

PERBEDAAN KADAR IL-6 PADA HUVECs NORMAL DENGAN HUVECs NORMAL YANG DIPAPAR PLASMA HAMIL PENDERITA PREEKLAMPSIA

Budi Rahayu¹, Nurdiana², Siti Candra Windu Baktiyani³

¹ Stikes Achmad Yani Yogyakarta

² Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³ Laboratorium Obstetri Dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang /RS dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRACT

Background : Preeclampsia is a condition where the blood pressure is increasing ($140/90$ mmHg) followed by proteinuria (300 mg/24 hour or $1+$ in stick test) in pregnant women after 20 weeks of pregnancy. Released placenta factor cause the damage in endothelial cells which lead to the excessive increase on pro inflammation factor interleukin 6 (IL-6).

Objective: This study aimed to investigate whether level IL-6 on normal HUVECs with normal HUVECs induced by plasma from preeclamptic patients.

Research Method: True experimental research using posttest only control group approach, conducted in the laboratory with invitro. HUVECs culture was divided into 5, that were normal HUVECs without treatment (K-); HUVECs preeclampsia model (K+). Measurement on the levels of IL-6 used ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Result: Independent sample t-test showed that there were significant differences ($p=0.000<$) on the average of IL-6 levels between the negative control group (1.64 ± 0.12 pg/ml) and the positive control group (31.64 ± 11.69 pg/ml).

Conclusion: Adding the patient's preeclampsia plasma into normal HUVECs can increase levels of IL-6.

Keyword: patient's preeclampsia plasma, HUVECs, and IL-6.

PENDAHULUAN

Preeklampsia merupakan "the disease of theories", dimana patofisiologinya masih belum jelas diketahui.¹ Preeklampsia merupakan karakteristik penyakit yang temuan klinisnya ditandai dengan kenaikan tekanan darah yang disertai dengan proteinuria pada wanita hamil dengan umur kehamilan setelah 20 minggu yang sebelumnya tidak mengalami hipertensi.²

Sindrom preeklampsia merupakan kelainan yang terjadi melalui dua tahap yaitu tahap pertama bersifat preklinis dan ditandai dengan kelainan dalam proses *remodelling* vaskular trofoblastik pada arteri uterinae yang akan mengakibatkan terjadinya hipoksia

plasenta. Tahap kedua pelepasan faktor plasenta kedalam sirkulasi maternal seperti *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1), *tumor necrosis factor alpha* (TNF-) dan IL-6, *angiotensin II tipe 1 receptor antibodies* (AT1-AA), dan *thromboxan* (TX) menyebabkan respon inflamasi dan peningkatan aktivasi sel endotel.^{3,4,5}

Fungsi dari sel endotel adalah sebagai pengatur tonus vaskuler, mencegah trombosis, mencegah perlekatan leukosit dan mengatur pembuluh darah vaskuler. Endotel yang mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti stress hemodinamik, stress oksidatif, maupun paparan dengan sitokin inflamasi

dan hiperkolesterolemia, akan berubah fungsinya menjadi abnormal.⁶

Disfungsi endotel menimbulkan ketidakseimbangan substansi dari vasokonstriktor sehingga dapat menyebabkan hipertensi dan hipoksia.^{6,7} Hipoksia akan memicu aktivitas leukosit yang menimbulkan peradangan dan peningkatan sitokin pro inflamasi *Interleukin 6* (IL-6) yang diaktifkan melalui jalur *nuclear factor-k* (NF-k).^{7,8}

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Penelitian true experimental dengan pendekatan yang digunakan *post test only control group design* yang dikerjakan di laboratorium dengan *invitro*. Kultur HUVECs dibagi menjadi 5 yaitu : HUVECs normal (K-) dan HUVECs preeklampsia (K+).

Kultur HUVECs setelah konfluent 80% pada hari ke-5 kemudian ditambahkan dengan plasma penderita preeklampsia 2% inkubasi *overnight* dan dilakukan pengoleksian supernatan untuk pengukuran ELISA.

Bahan untuk kultur sel endotel adalah tali pusat steril. Media pengambilan umbilikus adalah *delonized water*, *HEPES solution* 2 ml, *gentamycine*, *sodium hydrogen bicarbonat* dan *phenol red* 4 ml, dan *Hank's Balance Salt Solution* (HBSS) 100 ml. Pencucian umbilikus untuk menghilangkan eritrosit menggunakan *PBSA ready to use*. Bahan isolasi sel endothel : *medium serum free*, *filer* 0,2 μm , *collagenase solution*

(SIGMA TYPE HA, C-6885). Bahan *medium serum free* adalah L-glutamin 2 mM 1,25 ml, *medium 199* (SIGMA, M-5017), *nabic*, antibiotik menggunakan penisilin streptomisin 1 % dari volume total *medium free*. Bahan kultur sel endotel adalah gelatin 0.2 % (SIGMA, G1393), *endhotelial complete medium* 2 % (*Serum free medium* 80 ml ditambah *FBS (Fetal Bovine Serum)* sebanyak 10-15 %).

Bahan Plasma preeklampsia 2% adalah *medium preeklampsia* yang terdiri dari $\frac{1}{2}$ *medium komplit* ditambah dengan *FBS (Fetal Bovine Serum)* 5-7.5%, kemudian ditambahkan plasma penderita preeklampsi sebanyak 2% dari total *medium preeklampsia* yang dibutuhkan pada kultur HUVECs.

Bahan pemeriksaan kadar IL-6 menggunakan supernatan HUVECs diukur dengan menggunakan metode ELISA. Reagen disiapkan dalam suhu ruang, kemudian elisa reader diatur dengan panjang gelombang 450 nm-570 nm, *standard dilution* dibuat sebanyak 7, *PBS* dibuat, *microplate* disiapkan dan dilakukan dengan *wash buffer*, *asay buffer* sebanyak 50 μL ditambahkan, tambahkan standart dilution 50 μL pada well standar dan sampel 50 μL kemasing-masing well sampel, tutup dengan perekat *plate*, inkubasi 2 jam, pencucian dengan *wash solution* 4x, tambahkan Human IL-6 *Detection Antibody* kedalam masing-masing *well* inkubasi 30 menit, lakukan pencucian dengan *wash solution* 4x, tambahkan 100 μL *Avidin HRP-A Solution*

well tutup dengan perekat inkubasi 30 menit, pencucian 5x dengan *wash solution*, Tambahkan 100 μ L *Substrate Solution F* inkubasi 15 menit, tambahkan 100 μ L *Stop Solution F* pada masing-masing *well*, pembacaan dengan elisa *reader*, hitung OD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Perbandingan IL-6 pada kelompok HUVECs Normal dan kelompok HUVECs Preeklampsia

Kondisi preeklampsia adalah kondisi dimana terjadi disfungsi endotel yang diakibatkan oleh kenaikan sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-6. Pada penelitian ini terjadi kenaikan kadar IL-6 pada kultur HUVECs yang dipapar plasma preeklampsia. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Takacs yang mengemukakan bahwa IL-6 mengalami peningkatan pada kultur HUVECs yang dipapar plasma penderita preeklampsia.⁸ Kultur HUVECs yang dipapar penderita plasma preeklampsia kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam mampu menaikkan kadar IL-6 pada kultur HUVECs.⁹

uji t sampel bebas menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata kadar IL-6 antara kelompok HUVECs Normal (1.64 ± 0.12 pg/ml) dengan HUVECs preeklampsia (31.64 ± 11.69 pg/ml), ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil perbandingan kelompok kontrol positif dan negatif kadar IL6 (pg/ml) dan sVCAM-1 (ng/ml)

| Variabel | HUVECs normal Rerata \pm stan.dev | HUVECs preeklampsia Rerata \pm stan.dev | p-value |
|------------|---|---|-----------------|
| kadar IL-6 | 1.64 \pm 0.12 | 31.64 \pm 11.69 | 0.000< α |

$\alpha=0.05$ berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika

Penemuan aksi inflamatori IL-6 dapat menjadi mediator dalam interaksi *endotelial-leukocyte cell* dan efek ini dikorelasikan dengan peningkatan ekspresi *soluble vascular cell adhesion molecule-1* (sVCAM-1) pada permukaan sel endotel yang akan memperparah disfungsi endotel.^{10 11}

Faktor-faktor yang diusulkan menyebabkan disfungsi endotel pada preeklampsia meliputi remodelling vaskular plasenta yang abnormal dan iskemia plasenta, terjadinya peradangan akibat faktor pro inflamasi yang berlebihan menyebabkan stress oksidatif, ketidakseimbangan faktor angiogenik, dan hilangnya regulator pelindung.¹² Perubahan inflamatorik diduga merupakan kelanjutan perubahan pada tahap satu yang disebabkan oleh kecacatan dalam plasenta atau iskemia plasenta. Faktor metabolik dan antiangiogenik serta mediator inflamasi lainnya diduga memicu aktivasi sel endotel.¹³ Disfungsi sel endotel dipicu oleh keadaan leukosit yang terhiperaktivasi dalam sirkulasi maternal. Akibat rangsangan dari faktor proinflamasi selanjutnya akan menjadi pencetus timbulnya stress oksidatif yang terkait dengan preeklampsia.¹⁴

Respon inflamatori dipercaya mampu memainkan peranan penting dalam disfungsi endotel pada preeklampsia. Disfungsi

endotel, menyebabkan aktivasi leukosit dan *elevated cytokin inflamatory*. Level TNF- dan IL-6 merupakan pertanda buruk dari adanya respon inflamasi pada kehamilan dengan preeklampsia. Peningkatan respon inflamatori tidak hanya berkontribusi pada stress oksidatif dan vasokonstriksi namun juga pada gangguan metabolik serta peningkatan resisten pada insulin.^{15,16}

KESIMPULAN

Terdapat peningkatan kadar IL-6 pada kultur HUVECs yang dipapar plasma hamil penderita preeklampsia 2%.

KEPUSTAKAAN

1. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hakens GD, et al. Williams obstetrics. 23th ed. London: Prentice-Hall International; 2010.
2. Wang A, Rana S, Karumanchi AS. Preeclampsia: The role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology*. 2009; 24:147-58.
3. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and preeclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5): 309-16.
4. Gilbert JS, Ryan MJ, La marca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: Linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 294:541-50.
5. Redman CWG, Sargent IL, Immunology of pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010; 63:534-43.
6. Dharma R, Wibowo N, Raranta PTH. Disfungsi endotel pada preeklampsia. *Makara Kesehatan*. 2005; 9(2):63-69.
7. Susianto IA, Suharsono, Hadijono S. Kadar TNF- , IL-6 dan trofoblas pada preeklampsia – Eklampsia. *Medika Media Indonesia*. 2009; 43(4):166-73.
8. Takacs P, Green KL, Nikaeo A, Kauma SW. Increased vascular endothelial cell production of interleukin-6 in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188:740-4.
9. Gill-Villa AM, Norling LV, Serhan CN, Cordero D, Rojas M, Cadavid A. Aspirin triggered-lipoxin A4 reduced the adhesion of human polymorphonuclear neutrophils to endothelial cells initiated by preeclamptic plasma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2012; 87:127-34.
10. Min J, Kim Y, Kim S, Kwon M, Kong Y, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon Y. TNF-related activation-induced cytokine enchaces leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kB activation in endothelial cells. *J Immunol*. 2005; 175:531-40.
11. Anwar AD, Achmad TH, Sukandar H. Polimorfisme C1167T gen reseptor tipe II

- transforming growth factor- β , kadar soluble endoglin, dan vascular cell adhesion molecule-1 pada preeklampsia. MKB. 2010; 42(3):115-22.
12. Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia. *Biochemical Society Transaction*. 2011; 39:1619-27.
13. Taylor, RN, Davidge, ST, Roberts JM. Endothelial cell dysfunction and oxidative stress. In Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG, editors. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. 3rd ed. Elsevier
14. Faas MM, Schuiling GA, Linton EA, Sargent IL, Redman CWG. Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182:351
15. Faisal K, Galarraga, Belch, JJF. The role of endothelial function and its assesment in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010; 6:253-61.
16. Wang Y, Lewis FD, Gu Y, Zhao S, Groome JL. Elevated maternal soluble gp130 and il-6 levels and reduces gp 130 and socs-3 exspressions in women complicated with preeclampsia. *Hypertension American heart Association*. 2010; 57:336-42.