi oleh berbagai hal antara lain metabolisme lemak dan variasi genetik pada protein yang mengatur serapan vitamin D pada usus. Bioavailabilitas vitamin D merupakan fungsi berbagai faktor seperti absorpsi, transportasi dan metabolisme. Makanan mungkin meningkatkan hingga 50% penyerapan vitamin D meski hal ini masih menjadi kontroversi (Maurya dan Aggarwal, 2017). Pemberian makan dan

minum mencit pada penelitian ini dilakukan *ad libitum*, tetapi mekanisme memantau kondisi perut hewan saat administrasi vitamin D belum ada.

Vitamin D dapat mengatur estrogen melalui perbaikan kuantitas dan kualitas oosit sebagaimana dibahas sebelumnya. Safari dkk menemukan pemberian vitamin D dosis tinggi dapat memperbaiki profil sel granulosa (Safari *et al*, 2022). Estrogen merupakan faktor penyebab pertumbuhan endometriosis yang utama (Giudice dan Kao, 2004). Estradiol merupakan bentuk estrogen yang utama dalam pertumbuhan dan persistensi lesi endometriosis. Lesi endometriosis mampu memproduksi estradiol secara lokal, dimana kemampuan sintesis *de novo* karena tingginya ekspresi enzim aromatase dan StAR. Selain estradiol yang diproduksi lokal, estradiol sistemik juga mempengaruhi pertumbuhan lesi endometriosis meski tidak sebesar pengaruh lokal. Dapat disimpulkan bahwa vitamin D memiliki dua peran yang bertolak belakang dalam perkembangan lesi endometriosis. Vitamin D di satu sisi dapat menghambat pertumbuhan luas lesi melalui mekanisme inhibisi angiogenesis, modulasi enzim-enzim yang mendegradasi matriks ekstraseluler, dan modulasi sitokin. Vitamin D di sisi lain, mungkin mempengaruhi produksi estradiol yang menyebabkan pertumbuhan lesi endometriosis.

6.6 Keunggulan dan Kebaruan Penelitian

Penelitian ini dapat membuktikan bahwa ekspresi IL-17 pada mencit model endometriosis yang diberikan vitamin D secara bermakna lebih rendah dibandingkan bila tidak diberikan vitamin D. Penelitian ini juga dapat membuktikan bahwa luas lesi endometriosis secara bermakna lebih kecil dengan pemberian vitamin D. Korelasi positif ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis dapat

dibuktikan pada penelitian ini secara signifikan. Tingkat dosis vitamin D diketahui mempengaruhi ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis pada penelitian ini. Penelitian ini merekomendasikan vitamin D dosis 24 IU sebagai dosis yang optimal dalam regulasi ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis.

Pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 pada endometriosis sejauh ini belum diketahui. Penelitian pengaruh vitamin D terhadap ekspresi IL-17 sejauh ini baru dilakukan pada penyakit autoimun atau kondisi inflamasi kronis lainnya, baik pada hewan coba maupun manusia. Peneliti juga belum menemukan penelitian tentang hubungan variabel ekspresi IL-17 dengan luas lesi endometriosis. Penelitian ini mampu menambahkan informasi ilmiah mekanisme modulasi lesi endometriosis melalui regulasi ekspresi IL-17 oleh vitamin D. Modulasi ini terjadi pada lesi endometriosis peritoneum derajat ringan tahap awal sesuai dengan tipe model endometriosis pada penelitian ini.

Metode pemberian oral vitamin D juga merupakan unsur kebaruan penelitian ini. Pemberian oral merupakan metode koreksi defisiensi atau suplementasi vitamin D yang direkomendasikan pada manusia sehingga lebih sesuai apabila nantinya dilakukan penelitian translasional terhadap manusia. Hasil penelitian ini menunjukkan potensi vitamin D sebagai imunomodulator pada endometriosis. Penelitian klinis lanjutan diperlukan untuk menggali lebih jauh penggunaan vitamin D sebagai terapi suportif endometriosis.

6.7 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Keterbatasan pertama berhubungan dengan perbedaan status vitamin D karena faktor bioavailabilitas. Hal

ini disebabkan tidak ada pemeriksaan kadar vitamin D sebelum dan setelah perlakuan. Pemeriksaan kadar vitamin D sebelum perlakuan ditujukan sebagai pemeriksaan *baseline* vitamin D. Pemeriksaan kadar vitamin D setelah perlakuan bertujuan menilai kadar pasca suplementasi. Pemberian makanan secara *ad libitum* pada mencit menyebabkan tidak diketahuinya kondisi saluran cerna mencit saat vitamin D diberikan. Vitamin D yang diberikan secara oral diserap lebih baik di saluran cerna bila diberikan bersama dengan makanan yang mengandung lemak. Vitamin D tetap dapat diserap meski dalam kondisi saluran cerna kosong atau tidak bersama pembawa berbahan dasar lemak/minyak, tetapi kurang optimal (Silva dan Furlanetto, 2018). Kondisi ini berpotensi menyebabkan vitamin D yang diberikan tidak diserap secara optimal pada penelitian ini. Status polimorfisme genetik yang berhubungan dengan sintesis endogen atau metabolisme vitamin D pada mencit juga tidak diketahui. Hal-hal ini menyebabkan potensi perbedaan status vitamin D mencit pada penelitian ini.

Penelitian ini juga tidak mengukur kadar estrogen mencit. Vitamin D diketahui mempengaruhi produksi estrogen. Estrogen merupakan faktor kunci perkembangan endometriosis dan mempengaruhi berbagai jalur inflamasi serta angiogenesis. Pemeriksaan estrogen dilakukan dengan tujuan menghilangkan bias pengaruh estrogen terhadap perjalanan endometriosis pada mencit.

Keterbatasan selanjutnya adalah tidak meneliti pengaruh vitamin D terhadap komponen inflamasi lain, faktor *survival* sel endometrium di lokasi ektopik dan faktor angiogenesis. Komponen inflamasi dapat berupa mediator inflamasi dan sel-sel yang terlibat dalam proses inflamasi seperti makrofag. Berbagai mediator inflamasi yang terlibat tetapi tidak diteliti pada penelitian ini

antara lain IL-8, TNF- α , COX-2 dan PGE-2. Polarisasi makrofag ke arah tipe M2 yang erat kaitannya dengan kondisi inflamasi kronik juga merupakan faktor inflamasi yang tidak diteliti. Faktor *survival* sel endometrium ektopik yang berpotensi dimodulasi oleh vitamin D adalah kemampuan hambatan fagositosis makrofag. VEGF sebagai faktor angiogenesis yang dimodulasi vitamin D juga tidak diteliti.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Vitamin D dosis 24 IU dapat menyebabkan ekspresi IL-17 lebih rendah pada lesi endometriosis peritoneum mencit model endometriosis.
2. Vitamin D dosis 16 IU dan 24 IU dapat menyebabkan luas lesi endometriosis lebih kecil pada mencit model endometriosis.
3. Terdapat hubungan antara ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis. Kedua variabel tersebut memiliki korelasi positif sedang secara signifikan.
4. Terdapat hubungan antara tingkat dosis vitamin D dengan ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis. Dosis optimal vitamin D dalam menurunkan ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis berdasarkan penelitian ini adalah 24 IU.

7.2 Saran

1. Meneliti kadar serum vitamin D pasca perlakuan sebagai patokan koreksi kadar vitamin D dan pembandingan kadar optimal modulasi vitamin D.
2. Meneliti kadar estradiol serum pasca perlakuan untuk mengetahui efek vitamin D pada hormon estrogen dan mengetahui hubungan kadar estrogen terhadap variabel penelitian lainnya.
3. Meneliti pengaruh vitamin D terhadap berbagai mediator inflamasi yang berperan dalam proses patogenesis endometriosis dari sisi proses inflamasi antara lain IL-8, TNF- α , COX-2, dan PGE-2 serta polarisasi makrofag.

4. Meneliti pengaruh vitamin D terhadap kapasitas fagositosis makrofag sebagai salah satu kunci *survival* sel pada patogenesis endometriosis.
5. Meneliti potensi vitamin D sebagai terapi suportif khususnya penelitian klinis secara berkelanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2018) "Differentiation and functions of CD4⁺ effector T cells," in *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, pp. 225–240.
- Abbas, M. A., Taha, M. O., Disi, A. M. and Shomaf, M. (2013) "Regression of endometrial implants treated with vitamin D3 in a rat model of endometriosis," *European Journal of Pharmacology*, 715(1–3), pp. 72–75. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.06.016.
- Adegoke, S. A., Smith, O. S., Adekile, A. D. and Figueiredo, M. S. (2017) "Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and inflammatory cytokines in paediatric sickle cell disease," *Cytokine*, 96, pp. 87–93. doi: 10.1016/j.cyto.2017.03.010.
- Agostinis, C., Balduit, A., Mangogna, A., Zito, G., Romano, F., Ricci, G., Kishore, U. and Bulla, R. (2021) "Immunological basis of the endometriosis: the complement system as a potential therapeutic target," *Frontiers in Immunology*, 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.599117.
- Ahn, S. H., Edwards, A. K., Singh, S. S., Young, S. L., Lessey, B. A. and Tayade, C. (2015) "IL-17A contributes to the pathogenesis of endometriosis by triggering proinflammatory cytokines and angiogenic growth factors," *The Journal of Immunology*, 195(6), pp. 2591–2600. doi: 10.4049/jimmunol.1501138.
- Akyol, A., Şimşek, M., İlhan, R., Can, B., Baspinar, M., Akyol, H., Gül, H. F., Gürsu, F., Kavak, B. and Akın, M. (2016) "Efficacies of vitamin D and omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental endometriosis," *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 55(6), pp. 835–839. doi: 10.1016/j.tjog.2015.06.018.
- Almassinokiani, F., Khodaverdi, S., Solaymani-dodaran, M., Akbari, P. and Pazouki, A. (2016) "Effects of Vitamin D on Endometriosis-Related Pain: A Double-Blind Clinical Trial," *Medical Science Monitor*, 22, pp. 4960–4966. doi: 10.12659/MSM.901838.
- Aly, D., Mohammed, F., Sayed, K., Gawdat, H., Mashaly, H., Abdel Hay, R., Elias, T. and Agaiby, M. (2017) "Is there a relation between vitamin D and interleukin-17 in vitiligo? A cross-sectional study," *Dermatology*, 233(6), pp. 413–418. doi: 10.1159/000479925.
- Anastasi, E., Fuggetta, E., De Vito, C., Migliara, G., Viggiani, V., Manganaro, L., Granato, T., Benedetti Panici, P., Angeloni, A. and Porpora, M. G. (2017) "Low levels of 25-OH vitamin D in women with endometriosis and associated pelvic pain," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(12). doi: 10.1515/cclm-2017-0016.

- Baek, J. C., Jo, J. Y., Lee, S. M., Cho, I. A., Shin, J. K., Lee, S. A., Lee, J. H., Cho, M.-C. and Choi, W. J. (2019) "Differences in 25-hydroxy vitamin D and vitamin D-binding protein concentrations according to the severity of endometriosis," *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(3), pp. 125–131. doi: 10.5653/cerm.2018.00416.
- Becker, C. M., Bokor, A., Heikinheimo, O., Horne, A., Jansen, F., Kiesel, L., King, K., Kvaskoff, M., Nap, A., Petersen, K., Saridogan, E., Tomassetti, C., van Hanegem, N., Vulliamoz, N., Vermeulen, N., Altmäe, S., Ata, B., Ball, E., Barra, F., Bastu, E., Bianco-Anil, A., Knudsen, U. B., Brubel, R., Cambitzi, J., Cantineau, A., Cheong, Y., Daniilidis, A., Bie, B. De, Exacoustos, C., Ferrero, S., Gelbaya, T., Goetz-Collinet, J., Hudelist, G., Hussain, M., Indrielle-Kelly, T., Khazali, S., Kumar, S. L., Maggiore, U. L. R., Maas, J. W. M., McLaughlin, H., Metello, J., Mijatovic, V., Miremadi, Y., Muteshi, C., Nisolle, M., Oral, E., Pados, G., Parades, D., Pluchino, N., Supramaniam, P. R., Schick, M., Seeber, B., Seracchioli, R., Laganà, A. S., Stavroulis, A., Tebache, L., Uncu, G., Van den Broeck, U., van Peperstraten, A., Vereczkey, A., Wolthuis, A., Bahat, P. Y. and Yazbeck, C. (2022) "ESHRE guideline: endometriosis," *Human Reproduction Open*, 2022(2). doi: 10.1093/hropen/hoac009.
- Bedaiwy, M. A., Alfaraj, S., Yong, P. and Casper, R. (2017) "New developments in the medical treatment of endometriosis," *Fertility and Sterility*, 107(3), pp. 555–565. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.025.
- Bhargava, P., Sotirchos, E., Eckstein, C., Ntranos, A., Gocke, A., Mowry, E. and Calabresi, P. (2015) "High-dose vitamin D supplementation reduces IL-17-producing CD4⁺ T-cells and effector-memory CD4⁺ T-cells in multiple sclerosis patients (S38.001)," *Neurology*, 84(14 Supplement), p. S38.001. Available at: http://n.neurology.org/content/84/14_Supplement/S38.001.abstract.
- Bikle, D. D. (2014) "Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications," *Chemistry & Biology*, 21(3), pp. 319–329. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.12.016.
- Brosens, I., Gordts, S. and Benagiano, G. (2013) "Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion," *Human Reproduction*, 28(8), pp. 2026–2031. doi: 10.1093/humrep/det243.
- Bruce, D., Yu, S., Ooi, J. H. and Cantorna, M. T. (2011) "Converging pathways lead to overproduction of IL-17 in the absence of vitamin D signaling," *International Immunology*, 23(8), pp. 519–528. doi: 10.1093/intimm/dxr045.
- Burney, R. O. and Giudice, L. C. (2012) "Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis," *Fertility and Sterility*, 98(3), pp. 511–519. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.

- Burns, K. A., Pearson, A. M., Slack, J. L., Por, E. D., Scribner, A. N., Eti, N. A. and Burney, R. O. (2022) "Endometriosis in the Mouse: Challenges and Progress Toward a 'Best Fit' Murine Model," *Frontiers in Physiology*, 12. doi: 10.3389/fphys.2021.806574.
- Capobianco, A. (2013) "Endometriosis, a disease of the macrophage," *Frontiers in Immunology*, 4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00009.
- Cermisoni, G. C., Alteri, A., Corti, L., Rabellotti, E., Papaleo, E., Viganò, P. and Sanchez, A. M. (2018) "Vitamin D and Endometrium: A Systematic Review of a Neglected Area of Research," *International journal of molecular sciences*. MDPI, 19(8), p. 2320. doi: 10.3390/ijms19082320.
- Ciavattini, A., Serri, M., Delli Carpini, G., Morini, S. and Clemente, N. (2017) "Ovarian endometriosis and vitamin D serum levels," *Gynecological Endocrinology*, 33(2), pp. 164–167. doi: 10.1080/09513590.2016.1239254.
- Colonese, F., Laganà, A. S., Colonese, E., Sofo, V., Salmeri, F. M., Granese, R. and Triolo, O. (2015) "The Pleiotropic Effects of Vitamin D in Gynaecological and Obstetric Diseases: An Overview on a Hot Topic," *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–11. doi: 10.1155/2015/986281.
- Della Corte, L., Di Filippo, C., Gabrielli, O., Reppuccia, S., La Rosa, V. L., Ragusa, R., Fichera, M., Commodari, E., Bifulco, G. and Giampaolino, P. (2020) "The Burden of Endometriosis on Women's Lifespan: A Narrative Overview on Quality of Life and Psychosocial Wellbeing," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), p. 4683. doi: 10.3390/ijerph17134683.
- Daneshkhah, A., Agrawal, V., Eshein, A., Subramanian, H., Roy, H. K. and Backman, V. (2020) "Evidence for possible association of vitamin D status with cytokine storm and unregulated inflammation in COVID-19 patients," *Aging Clinical and Experimental Research*, 32(10), pp. 2141–2158. doi: 10.1007/s40520-020-01677-y.
- Delbandi, A.-A., Mahmoudi, M., Shervin, A. and Zarnani, A.-H. (2016) "1,25-Dihydroxy Vitamin D3 Modulates Endometriosis-Related Features of Human Endometriotic Stromal Cells," *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. Denmark, 75(4), pp. 461–473. doi: 10.1111/aji.12463.
- Delbandi, A.-A., Torab, M., Abdollahi, E., Khodaverdi, S., Rokhgireh, S., Moradi, Z., Heidari, S. and Mohammadi, T. (2021) "Vitamin D deficiency as a risk factor for endometriosis in Iranian women," *Journal of Reproductive Immunology*, 143, p. 103266. doi: 10.1016/j.jri.2020.103266.
- Dunselman, G. A. J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A. W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E., Soriano, D. and Nelen, W. (2014) "ESHRE guideline:

management of women with endometriosis,” *Human Reproduction*, 29(3), pp. 400–412. doi: 10.1093/humrep/det457.

Evans, J., Salamonsen, L. A., Winship, A., Menkhorst, E., Nie, G., Gargett, C. E. and Dimitriadis, E. (2016) “Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease,” *Nature Reviews Endocrinology*, 12(11), pp. 654–667. doi: 10.1038/nrendo.2016.116.

Fernandes, A. L., Murai, I. H., Reis, B. Z., Sales, L. P., Santos, M. D., Pinto, A. J., Goessler, K. F., Duran, C. S. C., Silva, C. B. R., Franco, A. S., Macedo, M. B., Dalmolin, H. H. H., Baggio, J., Balbi, G. G. M., Antonangelo, L., Caparbo, V. F., Gualano, B. and Pereira, R. M. R. (2022) “Effect of a single high dose of vitamin D3 on cytokines, chemokines, and growth factor in patients with moderate to severe COVID-19,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, 115(3), pp. 790–798. doi: 10.1093/ajcn/nqab426.

Ghorbani, Z., Rafiee, P., Haghighi, S., Razeghi Jahromi, S., Djalali, M., Moradi-Tabriz, H., Mahmoudi, M. and Togha, M. (2021) “The effects of vitamin D3 supplementation on TGF- β and IL-17 serum levels in migraineurs: post hoc analysis of a randomized clinical trial,” *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 7(1), p. 9. doi: 10.1186/s40780-021-00192-0.

Giampaolino, P., Corte, L. D., Foreste, V. and Bifulco, G. (2019) “Is there a Relationship Between Vitamin D and Endometriosis? An Overview of the Literature,” *Current Pharmaceutical Design*, 25(22), pp. 2421–2427. doi: 10.2174/1381612825666190722095401.

Giudice, L. C. and Kao, L. C. (2004) “Endometriosis,” *The Lancet*, 364(9447), pp. 1789–1799. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17403-5.

Hendarto, H. (2015) *Endometriosis dari Aspek Teori Sampai Penanganan Klinis.*, Airlangga University Press. Surabaya: AUP.

Hirata, T., Osuga, Y., Hamasaki, K., Yoshino, O., Ito, M., Hasegawa, A., Takemura, Y., Hirota, Y., Nose, E., Morimoto, C., Harada, M., Koga, K., Tajima, T., Saito, S., Yano, T. and Taketani, Y. (2008) “Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells,” *Endocrinology*, 149(3), pp. 1260–1267. doi: 10.1210/en.2007-0749.

Hogg, C., Panir, K., Dhami, P., Rosser, M., Mack, M., Soong, D., Pollard, J. W., Jenkins, S. J., Horne, A. W. and Greaves, E. (2021) “Macrophages inhibit and enhance endometriosis depending on their origin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), p. e2013776118. doi: 10.1073/pnas.2013776118.

Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H. and Weaver, C. M. (2011) “Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society

clinical practice guideline,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(7), pp. 1911–1930. doi: 10.1210/jc.2011-0385.

Hong, S.-H., Lee, J.-E., An, S.-M., Shin, Y. Y., Hwang, D. Y., Yang, S. Y., Cho, S.-K. and An, B.-S. (2017) “Effect of Vitamin D3 on Biosynthesis of Estrogen in Porcine Granulosa Cells via Modulation of Steroidogenic Enzymes,” *Toxicological Research*, 33(1), pp. 49–54. doi: 10.5487/TR.2017.33.1.049.

Ingles, S. A., Wu, L., Liu, B. T., Chen, Y., Wang, C.-Y., Templeman, C. and Brueggmann, D. (2017) “Differential gene expression by 1,25(OH) 2 D 3 in an endometriosis stromal cell line,” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 173, pp. 223–227. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.01.011.

Izumi, G., Koga, K., Takamura, M., Makabe, T., Satake, E., Takeuchi, A., Taguchi, A., Urata, Y., Fujii, T. and Osuga, Y. (2018) “Involvement of immune cells in the pathogenesis of endometriosis,” *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(2), pp. 191–198. doi: 10.1111/jog.13559.

Joshi, S., Pantalena, L.-C., Liu, X. K., Gaffen, S. L., Liu, H., Rohowsky-Kochan, C., Ichiyama, K., Yoshimura, A., Steinman, L., Christakos, S. and Youssef, S. (2011) “1,25-Dihydroxyvitamin D3 ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A,” *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), pp. 3653–3669. doi: 10.1128/MCB.05020-11.

Khan, D., Dai, R., Karpuzoglu, E. and Ahmed, S. A. (2010) “Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN- γ decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice,” *European Journal of Immunology*, 40(9), pp. 2549–2556. doi: 10.1002/eji.201040303.

Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S. and Seino, Y. (2000) “Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads,” *Endocrinology*, 141(4), pp. 1317–1324. doi: 10.1210/endo.141.4.7403.

Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M. and Kakiuchi, T. (2017) “The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases,” *Mediators of Inflammation*, 2017, pp. 1–11. doi: 10.1155/2017/3908061.

Lerchbaum, E. and Obermayer-Pietsch, B. (2012) “Mechanism in endocrinology Vitamin D and fertility: a systematic review,” *European Journal of Endocrinology*, 166(5), pp. 765–778. doi: 10.1530/EJE-11-0984.

Lessey, B. A. and Young, S. L. (2019) “Structure, function, and evaluation of the female reproductive tract,” in Strauss, J. F. and Barbieri, R. L. (eds.) *Yen and Jaffe’s Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier, pp. 206–247.e13. doi: 10.1016/B978-0-323-47912-7.00009-3.

- Liu, S., Xin, X., Hua, T., Shi, R., Chi, S., Jin, Z. and Wang, H. (2016) "Efficacy of Anti-VEGF/VEGFR Agents on Animal Models of Endometriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis," *PLOS ONE*. Edited by J.-L. Thomas, 11(11), p. e0166658. doi: 10.1371/journal.pone.0166658.
- Liu, W., Zhang, L., Xu, H.-J., Li, Y., Hu, C.-M., Yang, J.-Y. and Sun, M.-Y. (2018) "The Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D in Tumorigenesis," *International Journal of Molecular Sciences* . doi: 10.3390/ijms19092736.
- Lopez, A., Cruz, M. L., Chompre, G., Hernández, S., Isidro, R. A., Flores, I. and Appleyard, C. B. (2020) "Influence of Stress on the Vitamin D-Vitamin D Receptor System, Macrophages, and the Local Inflammatory Milieu in Endometriosis," *Reproductive Sciences*, 27(12), pp. 2175–2186. doi: 10.1007/s43032-020-00235-1.
- Madiyono, B., Mz Moeslichan, S., Sastroasmoro, S., Budiman, I. and Purwanto, S. H. (2014) "Perkiraan Besar Sampel," in Sastroasmoro, S. and Ismael, S. (eds.) *Dasar dasar Metodologi Penelitian Klinis*. 5th ed. Jakarta: Sagung Seto, pp. 352–65.
- Mahmoud, S. B., Anwar, M. K., Shaker, O. G. and El Sharkawy, D. A. (2021) "Possible relation between Vitamin D and interleukin-17 in the pathogenesis of lichen planus," *Dermatology*, 237(6), pp. 896–901. doi: 10.1159/000510539.
- Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbańska, M., Łukaszkiwicz, J., Płudowski, P. and Jones, G. (2018) "Vitamin D toxicity a clinical perspective," *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi: 10.3389/fendo.2018.00550.
- Maurya, V. K. and Aggarwal, M. (2017) "Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview," *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), pp. 3753–3765. doi: 10.1007/s13197-017-2840-0.
- Mehdizadehkashi, A., Rokhgireh, S., Tahermanesh, K., Eslahi, N., Minaeian, S. and Samimi, M. (2021) "The effect of vitamin D supplementation on clinical symptoms and metabolic profiles in patients with endometriosis," *Gynecological Endocrinology*, 37(7), pp. 640–645. doi: 10.1080/09513590.2021.1878138.
- Miller, J. E., Ahn, S. H., Marks, R. M., Monsanto, S. P., Fazleabas, A. T., Koti, M. and Tayade, C. (2020) "IL-17A modulates peritoneal macrophage recruitment and M2 polarization in endometriosis," *Frontiers in Immunology*, 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00108.
- Mińko, A., Turoń-Skrzypińska, A., Rył, A., Bargiel, P., Hilicka, Z., Michalczyk, K., Łukowska, P., Rotter, I. and Cymbaluk-Płoska, A. (2021) "Endometriosis a multifaceted problem of a modern woman," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(15), p. 8177. doi:

10.3390/ijerph18158177.

- Miyashita, M., Koga, K., Izumi, G., Sue, F., Makabe, T., Taguchi, A., Nagai, M., Urata, Y., Takamura, M., Harada, M., Hirata, T., Hirota, Y., Wada-Hiraike, O., Fujii, T. and Osuga, Y. (2016) "Effects of 1,25-Dihydroxy vitamin D3 on endometriosis," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(6), pp. 2371–2379. doi: 10.1210/jc.2016-1515.
- Namazi, M., Behboodi Moghadam, Z., Zareiyan, A. and Jafarabadi, M. (2021) "Exploring the impact of endometriosis on women's lives: A qualitative study in Iran," *Nursing Open*, 8(3), pp. 1275–1282. doi: 10.1002/nop2.744.
- Nnoaham, K. E., Hummelshoj, L., Webster, P., D'Hooghe, T., de Cicco Nardone, F., de Cicco Nardone, C., Jenkinson, C., Kennedy, S. H. and Zondervan, K. T. (2011) "Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries," *Fertility and Sterility*, 96(2), pp. 366-373.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.090.
- Nodler, J. L., Divasta, A. D., Vitonis, A. F., Karevicius, S., Malsch, M., Sarda, V., Fadayomi, A., Harris, H. R. and Missmer, S. A. (2020) "Supplementation with vitamin D or ω -3 fatty acids in adolescent girls and young women with endometriosis (SAGE): A double-blind, randomized, placebo-controlled trial," *American Journal of Clinical Nutrition*, 112(1), pp. 229–236. doi: 10.1093/ajcn/nqaa096.
- Oemardi, M., Horowitz, M., Wishart, J. M., Morris, H. A., Need, A. G., O'Loughlin, P. D. and Nordin, B. E. C. (2007) "The effect of menopause on bone mineral density and bone-related biochemical variables in Indonesian women," *Clinical Endocrinology*, 67(1), pp. 93–100. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.02844.x.
- Pagliardini, L., Vigano', P., Molgora, M., Persico, P., Salonia, A., Vailati, S., Paffoni, A., Somigliana, E., Papaleo, E. and Candiani, M. (2015) "High prevalence of vitamin D Deficiency in infertile women referring for assisted reproduction," *Nutrients*, 7(12), pp. 9972–9984. doi: 10.3390/nu7125516.
- Parasar, P., Ozcan, P. and Terry, K. L. (2017) "Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management," *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 6(1), pp. 34–41. doi: 10.1007/s13669-017-0187-1.
- Pazhohan, A., Danaei-Mehrabad, S., Mohamad-Rezaei, Z., Amidi, F., Khodarahmian, M., Shabani Nashtaei, M., Sobhani, A. and Farajzadeh, M. A. (2021) "The modulating effects of vitamin D on the activity of β -catenin in the endometrium of women with endometriosis: a randomized exploratory trial," *Gynecological Endocrinology*, 37(3), pp. 278–282. doi: 10.1080/09513590.2020.1858780.
- Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T. and Amrein, K. (2013) "Vitamin D and Immune Function," *Nutrients*, 5(7), pp. 2502–2521. doi: 10.3390/nu5072502.

- Qiu, Y., Yuan, S. and Wang, H. (2020) "Vitamin D status in endometriosis: a systematic review and meta-analysis," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 302(1), pp. 141–152. doi: 10.1007/s00404-020-05576-5.
- Ramírez-Pavez, T. N., Martínez-Esparza, M., Ruiz-Alcaraz, A. J., Marín-Sánchez, P., Machado-Linde, F. and García-Peñarrubia, P. (2021) "The role of peritoneal macrophages in endometriosis," *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), p. 10792. doi: 10.3390/ijms221910792.
- Rastogi, A., Bhansali, A., Khare, N., Suri, V., Yaddanapudi, N., Sachdeva, N., Puri, G. D. and Malhotra, P. (2020) "Short term, high-dose vitamin D supplementation for COVID-19 disease: a randomised, placebo-controlled, study (SHADE study)," *Postgraduate Medical Journal*, p. postgradmedj-2020-139065. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-139065.
- Roffe-Vazquez, D. N., Huerta-Delgado, A. S., Castillo, E. C., Villarreal-Calderón, J. R., Gonzalez-Gil, A. M., Enriquez, C., Garcia-Rivas, G. and Elizondo-Montemayor, L. (2019) "Correlation of Vitamin D with Inflammatory Cytokines, Atherosclerotic Parameters, and Lifestyle Factors in the Setting of Heart Failure: A 12-Month Follow-Up Study," *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), p. 5811. doi: 10.3390/ijms20225811.
- Safari, H., Hajian, M., Nasr-Esfahani, M. H., Forouzanfar, M. and Drevet, J. R. (2022) "Vitamin D and calcium, together and separately, play roles in female reproductive performance," *Scientific Reports*, 12(1), p. 10470. doi: 10.1038/s41598-022-14708-7.
- Sauqi, H., Santoso, B., Widjiati, W. and Hendarto, H. (2020) "Red fruit (Pandanus conoideus) inhibits the development of endometriosis lesions through downregulation of NF-kB and VEGF expression," *Rawal Medical Journal*, 45(4), pp. 985–989.
- Schaalan, M. F. (2012) "Vitamin D deficiency: corelation to interleukin-17, interleukin-23 and PIINP in hepatitis C virus genotype 4," *World Journal of Gastroenterology*, 18(28), p. 3738. doi: 10.3748/wjg.v18.i28.3738.
- Setiati, S. (2008) "Vitamin D status among Indonesian elderly women living in institutionalized care units.," *Acta medica Indonesiana*, 40(2), pp. 78–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054885>.
- Silva, M. C. and Furlanetto, T. W. (2018) "Intestinal absorption of vitamin D: a systematic review," *Nutrition Reviews*, 76(1), pp. 60–76. doi: 10.1093/nutrit/nux034.
- Soave, I., Occhiali, T., Wenger, J.-M., Pluchino, N., Caserta, D. and Marci, R. (2018) "Endometriosis and food habits: Can diet make the difference?," *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders*, 10(2), pp. 59–71. doi: 10.1177/2284026518773212.

- Taniguchi, F., Wibisono, H., Khine, Y. M. and Harada, T. (2021) “Animal models for research on endometriosis,” *Frontiers in Bioscience-Elite*, 13(1), p. 37. doi: 10.2741/871.
- Toghianifar, N., Ashtari, F., Zarkesh-Esfahani, S. H. and Mansourian, M. (2015) “Effect of high dose vitamin D intake on interleukin-17 levels in multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial,” *Journal of Neuroimmunology*, 285, pp. 125–128. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.05.022.
- Widjiati (2021) “Pengantar Animal Model,” in *Hewan Model Percobaan Penelitian Laboratorium*. Surabaya: Airlangga University Press, pp. 1–29.
- Xia, Y., Chen, H., Xiao, H., Yang, J., Li, Z., Wang, Y., Yang, T. and Wang, B. (2019) “Immune regulation mechanism of vitamin D level and IL-17/IL-17R pathway in Crohn’s disease,” *Experimental and Therapeutic Medicine*. doi: 10.3892/etm.2019.7389.
- Yildirim, B., Guler, T., Akbulut, M., Oztekin, O. and Sariiz, G. (2014) “1-Alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 Regresses Endometriotic Implants in Rats by Inhibiting Neovascularization and Altering Regulation of Matrix Metalloproteinase,” *Postgraduate Medicine*, 126(1), pp. 104–110. doi: 10.3810/pgm.2014.01.2730.
- Yusupov, E., Li-Ng, M., Pollack, S., Yeh, J. K., Mikhail, M. and Aloia, J. F. (2010) “Vitamin D and Serum Cytokines in a Randomized Clinical Trial,” *International Journal of Endocrinology*, 2010, pp. 1–7. doi: 10.1155/2010/305054.
- Zondervan, K. T., Becker, C. M. and Missmer, S. A. (2020) “Endometriosis,” *New England Journal of Medicine*. Edited by D. L. Longo, 382(13), pp. 1244–1256. doi: 10.1056/NEJMra1810764.

Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik Penelitian

	
KOMISI ETIK HEWAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA <i>Animal Care and Use Committee (ACUC)</i>	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK “ ETHICAL CLEARENCE ”	
No : 2.KE.143.12.2021	
KOMISI ETIK HEWAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA PROTOKOL PENGGUNAAN HEWAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :	
PENELITIAN BERJUDUL	: Pengaruh pemberian Vitamin D dosis bertingkat terhadap ekspresi Interleukin-17 (IL-17), dan luas lesi endometriosis pada mencit model endometriosis
PENELITI UTAMA	: Alfi Ruham Burjiah
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN	: Program Studi Ilmu Magister Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Surabaya, 29 Desember 2021	
Mengetahui Dekan FKH-Unair,  Prof. Dr. Mimi Lamid, M.P., Drh. NIP. 196201161992032001	Ketua,  Dr. Nurdianto Triakoso, M.P., Drh. NIP. 196805051997021001

Lampiran 2

Olah Data dan Analisis Statistik

A. Interleukin-17

Tabel statistik deskriptif ekspresi IL-17

Statistics					
		K	P1	P2	P3
N	Valid	6	6	6	6
Mean		6.883	5.733	6.250	3.233
Median		6.450	5.600	5.400	3.050
Std. Deviation		2.2427	2.8204	2.3730	.3266
Minimum		4.5	2.9	3.6	3.0
Maximum		10.8	8.7	9.3	3.7

Uji normalitas data ekspresi interleukin-17 antar kelompok

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL-17	Kontrol	.175	6	.200 [*]	.928	6	.568
	P1	.265	6	.200 [*]	.799	6	.057
	P2	.229	6	.200 [*]	.870	6	.227
	P3	.325	6	.047	.738	6	.015

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Kruskal Wallis ekspresi IL-17

Ranks			
	Kelompok	N	Mean Rank
IL-17	Kontrol	6	16.75
	P1	6	12.17
	P2	6	15.50
	P3	6	5.58
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

IL-17	
Kruskal-Wallis H	9.057
df	3
Asymp. Sig.	.029

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Kelompok

Uji perbandingan rerata ekspresi IL-17 antara kontrol dan perlakuan

a. Kelompok Kontrol dan P1

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	Kontrol	6	7.17	43.00
	P1	6	5.83	35.00
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17	
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

b. Kelompok Kontrol dan P2

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	Kontrol	6	7.08	42.50
	P2	6	5.92	35.50
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17	
Mann-Whitney U	14.500
Wilcoxon W	35.500
Z	-.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.574
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

c. Kelompok Kontrol dan P3

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	Kontrol	6	9.50	57.00
	P3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17

Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.903
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

B. Luas lesi endometriosis

Tabel statistik deskriptif luas lesi endometriosis

Statistics

	Kontrol	P1	P2	P3
N	6	6	6	6
Mean	67.4600	23.8667	15.8267	8.9317
Median	63.1650	17.6200	14.4550	5.0300
Std. Deviation	45.72662	27.58734	16.13603	9.63503
Minimum	.00	.00	.00	.00
Maximum	142.14	62.74	33.54	26.09

Uji normalitas data Luas lesi endometriosis antar kelompok

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Luas Lesi	Kontrol	.243	6	.200 [*]	.927	6	.557
	P1	.307	6	.081	.828	6	.104
	P2	.262	6	.200 [*]	.810	6	.073
	P3	.283	6	.144	.859	6	.185

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas data luas lesi endometriosis antar kelompok

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Luas Lesi	Based on Mean	1.836	3	20	.173
	Based on Median	1.822	3	20	.176
	Based on Median and with adjusted df	1.822	3	6.849	.233
	Based on trimmed mean	1.852	3	20	.170

ANOVA

Luas Lesi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12490.774	3	4163.591	5.196	.008
Within Groups	16025.951	20	801.298		
Total	28516.725	23			

Uji ANOVA dan post hoc dengan Tukey HSD data luas lesi endometriosis

ANOVA

Luas Lesi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12490.774	3	4163.591	5.196	.008
Within Groups	16025.951	20	801.298		
Total	28516.725	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas Lesi

Tukey HSD

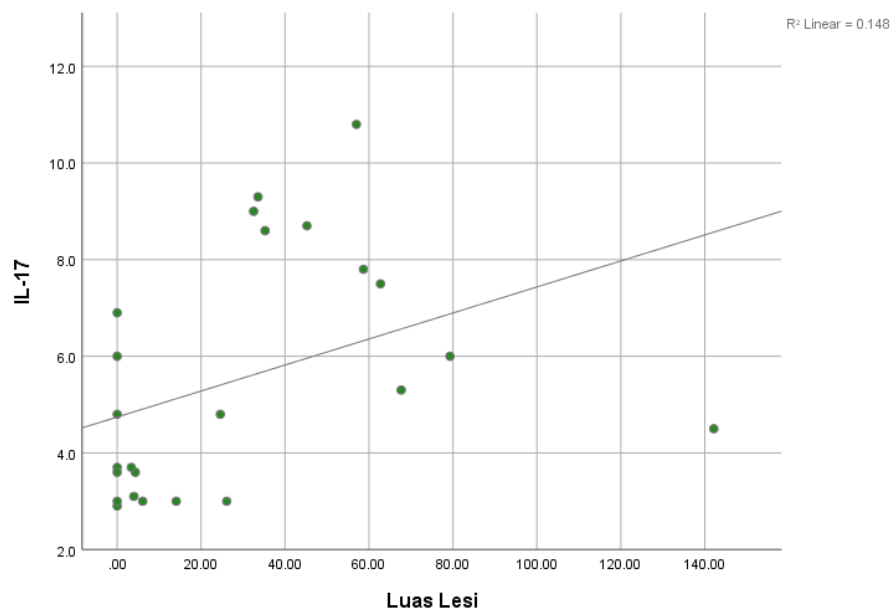
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	43.59333	16.34317	.065	-2.1502	89.3368
	P2	51.63333*	16.34317	.023	5.8898	97.3768
	P3	58.52833*	16.34317	.009	12.7848	104.2718
P1	Kontrol	-43.59333	16.34317	.065	-89.3368	2.1502
	P2	8.04000	16.34317	.960	-37.7035	53.7835
	P3	14.93500	16.34317	.798	-30.8085	60.6785
P2	Kontrol	-51.63333*	16.34317	.023	-97.3768	-5.8898
	P1	-8.04000	16.34317	.960	-53.7835	37.7035
	P3	6.89500	16.34317	.974	-38.8485	52.6385
P3	Kontrol	-58.52833*	16.34317	.009	-104.2718	-12.7848
	P1	-14.93500	16.34317	.798	-60.6785	30.8085
	P2	-6.89500	16.34317	.974	-52.6385	38.8485

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

C. Korelasi ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis**ANOVA Table**

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Luas Lesi * IL-17	Between Groups	(Combined)	24675.047	16	1542.190	2.810	.085
		Linearity	4220.717	1	4220.717	7.691	.028
		Deviation from Linearity	20454.330	15	1363.622	2.485	.114
	Within Groups		3841.678	7	548.811		
	Total		28516.725	23			

Gambaran plot scatter untuk mengetahui linearitas variabel ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis



Uji korelasi Spearman variabel ekspresi IL-17 dan luas lesi endometriosis

Correlations

			Luas Lesi	IL-17
Spearman's rho	Luas Lesi	Correlation Coefficient	1.000	.505*
		Sig. (2-tailed)	.	.012
		N	24	24
	IL-17	Correlation Coefficient	.505*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.012	.
		N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

- D. Hubungan tingkat dosis dan Ekspresi IL-17 serta luas lesi endometriosis**
 Uji Statistik untuk mengetahui adanya membandingkan tingkat dosis vitamin D yang berbeda dengan ekspresi IL-17
- Antara kelompok P1 dan P2

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	P1	6	5.67	34.00
	P2	6	7.33	44.00
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17	
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.802
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- Antara kelompok P1 dan P3

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	P1	6	7.67	46.00
	P3	6	5.33	32.00
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17	
Mann-Whitney U	11.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-1.143
Asymp. Sig. (2-tailed)	.253
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- Antara kelompok P2 dan P3

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-17	P2	6	9.25	55.50
	P3	6	3.75	22.50
	Total	12		

Test Statistics^a

IL-17	
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	22.500
Z	-2.670
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Uji statistik untuk mengetahui perbedaan tingkatan dosis vitamin D dengan luas lesi endometriosis

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas Lesi

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	43.59333	16.34317	.065	-2.1502	89.3368
	P2	51.63333*	16.34317	.023	5.8898	97.3768
	P3	58.52833*	16.34317	.009	12.7848	104.2718
P1	Kontrol	-43.59333	16.34317	.065	-89.3368	2.1502
	P2	8.04000	16.34317	.960	-37.7035	53.7835
	P3	14.93500	16.34317	.798	-30.8085	60.6785
P2	Kontrol	-51.63333*	16.34317	.023	-97.3768	-5.8898
	P1	-8.04000	16.34317	.960	-53.7835	37.7035
	P3	6.89500	16.34317	.974	-38.8485	52.6385
P3	Kontrol	-58.52833*	16.34317	.009	-104.2718	-12.7848
	P1	-14.93500	16.34317	.798	-60.6785	30.8085
	P2	-6.89500	16.34317	.974	-52.6385	38.8485

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.