



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK THYMOQUINONE TERHADAP
HITUNG JENIS LEUKOSIT PASCA EKSTRAKSI GIGI PADA
MODEL TIKUS DIABETES AKIBAT INDUKSI
STREPTOZOTOCIN**

SKRIPSI

Oleh

**Fatimah Az-Zahrah
NIM 121610101054**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK THYMOQUINONE TERHADAP
HITUNG JENIS LEUKOSIT PASCA EKSTRAKSI GIGI PADA
MODEL TIKUS DIABETES AKIBAT INDUKSI
STREPTOZOTOCIN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Fatimah Az-Zahrah
NIM 121610101054

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Hikmatul Faiza dan ayahanda Nasrullah, kakak Muhammad Rayhan Al-Karim serta adik Salman Al-Farisi, Haninah Salsabila, dan Syahid Abdul Aziz yang tercinta;
2. Guru-guru saya mulai taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang terhormat;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Bangsa Indonesia.

MOTTO

Dan apabila hamba-hamba-Ku bertanya kepadamu (Muhammad) tentang Aku, maka sesungguhnya Aku dekat. Aku kabulkan permohonan orang-orang yang berdo'a apabila dia berdo'a kepada-Ku. Hendaklah mereka itu memenuhi (perintah)-Ku dan beriman kepada-Ku, agar mereka memperoleh kebenaran.
(terjemahan surat Al-Baqarah ayat 186)*



*Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: PT Sygma Examedia Arkanleema

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Fatimah Az-Zahrah

NIM : 121610101054

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone terhadap Hitung Jenis Leukosit Pasca Ekstraksi Gigi pada Model Tikus Diabetes Akibat Induksi Streptozotocin” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Oktober 2017

Yang menyatakan,

Fatimah Az-Zahrah
NIM 121610101054

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK THYMOQUINONE TERHADAP HITUNG
JENIS LEUKOSIT PASCA EKSTRAKSI GIGI PADA MODEL TIKUS
DIABETES AKIBAT INDUKSI STREPTOZOTOCIN**

Oleh

Fatimah Az-Zahrah
NIM 121610101054

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc

Dosen Pembimbing Pendamping: Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc, Ph.D

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone terhadap Hitung Jenis Leukosit Pasca Ekstraksi Gigi pada Model Tikus Diabetes Akibat Induksi Streptozotocin” karya Fatimah Az-Zahrah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 25 Oktober 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Amandia Dewi P. S., M.Biomed
NIP. 198006032006042002

drg. Dwi Merry Christmarini R., M.Kes
NIP. 197712232008122002

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc
NIP. 197908142008122003

Prof. drg. Mei Syafrjadi, M.DSc, Ph.D
NIP. 196805291994031003

Mengesahkan

Dekan,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost.
NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone terhadap Hitung Jenis Leukosit Pasca Ekstraksi Gigi pada Model Tikus Diabetes Akibat Induksi Streptozotocin; Fatimah Az-Zahrah; 121610101054; 2017; 87 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Diabetes Mellitus (DM) merupakan gangguan metabolik kronis dengan prevalensi di Indonesia yang meningkat tiap tahunnya. Pada kondisi DM, proses penyembuhan luka berlangsung lebih lama. Gangguan penyembuhan luka terjadi akibat hiperglikemia atau meningkatnya Kadar Glukosa Darah (KGD). Kondisi hiperglikemia mengakibatkan meningkatnya infiltrasi sel neutrofil pada jaringan yang terluka. Keadaan tersebut memicu peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan kerusakan pada *Extracellular Matrix* (ECM). Neutrofil melepaskan elastase dan neutrofil kolagenase (MMP-8). Elastase dapat menurunkan faktor pertumbuhan. Sedangkan kolagenase dapat menurunkan dan menginaktivasi komponen ECM. Hiperglikemia juga meningkatkan *Advanced Glycation End products* (AGEs). Terjadi peningkatan interaksi antara AGEs dan reseptor AGEs (RAGE) yang menyebabkan *oxidative stress*. *Oxidative stress* memicu aktivasi *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B). Aktivasi NF- κ B akan meningkatkan molekul adhesi pada sel endotel. Ekspresi molekul adhesi berlebih dapat mengganggu diapedesis serta kemotaksis leukosit yang akan mempengaruhi penurunan jumlah leukosit. Keadaan tersebut membuat proses penyembuhan luka menjadi terganggu, terutama pada fase inflamasi. Pemberian ekstrak *Thymoquinone* (TQ) yang memiliki efek sebagai antioksidan dan *immunomodulator* diharapkan mampu memperbaiki kondisi disfungsi imun berupa perubahan pada jumlah leukosit, sehingga proses penyembuhan luka berjalan dengan baik.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus wistar ini menggunakan sampel berjumlah 27 ekor, berat 150-250 gram, nilai KGD acak normal dan sehat. Induksi DM menggunakan *streptozotocin* (STZ), diinjeksi secara intravena pada ekor tikus. Tikus dengan KGD ≥ 250 mg/dL pasca injeksi DM dikategorikan sebagai positif DM. Tikus positif DM dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok P1 yang diberi perlakuan ekstrak TQ 1x1/hari, kelompok P2 yang diberi metformin 3x1/hari, dan kelompok K yang diberi akuades 1x1/hari. Tiap kelompok dibagi menjadi 3 subkelompok berdasarkan waktu eutanasia yaitu pada hari ke-1, 3, dan 7 pasca ekstraksi gigi. Perlakuan diberikan secara intragastrik sejak hari ke-1 positif DM. Hari ke-7 sejak dinyatakan positif DM, dilakukan ekstraksi gigi, kemudian eutanasia menggunakan metode overdosis inhalasi eter sesuai dengan pembagian hari masing-masing sampel. Pengamatan yang dilakukan yaitu hitung jenis leukosit menggunakan metode *differential count* dari hapusan darah intrakardial tikus.

Hasil penelitian menunjukkan persentase hitung jenis leukosit yang bervariasi. Persentase jumlah leukosit yang abnormal diduga akibat respon stres pasca ekstraksi gigi, peningkatan kerentanan terhadap alergi, dan waktu inflamasi yang memanjang. Penyembuhan luka yang lebih baik tampak pada kelompok P1, dibandingkan dengan kelompok P2 dan K. Penyembuhan luka yang berlangsung baik mungkin terjadi karena efek antioksidan dan *immunomodulator* pada TQ. TQ sebagai antioksidan menekan *oxidative stress* dengan menghambat pembentukan ROS, produksi *Nitric Oxide* (NO), dan meningkatkan enzim antioksidan. Sedangkan peran TQ sebagai *immunomodulator* adalah meningkatkan jumlah sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, hitung jenis leukosit, ekspresi kemokin, serta meningkatkan aktivitas fagositosis, dan kemotaksis leukosit. Hitung jenis leukosit menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada hampir semua jenis leukosit, yaitu basofil, neutrofil, limfosit, dan monosit. Sedangkan eosinofil tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Kesimpulan penelitian ini yaitu pemberian ekstrak TQ mampu menyebabkan perubahan hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi STZ melalui efeknya sebagai antioksidan dan *immunomodulator*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone terhadap Hitung Jenis Leukosit Pasca Ekstraksi Gigi pada Model Tikus Diabetes Akibat Induksi Streptozotocin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah Subhanahu wa ta’ala dan Rasulullah Shallallahu ‘alaihi wa sallam;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Agustin Wulan Suci D. M.DSc, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc, Ph.D, selaku Dosen Pembimbing Pendamping dalam meluangkan waktu, pikiran, tenaga, ilmu dalam membimbing serta mendidik dengan ilmu dan kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Amandia Dewi P. S., M.Biomed, selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Dwi Merry Christmarini R., M.Kes, selaku Dosen Penguji Anggota, atas bimbingan, ilmu serta saran untuk kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Leliana Sandra Devi Ade Putri, Sp.Ort, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran, ilmu, dan motivasi dalam perjalanan sebagai mahasiswa;
6. Ibunda Hikmatul Faiza, ayahanda Nasrullah, kakak Muhammad Rayhan Al-Karim, serta adik Salman Al-Farisi, Haninah Salsabila, dan Syahid Abdul Aziz atas do’a, dukungan, motivasi, sumber kekuatan, dan kasih sayang yang tak terbatas;

7. Keluarga besar alm. Kakek Hasan Djamin dan alm. Kakek Hasan Basri atas do'a dan motivasinya;
8. Tim penelitian, Putri Rahmawati Yusuf, Retno Trisnawati, dan Sabrina Maharani Pratama atas motivasi, do'a, kerjasama, dan perhatian yang tak henti-hentinya dalam mengingatkan agar segera menyelesaikan skripsi ini;
9. Staff laboratorium Biomedik; mas Agus, mbak Indri, pak Pin, dan bu Wahyu;
10. Keluarga RQM Al-Ikhlas; ustadzah Kiptiyah, ustadzah Ifa, Husna, Dessy, Wili, Novida, Lilis, Arin, Eva, mbak Tira, mbak Ika, Muna, Mariyam, Firda, Iffa, mbak Nanik, Nidya, Sukma, dan Arifah atas do'a dan kasih sayang kekeluargaannya;
11. Keluarga Moffelty, TRUF, dan FKG 2012;
12. Semua pihak yang turut mendo'akan dan pihak yang tidak dapat disebutkan.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 25 Oktober 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR SINGKATAN	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Bagi Peneliti	4
1.4.2 Bagi Masyarakat.....	4
1.4.3 Bagi Institusi.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diabetes Mellitus	6
2.1.1 Patofisiologi	7
2.1.2 Gejala	8
2.1.3 Diagnosis.....	9
2.1.4 Komplikasi	10
2.2 Ekstraksi Gigi dan Penyembuhan Luka	10
2.3 Leukosit	12
2.3.1 Neutrofil	13
2.3.2 Eosinofil	13
2.3.3 Basofil	14
2.3.4 Limfosit	15

2.3.5	Monosit.....	16
2.4	Hubungan Diabetes Mellitus dengan Leukosit	16
2.5	Metformin	18
2.6	Thymoquinone (TQ)	19
2.6.1	Definisi	19
2.6.2	Manfaat Sebagai Antioksidan dan <i>Immunomodulator</i>	19
2.7	Kerangka Konseptual Penelitian	21
2.7.1	Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian	22
2.8	Hipotesis	22
BAB 3. METODE PENELITIAN		
3.1	Jenis Penelitian	23
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2.1	Tempat Penelitian	23
3.2.2	Waktu Penelitian.....	23
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian	23
3.3.1	Populasi Penelitian.....	23
3.3.2	Kriteria Sampel Penelitian.....	23
3.3.3	Besar Sampel Penelitian	24
3.4	Identifikasi Variabel Penelitian	25
3.4.1	Variabel Bebas.....	25
3.4.2	Variabel Terikat	25
3.4.3	Variabel Terkendali	25
3.5	Definisi Operasional Variabel Penelitian	25
3.5.1	Ekstrak <i>Thymoquinone</i> (TQ)	25
3.5.2	Induksi <i>Streptozotocin</i> (STZ)	26
3.5.3	Ekstraksi Gigi	26
3.5.4	Hitung Jenis Leukosit	26
3.6	Bahan dan Alat Penelitian	26
3.6.1	Bahan Penelitian	26
3.6.2	Alat Penelitian	27
3.7	Prosedur Penelitian	28
3.7.1	Persiapan <i>Ethical Clearance</i>	28
3.7.2	Persiapan Hewan Coba	28
3.7.3	Pembuatan Larutan Perlakuan	28
3.7.4	Induksi STZ	29
3.7.5	Pengelompokkan Hewan Coba.....	29
3.7.6	Perlakuan Hewan Coba.....	30

3.7.7 Euthanasia Hewan Coba	31
3.7.8 Pembuatan Sediaan Hapusan darah	31
3.8 Prosedur Hitung Jenis Leukosit	32
3.9 Analisa Data	33
3.10 Alur Penelitian.....	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Hasil	35
4.1.1 Hasil Penelitian.....	35
4.1.2 Hasil Analisa Data	37
4.2. Pembahasan	40
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	44
5.2. Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR SINGKATAN

AGEs	: <i>advanced glycation end products</i>
CAT	: <i>catalase</i>
DM	: <i>diabetes mellitus</i>
ECM	: <i>extracellular matrix</i>
ICAM-1	: <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IDDM	: <i>insulin dependent diabetes mellitus</i>
IgE	: <i>imunoglobulin E</i>
IL-1 β	: <i>interleukin-1β</i>
GDM	: <i>gestasional diabetes mellitus</i>
GPx	: <i>glutathione peroxidase</i>
GR	: <i>glutathione reductase</i>
GST	: <i>glutathione-s-transferase</i>
HSPCs	: <i>sel punca hemopoietik dan sel progenitor</i>
KGD	: <i>kadar glukosa darah</i>
LSD	: <i>least significant different</i>
MCP-1	: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MMP	: <i>matrix metalloproteinase</i>
NF- $\kappa\beta$: <i>nuclear factor-$\kappa\beta$</i>
NIDDM	: <i>non insulin dependent diabetes mellitus</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
PDGF	: <i>platelet-derived growth factor</i>
PEPCK	: <i>phosphoenol pyruvat carboxykinase</i>
RAGE	: <i>receptor for AGEs</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
SOD	: <i>superoxide dismutase</i>
STZ	: <i>streptozotocin</i>
TGF- β	: <i>transforming growth factor-β</i>
TIMMP	: <i>tissue inhibitor of MMP</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor-α</i>
TQ	: <i>thymoquinone</i>
TTGO	: <i>tes toleransi glukosa oral</i>
VCAM-1	: <i>vascular adhesion molecule-1</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kriteria penegakan diagnosis	10
3.1 Pengelompokan hewan coba	30
4.1 Hasil pengukuran KGD acak tikus sebelum ekstraksi	35
4.2 Hitung jenis leukosit pada hapusan darah tikus	36
4.3 Hasil uji analisis statistik <i>One Way Anova</i> dan <i>Kruskal Wallis</i> pada jenis leukosit berdasarkan waktu perlakuan	37
4.4 Hasil uji analisis statistik LSD pada jenis leukosit H-1	38
4.5 Hasil uji analisis statistik <i>One Way Anova</i> dan <i>Kruskal Wallis</i> pada jenis leukosit berdasarkan jenis perlakuan	38
4.6 Hasil uji analisis statistik LSD pada jenis leukosit kelompok P1	39
4.7 Hasil uji analisis statistik LSD pada jenis leukosit kelompok P2	39
4.8 Hasil uji analisis statistik LSD pada jenis leukosit kelompok K	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sel neutrofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah.....	13
2.2 Sel eosinofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah.....	14
2.3 Sel basofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah.....	15
2.4 Sel limfosit perbesaran 1600x dalam hapusan darah	15
2.5 Sel monosit perbesaran 1600x dalam hapusan darah.....	16
2.6 Struktur kimia TQ	19
2.7 Kerangka konseptual penelitian	21
3.3 Alur penelitian.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Surat Izin Penelitian	51
3.2 Surat Keterangan Layak Etik Penelitian	53
3.3 Bahan dan Alat Penelitian	54
3.3.1 Bahan Penelitian.....	54
3.3.2 Alat Penelitian	56
3.4 Prosedur Penelitian.....	60
3.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	60
3.4.2 Pembuatan Larutan Perlakuan.....	60
3.4.3 Induksi STZ.....	60
3.4.4 Pengelompokan Hewan Coba	61
3.4.5 Perlakuan Hewan Coba	61
3.4.6 Euthanasia Hewan Coba.....	62
3.4.7 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah.....	62
3.5 Penghitungan Dosis dan Volume Larutan Perlakuan.....	63
4.1 Data Kadar Glukosa Darah (KGD)	65
4.1.1 KGD Kelompok P1 (<i>Thymoquinone</i>).....	65
4.1.2 KGD Kelompok P2 (Metformin)	65
4.1.3 KGD Kelompok K (Akuades).....	65
4.2 Data Penghitungan Jenis Leukosit	66
4.2.1 Eosinofil	66
4.2.2 Basofil	67
4.2.3 Neutrofil	68
4.2.4 Limfosit	69
4.2.5 Monosit.....	70
4.3 Hasil Uji Analisis Statistik	71
4.3.1 Berdasarkan Waktu Perlakuan	71
4.3.2 Berdasarkan Jenis Perlakuan	79

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

World Health Organization (WHO) mengategorikan Diabetes Mellitus (DM) sebagai penyakit tidak menular yang banyak dialami penduduk dunia. *International Diabetes Federation* (IDF) menyatakan bahwa pada tahun 2014 jumlah penderita DM sebanyak 387 juta jiwa dengan angka kematian berkisar 4,9 juta jiwa setiap tahunnya. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada tahun 2007 sampai tahun 2013 menunjukkan proporsi penyakit DM di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,1% menjadi 2,4% (Balitbangkes, 2013; IDF, 2014).

Diabetes Mellitus merupakan gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia atau peningkatan Kadar Glukosa Darah (KGD). Peningkatan KGD yang tidak terkontrol dengan baik dapat menyebabkan berbagai komplikasi kesehatan, salah satunya yang sering terjadi di rongga mulut yaitu penyembuhan luka yang lama akibat ekstraksi gigi, dimana prosedur ekstraksi gigi akan menimbulkan luka pada soket gigi dan jaringan sekitarnya. Proses penyembuhan luka pada penderita DM berlangsung lebih lama akibat proses inflamasi yang memanjang (Swastini 2013; Zhao *et al.*, 2016).

Proses inflamasi yang memanjang ditandai dengan peningkatan infiltrasi sel neutrofil melebihi jumlah normal pada jaringan yang terluka. Keadaan tersebut memicu peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan kerusakan pada *Extracellular Matrix* (ECM). Selain itu, neutrofil melepaskan serin protease seperti elastase, dan *Matrix Metalloproteinase* (MMP) seperti neutrofil kolagenase (MMP-8). Elastase dapat menurunkan faktor pertumbuhan seperti *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang berperan penting dalam fase proliferasi. Sedangkan kolagenase dapat menurunkan dan

menginaktivasi komponen ECM yang bertanggungjawab dalam pembentukan jaringan (Zhao *et al.*, 2016).

Neutrofil yang persisten dapat menyebabkan luka sulit untuk mengalami proses penyembuhan. Hal tersebut bisa menyebabkan luka akut berprogresi menjadi luka kronis. Neutrofil dan makrofag juga memproduksi sitokin pro-inflamasi seperti *Interleukin-1 β* (IL-1 β) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) yang tidak hanya meningkatkan produksi MMP, namun juga menurunkan *Tissue Inhibitor of MMP* (TIMMP). Kondisi tersebut meningkatkan degradasi ECM, mengganggu migrasi sel, dan mengurangi proliferasi fibroblas serta sintesis kolagen yang mengakibatkan kerusakan berkepanjangan pada jaringan, sehingga terjadi penyembuhan luka yang lama (Zhao *et al.*, 2016; Suryadi *et al.*, 2017).

Leukosit berperan penting dalam proses inflamasi. Pada kondisi DM, keadaan hiperglikemia akan memicu peningkatan akumulasi *Advanced Glycation End products* (AGEs) dalam jaringan tubuh. AGEs dapat berinteraksi dengan reseptor AGEs (RAGE). RAGE dapat ditemukan di permukaan membran plasma leukosit, sel endotel, dan sel lainnya. Interaksi antara AGEs dan RAGE pada sel endotel akan menghasilkan *oxidative stress* yang memicu aktivasi *Nuclear Factor- $\kappa\beta$* (NF- $\kappa\beta$). Aktivasi NF- $\kappa\beta$ dapat meningkatkan molekul adhesi seperti selectin, *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel endotel. Ekspresi molekul adhesi yang berlebih dapat mengganggu diapedesis serta kemotaksis leukosit sehingga proses inflamasi tidak dapat berjalan dengan baik. Inflamasi yang terganggu menyebabkan terhambatnya penyembuhan luka (Negre-Salvayre *et al.*, 2009).

Hambatan pada proses penyembuhan luka memicu meningkatnya risiko infeksi. Infeksi yang tidak segera ditangani selanjutnya dapat menyebar dan mengakibatkan gangguan yang lebih kompleks. Beberapa terapi yang telah dikembangkan oleh para ahli untuk meminimalisir risiko komplikasi penyembuhan luka pada penderita DM seperti insulin, obat hipoglikemik oral, atau kombinasi keduanya. Obat hipoglikemik oral yang masih banyak digunakan di berbagai negara, termasuk Indonesia, adalah

metformin. Metformin merupakan pilihan terapi pada DM karena biayanya yang rendah, tidak menimbulkan efek hipoglikemia serta penyakit kardiovaskular, dan tidak menyebabkan penambahan maupun penurunan berat badan. Namun ternyata terapi ini masih memiliki kekurangan, metformin menimbulkan efek samping seperti *nausea*, muntah, diare, serta dapat menyebabkan asidosis laktat (Depkes RI, 2005; Inzucchi *et al.*, 2015).

Saat ini mulai dikembangkan terapi dengan menggunakan bahan alami untuk meminimalisir efek samping dari penggunaan obat yang ada. *Thymoquinone* (TQ) telah menunjukkan potensi sebagai agen terapi baru. TQ merupakan senyawa fitokimia yang memiliki efek sebagai antioksidan dan *immunomodulator*. Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa pemberian TQ secara oral mampu melindungi jantung, hati, dan ginjal terhadap kerusakan oksidatif yang dihasilkan oleh agen-agen yang memproduksi radikal bebas. Dalam perannya sebagai *immunomodulator*, TQ bekerja dengan memodulasi proses inflamasi dan sistem imun selular. TQ mampu melakukan perbaikan disfungsi imun dengan merubah jumlah leukosit, meningkatkan aktivitas fagositosis serta kemotaksis, dan ekspresi kemokin. Perbaikan disfungsi imun diharapkan mampu mencegah terjadinya gangguan proses penyembuhan luka pada kondisi DM (Ince *et al.*, 2013; Majdalawieh dan Fayyad, 2015).

Saat ini masih belum ditemukan penelitian tentang efek pemberian ekstrak TQ terhadap hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada kondisi DM, padahal penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa TQ memiliki efek sebagai antioksidan dan *immunomodulator*, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan tentang efek pemberian ekstrak TQ terhadap hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada kondisi DM.

Uji secara *in-vivo* akan dilakukan pada model tikus diabetes. Tikus dijadikan diabetes melalui induksi *Streptozotocin* (STZ) dengan dosis tunggal 50 mg/kg BB. Pemberian STZ dengan dosis tersebut menghasilkan keadaan DM Tipe I dan kerusakan ringan pada sel β pankreas. STZ memiliki pengaruh toksisitas spesifik terhadap sel β pankreas dengan meningkatkan *oxidative stress*. Dibandingkan dengan bahan lainnya,

STZ bekerja lebih cepat serta dapat meminimalisir efek toksisitas pada ginjal dan hati. Penggunaan dosis tunggal pada STZ diberikan karena lebih murah dan hasilnya lebih cepat dibandingkan pemberian STZ dengan dosis berulang (Cheng *et al.*, 2006; Deeds *et al.*, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan didapatkan permasalahan, yaitu apakah ekstrak TQ dapat menyebabkan perubahan hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi STZ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak TQ terhadap hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi STZ.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Mengetahui efek pemberian ekstrak TQ terhadap hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi STZ.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Memberi informasi ilmiah tentang terapi alternatif penyakit DM dalam usaha mempercepat proses penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi.

1.4.3 Bagi Institusi

- a. Memberi informasi ilmiah mengenai efek pemberian ekstrak TQ terhadap hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada kondisi diabetes.
- b. Menjadi bahan referensi ilmiah untuk pengembangan riset tentang proses penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi pada kondisi diabetes.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemia atau peningkatan Kadar Glukosa Darah (KGD). Pada kondisi ini terjadi gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Riskesdas menyatakan bahwa gangguan metabolisme terjadi akibat kekurangan insulin baik secara absolut maupun relatif (Guyton dan Hall, 2007; Balitbangkes, 2013).

Terdapat tiga tipe utama DM, yaitu DM tipe I, DM tipe II, dan Gestasional Diabetes Mellitus (GDM). DM tipe I disebut dengan *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM). Tipe ini hanya terjadi pada sekitar 10-20% keseluruhan kasus DM. DM tipe I terjadi akibat rusaknya sel β pankreas dalam mensekresi insulin. DM tipe II terjadi pada sekitar 90-95% keseluruhan kasus DM. Disebut dengan *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM). Tipe ini terjadi karena adanya kondisi yang dikenal sebagai resistensi insulin. Resistensi insulin yaitu penurunan sensitivitas jaringan terhadap efek metabolisme insulin, sehingga proses pengambilan glukosa oleh sel terganggu. Sedangkan GDM adalah kondisi hiperglikemia yang didapatkan pada masa kehamilan. Terdapat 1:25 kasus DM jenis ini pada kehamilan penduduk dunia. Setelah melahirkan biasanya GDM juga akan menghilang, namun wanita yang mengalami DM tipe ini memiliki risiko lebih tinggi terkena DM tipe II beberapa tahun setelah melahirkan (Price dan Wilson, 2005; Guyton dan Hall, 2007; Sherwood, 2010; IDF, 2014).

Angka kejadian DM hampir selalu meningkat setiap tahunnya. *International Diabetes Federation* (IDF) menyatakan bahwa pada tahun 2014 jumlah penderita DM sebanyak 387 juta jiwa dengan angka kematian berkisar 4,9 juta jiwa setiap tahunnya. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada tahun 2007 sampai tahun 2013

menunjukkan proporsi penyakit DM di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,1% menjadi 2,4% (Balitbangkes, 2013; IDF, 2014).

2.1.1 Patofisiologi

Kondisi hiperglikemia pada DM tipe I dan DM tipe II terjadi akibat mekanisme yang berbeda. Pada DM tipe I terjadi kerusakan sel β pankreas yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti infeksi virus, kelainan autoimun, maupun faktor herediter. Sel β pankreas berfungsi untuk menyintesis hormon insulin, sehingga kerusakan pada sel β pankreas dapat mengakibatkan terganggunya produksi insulin. Insulin merupakan hormon yang berfungsi untuk mengatur metabolisme karbohidrat, protein, lemak serta mengatur penyimpanan glukosa dalam darah. Setelah mengonsumsi makanan tinggi karbohidrat, glukosa akan diabsorpsi ke dalam darah. Tingginya kadar glukosa dalam darah mengakibatkan terjadinya sekresi insulin dengan cepat. Selanjutnya insulin berperan dalam penyimpanan glukosa sebagai glikogen, terutama di hati dan otot. Tubuh memerlukan glukosa untuk memperoleh energi. Dalam keadaan tidak tersedia makanan, konsentrasi glukosa dalam darah akan berkurang, sehingga glikogen yang tersimpan akan dipecah untuk mendapatkan glukosa sebagai sumber energi. Apabila produksi insulin terganggu, maka akan berdampak pada terganggunya pengaturan glukosa dalam darah. Kadar glukosa yang tinggi dalam darah seharusnya diubah menjadi glikogen, tetapi karena terjadi gangguan pada produksi insulin, akibatnya terjadi kondisi hiperglikemia pada tubuh.

Diabetes Mellitus tipe II terjadi akibat suatu kondisi yang dikenal sebagai resistensi insulin. Resistensi insulin yaitu keadaan dimana insulin tidak bisa bekerja secara optimal karena terjadi penurunan sensitivitas jaringan target terhadap efek metabolisme insulin. Penurunan sensitivitas jaringan target mengakibatkan terjadinya gangguan penggunaan dan penyimpanan karbohidrat. Gangguan tersebut menimbulkan kondisi hiperglikemia serta peningkatan sekresi insulin sebagai upaya kompensasi adanya resistensi terhadap insulin. Produksi insulin akan meningkat,

namun tetap tidak mampu mempertahankan pengaturan kadar glukosa yang normal (Guyton dan Hall, 2007).

Gestasional Diabetes Mellitus terjadi karena hormon progesteron, kortisol, laktogen, dan prolaktin yang diproduksi selama masa kehamilan menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Sel β pankreas akan merespon peningkatan glukosa pada darah dengan memproduksi insulin tiga kali lebih banyak dibandingkan dengan jumlah normal. Namun produksi insulin yang meningkat tetap tidak mampu mempertahankan pengaturan kadar glukosa yang normal (Setji *et al.*, 2005).

2.1.2 Gejala

Diabetes Melitus seringkali muncul tanpa adanya gejala. Pada DM tipe II, biasanya hampir tidak ada gejala yang dikeluhkan. DM tipe ini seringkali muncul tanpa diketahui, sehingga penanganan baru dilakukan saat penyakit telah berkembang dan mulai terjadi komplikasi. Namun terdapat beberapa tanda yang harus diwaspadai sebagai gejala DM. Gejala DM dibedakan menjadi gejala akut dan gejala kronis. Pada penderita DM yang memiliki gejala akut, dapat ditemukan kondisi polifagia (banyak makan), polidipsia (banyak minum), poliuria (banyak kencing/sering kencing saat malam hari), berat badan turun dengan cepat, dan mudah lelah. Gejala tersebut seringkali ditemukan pada penderita DM tipe I. Sedangkan gejala kronis DM yaitu kesemutan, kulit terasa panas atau seperti tertusuk jarum, rasa kebas di kulit, kram, kelelahan, mudah mengantuk, pandangan mulai kabur, gigi mudah goyah dan mudah lepas, kemampuan seksual menurun serta pada ibu hamil sering terjadi keguguran atau kematian janin dalam kandungan atau bayi yang lahir dengan berat lebih dari 4 kg (Depkes RI, 2005; Fatimah, 2015).

Gejala lain dari DM adalah glukosuria atau ditemukannya glukosa pada urin. Kondisi hiperglikemia pada penderita DM serta gangguan pada produksi insulin menyebabkan tekanan osmotik dalam cairan ekstrasel meningkat, sehingga sel mengalami dehidrasi karena terjadi perpindahan air secara osmosis keluar dari sel.

Pada kondisi ini, kadar glukosa ekstrasel meningkat dan terjadi defisiensi glukosa intrasel. Keadaan hiperglikemia juga mengakibatkan tubulus ginjal tidak mampu lagi mereabsorpsi glukosa yang tersaring keluar sehingga glukosa akan keluar bersama urin. Glukosuria akan menyebabkan keadaan diuresis osmotik dengan menarik H₂O yang terdapat dalam darah agar ikut keluar bersama dengan urin sehingga muncul gejala banyak kencing (poliuria). Cairan tubuh yang keluar secara berlebih akan mengakibatkan timbulnya gejala haus yang berlebih (polidipsia) sebagai upaya kompensasi untuk menggantikan cairan tubuh yang hilang. Selain itu, defisiensi glukosa intrasel akan mengakibatkan sel kehilangan nutrisi sehingga gejala banyak makan (polifagia) juga akan muncul. Meskipun mengonsumsi banyak makanan, biasanya penderita DM yang tidak diobati tetap akan kehilangan banyak berat badan dan mudah lelah. Hal tersebut terjadi karena peningkatan penggunaan protein dan lemak akibat adanya kegagalan penggunaan glukosa sebagai sumber energi (Sherwood, 2001; Guyton dan Hall, 2007).

2.1.3 Diagnosis

Kondisi hiperglikemia adalah gambaran paling menonjol pada penderita DM. Pada penderita DM yang memiliki gejala yang telah disebutkan, pemeriksaan kadar glukosa darah (KGD) dengan hasil KGD acak ≥ 200 mg/dL atau KGD puasa ≥ 126 mg/dL sudah cukup menjadi patokan untuk menegakan diagnosis DM. Apabila tidak terdapat gejala DM, maka pemeriksaan KGD dengan hasil abnormal tinggi saja tidak cukup. Diperlukan pemeriksaan lebih lanjut minimal satu kali lagi mendapatkan KGD acak abnormal tinggi, KGD puasa abnormal tinggi, atau pada hasil tes toleransi glukosa oral (TTGO) didapatkan KGD pasca pembebanan > 200 mg/dL. Penegakan diagnosa DM dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kriteria penegakan diagnosis

Hasil Tes Laboratorium	Normal	DM
Glukosa darah acak (mg/dL)	-	≥ 200 disertai gejala DM (≥ 11.1 mmol/l)
Glukosa darah puasa (mg/dL)	< 100	≥ 126 (≥ 7.0 mmol/l)
Glukosa darah 2 jam PP selama OGTT (mg/dL)	< 140	≥ 200 (≥ 11.1 mmol/l)

(Sumber: ADA, 2015)

2.1.4 Komplikasi

Penderita DM memiliki banyak risiko komplikasi kesehatan. Komplikasi yang mungkin terjadi seperti penyakit jantung koroner, penyakit pembuluh darah otak, obesitas, gangguan penyembuhan luka. Komplikasi lainnya yang terjadi dalam rongga mulut disebut dengan *oral diabetic* (Depkes RI, 2005; Emor *et al.*, 2015). Komplikasi rongga mulut yang sering terjadi pada penderita DM seperti penyembuhan luka yang lama, lepasnya *epithel attachment*, xerostomia, bertambahnya kedalaman sulkus gingiva, terjadi pendarahan spontan pada gingiva, munculnya penyakit periodontal, munculnya penyakit oportunistik, akumulasi plak, karies, gangguan sensasi pengecap, gigi geligi goyang, tanggalnya gigi (Swastini, 2013).

2.2 Ekstraksi Gigi dan Penyembuhan Luka

Ekstraksi gigi merupakan tindakan mengeluarkan gigi dari tulang alveolar. Tindakan ekstraksi gigi dapat menimbulkan luka di soket gigi dan jaringan sekitarnya (Pedlar dan Frame, 2007). Luka sendiri merupakan cedera yang mengakibatkan kerusakan jaringan tubuh, ditandai dengan gangguan normal struktur kontinuitas jaringan (Molnar, 2007).

Proses penyembuhan luka bersifat dinamis, dengan tujuan akhir memulihkan fungsi dan integritas jaringan. Pada proses penyembuhan luka, terdapat empat fase

utama yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Keempat fase tersebut berjalan berkesinambungan dan seringkali bersamaan (Orsted *et al.*, 2011).

Fase hemostasis terjadi hanya 5-10 menit setelah terjadi *injury*. Pada fase ini, terjadi peningkatan perlekatan platelet. Platelet juga akan menyekresikan faktor intrinsik pembekuan darah yang menginisiasi produksi trombin. Selanjutnya trombin akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin untuk menguatkan agregasi platelet sehingga terbentuk bekuan darah yang stabil (Kumar *et al.*, 2004; Orsted *et al.*, 2011).

Fase selanjutnya yaitu fase inflamasi yang umumnya dimulai sejak adanya luka hingga hari kelima. Fase ini ditandai dengan munculnya tanda berupa *calor* (hangat), *dolor* (nyeri), *rubor* (kemerahan), dan *tumor* (pembengkakan) pada daerah yang mengalami inflamasi. Pada fase ini terjadi respon vaskuler dan selular pada luka (Suryadi *et al.*, 2017).

Awal terjadi luka, sel yang mengalami *injury* menyekresikan epinefrin, norepinefrin dan prostaglandin yang memediasi terjadinya vasokonstriksi lokal pada arteri dan kapiler. Setelah 10-15 menit, sel mast pada permukaan endotel akan menyekresikan histamin dan serotonin yang menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskuler pada pembuluh darah, sehingga plasma keluar dari intravaskuler ke ekstrasvaskuler. Leukosit akan mengalami proses diapedesis, dimulai dengan penempelan leukosit pada sel endotel dimediasi oleh selectin. Leukosit semakin melekat dengan endotel akibat afinitas yang tinggi antara integrin yang terdapat pada permukaan leukosit dengan *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM) pada sel endotel. Leukosit distimulasi oleh kemokin untuk berpindah secara aktif dari sel endotel ke jaringan yang mengalami cedera (Suryadi *et al.*, 2017).

Neutrofil berperan pada proses inflamasi di dua hari pertama. Sel ini berfungsi untuk menghancurkan dan menyerang virus, bakteri, sel-sel mati, serta agen merugikan lain dalam tubuh melalui proses fagositosis. Selanjutnya neutrofil akan difagositosis oleh makrofag atau mati. Meskipun neutrofil memiliki peran dalam mencegah infeksi, keberadaan neutrofil yang persisten pada luka dapat menyebabkan luka sulit untuk

mengalami proses penyembuhan. Hal ini bisa menyebabkan luka akut berprogresi menjadi luka kronis untuk mengalami proses penyembuhan (Suryadi *et al.*, 2017).

Hari kedua atau ketiga, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) akan memediasi monosit/makrofag masuk ke dalam luka. Makrofag berperan terutama dalam fase inflamasi kronis, berfungsi dalam proses fagositosis bakteri dan jaringan mati. Makrofag menyekresi proteinase untuk mendegradasi *Extracellular Matrix* (ECM) dan membuang material asing, merangsang pergerakan sel, dan mengatur pergantian ECM. Makrofag juga menyekresikan sitokin dan *growth factor* yang berfungsi untuk proliferasi fibroblast, produksi kolagen, pembentukan pembuluh darah baru, dan proses penyembuhan lainnya. Limfosit meningkat secara signifikan pada hari kelima sampai hari ketujuh luka. Limfosit berperan dalam penyembuhan luka kronis sebagai reaksi imun dalam pertahanan terhadap serangan mikroorganisme, antigen abnormal atau asing, dan sel-sel kanker (Lawler *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Suryadi *et al.*, 2017).

Lima hari sampai dengan minggu ketiga sejak terjadinya luka, fase proliferasi dimulai. Pada fase ini, terjadi perbaikan pada luka meliputi fibroplasia, epitelisasi, sintesis kolagen, angiogenesis, dan pembentukan jaringan granulasi. Jaringan granulasi yang terbentuk pada luka berisi sel inflamasi, fibroblas, dan pembuluh darah. Terakhir, yaitu fase *remodelling* yang dimulai sejak minggu ketiga setelah luka sampai bulan kedua belas dimana sudah mulai terbentuk *scar*, dan penyempurnaan jaringan baru menjadi jaringan yang lebih kuat dan bermutu (Milorio *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Suryadi *et al.*, 2017).

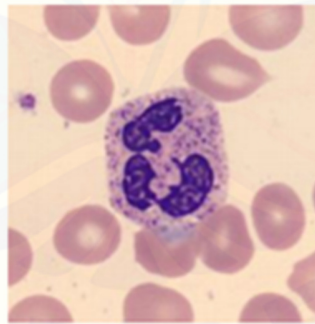
2.3 Leukosit

Leukosit disebut juga dengan sel darah putih, merupakan salah satu unit sistem pertahanan tubuh. Sebagian leukosit dibentuk di dalam sumsum tulang dan sebagian lainnya dibentuk di jaringan limfe. Leukosit bergerak melalui peredaran darah untuk kemudian diangkut menuju bagian tubuh atau jaringan yang mengalami infeksi dan

peradangan. Leukosit dibagi menjadi dua kelompok yaitu granulosit polimorfonuklear (neutrofil, eosinofil, basofil) dan agranulosit mononuklear (limfosit, monosit) (Guyton dan Hall, 2007; Mescher, 2011).

2.3.1 Neutrofil

Neutrofil (lihat Gambar 2.1) merupakan leukosit polimorfonuklear atau granulosit yang memiliki inti yang multipel, jumlahnya 60-70% dari seluruh leukosit yang beredar dalam darah. Pada hapusan darah, diameter neutrofil adalah 12-15 μm , memiliki inti yang terdiri dari 2-5 lobus yang dihubungkan dengan jembatan inti yang halus. Neutrofil mengandung glikogen yang akan diubah menjadi glukosa melalui jalur glikolisis apabila diperlukan energi. Lama hidup sel ini adalah 1-4 hari dalam jaringan ikat, dengan waktu paruh selama 6-7 jam dalam darah. Sel ini berfungsi untuk menghancurkan dan menyerang virus, bakteri, sel-sel mati, serta agen merugikan lain dalam tubuh (Guyton dan Hall, 2007; Mescher, 2011).

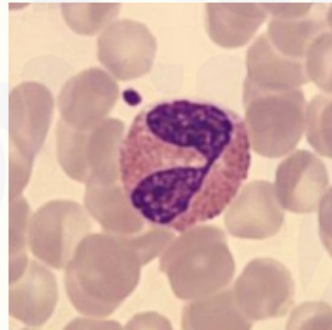


Gambar 2.1 Sel neutrofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah (sumber: Cellavision, 2015)

2.3.2 Eosinofil

Eosinofil (lihat Gambar 2.2) berjumlah hanya sekitar 2-4% dalam leukosit darah. Secara ultrastruktur dapat ditemukan sekitar 200 granul berbentuk oval pada setiap

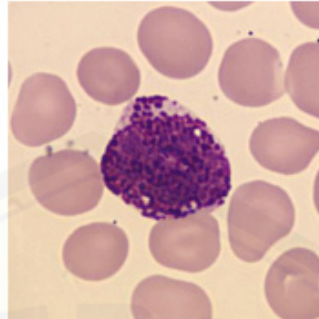
selnya. Pada hapusan darah eosinofil memiliki besar ukuran yang hampir sama dengan neutrofil. Sebagian besar granul eosinofil mengandung protein basa utama. Protein tersebut bekerja bersama dengan peroksidase eosinofilik, enzim, dan toksik lain akan memiliki efek sitotoksik terhadap parasit. Sel ini bermigrasi dalam jumlah besar pada jaringan yang diinfeksi oleh parasit serta merupakan faktor yang penting dalam memperantarai reaksi alergi dan asma (Guyton dan Hall, 2007; Mescher, 2011).



Gambar 2.2 Sel eosinofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah (sumber: Cellavision, 2015)

2.3.3 Basofil

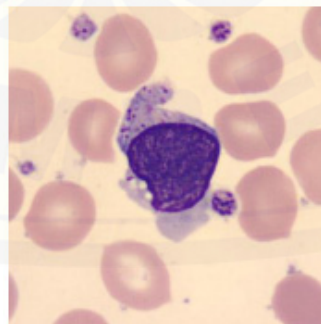
Basofil (lihat Gambar 2.3) sangat sulit ditemukan pada hapusan darah normal karena hanya berjumlah 1% dalam leukosit darah. Basofil memiliki diameter yang sama dengan neutrofil, yaitu 12-15 μm . Inti selnya terbagi menjadi dua atau lebih, namun biasanya granul-granul yang berada di atasnya mengaburkan bentuk inti sel ini. Granul basofil mengandung histamin dan berbagai mediator peradangan. Basofil dan sel mast memiliki granul metakromatik yang mengandung heparin dan histamin. Kedua sel ini sangat berperan pada beberapa tipe reaksi alergi, karena antibodi yang menyebabkan reaksi alergi, yaitu imunoglobulin E (IgE) memiliki kecenderungan terikat pada reseptor permukaannya (Guyton dan Hall, 2007; Mescher, 2011).



Gambar 2.3 Sel basofil perbesaran 1600x dalam hapusan darah (sumber: Cellavision, 2015)

2.3.4 Limfosit

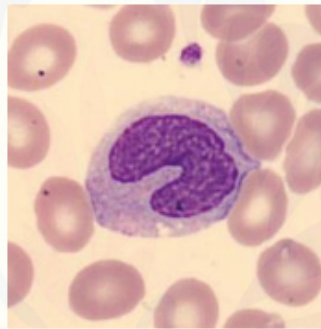
Limfosit (lihat Gambar 2.4) merupakan jenis leukosit yang kebanyakan berukuran kecil dengan diameter hanya sekitar 6-8 μ m di dalam darah, namun juga terdapat limfosit yang berukuran medium dan besar dengan diameter 9-18 μ m. Inti limfosit berbentuk sferis. Jangka hidup sel ini bervariasi, sebagian hanya hidup beberapa hari, dan sebagian lain dapat bertahan selama bertahun-tahun dalam sirkulasi darah atau jaringan. Sel ini berperan sebagai reaksi imun dalam pertahanan terhadap serangan mikroorganisme, antigen abnormal atau asing, dan sel-sel kanker (Mescher, 2011).



Gambar 2.4 Sel limfosit perbesaran 1600x dalam hapusan darah (sumber: Cellavision, 2015)

2.3.5 Monosit

Monosit (lihat Gambar 2.5) merupakan agranulosit yang diproduksi di sumsum tulang, masuk ke dalam sirkulasi dalam keadaan imatur, kemudian berubah menjadi makrofag setelah masuk ke dalam jaringan. Diameter monosit berkisar antara 12-20 μ m, memiliki inti besar yang berbentuk lonjong, seperti ginjal, atau huruf U. Protoplasmanya besar, memiliki warna biru sedikit abu-abu, serta terdapat bintik-bintik sedikit kemerahan. Sel ini berjumlah sekitar 34% dalam total leukosit dalam darah, fungsinya yaitu dalam proses fagositosis (Mescher, 2011).



Gambar 2.5 Sel monosit perbesaran 1600x dalam hapusan darah (sumber: Cellavision, 2015)

2.4 Hubungan Diabetes Mellitus dengan Leukosit

Penderita DM memiliki banyak komplikasi kesehatan pada rongga mulut, seperti karies, munculnya penyakit periodontal, gigi geligi yang goyang, dan gangguan penyembuhan luka. Gigi dengan penyakit periodontal, gigi geligi yang goyang, dan karies akan diindikasikan untuk diekstraksi apabila gigi tersebut sudah tidak dapat dipertahankan lagi (Chrysanthakopoulos, 2011; Swastini, 2013; Fenanlampir *et al.*, 2014). Tindakan ekstraksi gigi dapat menimbulkan luka di soket gigi dan jaringan

sekitarnya. Pada penderita DM, juga terjadi komplikasi berupa gangguan penyembuhan luka.

Gangguan penyembuhan luka terjadi karena disfungsi imun pada fase inflamasi melalui beberapa mekanisme. Pada penyembuhan luka yang lama, ditemukan proses inflamasi yang memanjang ditandai dengan peningkatan infiltrasi sel neutrofil di atas jumlah normal pada jaringan yang terluka. Keadaan tersebut memicu peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan kerusakan pada ECM. Selain itu neutrofil melepaskan serin protease seperti elastase, dan *Matrix Metalloproteinase* (MMP) seperti neutrofil kolagenase (MMP-8). Elastase dapat menurunkan faktor pertumbuhan seperti *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang berperan penting dalam fase proliferasi. Sedangkan kolagenase dapat menurunkan dan menginaktivasi komponen ECM yang bertanggungjawab dalam pembentukan jaringan (Zhao *et al.*, 2016).

Meskipun neutrofil memiliki peran dalam proses penyembuhan luka, keberadaan neutrofil yang persisten dapat menyebabkan luka sulit untuk mengalami proses penyembuhan. Hal tersebut bisa menyebabkan luka akut berprogresi menjadi luka kronis. Neutrofil dan makrofag juga memproduksi sitokin pro-inflamasi seperti *Interleukin-1 β* (IL-1 β) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) yang tidak hanya meningkatkan produksi MMP, namun juga menurunkan *Tissue Inhibitor of MMP* (TIMMP). Kondisi tersebut meningkatkan degradasi ECM, mengganggu migrasi sel, dan mengurangi proliferasi fibroblas serta sintesis kolagen yang mengakibatkan kerusakan berkepanjangan pada jaringan, sehingga terjadi penyembuhan luka yang lama (Zhao *et al.*, 2016; Suryadi *et al.*, 2017).

Leukosit berperan penting dalam proses inflamasi. Pada kondisi DM, keadaan hiperglikemia akan memicu peningkatan akumulasi *Advanced Glycation End products* (AGEs) dalam jaringan tubuh. AGEs adalah molekul bioaktif yang terbentuk dari proses glikasi nonenzimatik protein, lipid, dan asam nukleat. Proses glikasi sendiri merupakan reaksi kimia yang muncul akibat meningkatnya interaksi antara glukosa

dengan molekul biologis penyusun sel-sel tubuh seperti protein dan lemak pada kondisi hiperglikemia. AGEs dapat berinteraksi dengan reseptor AGEs (RAGE). RAGE dapat ditemukan di permukaan membran plasma leukosit, sel endotel, dan sel lainnya. Interaksi antara AGEs dan RAGE pada sel endotel akan menghasilkan *oxidative stress* yang memicu aktivasi *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B). Aktivasi NF- κ B dapat meningkatkan molekul adhesi seperti selectin, *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel endotel. Ekspresi molekul adhesi yang berlebih dapat mengganggu diapedesis serta kemotaksis leukosit sehingga proses inflamasi tidak dapat berjalan dengan baik. Inflamasi yang terganggu menyebabkan terhambatnya penyembuhan luka (Collison *et al.*, 2002; Basta *et al.*, 2004; Negre-Salvayre *et al.*, 2009).

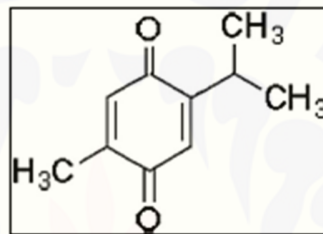
2.5 Metformin

Metformin adalah obat hipoglikemik oral dari golongan *dimetil biguanide* yang sering dipilih sebagai pilihan terapi pada DM tipe II karena biaya yang rendah, tidak menimbulkan efek hipoglikemia serta penyakit kardiovaskular, dan tidak menyebabkan penambahan maupun penurunan berat badan (Inzucchi *et al.*, 2015). Obat ini bekerja menurunkan *hepatic glucose output* dengan menurunkan glukoneogenesis di dalam hati. Mekanisme tersebut dilakukan melalui penurunan mRNA pengkode enzim *Phosphoenol Pyruvat Carboxykinase* (PEPCK) yang berperan dalam proses glukoneogenesis. Metformin juga bekerja dengan memperbaiki pengambilan glukosa di dalam jaringan perifer (Cheng *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010). Namun ternyata terapi dengan menggunakan metformin masih memiliki kekurangan, yaitu munculnya efek samping seperti *nausea*, muntah, diare, serta dapat menyebabkan asidosis laktat (Depkes RI, 2005).

2.6 Thymoquinone (TQ)

2.6.1 Definisi

Thymoquinone (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) merupakan senyawa fitokimia yang banyak ditemukan pada biji tanaman jintan hitam. Senyawa ini memiliki struktur kimia $C_{10}H_{12}O_2$. Gambaran struktur kimia TQ dapat dilihat di Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur kimia TQ (sumber: Pari dan Sankaranarayanan, 2009)

TQ merupakan senyawa yang memiliki banyak manfaat. TQ memiliki aktivitas anti bakteri terhadap beberapa jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif, sebagai agen kemoterapi, aktivitas antioksidan, serta sebagai *immunomodulator* (Pari dan Sankaranarayanan, 2009; Majdalawieh dan Fayyad, 2015).

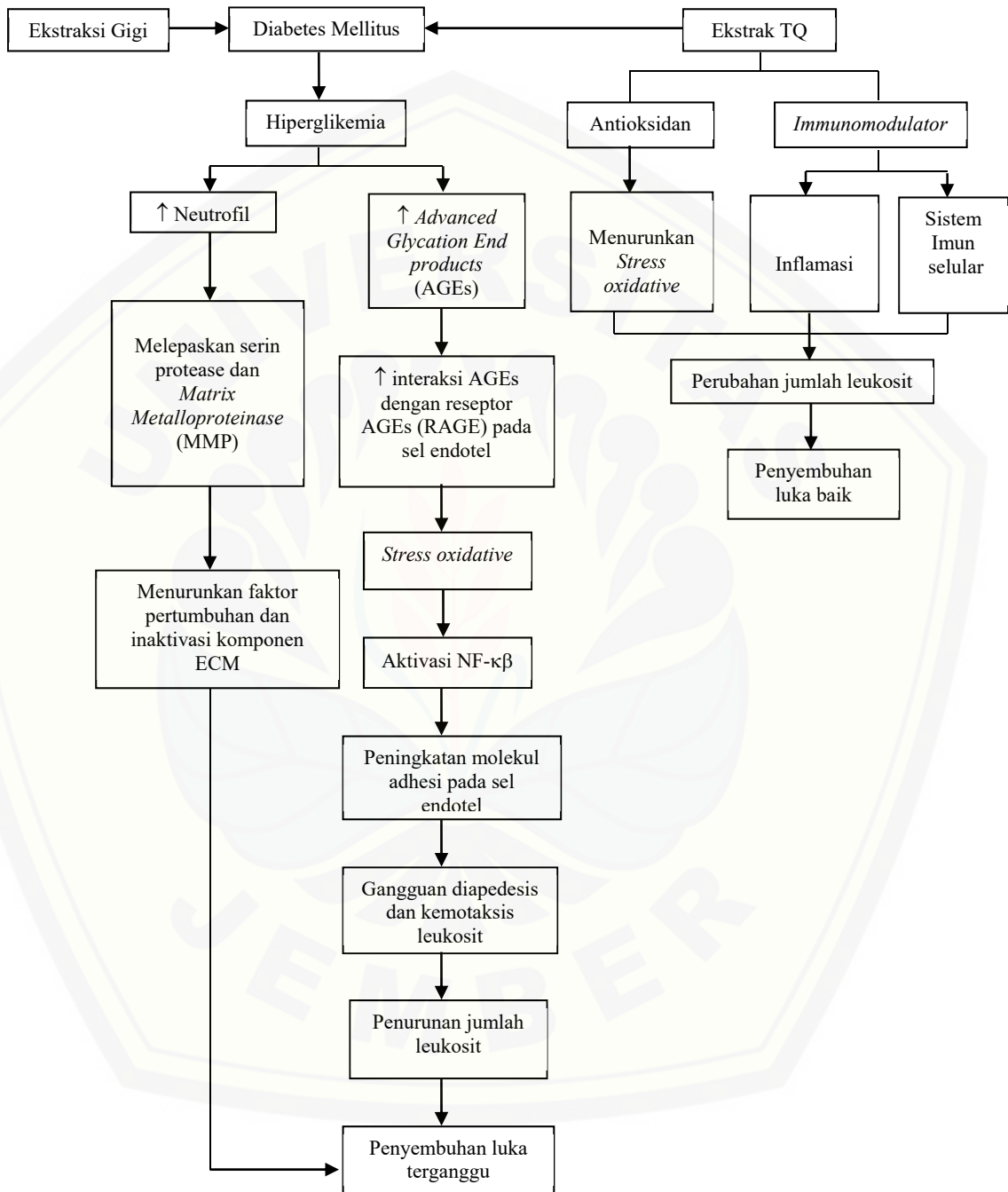
2.6.2 Manfaat sebagai Antioksidan dan *Immunomodulator*

Penelitian sebelumnya telah membuktikan efek TQ sebagai antioksidan. Pemberian TQ secara oral mampu melindungi jantung, hati, dan ginjal terhadap kerusakan oksidatif yang dihasilkan oleh agen-agen yang memproduksi radikal bebas. *immunomodulator* bekerja dengan memodulasi proses inflamasi, dan sistem imun selular. TQ mampu melakukan perbaikan disfungsi imun dengan merubah jumlah leukosit, meningkatkan aktivitas fagositosis serta kemotaksis, dan ekspresi kemokin, selain itu TQ juga memodulasi peningkatan proliferasi sel limfosit T dan meningkatkan

jumlah sel T CD4⁺ serta sel T CD8⁺ pada sirkulasi darah (Ince *et al.*, 2013; Majdalawieh dan Fayyad, 2015).



2.7 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian

2.7.1 Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian

Diabetes Mellitus adalah penyakit yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia atau peningkatan KGD melebihi batas normal. KGD yang meningkat mengakibatkan meningkatnya infiltrasi sel neutrofil pada jaringan yang terluka. Neutrofil kemudian melepaskan serin protease seperti elastase, dan MMP seperti MMP-8. Elastase dapat menurunkan faktor pertumbuhan seperti PDGF dan TGF- β yang berperan penting dalam fase proliferasi. Sedangkan kolagenase dapat menurunkan dan menginaktivasi komponen ECM yang bertanggungjawab dalam pembentukan jaringan. Kondisi hiperglikemia juga turut meningkatkan AGEs. Pada permukaan membran plasma beberapa sel, termasuk sel endotel terdapat RAGE. Terjadi peningkatan interaksi antara AGEs dan RAGE yang menyebabkan *oxidative stress*. *Oxidative stress* akan memicu aktivasi NF- $\kappa\beta$. Aktivasi NF- $\kappa\beta$ akan meningkatkan molekul adhesi pada sel endotel. Ekspresi molekul adhesi yang berlebih dapat mengganggu diapedesis serta kemotaksis leukosit. Penurunan aktivitas diapedesis dan kemotaksis leukosit akan mempengaruhi penurunan jumlah leukosit. Keadaan tersebut membuat proses penyembuhan luka menjadi terganggu. Saat dilakukan ekstraksi gigi, penyembuhan luka yang terganggu memunculkan berbagai komplikasi. Pemberian ekstrak TQ yang memiliki efek sebagai antioksidan bekerja dengan menekan *oxidative stress*, sedangkan sebagai *immunomodulator* TQ bekerja dengan memodulasi proses inflamasi dan sistem imun selular. Efek tersebut diharapkan mampu memperbaiki kondisi disfungsi imun berupa perubahan pada jumlah leukosit sehingga proses penyembuhan luka berjalan dengan baik.

2.8 Hipotesis

Pemberian ekstrak TQ mampu menyebabkan perubahan hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi *Streptozotocin* (STZ).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *the post test only with control group design*, yaitu melakukan pengamatan setelah perlakuan sesuai waktu yang telah ditentukan dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2002).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Patologi Klinik bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Surat izin penelitian dapat dilihat di Lampiran 3.1.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 - Oktober 2017.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang berjenis kelamin jantan.

3.3.2 Kriteria Sampel Penelitian

a. Kriteria inklusi

- 1) Sampel yang akan diinduksi *Streptozotocin* (STZ)

Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar, jenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan, berat badan 150-250 gram, kondisi fisik sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dari tikus, Kadar Glukosa Darah (KGD) acak < 250 mg/dL.

2) Sampel positif DM

Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar, jenis kelamin jantan, usia 2-4 bulan, berat badan 120-200 gram, KGD acak ≥ 250 mg/dL.

b. Kriteria eksklusi

Tikus dengan KGD acak < 250 mg/dL dan mati saat proses penelitian.

3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Kelompok penelitian terdiri dari tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Setiap kelompok terdiri dari tiga subkelompok dengan waktu pengamatan hari ke-1, 3, dan 7 pasca ekstraksi gigi (H-1, H-3, dan H-7). Jumlah sampel minimum dihitung dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Ridwan, 2013):

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = besar sampel dalam kelompok

t = jumlah kelompok (9 kelompok)

Penghitungan:

$$[(n-1)(9-1)] \geq 15$$

$$(n-1)8 \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$n \geq 2,875$ dibulatkan menjadi 3.

Berdasarkan perhitungan rumus di atas, didapatkan jumlah sampel minimum dalam tiap kelompok adalah 3, sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 27 ekor tikus.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Thymoquinone* (TQ).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hitung jenis leukosit (eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit, dan monosit).

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba
- b. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba
- c. Dosis pemberian TQ, metformin, dan STZ
- d. Prosedur penelitian

3.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian

3.5.1 Ekstrak *Thymoquinone* (TQ)

Ekstrak TQ adalah ekstrak TQ berupa sediaan jadi berbentuk kristal produk Sigma Aldrich (USA) yang dicampurkan dengan minyak zaitun, diberikan secara sondasi dengan dosis 80 mg/kg BB tikus 1x1/hari.

3.5.2 Induksi *Streptozotocin* (STZ)

Induksi STZ adalah pemberian injeksi sediaan bubuk STZ produk Bioworld (USA) yang dicampur dengan buffer asam sitrat, diberikan secara intravena pada ekor tikus dengan dosis 50 mg/kg BB tikus pada hari ke-0.

3.5.3 Ekstraksi Gigi

Ekstraksi gigi adalah pencabutan gigi molar satu kiri rahang bawah di bawah anestesi umum menggunakan ketamin 0,1 ml, dilakukan dengan menggunakan *arteri clamp*, dan dilanjutkan dengan pengeburan dasar soket menggunakan *contraangle low speed* dan *diamond round bur* no. 1 dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 detik.

3.5.4 Hitung Jenis Leukosit

Hitung jenis leukosit adalah penghitungan jumlah sel leukosit (eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit, dan monosit) pada hapusan darah intrakardial, kemudian diamati dengan metode *differential count* menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CX21, Japan) perbesaran 100x, 400x, dan 1000x.

3.6 Bahan dan Alat Penelitian

3.6.1 Bahan Penelitian

- a. Pakan standar hewan (Turbo 521, Indonesia) coba dan air minum
- b. *Streptozotocin* (Bioworld, USA)
- c. Ekstrak TQ 99% (Sigma Aldrich, USA)
- d. Minyak zaitun (Bertolli, Italia)
- e. Metformin 500 mg (Hexapharm, Indonesia)
- f. Larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (FMIPA Biologi UNEJ, Indonesia)
- g. Akuades steril dan metanol absolut (Onelab Waterone, Indonesia)
- h. Eter (Merck KgaA, Jerman)

- i. Ketamin 100 mg (KTM-100, Indonesia)
- j. Povidine-Iodine (Indonesia)
- k. Cat *giemsa*
- l. Buffer *progiemsa*
- m. Minyak emersi
- n. Alkohol 70% (OneMed, Indonesia)

3.6.2 Alat Penelitian

- a. Kandang tikus (Citra Plastics, Indonesia)
- b. Tempat pakan dan minum
- c. Timbangan berat badan tikus (Camry EK 3650, China)
- d. Timbangan digital (Pioneer, Ohaus Corp., USA)
- e. *Rat dental chair*
- f. *Glucometer Easy Touch* (GCU, Indonesia)
- g. *Test strip* glukosa dan *needle* (GCU, Indonesia)
- h. *Excavator*, sonde setengah lingkaran, *scalpel*, *arteri clamp*, pinset
- i. Mikromotor dan *contraangle low speed* (Saeshin Strong 90, Korea)
- j. *Diamond round bur* no. 1 (Edents, Switzerland)
- k. Toples plastik
- l. Label identitas
- m. *Deck glass*/kaca penutup dan *Object glass*/kaca obyek
- n. Rak kaca obyek
- o. Bunsen
- p. Nierbeken
- q. Sonde lambung (Fakultas Farmasi UNEJ, Indonesia)
- r. *Eppendorf* (Makmur Jaya, Indonesia)
- s. *Disposable syringe* 27 G 1 ml (OneMed, Indonesia)
- t. Mikroskop cahaya (Olympus CX21, Jepang)

Gambar bahan dan alat penelitian dapat dilihat di Lampiran 3.3.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan *Ethical Clearance*

Penelitian ini diajukan ke Komisi Etika dan Advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Surat keterangan layak etik penelitian dapat dilihat di Lampiran 3.2.

3.7.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus Wistar jantan sebanyak 27 ekor diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu (gambar yang menunjukkan prosedur penelitian dapat dilihat di Lampiran 3.4). Setiap kandang diisi 4-5 tikus. Selama proses adaptasi, tikus diberi makanan standar dan diberi minum secara *ad-libitum*/bebas setiap hari. Hal ini bertujuan untuk mengurangi stres hewan coba dan memperoleh keseragaman (homogenitas) sebelum dilakukan penelitian serta untuk memenuhi kriteria penelitian.

3.7.3 Pembuatan Larutan Perlakuan

a. Larutan STZ

Bubuk STZ ditimbang sesuai dosis yang akan diberikan, yaitu 50 mg/kg BB tikus. Kemudian STZ dilarutkan dalam 50 mg/ml larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Larutan dipersiapkan dalam *eppendorf*. Larutan harus dipersiapkan <5 menit sebelum diinjeksikan karena sifatnya yang tidak stabil. Penghitungan dosis dan volume yang diberikan pada hewan coba dapat dilihat di Lampiran 3.5.

b. Larutan TQ

Bubuk kristal TQ ditimbang sesuai dosis, yaitu 80 mg/kg BB, kemudian dilarutkan kedalam minyak zaitun menyesuaikan dengan kapasitas lambung hewan coba pada pagi hari, \pm 1,5 ml. Larutan dipersiapkan dalam *eppendorf* (Sankaranarayanan dan Pari, 2011).

c. Larutan metformin

Bubuk metformin ditimbang dengan dosis 100 mg/kg BB dan dilarutkan ke dalam *ependorf* berisi akuades 1,5 ml (Cheng *et al.*, 2006).

3.7.4 Induksi STZ

Tikus dipuasakan selama 8 jam dan tetap diberi minum secara *ad-libitum*. Setelah 8 jam, berat badan tikus ditimbang untuk menentukan berat bubuk STZ yang akan diberikan. Sebelum diinduksi, dilakukan pengukuran KGD awal. KGD awal diukur menggunakan alat Glukometer. Pangkal ekor tikus ditusuk dengan menggunakan *lancet*, setelah darah keluar, darah diteteskan ke *test strip* (Carvalho *et al.*, 2003).

Pelarut bubuk STZ adalah larutan buffer asam sitrat 0,1 M pH 4,5 dengan volume 50 mg/ml. Larutan buffer asam sitrat dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah berisi bubuk STZ dosis 50 mg/kg BB tikus tepat saat tikus siap diinjeksi. *Eppendorf* divibrasi secara manual hingga homogen sampai larutan terlihat kekuningan. Setelah itu larutan STZ diinjeksikan sesuai dosis secara intravena pada ekor tikus. Sebelum dideponir, dilakukan aspirasi untuk mencegah kesalahan lokasi injeksi. Setelah 30 menit, tikus kembali diberi makan secara *ad-libitum* serta diberi larutan glukosa. Pemberian STZ dapat menyebabkan syok hipoglikemia yang dapat menyebabkan kematian selama 24 jam awal, sehingga tikus diberi larutan glukosa selama 24 jam pasca induksi untuk mencegah terjadinya syok hipoglikemia (Luo, 2004).

3.7.5 Pengelompokkan Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Kelompok P1 adalah kelompok hewan coba yang diberikan ekstrak TQ dengan dosis 80 mg/kg BB tikus, kelompok P2 diberikan metformin dengan dosis 100 mg/kg BB tikus, dan kelompok K diberikan akuades steril. Perlakuan diberikan secara sondasi setiap hari. Masing-masing kelompok berjumlah 9 ekor hewan coba. Setiap kelompok dibagi kembali menjadi 3

subkelompok berdasarkan waktu eutanasia, yaitu subkelompok H-1, H-3, dan H-7 pasca ekstraksi gigi. Pengelompokan hewan coba dapat dilihat di Tabel 3.1

Tabel 3.1 Pengelompokan hewan coba

Kelompok Perlakuan	No. Hewan Coba	Waktu Eutanasia
Perlakuan 1 (P1); Ekstrak TQ 80 mg/kg BB secara sondasi	1-3	H-1 pasca ekstraksi gigi
	4-6	H-3 pasca ekstraksi gigi
	7-9	H-7 pasca ekstraksi gigi
Perlakuan 2 (P2); metformin 100 mg/kg BB secara sondasi	1-3	H-1 pasca ekstraksi gigi
	4-6	H-3 pasca ekstraksi gigi
	7-9	H-7 pasca ekstraksi gigi
Kontrol (K); akuades steril secara sondasi	1-3	H-1 pasca ekstraksi gigi
	4-6	H-3 pasca ekstraksi gigi
	7-9	H-7 pasca ekstraksi gigi

3.7.6 Perlakuan Hewan Coba

Induksi STZ pada hewan coba dihitung sebagai hari ke-0. 24 jam pasca induksi, KGD acak tikus diukur dengan menggunakan Glukometer. Tikus dengan KGD ≥ 250 mg/dL dikategorikan DM. Jika belum positif DM, ditunggu hingga hari ke-3 untuk dilakukan pemeriksaan KGD ulang (Akbarzadeh *et al.*, 2007). Tikus yang telah positif DM dihitung sebagai hari ke-1 kemudian dikelompokkan menjadi tiga kelompok, kelompok K, P1 dan P2. Tiap kelompok terdiri dari 9 ekor dan dibagi lagi menjadi tiga subkelompok yaitu kelompok H-1, H-3, dan H-7.

Perlakuan yang diberikan yaitu kelompok K diberi 1,5 ml akuades steril secara sondasi 1x1/hari, kelompok P1 diberi 1,5 ml larutan TQ secara sondasi dengan dosis sesuai berat badan tikus selama 1x1/hari, dan kelompok P2 diberi larutan 1,5 ml metformin secara sondasi dengan dosis sesuai berat badan tikus selama 3x1/hari di pagi, sore, dan malam. Pada hari ke-7, gigi molar satu kiri rahang bawah pada semua kelompok tikus diekstraksi. Sebelum diekstraksi, KGD acak tikus diukur.

Prosedur ekstraksi gigi yang dilakukan yaitu tikus dianestesi dengan injeksi ketamin 0,1 ml secara *intramuscular*. Selanjutnya saat proses ekstraksi, gigi tikus

dipisahkan dengan jaringan sekitarnya menggunakan sonde setengah lingkaran, kemudian setelah gigi terlepas dari perlekatan, gigi tikus diungkit dengan menggunakan *excavator* (sebagai pengganti *forcep*/tang ekstraksi) dan diambil dari soket menggunakan *arteri clamp*. Setelah gigi terambil, mata bur diletakkan di dasar soket, kemudian mikromotor dinyalakan dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 detik. Alat yang digunakan adalah *contraangle low speed* dengan bur *round end* no. 1. Tujuannya adalah merusak septum dan tepi-tepi tulang alveolar agar menyerupai kondisi pencabutan normal pada manusia yang menggunakan elevator yang dapat merusak tulang alveolar. Pengeboran dilakukan pada setiap tikus dengan sama yaitu memutar mata bur pada dinding dan dasar soket (Pawestri *et al.*, 2015).

3.7.7 Eutanasia Hewan Coba

Pada H-1, H-3, dan H-7 pasca ekstraksi, 3 ekor tikus dari tiap subkelompok dilakukan eutanasia. Eutanasia dilakukan dengan overdosis inhalasi eter. Tikus dimasukkan ke dalam toples yang di dalamnya terdapat kapas yang dibasahi larutan eter, toples ditutup rapat untuk beberapa saat hingga tikus pingsan. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah secara intrakardial dengan menggunakan spuit injeksi.

3.7.8 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah

Pembuatan hapusan diawali dengan menghilangkan lemak pada kaca obyek. Kaca obyek dibakar di atas api bunsen. Setetes darah yang diambil dari jantung tikus diletakkan ± 1 cm dari satu ujung kaca obyek. Kaca penutup dipegang dengan membuat sudut 30° - 45° dengan kaca obyek, tetesan darah terletak di dalam sudut tersebut. Kaca obyek lalu digeserkan ke arah tetesan darah, sehingga darah tersebut tersentuh dan akan dibiarkan merata antara ujung kaca penutup dan kaca obyek. Dengan cepat kaca penutup digeserkan ke arah yang bertentangan dengan arah pertama, sehingga darah akan merata di atas kaca obyek sebagai lapisan yang tipis sepanjang 3-4 cm. Hapusan kemudian dikeringkan dengan menggerak-gerakkannya di udara atau dibiarkan

mengering minimal selama satu jam. Hapusan yang sudah kering difiksasi dengan menggunakan metanol absolut sehingga tertutup seluruhnya. Waktu fiksasi 2-3 menit, kemudian ditiriskan dan ditunggu sampai kering.

Hapusan darah selanjutnya diwarnai dengan cat *giemsa* dan buffer dicampur dengan perbandingan 1:9. Setelah hapusan kering, dilakukan pengecatan dengan direndam dalam *giemsa* 10% selama 15-20 menit, kemudian ditiriskan, dan dibilas dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya kaca obyek diletakkan dengan tegak di rak kaca obyek dan hapusan darah yang telah dicat ditunggu hingga kering, baru kemudian dapat diamati (Arif, 2009).

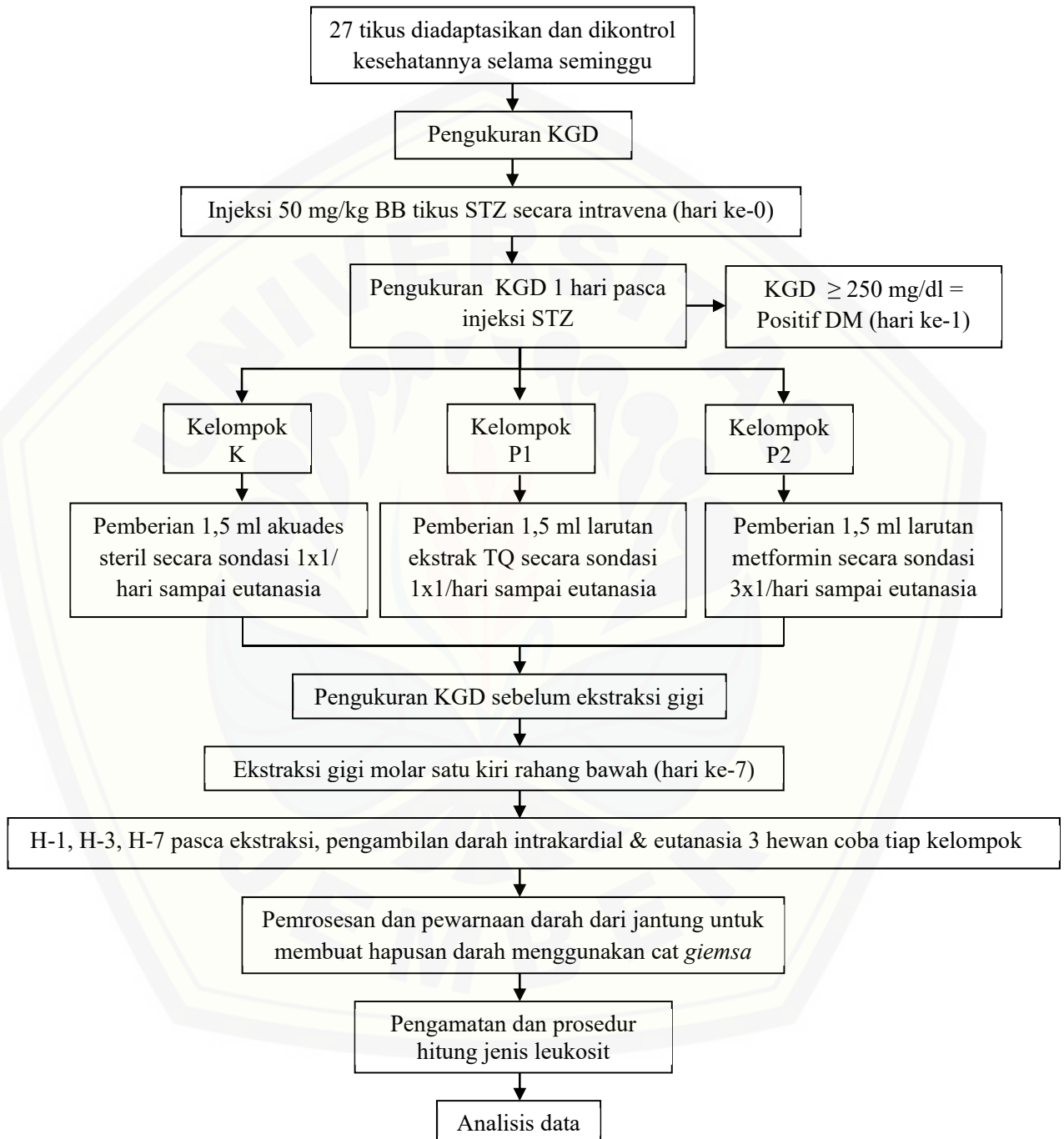
3.8 Prosedur Hitung Jenis Leukosit

Jenis-jenis leukosit dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya. Penghitungan dilakukan pada beberapa lapang pandang yang disebut *counting area* dengan perbesaran bertahap. Penghitungan dimulai dari satu sisi bergerak ke sisi lain, kemudian kembali ke sisi semula dengan arah zigzag. Perbesaran awal yaitu 100x bertujuan untuk menemukan lapang pandang, memeriksa kualitas hapusan darah, penafsiran jumlah leukosit, dan melihat apakah ada sel yang abnormal. Leukosit dapat dihitung dengan menggunakan perbesaran selanjutnya, yaitu 400x. Agar dapat melihat jenis-jenis leukosit dan mengamati morfologinya, perbesaran ditingkatkan menjadi 1000x menggunakan minyak emersi. Jenis-jenis leukosit yang dihitung yaitu basofil, eosinofil, neutrofil, limfosit, dan monosit. Leukosit dihitung hingga didapatkan jumlah sebanyak 100 sel. Hitung jenis leukosit hanya menunjukkan jumlah relatif dari masing-masing jenis sel, dimana tiap jenis leukosit dinyatakan dalam persen (%) (Arif, 2009; Riswanto, 2013).

3.9 Analisa Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif dengan skala data rasio berupa jumlah masing-masing sel leukosit. Data yang sudah didapat dilakukan uji normalitas dahulu, menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*. Langkah selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Tujuan uji normalitas dan homogenitas adalah sebagai syarat untuk dapat menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Data yang berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dianalisis menggunakan uji parametrik *One Way Anova* karena jenis data yang diuji adalah data rasio dengan jumlah kelompok sampel yang digunakan lebih dari dua kelompok. Jika didapatkan nilai $p < \alpha$, dilakukan uji lanjutan, yaitu uji *Least Significant Different (LSD)*. Data yang tidak homogen dan atau tidak normal hanya ditemukan pada limfosit kelompok K, data tersebut dianalisis menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*, serta uji lanjutan *Mann Whitney* karena diperoleh $p < \alpha$ (Notoatmodjo, 2002).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak *thymoquinone* (TQ) mampu menyebabkan perubahan hitung jenis leukosit pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes akibat induksi *Streptozotocin* (STZ) melalui efeknya sebagai antioksidan dan *immunomodulator* yang memodulasi proses inflamasi dan sistem imun selular.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, penulis dapat memberikan saran sebagai berikut:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai waktu penghitungan jenis leukosit dengan interval hari yang berbeda, sehingga dapat diketahui perubahan jenis leukosit yang lebih baik.
- b. Perlu diberikan pemberian ekstrak TQ dalam jangka waktu yang lebih lama untuk menganalisis efek ekstrak TQ terhadap perbaikan proses penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmeguid, N. E., Fakhoury, R., Kamal, S. M., dan Al Wafai, R. J. 2010. Effects of Nigella Sativa and Thymoquinone on Biochemical and Subcellular Changes in Pancreatic β Cells of Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Journal of Diabetes*. **2**: 256-266
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, Sh., Farhangi, A., Verdi, A. A., Modifian, S. M. A., dan Rad, B. L. 2007. Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **22**(2): 60-64
- American Diabetes Association. 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 38 (Suppl.1): S8–S16
- Arif, M. 2009. *Penuntun Praktikum Hematologi*. Makassar: Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. Riset Kesehatan Dasar: Riskesdas 2013. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI
- Basta, G., Schmidt, A. M., dan Caterinaa, R. D. 2004. Review: Advanced Glycation End Products and Vascular Inflammation: Implications for Accelerated Atherosclerosis in Diabetes. *Cardiovascular Research* **63**: 582–592
- Carvalho, E. N. D., Carvalho, N. A. S. D., dan Ferreira, L. M. 2003. Experimental Model of Induction of Diabetes Mellitus in Rats. *Acta Cir Brass* 18 Special Edition [serial online]
- Cellavision. Copyright 2000-2011. CellaVision®. Competency Software Evaluation Edition. <http://www.cellavision.com/> [8 Desember 2015].

- Chang, E., Daly, J., dan Elliott, D. 2010. *Patofisiologi Aplikasi pada Praktik Keperawatan*. Jakarta: EGC
- Cheng, J. T., Huang, C. C., Liu, I. M., Tzeng, T. F., dan Chang, C. J. 2006. Original Article Novel Mechanism for Plasma Glucose-Lowering Action of Metformin in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats. *DIABETES* **55**(3): 819-825
- Chrysanthakopoulos, N. A. 2011. Original Article: Periodontal Reasons for Tooth Extraction in a Group of Greek Army Personnel. *JODDD*. **5**(2): 55-60
- Collison, K. S., Parhar, R. S., Saleh, S. S., Meyer, B. F., Kwaasi, A. A., Hammami, M. M., Schmidt, A. M., Stern, D. M., dan Al-Mohanna, F. A. 2002. RAGE-Mediated Neutrophil Dysfunction is Evoked by Advanced Glycation End Products (AGEs). *Journal Leukoc Biol.* **71**: 433-444
- Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., Eberhardt, N. L., dan Kudva, Y. C. 2011. Single Dose Streptozotocin-Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *Laboratory Animals*. **45**: 131-140
- Depkes RI. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Jakarta
- Emor, S. F., Pandelaki, K., dan Supit, A. S. R. 2015. Hubungan Status Periodontal dan Derajat Regulasi Gula Darah Pasien Diabetes Melitus di Rumah Sakit Umum Pusat Prof Dr. R. D. Kandou Manado. *Jurnal e-GiGi*. **3**(1)
- Fatimah, R. N. 2015. Diabetes Melitus Tipe 2. *J. Majority*. **4**(5)
- Fenanlampir, I. J., Mariati, N. W., dan Hutagalung, B. 2014. Gambaran Indikasi Pencabutan Gigi dalam Periode Gigi Bercampur pada Siswa SMP Negeri 1 Langowan. *Jurnal e-GiGi*. **2**(2)
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. 2007. *Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC

Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Turkmen, R., Zemheri, F., dan Akbel, E. 2013. The Role of Thymoquinone as Antioxidant Protection on Oxidative Stress Induced by Imidacloprid in Male and Female Swiss Albino Mice. *Toxicological & Environmental Chemistry*. **95**(2): 318-329

International Diabetes Federation. 2014. *IDF Diabetes Atlas Sixth Edition*

Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A. L., Tsapas, A., Wender, R., dan Matthews, D. R. 2015. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care* **38**:140–149

Kumar, V., Cotran, R., dan Robbins, S. L. 2004. *Robbins: Buku Ajar Patologi Edisi Volume 1*. Jakarta: EGC

Kemenkes RI. *Pedoman Interpretasi Data Klinik*. 2011. Jakarta

Lawler W., Ahmed, A., dan Hume, W. J. 2002. *Buku Pintar Patologi untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC

Luo, Z. D. 2004. *Pain Research: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc

Majdalawieh, A. F. dan Fayyad, M. W. 2015. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Action of Nigella sativa and Thymoquinone: A Comprehensive Review. *International Immunopharmacology*. **28**: 295-304

Mescher, A. L. 2011. *Histologi Dasar Junqueira; Teks & Atlas*. Jakarta: EGC

Miloro, M., Ghali, G. E., Larsen, P. E., dan Waite, P. D. 2004. *Petersons Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd Ed*. London: BC Decker

Molnar, J. A. 2007. *Nutrition and Wound Healing*. CRC Press: New York

- Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R., dan Portero-Otín, M. 2009. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**(12): 3071-3109
- Notoatmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta
- Orsted, H. L., Keast, D., Forest-Lalande, L., dan Megie, M. F. 2011. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada*. **9**(2)
- Pari, L., dan Sankaranarayanan, C. 2009. Beneficial Effects of Thymoquinone on Hepatic Key Enzymes in Streptozotocin-nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Life Sciences*. **85**: 830-834
- Pawestri, A. D., Syafriadi, M., dan Rochim, A. 2015. Pengaruh Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) terhadap Jumlah Neutrofil pada Soket Tikus Pasca Pencabutan Gigi Disertai Trauma Jaringan. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*
- Pedlar, J., dan Frame, J. 2007. *Extraction of Teeth in Oral and Maxillofacial Surgery- An objective based textbook Second Edition*. Elsevier: Churchill Livingstone
- Price, S. A., dan Wilson, L. M. 2005. *Patofisiologi, Konsep Klinik Proses-proses Penyakit Vol 1 Edisi 6*. Jakarta: EGC
- Ridwan, Endi. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc*. **63**(3): 112-6
- Riswanto. 2013. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi*. Yogyakarta: Alfabedia & Kanal Medika
- Sankaranarayanan, C. dan Pari, L. 2011. Thymoquinone Ameliorates Chemical Induced Oxidative Stress and β -Cell Damage in Experimental Hyperglycemic Rats. *Chemico-Biological Interaction*. **190**: 148-154

Setji, T. L., Brown, A. J., dan Feinglos, M. N. 2005. Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Diabetes*. **23**(1)

Sherwood, L. 2001. *Human Physiology: From Cells to System Fourth Edition*. United States of America: Brooks/Cole

Sherwood, L. 2010. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem, Edisi 7*. Jakarta: EGC


Suryadi, I. A., Asmarajaya, A. A. G. N., dan Maliawan, S. 2017. *Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Swastini, I. G. A. A. P. 2013. Kerusakan Gigi Merupakan Fokal Infeksi Penyebab Timbulnya Penyakit Sistemik. *Jurnal Kesehatan Gigi*. **1**(1)

Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., dan Vasbinder, M. A. 2011. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Amm Assoc Lam Anim Sci*. **50**(5): 600-613

Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., dan Xue, M. 2016. Inflammation in Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**: 2085

Lampiran 3.1 Surat Izin Penelitian


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 78 /UN25.8.TL/2016
 Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.
 Ka. Bag. BIOMEDIK FKG Universitas Jember
 di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama	: Fatimah Az-Zahrah
2. NIM	: 121610101054
3. Tahun Akademik	: 2015/2016
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Jl. Mastrip II No. 29 C Jember
6. Judul Penelitian	: Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes
7. Lokasi Penelitian	: Lab. Fisiologi FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam	: -
9. Waktu	: Januari 2016 s/d Mei 2016
9. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes
10. Dosen Pembimbing	: 1. drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc 2. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc, Ph.D

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, **02 JUN 2016**
 an. Dekan
 Pembantu Dekan I


Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIP. 196109031986022001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 1780 /UN25.8.TL/2016
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Ka. Bag. BIOMEDIK FKG Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama : Fatimah Az-Zahrah
2. NIM : 121610101054
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Mastrip II No. 29 C Jember
6. Judul Penelitian : Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes
7. Lokasi Penelitian : Lab. Patologi Klinik FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : -
9. Waktu : Januari 2016 s/d Mei 2016
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Efek Pemberian Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes
10. Dosen Pembimbing : 1. drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc
2. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc, Ph.D



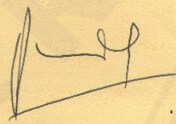
Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 02 JUN 2016
an. Dekan
Pembantu Dekan I



Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001



Lampiran 3.2 Surat Keterangan Layak Etik Penelitian

 <p>KOMISI ETIKA PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900</p>	
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN (“ETHICAL CLEARANCE”) No.001181KKEP/FKG-UGM/EC/2017</p>	
<p>Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:</p>	
Judul	: EFEK PEMBERIAN EKSTRAK THYMOQUINONE TERHADAP HITUNG JENIS LEUKOSIT PASCA EKSTRAKSI GIGI PADA MODEL TIKUS DIABETES AKIBAT INDUKSI STREPTOZOTOCIN
Peneliti Utama	: Fatimah Az-Zahrah
Penanggung Jawab Medis	: drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc
Unit/Lembaga	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Lokasi Penelitian	: 1. Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 2. Laboratorium Patologi Klinik Universitas Jember
Waktu Penelitian	: Agustus 2017 – Selesai
<p>Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.</p>	
<p>Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama</p>  <p>drg. Trianna Wahyu Utami, MDSc., Ph.D</p>	<p style="text-align: right;">Yogyakarta, 24 Agustus 2017</p> <p>Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM</p>  <p>Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)</p>

Lampiran 3.3 Bahan dan Alat Penelitian

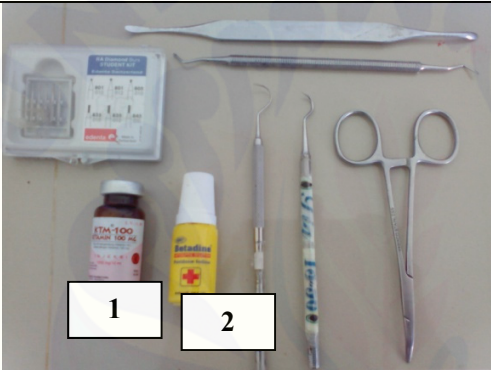

3.3.1 Bahan Penelitian

a. Bahan Perlakuan Hewan Coba


Gambar	Keterangan
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. <i>Streptozotocin</i> (STZ) 2. Larutan buffer asam sitrat</p>
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. Ekstrak murni <i>thymoquinone</i> (TQ) 2. Minyak zaitun</p>
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. Metformin 500 mg 2. Metformin yang sudah dihaluskan</p>

	<p>Akuades</p>
---	----------------

b. Bahan Ekstraksi Gigi dan Euthanasia

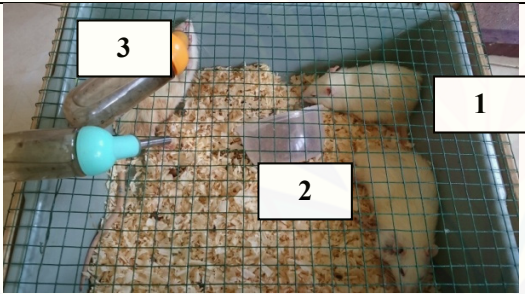
Gambar	Keterangan
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. Ketamin 100 mg 2. Povidine Iodine</p>
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. Chloroform/eter 2. Alkohol 70%</p>

c. Bahan Pembuatan Hapusan Darah

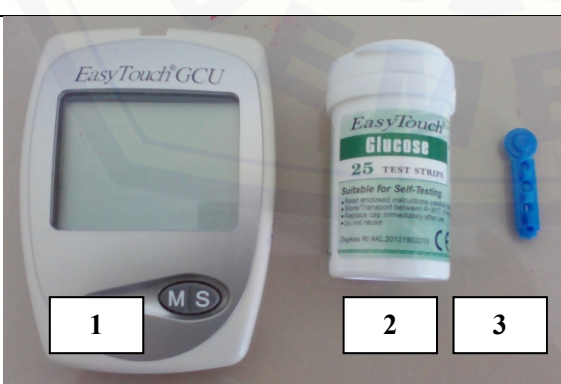
Gambar	Keterangan
 <p>The image shows three bottles on a white surface. Bottle 1 is a white plastic bottle with a white cap. Bottle 2 is a dark brown glass bottle with a white cap. Bottle 3 is a clear glass bottle with a white cap. Each bottle has a small white label with a black number (1, 2, or 3) below it.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Metanol absolut 2. Cat <i>giemsa</i> 3. Buffer <i>progiemsa</i>

3.3.2 Alat Penelitian

a. Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Gambar	Keterangan
 <p>The image shows a wire mesh cage. Inside, there is a white mouse (labeled 1), a metal tray with brown food pellets (labeled 2), and a blue water dispenser (labeled 3).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kandang 2. Tempat Pakan 3. Tempat Minum

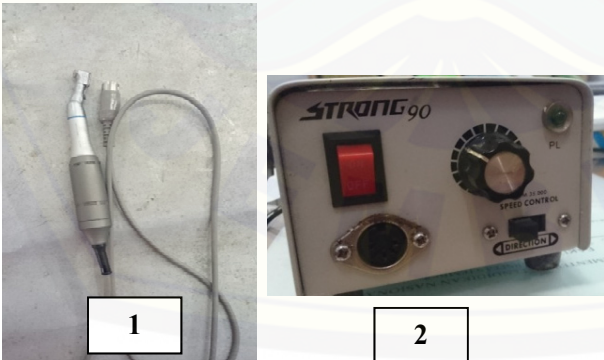
b. Alat Pengukur Kadar Glukosa Darah (KGD)

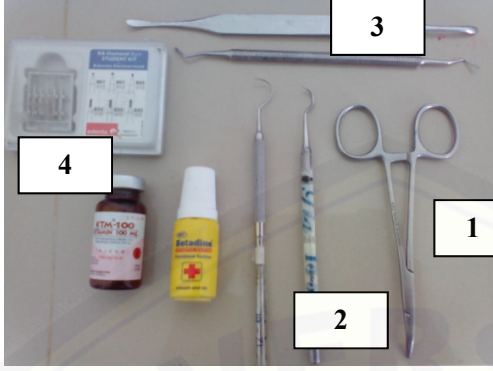


Gambar	Keterangan
 <p>The image shows a white glucometer (labeled 1), a white container of 'EasyTouch Glucose' test strips (labeled 2), and a blue lancet (labeled 3).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Glucometer</i> 2. <i>Test strip</i> glukosa 3. <i>Needle</i>

c. Alat Perlakuan Hewan Coba

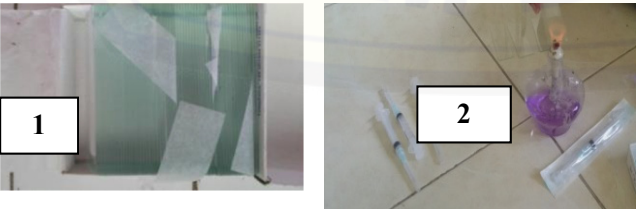
Gambar	Keterangan
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. Timbangan berat badan tikus 2. <i>Eppendorf</i></p>
 <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>	<p>1. Timbangan digital 2. Sonde lambung 3. <i>Disposable syringe 27 G 1 ml</i></p>

d. Alat Ekstraksi Gigi dan Euthanasia

Gambar	Keterangan
 <p>1</p> <p>2</p>	<p>1. <i>Contra angle low speed</i> 2. Mikromotor</p>

	<p>1. <i>Arteri clamp</i> 2. <i>Sonde setengah lingkaran</i> 3. <i>Excavator</i> 4. <i>Diamond Round bur no.1</i></p>
	<p>1. <i>Rat dental chair</i> 2. <i>Toples plastik</i></p>
	<p><i>Scalpel, arteri clamp, pinset</i></p>

e. Alat Pembuatan Hapusan Darah dan Pengamatan

Gambar	Keterangan
	<p>1. <i>Kaca penutup dan kaca obyek</i> 2. <i>Bunsen</i></p>



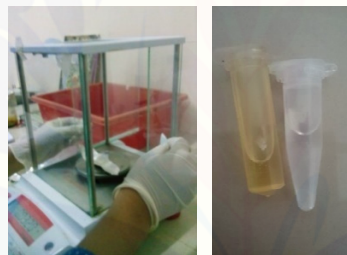
Lampiran 3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Coba



Gambar 3.4.1 Adaptasi hewan coba dengan kondisi lingkungan kandang

3.4.2 Pembuatan Larutan Perlakuan



(a)

(b)

Gambar 3.4.2 (a) Penimbangan bahan perlakuan (b) larutan perlakuan

3.4.3 Induksi STZ



(a)

(b)

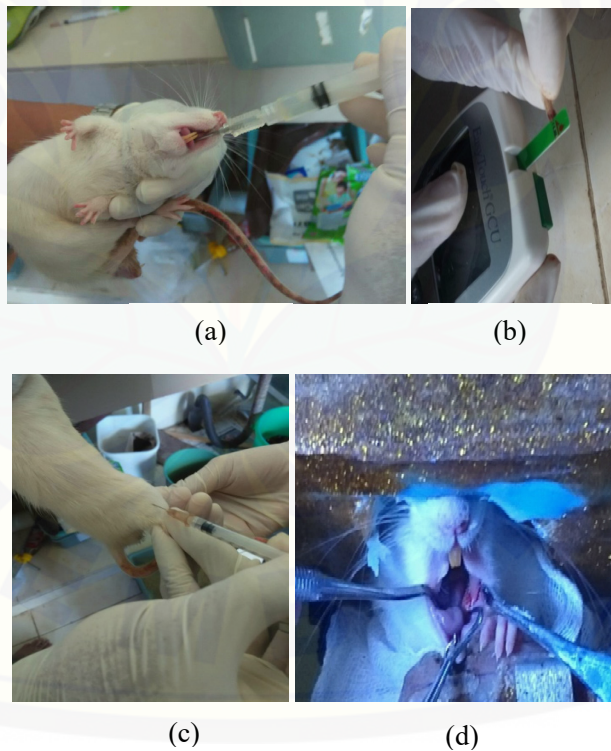
Gambar 3.4.3 Prosedur induksi STZ (a) pengukuran KGD sebelum injeksi STZ (b) larutan STZ yang diinjeksikan secara intravena pada ekor tikus

3.4.4 Pengelompokan Hewan Coba



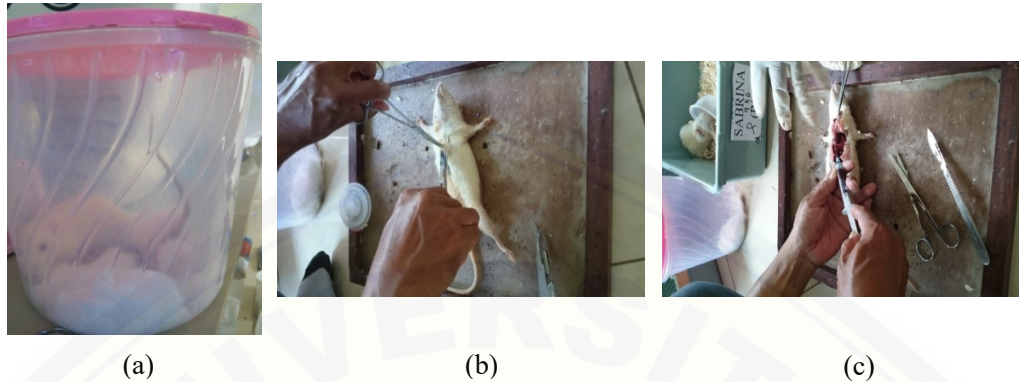
Gambar 3.4.4 Hewan coba yang akan dikelompokkan menjadi kelompok P1, P2, K

3.4.5 Perlakuan Hewan Coba



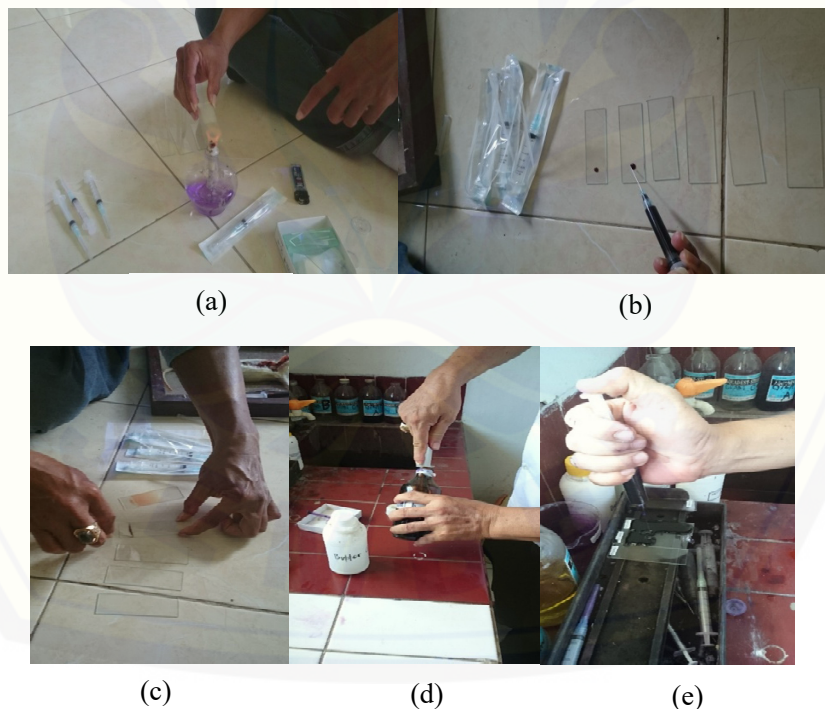
Gambar 3.4.5 Prosedur perlakuan hewan coba (a) pemberian larutan perlakuan sesuai kelompok (b) pengukuran KGD sebelum ekstraksi gigi (c) anestesi ketamin (d) ekstraksi gigi

3.4.6 Euthanasia Hewan Coba



Gambar 3.4.6 (a) metode overdosis inhalasi eter (b) pembedahan hewan coba (c) pengambilan darah dari jantung

3.4.7 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah



Gambar 3.4.7 (a) proses menghilangkan lemak pada kaca obyek (b) darah jantung yang diteteskan (c) pembuatan hapusan (d) pembuatan cat *giemsa* 10% (e) pengecatan menggunakan *giemsa*

Lampiran 3.5 Penghitungan Dosis dan Volume Larutan Perlakuan

Dalam memberikan perlakuan, volume maksimal larutan yang dapat diberikan pada hewan coba harus diketahui. Hal ini bertujuan untuk menghindari efek samping yang tidak diinginkan, seperti stres, gangguan pernapasan, syok, bahkan kematian hewan coba. Volume maksimal yang dapat diberikan pada hewan coba jenis tikus yaitu:

1. Pemberian secara sondasi : 5 mL/kg – 20 mL/kg BB tikus
2. Pemberian secara intravena : 5 mL/kg BB tikus (Turner *et al.*, 2011)

Jika berat badan rata-rata tikus = 200 gr/ekor, maka volume maksimal yang dapat diberikan kepada tikus adalah:

- Sondasi

$$\frac{5-20 \text{ mL}}{1000 \text{ gr}} = \frac{X \text{ ml}}{200 \text{ gr}} = 1 - 4 \text{ ml}$$

- Intravena

$$\frac{5 \text{ ml}}{1000 \text{ gr}} = \frac{X \text{ ml}}{200 \text{ gr}} = 1 \text{ ml}$$

Larutan STZ

Dosis : 50 mg/kg BB tikus bubuk STZ (Cheng *et al.*, 2006)

Pelarut : 50 mg/ml larutan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (Info produk)

BB tikus rata-rata: 200 gr/tikus

Dosis yang diberikan :

- Berat bubuk STZ

$$\frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{X \text{ mg}}{200 \text{ gr}} = 10 \text{ mg}$$

- Volume larutan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5

$$\frac{50 \text{ mg}}{\text{ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{\text{X ml}} = 0,2 \text{ ml}$$

Larutan STZ dibuat dengan mencampur 10 mg STZ ke dalam 0,2 ml larutan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5.

Larutan TQ

Dosis : 80 mg/kg BB tikus bubuk TQ (Pari dan Sankaranarayanan, 2009)

Pelarut : Minyak zaitun

BB tikus rata-rata: 200 gr/ekor

Dosis yang diberikan :

- Berat bubuk TQ

$$\frac{80 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{\text{X mg}}{200 \text{ gr}} = 16 \text{ mg}$$

Larutan TQ dibuat dengan mencampur 16 mg TQ ke dalam 2 ml minyak zaitun.

Larutan metformin

Dosis : 100 mg/kg BB tikus bubuk metformin (Cheng *et al.*, 2006)

Pelarut : Akuades

BB tikus rata-rata : 200 gr/ekor

- Berat bubuk metformin

$$\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{\text{X mg}}{200 \text{ gr}} = 20 \text{ mg}$$

Metformin dihaluskan hingga menjadi bubuk kemudian dicampur sebanyak 20 mg ke dalam 2 ml akuades. Larutan metformin diberikan sebanyak tiga kali dalam satu hari.

Lampiran 4.1 Data Kadar Glukosa Darah (KGD)4.1.1 KGD Kelompok P1 (*Thymoquinone*)

No. Tikus/KGD	Hari ke-0	Hari ke-1	H-1	H-3	H-7
10	74	531	587		
11	67	469	367		
12	110	503	573		
2	68	340		458	
6	81	290		552	
8	97	386		525	
1	83	395			543
5	81	356			434
7	67	600			587

4.1.2 KGD Kelompok P2 (Metformin)

No. Tikus/KGD	Hari ke-0	Hari ke-1	H-1	H-3	H-7
10	81	412	600		
11	81	412	565		
12	83	394	572		
6	72	265		519	
8	86	475		521	
9	62	504		600	
3	56	532			394
4	169	479			402
5	62	587			600

4.1.3 KGD Kelompok K (Akuades)

No. Tikus/KGD	Hari ke-0	Hari ke-1	H-1	H-3	H-7
10	83	405	600		
11	72	468	322		
12	69	512	572		
1	152	471		424	
3	137	372		600	
4	95	457		374	
2	155	402			437
6	135	600			452
7	155	566			386

Hari ke-0 : Hari sebelum dilakukan induksi STZ
 Hari ke-1 : Hari ke-1 positif DM (perlakuan dimulai)
 H-1 : Hari ke-1 pasca ekstraksi gigi
 H-3 : Hari ke-3 pasca ekstraksi gigi
 H-7 : Hari ke-7 pasca ekstraksi gigi

Lampiran 4.2 Data Penghitungan Jenis Leukosit

4.2.1 Eosinofil

Kelompok	Hari ke-	Jumlah Sel	Rata-rata
P1-10	1	0	1,33
P1-11		2	
P1-12		2	
P1-2	3	1	0,67
P1-6		1	
P1-8		0	
P1-1	7	0	0,00
P1-5		0	
P1-7		0	
P2-10	1	0	0,00
P2-11		0	
P2-12		0	
P2-6	3	1	0,67
P2-8		0	
P2-9		1	
P2-3	7	4	2,00
P2-4		1	
P2-5		1	
K10	1	0	0,00
K11		0	
K12		0	
K1	3	2	1,00
K3		0	
K4		1	
K2	7	5	2,67
K6		3	
K7		0	

4.2.2 Basofil

Kelompok	Hari ke-	Jumlah Sel	Rata-rata
P1-10	1	2	3,33
P1-11		4	
P1-12		4	
P1-2	3	2	2,33
P1-6		4	
P1-8		1	
P1-1	7	1	1,00
P1-5		1	
P1-7		1	
P2-10	1	0	0,67
P2-11		1	
P2-12		1	
P2-6	3	4	2,00
P2-8		1	
P2-9		1	
P2-3	7	3	3,00
P2-4		3	
P2-5		3	
K10	1	1	0,33
K11		0	
K12		0	
K1	3	0	1,33
K3		1	
K4		3	
K2	7	3	2,33
K6		3	
K7		1	

4.2.3 Neutrofil

Kelompok	Hari ke-	Jumlah Sel	Rata-rata
P1-10	1	48	43,00
P1-11		38	
P1-12		43	
P1-2	3	24	24,67
P1-6		25	
P1-8		25	
P1-1	7	25	19,00
P1-5		14	
P1-7		18	
P2-10	1	8	7,67
P2-11		9	
P2-12		6	
P2-6	3	19	15,67
P2-8		9	
P2-9		19	
P2-3	7	25	19,67
P2-4		26	
P2-5		8	
K10	1	3	11,33
K11		18	
K12		13	
K1	3	15	15,00
K3		27	
K4		3	
K2	7	11	14,00
K6		17	
K7		14	

4.2.4 Limfosit

Kelompok	Hari ke-	Jumlah Sel	Rata-rata
P1-10	1	72	70,00
P1-11		68	
P1-12		70	
P1-2	3	55	52,33
P1-6		56	
P1-8		46	
P1-1	7	37	42,00
P1-5		51	
P1-7		38	
P2-10	1	30	33,67
P2-11		30	
P2-12		41	
P2-6	3	42	52,00
P2-8		57	
P2-9		57	
P2-3	7	62	65,33
P2-4		64	
P2-5		70	
K10	1	45	29,33
K11		35	
K12		8	
K1	3	46	44,67
K3		45	
K4		43	
K2	7	68	68,33
K6		68	
K7		69	

4.2.5 Monosit

Kelompok	Hari ke-	Jumlah Sel	Rata-rata
P1-10	1	26	23,00
P1-11		22	
P1-12		21	
P1-2	3	18	23,00
P1-6		26	
P1-8		25	
P1-1	7	20	21,00
P1-5		22	
P1-7		21	
P2-10	1	20	16,67
P2-11		17	
P2-12		13	
P2-6	3	22	20,00
P2-8		17	
P2-9		21	
P2-3	7	24	26,67
P2-4		25	
P2-5		31	
K10	1	10	12,33
K11		16	
K12		11	
K1	3	14	16,00
K3		15	
K4		19	
K2	7	23	20,67
K6		17	
K7		22	

Lampiran 4.3 Hasil Uji Analisis Statistik

4.3.1 Berdasarkan Waktu Perlakuan

a. Hari ke-1 Pasca Ekstraksi (H-1)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eosinofil	basofil	neutrofil	limfosit	monosit
N		9	9	9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	.44	1.44	20.67	44.33	17.33
	Std. Deviation	.882	1.590	17.450	21.835	5.385
Most Extreme Differences	Absolute	.471	.277	.227	.194	.134
	Positive	.471	.277	.227	.154	.123
	Negative	-.307	-.182	-.173	-.194	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z		1.412	.830	.682	.582	.403
Asymp. Sig. (2-tailed)		.037	.496	.741	.887	.997
a. Test distribution is Normal.						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	16.000	2	6	.004
basofil	2.667	2	6	.148
neutrofil	2.131	2	6	.200
limfosit	5.802	2	6	.040
monosit	.103	2	6	.903

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	3.556	2	1.778	4.000	.079
	Within Groups	2.667	6	.444		
	Total	6.222	8			
basofil	Between Groups	16.222	2	8.111	12.167	.008
	Within Groups	4.000	6	.667		
	Total	20.222	8			
neutrofil	Between Groups	2264.667	2	1132.333	39.654	.000
	Within Groups	171.333	6	28.556		
	Total	2436.000	8			
limfosit	Between Groups	2992.667	2	1496.333	10.931	.010
	Within Groups	821.333	6	136.889		
	Total	3814.000	8			
monosit	Between Groups	172.667	2	86.333	8.730	.017
	Within Groups	59.333	6	9.889		
	Total	232.000	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	thymoquinone hari ke-1	metformin hari ke-1	1.333*	.544	.050	.00	2.67
		kontrol hari ke-1	1.333*	.544	.050	.00	2.67
	metformin hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-1.333*	.544	.050	-2.67	.00
		kontrol hari ke-1	.000	.544	1.000	-1.33	1.33
basofil	thymoquinone hari ke-1	metformin hari ke-1	2.667*	.667	.007	1.04	4.30
		kontrol hari ke-1	3.000*	.667	.004	1.37	4.63
	metformin hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-2.667*	.667	.007	-4.30	-1.04
		kontrol hari ke-1	.333	.667	.635	-1.30	1.96
neutrofil	thymoquinone hari ke-1	metformin hari ke-1	35.333*	4.363	.000	24.66	46.01
		kontrol hari ke-1	31.667*	4.363	.000	20.99	42.34
	metformin hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-35.333*	4.363	.000	-46.01	-24.66
		kontrol hari ke-1	-3.667	4.363	.433	-14.34	7.01
limfosit	thymoquinone hari ke-1	metformin hari ke-1	36.333*	9.553	.009	12.96	59.71
		kontrol hari ke-1	40.667*	9.553	.005	17.29	64.04
	metformin hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-36.333*	9.553	.009	-59.71	-12.96
		kontrol hari ke-1	4.333	9.553	.666	-19.04	27.71
monosit	thymoquinone hari ke-1	metformin hari ke-1	6.333*	2.568	.049	.05	12.62
		kontrol hari ke-1	10.667*	2.568	.006	4.38	16.95
	metformin hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-6.333*	2.568	.049	-12.62	-.05
		kontrol hari ke-1	4.333	2.568	.142	-1.95	10.62
kontrol hari ke-1	thymoquinone hari ke-1	-10.667*	2.568	.006	-16.95	-4.38	
	metformin hari ke-1	-4.333	2.568	.142	-10.62	1.95	

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

Ranks

kelompok	N	Mean Rank
eosinofil	thymoquinone hari ke-1	7.00
	metformin hari ke-1	4.00
	kontrol hari ke-1	4.00
	Total	9
limfosit	thymoquinone hari ke-1	8.00
	metformin hari ke-1	3.33
	kontrol hari ke-1	3.67
	Total	9

Test Statistics^{a,b}

	eosinofil	limfosit
Chi-Square	4.571	5.468
df	2	2
Asymp. Sig.	.102	.065

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

b. Hari ke-3 Pasca Ekstraksi (H-3)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eosinofil	basofil	neutrofil	limfosit	monosit
N		9	9	9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	.78	1.89	18.44	49.67	19.67
	Std. Deviation	.667	1.453	8.141	6.403	4.183
Most Extreme Differences	Absolute	.297	.285	.197	.272	.121
	Positive	.258	.285	.147	.272	.119
	Negative	-.297	-.159	-.197	-.242	-.121
Kolmogorov-Smirnov Z		.892	.856	.591	.816	.363
Asymp. Sig. (2-tailed)		.404	.457	.876	.518	.999
a. Test distribution is Normal.						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	.364	2	6	.709
basofil	.114	2	6	.894
neutrofil	2.485	2	6	.164
limfosit	5.624	2	6	.042
monosit	1.231	2	6	.357

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	.222	2	.111	.200	.824
	Within Groups	3.333	6	.556		
	Total	3.556	8			
basofil	Between Groups	1.556	2	.778	.304	.748
	Within Groups	15.333	6	2.556		
	Total	16.889	8			
neutrofil	Between Groups	174.889	2	87.444	1.477	.301
	Within Groups	355.333	6	59.222		
	Total	530.222	8			
limfosit	Between Groups	112.667	2	56.333	1.570	.283
	Within Groups	215.333	6	35.889		
	Total	328.000	8			
monosit	Between Groups	74.000	2	37.000	3.364	.105
	Within Groups	66.000	6	11.000		
	Total	140.000	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	thymoquinone hari ke-3	metformin hari ke-3	.000	.609	1.000	-1.49	1.49
		kontrol hari ke-3	-.333	.609	.604	-1.82	1.16
	metformin hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	.000	.609	1.000	-1.49	1.49
		kontrol hari ke-3	-.333	.609	.604	-1.82	1.16
	kontrol hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	.333	.609	.604	-1.16	1.82
		metformin hari ke-3	.333	.609	.604	-1.16	1.82
basofil	thymoquinone hari ke-3	metformin hari ke-3	.333	1.305	.807	-2.86	3.53
		kontrol hari ke-3	1.000	1.305	.473	-2.19	4.19
	metformin hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-.333	1.305	.807	-3.53	2.86
		kontrol hari ke-3	.667	1.305	.628	-2.53	3.86
	kontrol hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-1.000	1.305	.473	-4.19	2.19
		metformin hari ke-3	-.667	1.305	.628	-3.86	2.53
neutrofil	thymoquinone hari ke-3	metformin hari ke-3	9.000	6.283	.202	-6.37	24.37
		kontrol hari ke-3	9.667	6.283	.175	-5.71	25.04
	metformin hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-9.000	6.283	.202	-24.37	6.37
		kontrol hari ke-3	.667	6.283	.919	-14.71	16.04
	kontrol hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-9.667	6.283	.175	-25.04	5.71
		metformin hari ke-3	-.667	6.283	.919	-16.04	14.71
limfosit	thymoquinone hari ke-3	metformin hari ke-3	.333	4.891	.948	-11.64	12.30
		kontrol hari ke-3	7.667	4.891	.168	-4.30	19.64
	metformin hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-.333	4.891	.948	-12.30	11.64
		kontrol hari ke-3	7.333	4.891	.184	-4.64	19.30
	kontrol hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-7.667	4.891	.168	-19.64	4.30
		metformin hari ke-3	-7.333	4.891	.184	-19.30	4.64
monosit	thymoquinone hari ke-3	metformin hari ke-3	3.000	2.708	.310	-3.63	9.63
		kontrol hari ke-3	7.000*	2.708	.041	.37	13.63
	metformin hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-3.000	2.708	.310	-9.63	3.63
		kontrol hari ke-3	4.000	2.708	.190	-2.63	10.63
	kontrol hari ke-3	thymoquinone hari ke-3	-7.000*	2.708	.041	-13.63	-.37
		metformin hari ke-3	-4.000	2.708	.190	-10.63	2.63

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

Ranks

kelompok	N	Mean Rank
limfosit thymoquinone hari ke-3	3	5.83
metformin hari ke-3	3	6.00
kontrol hari ke-3	3	3.17
Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	limfosit
Chi-Square	2.056
df	2
Asymp. Sig.	.358

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

c. Hari ke-7 Pasca Ekstraksi (H-7)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eosinofil	basofil	neutrofil	limfosit	Monosit
N		9	9	9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	1.56	2.11	17.56	58.56	22.78
	Std. Deviation	1.944	1.054	6.540	13.249	3.866
Most Extreme Differences	Absolute	.279	.356	.206	.269	.172
	Positive	.279	.299	.151	.194	.172
	Negative	-.212	-.356	-.206	-.269	-.125
Kolmogorov-Smirnov Z		.837	1.068	.617	.808	.515
Asymp. Sig. (2-tailed)		.485	.204	.840	.532	.954
a. Test distribution is Normal.						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	4.000	2	6	.079
basofil	16.000	2	6	.004
neutrofil	3.588	2	6	.094
limfosit	7.053	2	6	.027
monosit	3.537	2	6	.097

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	11.556	2	5.778	1.857	.236
	Within Groups	18.667	6	3.111		
	Total	30.222	8			
basofil	Between Groups	6.222	2	3.111	7.000	.027
	Within Groups	2.667	6	.444		
	Total	8.889	8			
neutrofil	Between Groups	57.556	2	28.778	.607	.576
	Within Groups	284.667	6	47.444		
	Total	342.222	8			
limfosit	Between Groups	1246.889	2	623.444	23.775	.001
	Within Groups	157.333	6	26.222		
	Total	1404.222	8			
monosit	Between Groups	68.222	2	34.111	3.987	.079
	Within Groups	51.333	6	8.556		
	Total	119.556	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	thymoquinone hari ke-7	metformin hari ke-7	-2.000	1.440	.214	-5.52	1.52
		kontrol hari ke-7	-2.667	1.440	.114	-6.19	.86
	metformin hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	2.000	1.440	.214	-1.52	5.52
		kontrol hari ke-7	-.667	1.440	.660	-4.19	2.86
basofil	thymoquinone hari ke-7	metformin hari ke-7	-2.000*	.544	.010	-3.33	-.67
		kontrol hari ke-7	-1.333*	.544	.050	-2.67	.00
	metformin hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	2.000*	.544	.010	.67	3.33
		kontrol hari ke-7	.667	.544	.267	-.67	2.00
neutrofil	thymoquinone hari ke-7	metformin hari ke-7	-.667	5.624	.910	-14.43	13.09
		kontrol hari ke-7	5.000	5.624	.408	-8.76	18.76
	metformin hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	.667	5.624	.910	-13.09	14.43
		kontrol hari ke-7	5.667	5.624	.353	-8.09	19.43
limfosit	thymoquinone hari ke-7	metformin hari ke-7	-23.333*	4.181	.001	-33.56	-13.10
		kontrol hari ke-7	-26.333*	4.181	.001	-36.56	-16.10
	metformin hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	23.333*	4.181	.001	13.10	33.56
		kontrol hari ke-7	-3.000	4.181	.500	-13.23	7.23
monosit	thymoquinone hari ke-7	metformin hari ke-7	-5.667	2.388	.055	-11.51	.18
		kontrol hari ke-7	.333	2.388	.894	-5.51	6.18
	metformin hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	5.667	2.388	.055	-.18	11.51
		kontrol hari ke-7	6.000*	2.388	.046	.16	11.84
kontrol hari ke-7	thymoquinone hari ke-7	-.333	2.388	.894	-6.18	5.51	
	metformin hari ke-7	-6.000*	2.388	.046	-11.84	-.16	

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

Ranks

kelompok	N	Mean Rank	
basofil	thymoquinone hari ke-7	3	2.50
	metformin hari ke-7	3	7.00
	kontrol hari ke-7	3	5.50
	Total	9	
limfosit	thymoquinone hari ke-7	3	2.00
	metformin hari ke-7	3	6.00
	kontrol hari ke-7	3	7.00
	Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	basofil	limfosit
Chi-Square	5.600	5.647
df	2	2
Asymp. Sig.	.061	.059

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

4.3.2 Berdasarkan Jenis Perlakuan

a. *Thymoquinone*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	eosinofil	basofil	netrofil	limfosit	Monosit	
N	9	9	9	9	9	
Normal Parameters ^a	Mean	.67	2.22	28.89	54.78	22.33
	Std. Deviation	.866	1.394	11.494	13.198	2.784
Most Extreme Differences	Absolute	.335	.254	.299	.175	.214
	Positive	.335	.254	.299	.130	.214
	Negative	-.221	-.232	-.119	-.175	-.164
Kolmogorov-Smirnov Z	1.005	.762	.897	.525	.643	
Asymp. Sig. (2-tailed)	.265	.607	.396	.945	.803	

a. Test distribution is Normal.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	9.600	2	6	.013
basofil	4.941	2	6	.054
netrofil	2.092	2	6	.205
limfosit	4.186	2	6	.073
monosit	4.364	2	6	.068

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	2.667	2	1.333	2.400	.171
	Within Groups	3.333	6	.556		
	Total	6.000	8			
basofil	Between Groups	8.222	2	4.111	3.364	.105
	Within Groups	7.333	6	1.222		
	Total	15.556	8			
netrofil	Between Groups	944.222	2	472.111	25.142	.001
	Within Groups	112.667	6	18.778		
	Total	1056.889	8			
limfosit	Between Groups	1202.889	2	601.444	18.927	.003
	Within Groups	190.667	6	31.778		
	Total	1393.556	8			
monosit	Between Groups	8.000	2	4.000	.444	.661
	Within Groups	54.000	6	9.000		
	Total	62.000	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	timoquinone hari 1	timoquinone hari ke 3	.667	.609	.315	-.82	2.16
		timoquinone hari ke 7	1.333	.609	.071	-.16	2.82
	timoquinone hari ke 3	timoquinone hari 1	-.667	.609	.315	-2.16	.82
		timoquinone hari ke 7	.667	.609	.315	-.82	2.16
	timoquinone hari ke 7	timoquinone hari 1	-1.333	.609	.071	-2.82	.16
		timoquinone hari ke 3	-.667	.609	.315	-2.16	.82
basofil	timoquinone hari 1	timoquinone hari ke 3	1.000	.903	.310	-1.21	3.21
		timoquinone hari ke 7	2.333*	.903	.041	.12	4.54
	timoquinone hari ke 3	timoquinone hari 1	-1.000	.903	.310	-3.21	1.21
		timoquinone hari ke 7	1.333	.903	.190	-.88	3.54
	timoquinone hari ke 7	timoquinone hari 1	-2.333*	.903	.041	-4.54	-.12
		timoquinone hari ke 3	-1.333	.903	.190	-3.54	.88
netrofil	timoquinone hari 1	timoquinone hari ke 3	18.333*	3.538	.002	9.68	26.99
		timoquinone hari ke 7	24.000*	3.538	.001	15.34	32.66
	timoquinone hari ke 3	timoquinone hari 1	-18.333*	3.538	.002	-26.99	-9.68
		timoquinone hari ke 7	5.667	3.538	.160	-2.99	14.32
	timoquinone hari ke 7	timoquinone hari 1	-24.000*	3.538	.001	-32.66	-15.34
		timoquinone hari ke 3	-5.667	3.538	.160	-14.32	2.99
limfosit	timoquinone hari 1	timoquinone hari ke 3	17.667*	4.603	.009	6.40	28.93
		timoquinone hari ke 7	28.000*	4.603	.001	16.74	39.26
	timoquinone hari ke 3	timoquinone hari 1	-17.667*	4.603	.009	-28.93	-6.40
		timoquinone hari ke 7	10.333	4.603	.066	-.93	21.60
	timoquinone hari ke 7	timoquinone hari 1	-28.000*	4.603	.001	-39.26	-16.74
		timoquinone hari ke 3	-10.333	4.603	.066	-21.60	.93
monosit	timoquinone hari 1	timoquinone hari ke 3	.000	2.449	1.000	-5.99	5.99
		timoquinone hari ke 7	2.000	2.449	.445	-3.99	7.99
	timoquinone hari ke 3	timoquinone hari 1	.000	2.449	1.000	-5.99	5.99
		timoquinone hari ke 7	2.000	2.449	.445	-3.99	7.99
	timoquinone hari ke 7	timoquinone hari 1	-2.000	2.449	.445	-7.99	3.99
		timoquinone hari ke 3	-2.000	2.449	.445	-7.99	3.99

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

Ranks

kelompok	N	Mean Rank
eosinofil timoquinone hari 1	3	6.67
timoquinone hari ke 3	3	5.33
timoquinone hari ke 7	3	3.00
Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	eosinofil
Chi-Square	3.374
df	2
Asymp. Sig.	.185

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

b. Metformin

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eosinofil	basofil	neutrofil	limfosit	Monosit
N		9	9	9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	.89	1.89	14.33	50.33	21.11
	Std. Deviation	1.269	1.364	7.906	14.925	5.278
Most Extreme Differences	Absolute	.354	.298	.306	.228	.120
	Positive	.354	.298	.306	.156	.120
	Negative	-.242	-.237	-.167	-.228	-.107
Kolmogorov-Smirnov Z		1.062	.895	.917	.684	.359
Asymp. Sig. (2-tailed)		.209	.400	.370	.738	1.000
a. Test distribution is Normal.						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	11.200	2	6	.009
basofil	11.200	2	6	.009
neutrofil	6.338	2	6	.033
limfosit	1.820	2	6	.241
monosit	.287	2	6	.760

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	6.222	2	3.111	2.800	.138
	Within Groups	6.667	6	1.111		
	Total	12.889	8			
basofil	Between Groups	8.222	2	4.111	3.700	.090
	Within Groups	6.667	6	1.111		
	Total	14.889	8			
neutrofil	Between Groups	224.000	2	112.000	2.435	.168
	Within Groups	276.000	6	46.000		
	Total	500.000	8			
limfosit	Between Groups	1516.667	2	758.333	17.148	.003
	Within Groups	265.333	6	44.222		
	Total	1782.000	8			
monosit	Between Groups	155.556	2	77.778	6.931	.028
	Within Groups	67.333	6	11.222		
	Total	222.889	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	metformin hari ke-1	metformin hari ke-3	-.667	.861	.468	-2.77	1.44
		metformin hari ke-7	-2.000	.861	.059	-4.11	.11
	metformin hari ke-3	metformin hari ke-1	.667	.861	.468	-1.44	2.77
		metformin hari ke-7	-1.333	.861	.172	-3.44	.77
	metformin hari ke-7	metformin hari ke-1	2.000	.861	.059	-.11	4.11
		metformin hari ke-3	1.333	.861	.172	-.77	3.44
basofil	metformin hari ke-1	metformin hari ke-3	-1.333	.861	.172	-3.44	.77
		metformin hari ke-7	-2.333*	.861	.035	-4.44	-.23
	metformin hari ke-3	metformin hari ke-1	1.333	.861	.172	-.77	3.44
		metformin hari ke-7	-1.000	.861	.289	-3.11	1.11
	metformin hari ke-7	metformin hari ke-1	2.333*	.861	.035	.23	4.44
		metformin hari ke-3	1.000	.861	.289	-1.11	3.11
neutrofil	metformin hari ke-1	metformin hari ke-3	-8.000	5.538	.199	-21.55	5.55
		metformin hari ke-7	-12.000	5.538	.073	-25.55	1.55
	metformin hari ke-3	metformin hari ke-1	8.000	5.538	.199	-5.55	21.55
		metformin hari ke-7	-4.000	5.538	.497	-17.55	9.55
	metformin hari ke-7	metformin hari ke-1	12.000	5.538	.073	-1.55	25.55
		metformin hari ke-3	4.000	5.538	.497	-9.55	17.55
limfosit	metformin hari ke-1	metformin hari ke-3	-18.333*	5.430	.015	-31.62	-5.05
		metformin hari ke-7	-31.667*	5.430	.001	-44.95	-18.38
	metformin hari ke-3	metformin hari ke-1	18.333*	5.430	.015	5.05	31.62
		metformin hari ke-7	-13.333*	5.430	.049	-26.62	-.05
	metformin hari ke-7	metformin hari ke-1	31.667*	5.430	.001	18.38	44.95
		metformin hari ke-3	13.333*	5.430	.049	.05	26.62
monosit	metformin hari ke-1	metformin hari ke-3	-3.333	2.735	.269	-10.03	3.36
		metformin hari ke-7	-10.000*	2.735	.011	-16.69	-3.31
	metformin hari ke-3	metformin hari ke-1	3.333	2.735	.269	-3.36	10.03
		metformin hari ke-7	-6.667	2.735	.051	-13.36	.03
	metformin hari ke-7	metformin hari ke-1	10.000*	2.735	.011	3.31	16.69
		metformin hari ke-3	6.667	2.735	.051	-.03	13.36

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

Ranks

kelompok		N	Mean Rank
eosinofil	metformin hari ke-1	3	2.50
	metformin hari ke-3	3	5.17
	metformin hari ke-7	3	7.33
	Total	9	
basofil	metformin hari ke-1	3	2.67
	metformin hari ke-3	3	5.33
	metformin hari ke-7	3	7.00
	Total	9	
neutrofil	metformin hari ke-1	3	2.67
	metformin hari ke-3	3	5.83
	metformin hari ke-7	3	6.50
	Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	eosinofil	basofil	neutrofil
Chi-Square	5.627	4.327	3.442
df	2	2	2
Asymp. Sig.	.060	.115	.179

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

c. Kontrol

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eosinofil	basofil	neutrofil	limfosit	monosit
N		9	9	9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	1.22	1.33	13.44	47.44	16.33
	Std. Deviation	1.787	1.323	7.452	19.539	4.472
Most Extreme Differences	Absolute	.309	.266	.159	.196	.120
	Positive	.309	.266	.159	.196	.107
	Negative	-.247	-.229	-.149	-.188	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.926	.798	.478	.588	.359
Asymp. Sig. (2-tailed)		.358	.547	.976	.879	1.000
a. Test distribution is Normal.						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
eosinofil	3.769	2	6	.087
basofil	1.556	2	6	.286
neutrofil	1.300	2	6	.340
limfosit	8.563	2	6	.017
monosit	.158	2	6	.857

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
eosinofil	Between Groups	10.889	2	5.444	2.227	.189
	Within Groups	14.667	6	2.444		
	Total	25.556	8			
basofil	Between Groups	6.000	2	3.000	2.250	.187
	Within Groups	8.000	6	1.333		
	Total	14.000	8			
neutrofil	Between Groups	21.556	2	10.778	.153	.861
	Within Groups	422.667	6	70.444		
	Total	444.222	8			
limfosit	Between Groups	2316.222	2	1158.111	9.416	.014
	Within Groups	738.000	6	123.000		
	Total	3054.222	8			
monosit	Between Groups	104.667	2	52.333	5.675	.041
	Within Groups	55.333	6	9.222		
	Total	160.000	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kontrol	(J) kontrol	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
eosinofil	kontrol hari ke-1	kontrol hari ke-3	-1.000	1.277	.463	-4.12	2.12
		kontrol hari ke-7	-2.667	1.277	.082	-5.79	.46
	kontrol hari ke-3	kontrol hari ke-1	1.000	1.277	.463	-2.12	4.12
		kontrol hari ke-7	-1.667	1.277	.240	-4.79	1.46
	kontrol hari ke-7	kontrol hari ke-1	2.667	1.277	.082	-.46	5.79
		kontrol hari ke-3	1.667	1.277	.240	-1.46	4.79
basofil	kontrol hari ke-1	kontrol hari ke-3	-1.000	.943	.330	-3.31	1.31
		kontrol hari ke-7	-2.000	.943	.078	-4.31	.31
	kontrol hari ke-3	kontrol hari ke-1	1.000	.943	.330	-1.31	3.31
		kontrol hari ke-7	-1.000	.943	.330	-3.31	1.31
	kontrol hari ke-7	kontrol hari ke-1	2.000	.943	.078	-.31	4.31
		kontrol hari ke-3	1.000	.943	.330	-1.31	3.31
neutrofil	kontrol hari ke-1	kontrol hari ke-3	-3.667	6.853	.612	-20.44	13.10
		kontrol hari ke-7	-2.667	6.853	.711	-19.44	14.10
	kontrol hari ke-3	kontrol hari ke-1	3.667	6.853	.612	-13.10	20.44
		kontrol hari ke-7	1.000	6.853	.889	-15.77	17.77
	kontrol hari ke-7	kontrol hari ke-1	2.667	6.853	.711	-14.10	19.44
		kontrol hari ke-3	-1.000	6.853	.889	-17.77	15.77
limfosit	kontrol hari ke-1	kontrol hari ke-3	-15.333	9.055	.141	-37.49	6.82
		kontrol hari ke-7	-39.000*	9.055	.005	-61.16	-16.84
	kontrol hari ke-3	kontrol hari ke-1	15.333	9.055	.141	-6.82	37.49
		kontrol hari ke-7	-23.667*	9.055	.040	-45.82	-1.51
	kontrol hari ke-7	kontrol hari ke-1	39.000*	9.055	.005	16.84	61.16
		kontrol hari ke-3	23.667*	9.055	.040	1.51	45.82
monosit	kontrol hari ke-1	kontrol hari ke-3	-3.667	2.480	.190	-9.73	2.40
		kontrol hari ke-7	-8.333*	2.480	.015	-14.40	-2.27
	kontrol hari ke-3	kontrol hari ke-1	3.667	2.480	.190	-2.40	9.73
		kontrol hari ke-7	-4.667	2.480	.109	-10.73	1.40
	kontrol hari ke-7	kontrol hari ke-1	8.333*	2.480	.015	2.27	14.40
		kontrol hari ke-3	4.667	2.480	.109	-1.40	10.73

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

Ranks

kelompok	N	Mean Rank
limfosit kontrol hari ke-1	3	2.50
kontrol hari ke-3	3	4.50
kontrol hari ke-7	3	8.00
Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	Limfosit
Chi-Square	6.305
df	2
Asymp. Sig.	.043

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
limfosit kontrol hari ke-1	3	2.00	6.00
limfosit kontrol hari ke-7	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok