

**EFEKTIVITAS EKSTRAK *THYMOQUINONE* JINTAN HITAM
TERHADAP PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH BARU
(ANGIOGENESIS) SOKET GIGI PASCA EKSTRAKSI
PADA MODEL TIKUS DIABETES**

SKRIPSI

Oleh

Retno Trisnawati

NIM 121610101023

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**EFEKTIVITAS EKSTRAK *THYMOQUINONE* JINTAN HITAM
TERHADAP PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH BARU
(ANGIOGENESIS) SOKET GIGI PASCA EKSTRAKSI
PADA MODEL TIKUS DIABETES**

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
Retno Trisnawati
121610101023

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Rasulullah Muhammad SAW, atas segala bimbingan dan pencerahan yang membawa saya sampai saat ini.
2. Yang tersayang kedua orang tua saya, Bapak Sutrisno dan Ibu Lilis Setyowati yang telah mendukung, memberikan kasih sayang dan yang tak pernah putus mendoakan saya.
3. Yang terhormat Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD dan drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed selaku dosen pembimbing, semoga segala bimbingan dan kebaikan yang telah diberikan dapat menjadi amal dan barokah.
4. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi.
5. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Berbahagialah dia yang makan dari keringatnya sendiri, bersuka karena usahanya sendiri, maju karena pengalamannya sendiri.”

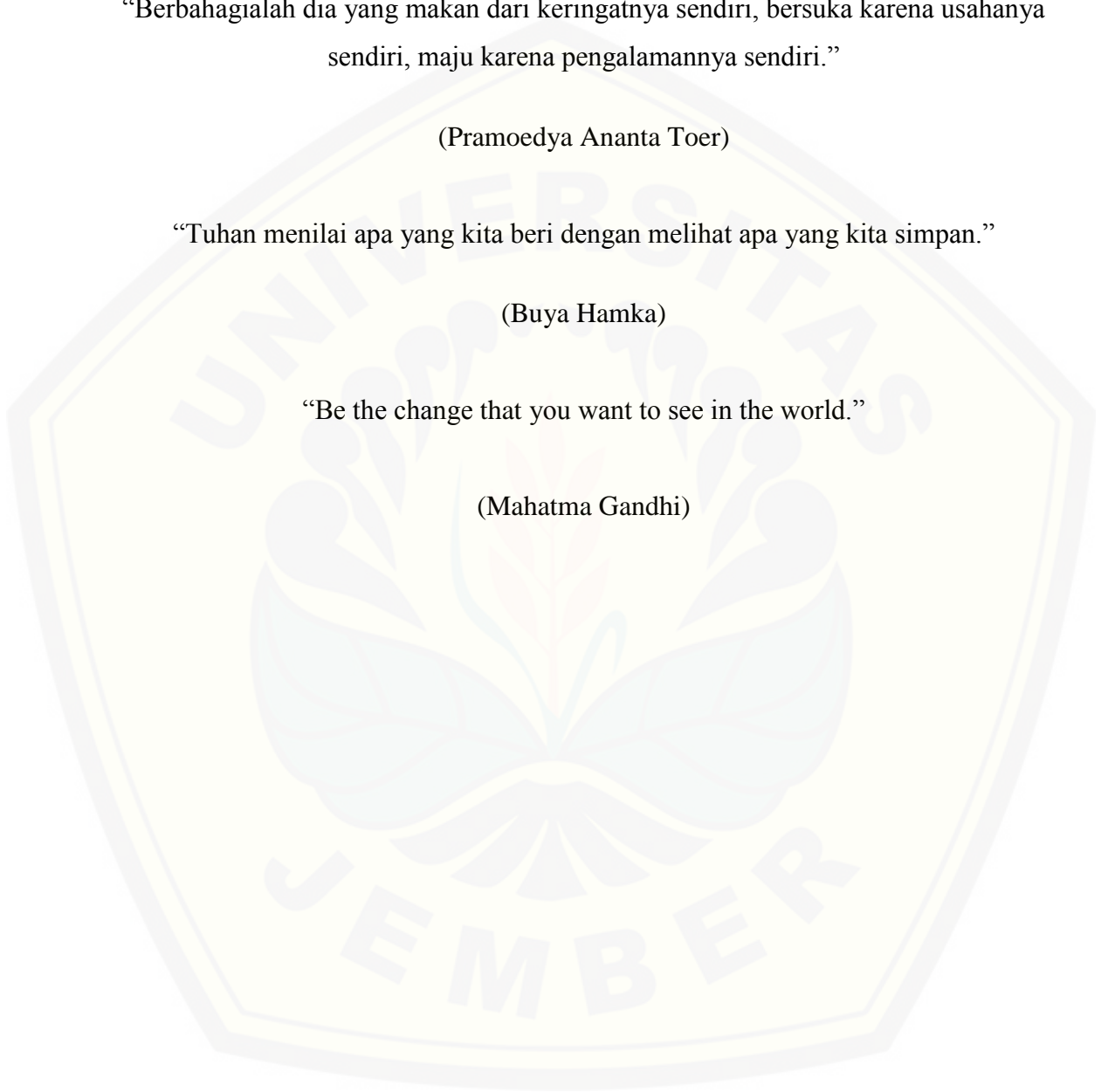
(Pramoedya Ananta Toer)

“Tuhan menilai apa yang kita beri dengan melihat apa yang kita simpan.”

(Buya Hamka)

“Be the change that you want to see in the world.”

(Mahatma Gandhi)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Retno Trisnawati

NIM : 121610101023

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Efektifitas Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Pembentukan Pembuluh Darah Baru (Angiogenesis) Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Model Tikus Diabetes” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 April 2017
Yang menyatakan,

Retno Trisnawati
NIM : 121610101023

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS EKSTRAK *THYMOQUINONE* JINTAN HITAM
TERHADAP PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH BARU
(ANGIOGENESIS) SOKET GIGI PASCA EKSTRAKSI
PADA MODEL TIKUS DIABETES**

Oleh

Retno Trisnawati

NIM : 121610101023

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektifitas Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Pembentukan Pembuluh Darah Baru (Angiogenesis) Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Model Tikus Diabetes”, telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Jum’at, 28 April 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

drg. Dwi Merry Ch. Robin, M.Kes
NIP. 197712232008122002

Pembimbing Utama,

Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD
NIP. 196407132000121001

Penguji Anggota,

drg. Rendra Criestedy P., MDSc
NIP. 198305312008011003

Pembimbing Pendamping,

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

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

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

RINGKASAN

Efektifitas Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Pembentukan Pembuluh Darah Baru (Angiogenesis) Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Model Tikus Diabetes; Retno Trisnawati; 121610101023; 2017; 86 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Diabetes Melitus (DM) ditandai dengan peningkatan kadar gula darah (KGD) atau hiperglikemia, dapat meningkatkan interaksi antara glukosa dengan molekul penyusun sel tubuh (protein, lemak). Interaksi ini menghasilkan produk modifikasi *advanced glycation end products* (AGEs) yang menyebabkan perubahan fungsi sel dan jaringan sehingga terjadi komplikasi pasca ekstraksi pada penderita DM. Terapi pencegahan dengan bahan sintesis memiliki efek samping sehingga terjadi peningkatan minat masyarakat terhadap pengobatan tradisional dan herbal dengan memanfaatkan berbagai macam tanaman. Jintan hitam (*Nigella sativa L.*) mengandung *Thymoquinone* yang bersifat anti-diabetik dan dapat mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) secara in-vitro. Pemberian ekstrak *Thymoquinone* pada kondisi DM diduga efektif dalam proses pembentukan pembuluh darah baru soket gigi pasca ekstraksi.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus Wistar jantan ini menggunakan rancangan *the post-test only control group design*. Sampel berjumlah 27 ekor, berat 150-250 gram, nilai KGD acak (<135 mg/dL) dan sehat. Model tikus diabetes diperoleh dengan injeksi *streptozotocin* (STZ) secara intravena pada ekor tikus dengan dosis 50 mg/kg BB tikus. Tikus dengan KGD acak ≥ 250 mg/dL dikategorikan positif DM, dan dibagi menjadi kelompok perlakuan 1 (ekstrak *Thymoquinone*; 80 mg/kg BB tikus), perlakuan 2 (metformin; 100 mg/kg BB tikus) dan kontrol (aquadest). Tiap kelompok dibagi menjadi 3 subkelompok berdasarkan hari pengamatan yaitu hari ke-3, ke-7 dan ke-10 pasca ekstraksi (H-3, H-7 dan H-10); tiap subkelompok terdiri dari 3 sampel. Larutan perlakuan diberikan secara

intragastrik sejak hari ke-1 positif DM. Hari ke-7 pasca perlakuan, gigi molar kiri rahang bawah diekstraksi dan soket diperluas dengan *contra angle lowspeed round bur* no.1 (5000 rpm/2 s). Perlakuan dilanjutkan sampai tikus dilakukan *euthanasia* dengan metode inhalasi eter sesuai dengan pembagian harinya. Pengukuran KGD tikus dilakukan sebelum dan sesudah induksi DM, sebelum ekstraksi dan sebelum *euthanasia*.

Pemrosesan jaringan dilakukan dengan metode *paraffin embedding*. Jaringan dipotong secara vertikal dengan ketebalan 5 μm dan diwarnai dengan metode *Hematoxylin & Eosin* dan Immunohistokimia (IHC). Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 40x dan 1000x pada 1/3 apikal soket gigi bagian mesial dan distal sebanyak 20 lapang pandang. Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru diamati melalui ekspresi VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Jumlah ekspresi VEGF dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma sel endotel dan monosit yang terwarnai coklat dan telah membentuk lumen.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata KGD kelompok Perlakuan 1 hari ke-10 mencapai nilai terendah meskipun masih diatas normal. Hasil pengamatan gambaran HPA menunjukkan rata-rata jumlah ekspresi VEGF soket gigi pasca ekstraksi terus mengalami peningkatan dari hari ke-3 hingga hari ke-7, namun mengalami penurunan pada hari ke-10. Hal ini terjadi pada semua kelompok yaitu kelompok kontrol, perlakuan 1 dan perlakuan 2. Peningkatan yang cukup drastis terjadi pada kelompok perlakuan 1 hari ke-3 hingga hari ke-7.

Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Thymoquinone* jintan hitam efektif dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) melalui mekanisme penurunan KGD.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektifitas Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Pembentukan Pembuluh Darah Baru Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Model Tikus Diabetes”. Skripsi disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatiannya dengan penuh kesabaran dalam penyusunan skripsi ini.
2. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi serta meluangkan waktu sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. drg. Dwi Merry Ch. Robin, M.Kes selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan bimbingan, saran dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
4. drg. Rendra Criestedy Prasetya, MDSc selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan bimbingan, saran dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF selaku Dosen Pembimbing Akademik atas bimbingan dan motivasi dalam perjalanan sebagai mahasiswa.
6. Yang tersayang kedua orang tua saya, Bapak Sutrisno dan Ibu Lilis Setyowati yang selalu memberi semangat, dukungan, nasehat untuk bisa menjadi seorang dokter gigi yang baik dan bermanfaat bagi orang lain, serta do’a yang tidak pernah putus untuk dipanjatkan.

7. Teman-teman seperjuangan Sabrina Maharani Pratama, Putri Rahmawati Yusuf dan Fatimah Az-Zahrah, tim Jintan Hitam yang selalu memberikan dukungan serta inspirasi, terima kasih telah menjadi tempat suka dan duka, menjadi saudara yang teramat dekat.
8. Staf Laboratorium Biomedik; mas Agus, mbak Wahyu, bu Nur, mbak Indri dan Pak Pin atas segala bantuan, ilmu, waktu dan semangat selama penelitian.
9. Staf Laboratorium Biokimia FK UB, Pak Wibi Riawan, S.Si yang telah memberikan bantuan dan ilmu selama pewarnaan IHC dan penghitungan sel.
10. Sahabatku, Kiki Andari, Mbak Lulu Rosima Putri dan Rakotoarison Joary Nirina yang telah membantu dalam penyusunan skripsi, selalu memberi motivasi dan semangat.
11. Ipda Atmaji Sugeng Wibowo, S.T.K yang selalu memberikan semangat, dukungan serta doa selama penyusunan skripsi ini.
12. Teman satu kontrakan, Kak Rini yang telah meluangkan waktunya untuk membantu saya dalam menyelesaikan penelitian serta memberi semangat.
13. Teman-teman FKG 2012 yang telah berjuang bersama-sama menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
14. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
15. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak dalam proses pembuatan skripsi ini.

Penulis merasa penyusunan skripsi belum sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan skripsi. Semoga skripsi yang saya susun dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membacanya.

Jember, 28 April 2017

Penulis

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik menahun akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi glukosa di dalam darah atau hiperglikemia (Depkes RI, 2009). Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) diketahui bahwa prevalensi penyakit DM diseluruh dunia sebanyak 171 juta penderita pada tahun 2000, dan akan meningkat dua kali menjadi 366 juta pada tahun 2030. Prevalensi DM di Indonesia mencapai 8.426 juta pada tahun 2000 yang diperkirakan akan meningkat pada tahun 2030 sebesar 21.257 juta jiwa. Hal ini berarti terjadi kenaikan tiga kali lipat dalam kurun waktu 30 tahun. Berdasarkan data statistik WHO, dari 10 besar negara yang memiliki penderita diabetes terbanyak, Indonesia menempati peringkat ke-4 di dunia (Herliana, 2013).

Kondisi hiperglikemia yang merupakan ciri khas dari DM akan berkembang menjadi diabetes melitus dengan berbagai macam bentuk manifestasi komplikasi (Unger dan Foster, 1992). Kondisi hiperglikemia dalam jangka panjang pada penderita DM akan meningkatkan interaksi antara glukosa dengan molekul biologis penyusun sel-sel tubuh, seperti protein dan lemak. Interaksi ini memicu reaksi kimia yang disebut glikasi dan menghasilkan *advanced glycation end products* (AGEs). Produk AGEs ini dapat bereaksi dengan reseptornya (RAGEs) atau bereaksi langsung dengan protein-protein penyusun sel tubuh. Interaksi ini akan mengubah struktur dan sifat molekul sehingga fungsi sel dan jaringan juga mengalami perubahan (Negre-Salvayre *et al.*, 2009; Kahn, 1995). Selain itu, ikatan AGEs-RAGEs pada permukaan sel endotel menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan

ROS akan menyebabkan peningkatan regulasi iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) dan penurunan regulasi eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) sehingga bioavailabilitas NO (*nitric oxide*) menurun dan berakibat terjadinya disfungsi endotel. Pada kondisi ini apabila dilakukan tindakan ekstraksi gigi dapat menyebabkan penurunan vaskularisasi pada luka pasca ekstraksi gigi sehingga menyebabkan gangguan penyembuhan luka (Al-Farabi, 2013). Hal tersebut dapat menimbulkan komplikasi pasca ekstraksi gigi pada penderita DM, sehingga prosedur ekstraksi gigi merupakan kontraindikasi pada penderita DM. Oleh karena itu penyakit DM kini mendapat banyak perhatian dari berbagai pihak dalam upaya pencegahan maupun pengelolannya (Meral *et al.*, 2004).

Upaya pengelolaan dan terapi yang telah dilakukan untuk mencegah komplikasi pasca ekstraksi gigi pada penderita DM adalah dengan kontrol gula darah (Vernillo, 2003). Kontrol gula darah pada penderita DM dilakukan dengan terapi insulin dan pemberian obat hipoglikemik oral (OHO) (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005). Terapi insulin merupakan obat utama untuk DM tipe 1, namun terapi ini memiliki efek samping berupa hipoglikemik dan bertambahnya berat badan (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005; Goodman dan Gilman, 2006). Sedangkan obat hipoglikemik oral (OHO) merupakan terapi untuk DM tipe 2. Obat hipoglikemik oral yang sering digunakan adalah golongan biguanid yaitu metformin. Metformin memiliki kelebihan yaitu tidak menaikkan berat badan namun memiliki efek samping pada saluran cerna seperti diare, *abdomen discomfort*, mual, anoreksia, dan *metallic taste* (Kasper, 2006). Pada situasi seperti ini, masyarakat mulai melirik pengobatan tradisional dan herbal dengan memanfaatkan berbagai macam tanaman (Bamosa, 2015).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat adalah jintan hitam (*Nigella sativa L.*). Jintan hitam diketahui mempunyai banyak khasiat seperti antikanker, antiinflamasi, immunomodulasi, antidiabetik (efek hipoglikemik),

analgesik, antipiretik, antimikroba, diuretik, bronkodilator, hepatoprotektor, antidiare, antihipertensi, dan antioksidan (Meral *et al.*, 2004; Bamosa, 2015). Jintan hitam mempunyai efek hipoglikemik karena mempunyai kandungan *Thymoquinone* (TQ) yang cukup tinggi yaitu sebanyak 30-48%. Kandungan *Thymoquinone* dalam jintan hitam terbukti mempunyai efek hipoglikemik dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan tubuh dan memperbaiki kerusakan sel β pankreas sehingga meningkatkan sekresi insulin (Kanter *et al.*, 2003; Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2008). Efek hipoglikemik yang dihasilkan oleh *Thymoquinone* akan menurunkan produk AGE sehingga komplikasi DM akibat kondisi hiperglikemia dapat dihambat. Selain itu, *Thymoquinone* juga berperan dalam mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dalam proses penyembuhan luka melalui peningkatan aktivitas protease dan migrasi sel endotel. Kumpulan sel pada jaringan yang mengalami hipoksia akan melepaskan faktor angiogenik yang dapat berdifusi ke sel-sel pada jaringan sekitarnya. *Thymoquinone* berperan dalam pelepasan faktor angiogenik seperti VEGF, FGF dan TGF. Menyusul proses tersebut, terjadi pula proses inflamasi. Faktor angiogenik berupa faktor pertumbuhan kemudian berikatan dengan reseptor yang spesifik terdapat pada reseptor sel endotel di sekitar lokasi pembuluh darah lama. Ketika faktor angiogenik berikatan dengan reseptornya, sel endotel akan teraktivasi dan menghasilkan signal yang kemudian dikirim dari permukaan sel ke nukleus. Organel-organel sel endotel kemudian mulai memproduksi molekul baru antara lain adalah enzim protease yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah. Protease bekerja dengan menghancurkan jaringan yang rusak pada sekitar luka sebagai jalan migrasi sel endotel, mendorong migrasi dan proliferasi sel endotel, dan secara langsung membentuk tubulus pembuluh darah dari populasi sel endotel yang sedang berkembang (Frisca *et al.*, 2009; Omran, 2014).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pratama *et al.* (2016), pemberian ekstrak *Thymoquinone* jintan hitam efektif dapat menurunkan kadar gula darah pasca ekstraksi pada model tikus yang diinduksi diabetes. Hal ini ditunjukkan dengan nilai kadar gula darah acak terendah berada pada kelompok yang diberi perlakuan ekstrak *Thymoquinone*. Namun pada penelitian tersebut belum diketahui apakah ekstrak *Thymoquinone* juga efektif dalam meningkatkan proses penyembuhan luka pasca ekstraksi melalui pembentukan pembuluh darah baru.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk meneliti efektifitas ekstrak *Thymoquinone* (TQ) dalam meningkatkan proses penyembuhan luka soket gigi pasca ekstraksi gigi melalui pembentukan pembuluh darah baru pada model tikus diabetes.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut didapatkan rumusan masalah bagaimanakah efektifitas ekstrak *Thymoquinone* (TQ) terhadap pembentukan pembuluh darah baru soket gigi pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas ekstrak *Thymoquinone* (TQ) terhadap pembentukan pembuluh darah baru soket gigi pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan:

1. Bagi peneliti

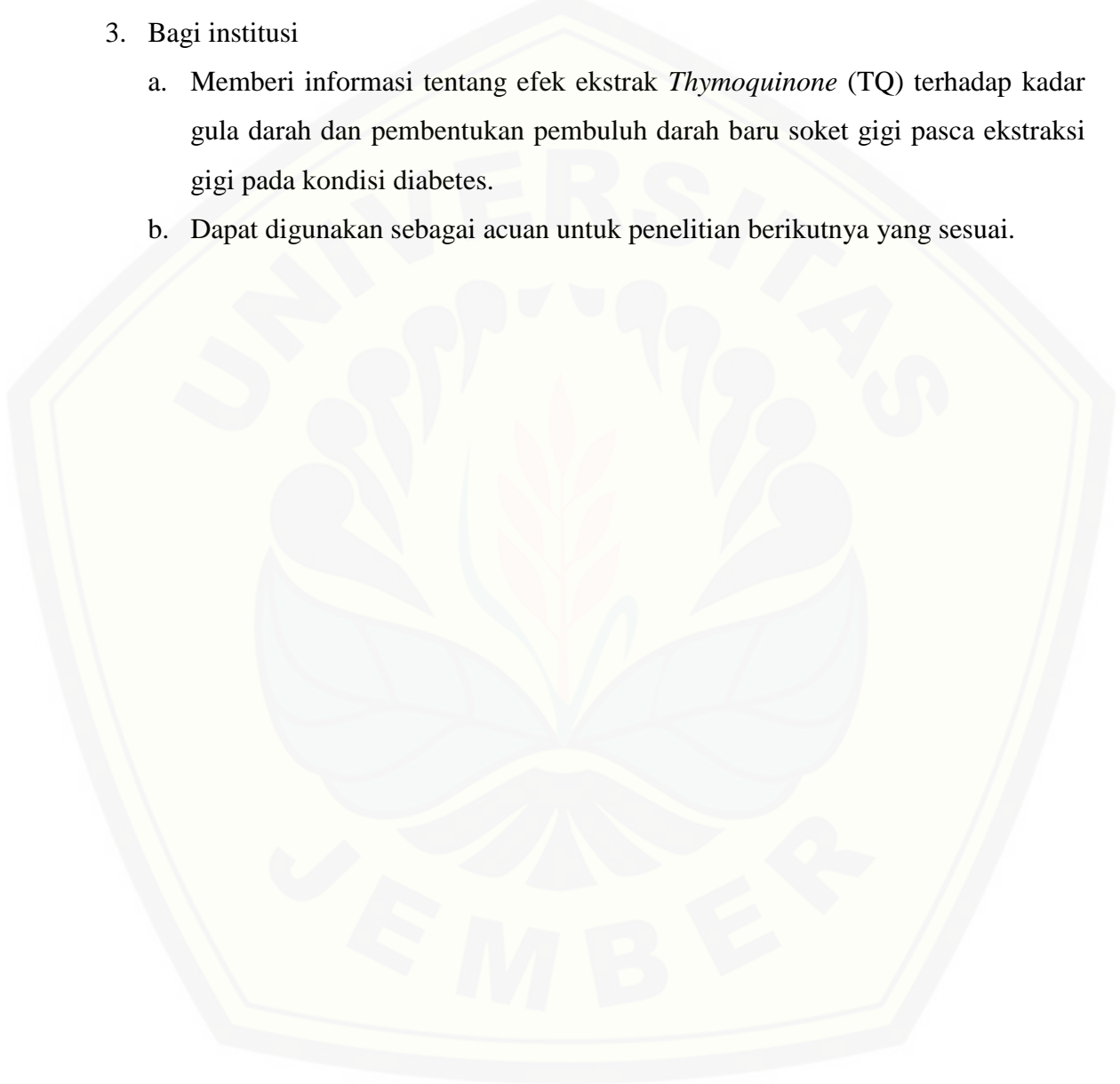
Mengetahui efek ekstrak *Thymoquinone* (TQ) terhadap pembentukan pembuluh darah baru soket gigi pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes.

2. Bagi masyarakat

Memberi informasi ilmiah tentang terapi alternatif penyakit diabetes melitus untuk mengurangi resiko dan komplikasi pasca ekstraksi gigi.

3. Bagi institusi

- a. Memberi informasi tentang efek ekstrak *Thymoquinone* (TQ) terhadap kadar gula darah dan pembentukan pembuluh darah baru soket gigi pasca ekstraksi gigi pada kondisi diabetes.
- b. Dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian berikutnya yang sesuai.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu sindrom dengan terganggunya metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh berkurangnya sekresi insulin atau penurunan sensitivitas jaringan terhadap insulin (Guyton dan Hall, 2007). Menurut *American Diabetes Assosiation* (ADA, 2013), klasifikasi diabetes meliputi empat kelas klinis:

1. Diabetes Melitus tipe 1
Hasil dari kerusakan sel β pankreas, biasanya menyebabkan defisiensi insulin yang absolut.
2. Diabetes Melitus tipe 2
Hasil dari gangguan sekresi insulin yang progresif yang menjadi latar belakang terjadinya resistensi insulin.
3. Gestasional Diabetes Melitus
Diabetes yang terjadi pada kehamilan.
4. Diabetes tipe spesifik lain
Misalnya: gangguan genetik pada fungsi sel β pankreas, gangguan genetik pada kerja insulin, penyakit eksokrin pankreas (seperti *cystic fibrosis*), dan diabetes yang dipicu oleh obat atau bahan kimia (seperti dalam pengobatan HIV/AIDS atau setelah transplantasi organ).

Pada diabetes melitus terjadi suatu kekacauan metabolisme sebagai akibat ketidakmampuan memanfaatkan glukosa secara cukup, karena pengiriman glukosa darah ke jaringan otot dan jaringan lemak tergantung pada insulin (Robbins dan

Kumar, 1995). Aktivitas insulin yang rendah, baik karena defisiensi maupun resistensi akan menyebabkan:

- a. Penurunan penyerapan glukosa oleh sel-sel, disertai peningkatan pengeluaran glukosa oleh hati melalui proses glukoneogenesis dan glikogenolisis. Karena sebagian besar sel tubuh tidak dapat menggunakan glukosa tanpa bantuan insulin, timbul keadaan ironis, yakni terjadi kelebihan glukosa ekstrasel sementara terjadi defisiensi glukosa intrasel.
- b. Kadar glukosa yang meninggi ke tingkat dimana jumlah glukosa yang difiltrasi melebihi kapasitas sel-sel tubulus melakukan reabsorpsi akan menyebabkan glukosa muncul pada urin, keadaan ini dinamakan glukosuria.
- c. Glukosa pada urin menimbulkan efek osmotik yang menarik H_2O bersamanya. Keadaan ini menimbulkan diuresis osmotik yang ditandai oleh poliuria (sering berkemih).
- d. Cairan yang keluar dari tubuh secara berlebihan akan menyebabkan dehidrasi, yang pada gilirannya dapat menyebabkan kegagalan sirkulasi perifer karena volume darah turun mencolok. Kegagalan sirkulasi apabila tidak diperbaiki dapat menyebabkan kematian karena penurunan aliran darah ke otak atau menimbulkan gagal ginjal sekunder akibat tekanan filtrasi yang tidak adekuat.
- e. Selain itu, sel-sel kehilangan air karena tubuh mengalami dehidrasi akibat perpindahan osmotik air dari dalam sel ke cairan ekstrasel yang hipertonik. Akibatnya timbul polidipsia (rasa haus berlebihan) sebagai mekanisme kompensasi untuk mengatasi dehidrasi.
- f. Defisiensi glukosa intrasel menyebabkan “sel kelaparan” akibatnya nafsu makan (*appetite*) meningkat sehingga timbul polifagia (pemasukan makanan yang berlebihan).
- g. Efek defisiensi insulin pada metabolisme lemak menyebabkan penurunan sintesis trigliserida dan peningkatan lipolisis. Hal ini akan menyebabkan

mobilisasi besar-besaran asam lemak dari simpanan trigliserida. Peningkatan asam lemak dalam darah sebagian besar digunakan oleh sel sebagai sumber energi alternatif karena glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel.

- h. Efek insulin pada metabolisme protein menyebabkan pergeseran netto ke arah katabolisme protein. Penguraian protein-protein otot menyebabkan otot rangka berkerut dan melemah sehingga terjadi penurunan berat badan (Sherwood, 2001).

Diagnosis DM harus didasarkan atas pemeriksaan kadar glukosa darah. Untuk diagnosis, pemeriksaan yang dianjurkan adalah pemeriksaan glukosa dengan cara enzimatik dengan bahan darah plasma vena. Walaupun demikian sesuai dengan kondisi setempat dapat juga dipakai bahan darah utuh (*whole blood*), vena ataupun kapiler dengan memperhatikan angka-angka kriteria diagnostik yang berbeda sesuai pembakuan oleh WHO. Untuk pemantauan pengobatan dapat diperiksa glukosa darah kapiler (Viswanathan *et al.*, 2003).

Kecurigaan adanya DM perlu dipikirkan apabila terdapat keluhan klasik DM seperti tersebut dibawah ini:

- a. Keluhan klasik DM berupa: poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya.
- b. Keluhan lain dapat berupa: lemah badan, kesemutan, gatal, mata kabur.

Diagnosis diabetes dapat didasari satu dari kriteria-kriteria tersebut tapi harus dikonfirmasi dengan metode pemeriksaan laboratorium (Mansjoer, 2007).

1. Gejala klasik diabetes (haus, sering kencing, penurunan berat badan) ditambah kadar gula darah sewaktu 200mg/dL (11.1mmol/L), atau

2. Gejala klasik DM ditambah Gula darah puasa 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Puasa diartikan pasien tidak mendapat kalori tambahan sedikitnya 8 jam sebelumnya atau
3. Kadar glukosa darah 2 jam pada TTGO 200 mg/dL (11.1 mmol/L) setelah pemberian glukosa standar 75 mg.

2.2 Komplikasi Diabetes Melitus

Secara garis besar, komplikasi diabetes melitus dibagi menjadi 2 yaitu: 1) komplikasi metabolik; 2) komplikasi vaskular jangka panjang. Komplikasi metabolik yang paling sering dijumpai pada DM tipe 1 yaitu ketoasidosis diabetik (DKA), yang ditandai dengan hiperglikemia (gula darah >300 mg/dL), asidosis metabolik akibat penimbunan benda keton dan diuresis osmotik. Sedangkan komplikasi vaskuler jangka panjang melibatkan pembuluh-pembuluh darah kecil (mikroangiopati) diantaranya retinopati diabetik, nefropati diabetik, neuropati diabetik, dan komplikasi pembuluh darah sedang maupun besar (makroangiopati) antara lain aterosklerosis, ganggren pada ekstremitas dan stroke akibat DM (Price, 2005).

2.2.1 Komplikasi DM melalui jalur pembentukan AGEs

Kadar glukosa darah yang tinggi dalam jangka panjang pada penderita diabetes memicu terjadinya proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs. AGEs merupakan produk akibat glikasi nonenzimatik protein yang beragam struktur kimiawinya. 2-furoil-4(5)-(2-furanil)1H-imidazol (FFI), AFPG (1-alkil-2-formil-3,4-diglukosil-pirol), N-karboksimetil lisin, pirlalin, dan pentosidin adalah contoh AGE. Glukosa adalah suatu aldehyd reaktif yang dapat bereaksi secara spontan, walaupun lambat, dengan protein. Melalui proses yang disebut glikosilasi non enzimatik, protein mengalami modifikasi. Gugus aldehyd glukosa bereaksi dengan gugus amino yang terdapat pada suatu protein, membentuk produk glikosilasi

yang bersifat reversibel. Produk ini mengalami serangkaian reaksi dengan gugus NH_2 dari protein dan mengadakan ikatan silang membentuk AGEs (Al-Farabi, 2013).

Glukosa dapat juga menjalankan glikasi secara langsung, molekul glukosa secara kovalen berikatan dengan protein membentuk basa Schiff. Molekul-molekul ini dapat melakukan penataan ulang membentuk *Amadori adduct*. *Amadori adduct* kemudian mengalami dekomposisi menjadi deoksiglukon, yang dianggap lebih reaktif dibanding gula turunannya. Pembentukan AGEs juga disebut dengan reaksi Maillard, yang merupakan rangkaian reaksi kimia yang sangat rumit. Pembentukan AGEs melalui jalur klasik, yaitu lewat reaksi Maillard antara glukosa atau gula tereduksi lainnya dengan residu *N-terminal amino acid* dan atau gugus amino protein yang dikenal dengan basa Schiff menghasilkan produk Amadori, seperti fruktosa lisin (Al-Farabi, 2013).

Secara garis besar, peranan AGEs dalam perkembangan diabetes meliputi 1) pembentukan ikatan silang dengan molekul membran basal matriks ekstraseluler, yang mengubah struktur seluler; kebanyakan mekanisme ini diperankan oleh AGE intraseluler; 2) Interaksi antara AGEs dengan RAGE pada permukaan sel yang mengaktifkan fungsi seluler patologis, kebanyakan diaktifkan oleh AGEs dalam sirkulasi (Al-Farabi, 2013).

AGEs intraseluler merupakan salah satu faktor penting pada hemostasis vaskuler. Pembentukan AGEs pada protein intraseluler relatif lebih lambat pada glukosa dan lebih cepat dengan fruktosa, gliseraldehid-3fosfat, glukosa-6-fosfat intraseluler, terbentuk secara signifikan pada sel endotel setelah satu minggu pada kondisi hiperglikemik. Secara intraseluler, *fibroblast growth factor* merupakan salah satu protein yang juga terglykasi. Modifikasi AGEs terhadap *fibroblast growth factor* mengakibatkan penurunan aktivitas mitogenik sitosol sel endotel hingga 70%. Pembentukan AGEs pada matriks ekstraseluler terjadi pada protein secara lambat.

Akumulasi AGEs pada protein di matrik ekstraseluler akan mengakibatkan terjadinya ikatan silang yang juga memerangkap makromolekul lain di sekitarnya. AGEs mampu mengubah struktur dan sifat kolagen matriks protein, vitronektin, dan laminin melalui kovalen AGEs-AGEs intermolekul atau ikatan silang. Ikatan silang AGEs pada kolagen tipe I dan elastin meningkatkan kekakuan vaskulatur. Glikasi mengakibatkan peningkatan sintesis kolagen tipe III, IV, V, VI, laminin, dan fibronektin pada matrik ekstraseluler yang dipicu melalui *up-regulation transforming growth factor- β intermediate*. AGEs mengganggu ikatan antara *noncollagenous domain* (NC-1) dengan *helix rich domain* pada kolagen tipe IV membran basal, yang akhirnya menginhibisi struktur matriks. Glikasi laminin, kolagen tipe I dan IV yang merupakan molekul kunci pada membran basalis mengakibatkan inhibisi adhesi pada sel endotel untuk kedua matriks glikoprotein (Al-Farabi, 2013).

AGEs dalam sirkulasi dapat berinteraksi dengan RAGE sehingga meningkatkan produksi ROS intraseluler, menurunkan ekspresi eNOS dan peningkatan regulasi faktor transkripsi NF- κ B. ROS mengakibatkan pengurangan atom hidrogen PUFA dan menginisiasi proses peroksidasi lipid. Proses lipid ini berperan penting dalam pembentukan oxLDL yang penting pada patogenesis aterosklerosis, ditandai dengan peningkatan MDA, sedangkan peningkatan transkripsi NF- κ B akibat interaksi AGE dengan RAGE yang meningkatkan *signaling* NADPH Oksidase, P2, p38, GTPase Cdc42 dan Rac. Aktivasi NF- κ B akan meningkatkan ekspresi endotelin-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selektin, *tissue factor*, trombomodulin, VEGF, sitokin proinflamasi IL-1 α , IL-6, *tumor necrosis factor- α* , dan RAGE. Inhibisi RAGE dengan anti-RAGE IgG atau *soluble* RAGE sebagai ligan ekstraseluler akan menginhibisi aktivasi NF- κ B (Al-Farabi, 2013).

Interaksi AGEs dengan RAGE pada diabetes melitus juga dapat meningkatkan ROS yang merusak endotel. Pada diabetes, terjadi hiperglikemia persisten yang meningkatkan produksi radikal bebas atau ROS di semua jaringan akibat autooksidasi

glukosa, glikosilasi protein, jalur poliol (sorbitol), aktivasi MAPK, dan aktivasi protein kinase C. Proses pembentukan ROS meningkat seiring dengan peningkatan peroksidasi lipid dan oksidasi protein, baik pada diabetes tipe 1 maupun 2 (Al-Farabi, 2013).

ROS mengakibatkan penurunan aktivitas NO *in vitro* maupun *in vivo*, atau menyebabkan terjadinya peningkatan regulasi (*up-regulation*) iNOS dan penurunan regulasi (*down-regulation*) eNOS, hal ini akan mengakibatkan penurunan bioavailabilitas NO, disebut sebagai disfungsi endotel. Kerusakan sel endotel inilah yang menyebabkan penurunan kadar eNOS sehingga bioavailabilitas NO pun berkurang. Disfungsi endotel pada diabetes melitus terjadi melalui dua cara, yaitu peningkatan sintesis endotelin dan/atau gangguan jalur L-arginin NO. Pada diabetes melitus, juga akan terjadi peningkatan *advanced glycation end product* yang akan menghilangkan aktivitas NO *in vitro* maupun *in vivo*, atau menyebabkan terjadinya peningkatan regulasi (*up-regulation*) iNOS dan penurunan regulasi (*down-regulation*) eNOS (Al-Farabi, 2013).

2.3 Ekstraksi Gigi

Ekstraksi gigi merupakan suatu proses pengeluaran gigi dari tulang alveolar, dimana pada gigi tersebut tidak dapat dilakukan perawatan lagi. Ekstraksi gigi juga merupakan tindakan bedah yang melibatkan jaringan bergerak dan jaringan lunak dari rongga mulut, serta akses yang dibatasi oleh bibir dan pipi. Ekstraksi yang ideal adalah pencabutan tanpa rasa sakit dengan trauma minimal terhadap jaringan pendukung gigi, sehingga bekas pencabutan dapat sembuh dengan sempurna dan tidak terdapat masalah prostetik di kemudian hari (Archer, 1975).

Ada dua cara dalam melakukan ekstraksi gigi. Cara pertama sering disebut pencabutan *intra-alveolar*. Ekstraksi gigi atau akar gigi dilakukan dengan menggunakan tang atau *elevator*, atau keduanya. Cara kedua sering disebut

pencabutan *trans-alveolar*. Pembelahan gigi atau akar gigi dari perlekatan tulangnya. Pemisahan ini dilakukan dengan membuang sebagian tulang yang menutupi akar gigi, kemudian pencabutan dilakukan dengan menggunakan *bein* atau tang (Howe, 1995).

Setelah tindakan ekstraksi gigi, hal yang perlu diperhatikan adalah kecepatan proses penyembuhan luka paska pencabutan gigi. Proses ini kadang-kadang mengalami gangguan yang menyebabkan terjadinya komplikasi (Saptoyo, 1996).

2.4 Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah respon tubuh terhadap berbagai cedera dengan proses pemulihan yang kompleks dan dinamis yang menghasilkan pemulihan anatomi dan fungsi secara terus-menerus. Penyembuhan luka terkait dengan regenerasi sel sampai fungsi organ tubuh kembali pulih, ditunjukkan dengan tanda-tanda dan respon yang berurutan dimana sel secara bersama-sama berinteraksi, melakukan tugas dan berfungsi secara normal. Idealnya luka yang sembuh kembali normal secara struktur anatomi, fungsi dan penampilan (Black, 2001).

2.4.1 Proses Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka terdiri dari tiga fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (Mendonca dan Coutinho-Netto, 2009).

a. Fase Inflamasi

Beberapa saat setelah terjadi injuri, jaringan akan menstimulasi pembuluh darah untuk mengeluarkan plasma darah dan elemen seluler termasuk platelet di area luka. Platelet agregasi dan gumpalan darah (*blood clot*) mengandung banyak fibrin, untuk mengembalikan hemostasis dan sebagai barier terhadap invasi bakteri, serta

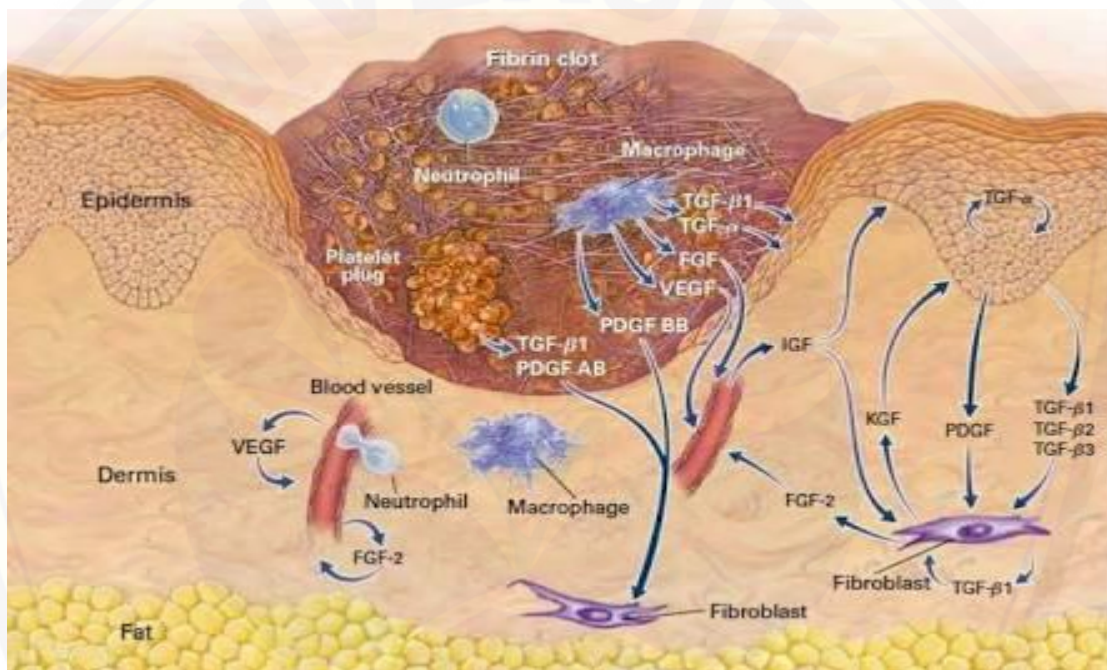
mengatur kebutuhan matrik untuk migrasi sel. Matrik ini juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan faktor pertumbuhan yang akan digunakan pada fase penyembuhan selanjutnya (Werner dan Grose, 2003; Eming dan Krieg, 2007).

Platelet sebagai sumbat hemostatik mensekresikan berbagai mediator ke area luka. Platelet merupakan elemen penting dalam proses pembekuan darah melalui degranulasi trombin, pelepasan faktor pertumbuhan, seperti PDGF, TGF- β , EGF, TGF- α , VEGF dan glikoprotein adhesiv seperti fibronektin dan trombospondin yang merupakan unsur penting dari matrik ekstraseluler (Ribatti, 2009). Faktor pembekuan dan faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh platelet bersamaan dengan aktivasi komplemen dan sel parenkim akibat injuri, menghasilkan banyak mediator vasoaktif dan faktor kemotaksis yang membantu pengeluaran sel inflamasi pada luka (Delavary dan van der Veer, 2011). Selain berfungsi untuk fagositosis bakteri, debris seluler dan benda asing, sel inflamasi juga memproduksi faktor pertumbuhan yang akan digunakan pada fase proliferasi (Singer dan Clark, 1999).

Pembentukan kinin dan prostaglandin pada fase ini akan menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas dari pembuluh darah di daerah luka. Hal ini menyebabkan edema dan kemudian menimbulkan pembengkakan dan nyeri. PMN terutama neutrofil adalah sel pertama yang menuju ke daerah luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncaknya pada 24-48 jam. Neutrofil melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Bila tidak terjadi infeksi neutrofil berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga (Werner dan Grose, 2003).

Elemen imun seluler berikutnya adalah makrofag. Sel ini adalah turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Sel ini muncul 48-96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke-3. Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap ada di dalam

luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Setelah makrofag akan muncul limfosit T pada hari ke-5 dan mencapai puncak pada hari ke-7. Makrofag dan limfosit T berperan penting pada penyembuhan luka normal. Makrofag seperti halnya neutrofil, melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas IL-12 yang menghasilkan CD-8 dan mengaktifkan sel *Natural Killer* (NK) yang membantu makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan (Werner dan Grose, 2003).



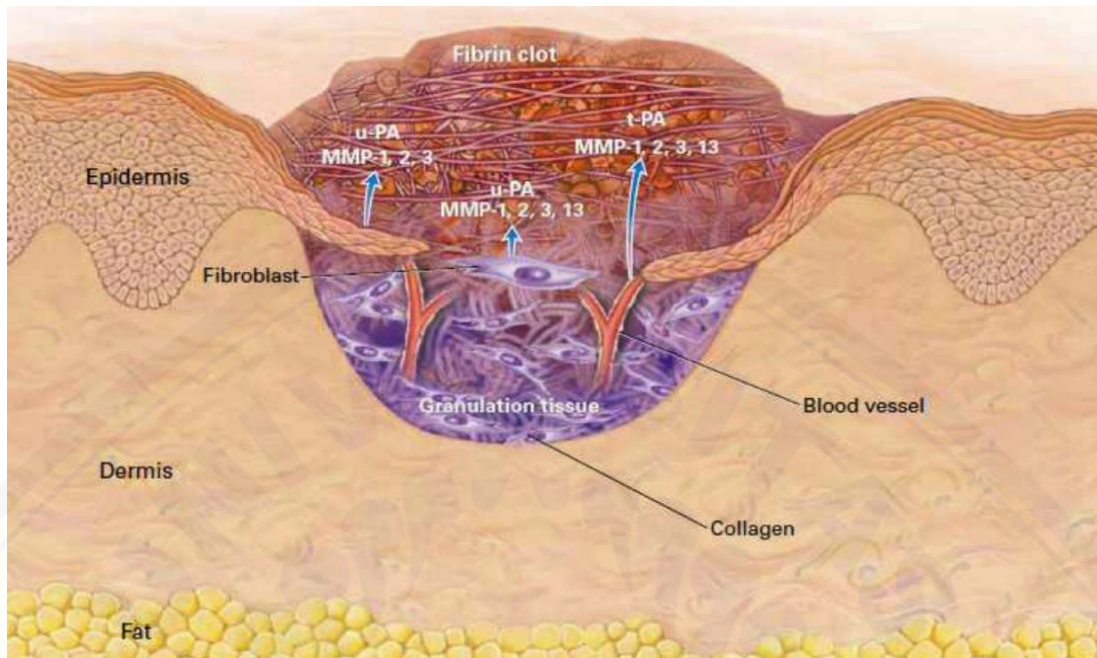
Gambar 2.1 Fase inflamasi (Sumber: Singer dan Clark, 1999)

b. Fase Proliferasi

Fase ini terjadi pada hari ke 3-14. Fase ini ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, yang bersamaan dengan timbulnya kapiler baru dalam jaringan ikat longgar ekstraseluler dari matriks kolagen, fibronectin

dan asam hialuronik. Fibroblas muncul pada hari ke-3 dan mencapai puncak pada hari ke-7 (Mendonca dan Coutinho-Netto, 2009).

Peningkatan jumlah fibroblas pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi. Fibroblas ini berasal dari sel-sel mesenkim lokal, terutama yang berhubungan dengan lapisan adventitia, pertumbuhannya disebabkan oleh sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit. Fibroblas merupakan elemen utama pada proses pembentukan protein struktural yang berperan dalam pembentukan jaringan. Fibroblas juga memproduksi kolagen dalam jumlah besar. Kolagen ini berupa glikoprotein berantai tiga dan merupakan unsur utama matriks ekstraseluler yang berguna membentuk kekuatan pada jaringan parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke-3 setelah luka dan meningkat sampai minggu ke-3. Kolagen terus menumpuk sampai tiga bulan. Penumpukan kolagen ini akan diikuti fibril kolagen yang mengalami reorganisasi sehingga terbentuk jaringan regular sepanjang luka. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia. Pada fase proliferasi ini juga terjadi pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis (Stojadinovic *et al.*, 2008).



Gambar 2.2 Fase proliferasi (Sumber: Singer dan Clark, 1999)

c. Fase Maturasi

Fase maturasi atau fase *remodelling* merupakan fase akhir dari proses penyembuhan luka, dimana pada fase ini terjadi pembentukan epitelium dan formasi akhir dari jaringan parut yang terbentuk. Matriks ekstraseluler yang kaya akan fibronectin akan menyebabkan penumpukan kolagen oleh fibroblas. Pada tahap terakhir yang disebut *wound maturation*, sebagian besar serabut kolagen yang terbentuk akan dihancurkan dan diganti dengan serabut kolagen yang baru dan lebih baik serta cukup kuat terhadap tekanan yang mengenai luka yaitu 40-70% dari kekuatan jaringan normal. Proses ini dapat dicapai dalam waktu 4 minggu. Pada beberapa jenis luka, jaringan parut bahkan memerlukan waktu hingga 2 tahun untuk menyelesaikan tahap *remodelling*. Hal ini dikarenakan adanya berbagai faktor seperti usia nutrisi dan status metabolik (Miller dan MacKay, 2003).

2.4.2 Penyembuhan Luka Pasca Ekstraksi gigi

Penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi tidak banyak berbeda dengan penyembuhan luka pada bagian tubuh lainnya, mengikuti prinsip-prinsip serupa dengan penyembuhan jaringan lunak, tetapi melibatkan penyembuhan tulang, yaitu pembekuan, re-epitelisasi, pembentukan jaringan granulasi dan pembentukan tulang. Perbedaannya mungkin terletak pada keadaan anatomis luka yang khas setelah gigi tersebut dicabut (Larjava, 2012; Shafer, 1983).

Menurut Purkait (2003), penyembuhan pada soket pencabutan gigi terjadi melalui langkah-langkah berikut:

- a. Segera setelah gigi dicabut, perdarahan terjadi pada soket dan terjadi pembekuan darah (mekanisme hemostasis).
- b. Dalam 24 jam, tepi bekuan darah mengalami edema dan infiltrasi sel neutrofil dan makrofag.
- c. Dalam 2 sampai 4 hari berikutnya, fibroblas dan sel endotel berproliferasi menempati ruang sumsum tulang dan bertahap masuk ke dalam bekuan darah.
- d. Pada saat yang sama, pemindahan debris (seperti jaringan nekrotik, sel-sel mati dan potongan tulang) dari luka juga terjadi, dan hal tersebut dilakukan oleh neutrofil, makrofag dan sel-sel osteoklas yang menyebabkan fagositosis atau proteolisis dari debris.
- e. Proses pembekuan darah selesai biasanya seminggu dan diikuti epitel di tepi luka mulai tumbuh secara bertahap meliputi seluruh soket.
- f. Kemudian sel-sel inflamasi mengalami penurunan jumlah dan serat kolagen meningkat di daerah tersebut.
- g. Sekitar 10 sampai 15 hari, tulang dewasa atau osteosit mulai terbentuk pada tepi soket. Osteosit pindah ke soket dan secara bertahap mengisi seluruh soket dengan mengganti jaringan granulasi.

- h. Dalam waktu sekitar 3 minggu sampai 6 bulan, seluruh soket diisi dengan tulang dewasa yang menggantikan osteosit.

2.5 Angiogenesis

Pembentukan pembuluh darah baru dapat melalui dua mekanisme berbeda tetapi berhubungan, yaitu vaskulogenesis dan angiogenesis. Vaskulogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru selama perkembangan embrio. Pada vaskulogenesis, pembuluh darah berkembang dari prekursor sel-sel endotel (angioblas), sedangkan angiogenesis meliputi pertumbuhan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada (Seed dan Walsh, 2008).

VEGF merupakan zat yang dibuat oleh sel-sel yang merangsang pembentukan pembuluh darah baru yang disebut angiogenesis. VEGF juga bertindak sebagai mitogen untuk vaskuler endotel sel, merangsang sel-sel untuk membelah dan berkembang biak. VEGF adalah glikoprotein homodimerik yang mengandung lebih dari 20% asam amino yang sama dengan PDGF. VEGF memiliki lima anggota yaitu VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D dan PlGF. Sebagai tambahan, VEGF-C disekresikan oleh makrofag dan bertindak sebagai “detektif” pada proses penyembuhan luka. VEGF dihasilkan oleh berbagai sel yang berperan pada proses penyembuhan diantaranya sel endotel, fibroblas, platelet, neutrofil, osteoblas dan makrofag (Bao *et al.*, 2009).

Salah satu peran VEGF pada proses penyembuhan luka adalah menstimulasi angiogenesis melalui pembentukan pembuluh darah baru. Angiogenesis pada proses penyembuhan luka mencakup berbagai tahap yaitu vasodilatasi, degradasi membran basal, migrasi sel endotel, dan proliferasi sel endotel seperti terlihat pada Gambar 2.3 (Bao *et al.*, 2009).

a. Vasodilatasi

Pada fase vasodilatasi, VEGF memiliki kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas vaskuler. Sebelum mengenali rantai asam amino, VEGF membentuk faktor permeabilitas vaskuler. VEGF lebih poten daripada histamin yang menginduksi *vascular leakage*, dan mengikat reseptor KDR, menstimulasi sintesis NO dan aktifitas siklooksigenase. NO dan prostacyclin akan menstimulasi vasodilatasi dan permeabilitas vaskuler. Vasodilatasi akan melebarkan dan meningkatkan sensitifitas sel endotel (Bao *et al.*, 2009).

b. Degradasi membran basal

Pada fase degradasi membran basal, VEGF menginduksi faktor prokoagulan pada sel endotel seperti faktor von Willebrand, yang memediasi adhesi dan agregasi platelet. Platelet akan mengalami sintesis dan melepaskan VEGF, sehingga meningkatkan konsentrasi lokal protein dan mengaktifkan faktor koagulasi trombin dan fibrin. Trombin akan mengaktifkan *endothelial progelatinase A*. VEGF secara langsung akan meningkatkan sekresi MMP-1, inhibitor *metalloproteinase* dan gelatin A (MMP-2). VEGF juga menginduksi ekspresi dari plasminogen aktivator inhibitor. Selain itu, VEGF juga menstimulasi pembuluh darah sel otot polos untuk mengekspresikan MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 (Bao *et al.*, 2009).

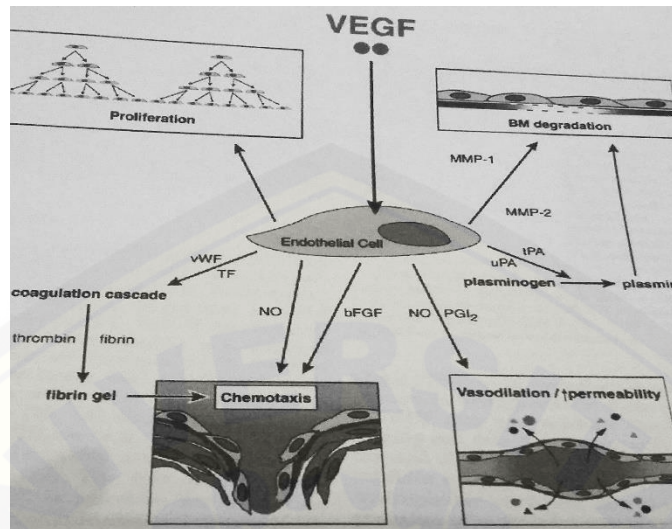
Pembuluh darah lokal juga diinduksi oleh VEGF yang berperan sebagai penyeimbang enzimatik dan inhibitor, sebagai tempat migrasi endotel. MMP-2 akan mendegradasi kolagen tipe 4, yang merupakan unsur pokok membran basal pembuluh darah. MMP-1 akan menghancurkan kolagen tipe 1-3. Plasmin memotong ikatan carboxy-termini dari VEGF sehingga aktifitas enzimatik akan menghasilkan VEGF lebih lanjut. Akibat aktifitas proteolitik yang menghancurkan sktruktur elemen membran basal dan matriks ekstraseluler akan memfasilitasi migrasi endotel ke dalam ruang ekstraseluler (Bao *et al.*, 2009).

c. Migrasi sel endotel

VEGF menginduksi migrasi sel endotel melalui 2 mekanisme primer yaitu kemotaksis dan vasodilatasi. Pada fase awal angiogenesis, sel endotel bermigrasi sebelum pembelahan sel secara mitosis. Kemotaksis merupakan proses regulasi tingkat tinggi yang melibatkan interaksi molekul adhesi sel dengan matrik ekstraseluler. Mekanisme lain yang menyebabkan VEGF menginduksi migrasi sel endotel pada proses penyembuhan yaitu peningkatan permeabilitas vaskuler yang dimediasi oleh NO dan *prostacyclin*. Kebocoran pada protein plasma fibrinogen akan merubah ruang ekstraseluler menjadi gel fibrin yang menstimulasi migrasi endotel (Bao *et al.*, 2009).

d. Proliferasi sel endotel

VEGF diuraikan sebagai selektif mitogen bagi sel endotel. VEGF menginduksi pertumbuhan sel endotel pada permukaan matrik kolagen untuk menginvasi matrik dasar dan menstimulasi respon proliferasi. Selanjutnya, VEGF akan mengembalikan kapasitas proliferasi sel endotel. Untuk memperpanjang umur sel endotel dan mencegah apoptosis dengan cara menginduksi 2 anti-apoptosis protein pada sel endotel manusia. Protein ini akan bertanggung jawab mencegah apoptosis, menginduksi TNF- α pada sel endotel dan radiasi ion pada hematopoietik stem sel. VEGF menghambat apoptosis kultur sel nonsupportif pada permukaan hidrofobik, tetapi keterlibatan ini meningkatkan ekspresi integrin $\alpha\beta 5$ dan deposisi vitronektin. Penghambatan pada apoptosis juga akan menghambat sinyal pro- apoptosis termasuk aktivasi caspase-3. Sehingga peningkatan replikasi dan umur sel endotel akan meningkatkan proliferasi VEGF (Bao *et al.*, 2009).



Gambar 2.3 Mekanisme kerja VEGF pada proses penyembuhan luka (Sumber: Bao *et al*, 2009)

2.6 Pembuluh Darah

Pembuluh darah adalah bagian dari sistem sirkulasi yang mengangkut darah ke seluruh tubuh. Dinding pembuluh darah terdiri dari tiga lapisan utama yaitu:

- Tunika intima, merupakan lapisan paling tipis dan paling dalam yang berkontak langsung dengan darah. Tersusun atas endotel selapis dengan lapisan subendotel jaringan ikat longgar yang terkadang mengandung otot polos.
- Tunika media, merupakan lapisan paling tebal yang tersusun atas lapisan konsentris otot polos. Di antara sel otot polos terdapat berbagai serabut jaringan ikat, elastin, retikular kolagen, substansi dasar, substansi dasar proteoglikan, dan glikoprotein.
- Tunika adventitia, tersusun atas serat kolagen tipe I dan elastin. Lapisan ini lebih tebal pada vena dan akan menyatu dengan stroma jaringan ikat organ (Corwin, 2007).

2.6.1 Pembuluh Darah Kapiler

Pembuluh darah kapiler merupakan pembuluh darah terkecil. Lumennya cukup untuk satu atau paling banyak dua eritrosit. Dindingnya hanya terdiri dari selapis tipis sel endotel (Halim, 1989). Jika dipotong secara memanjang, pembuluh darah kapiler tampak sebagai pembuluh panjang yang dibatasi oleh sel endotel saja. Sel endotel tampak berinti gepeng (Wonodirekso, 2003).

2.6.2 Pembuluh Darah Arteri

a. Arteri besar

Arteri besar tidak mempunyai lapisan tambahan yang membatasi lapisan dindingnya dengan tegas. Tunika intimanya tebal, terdiri atas selapis sel endotel dengan jaringan ikat longgar subendotel yang cukup tebal di bawahnya. Tunika media terdiri atas serat elastis yang membentuk lembaran-lembaran yang tersusun melingkari dinding pembuluh. Di antara lembaran-lembaran tersebut terdapat berkas-berkas otot polos. Tunika adventitia terdiri atas jaringan ikat longgar (Wonodirekso, 2003).

b. Arteri sedang

Arteri sedang berlumen bulat dan lonjong. Termasuk tipe muskuler. Tunika intima terdiri atas selapis sel endotel dengan jaringan ikat longgar yang tipis di bawahnya. Sel endotel berjejer mengikuti kelok-kelok tunika elastika interna. Tunika elastika interna sangat jelas dan terlihat berkelok-kelok mengelilingi lumennya. Tunika media tebal, terdiri banyak serat otot polos yang tersusun melingkar. Tunika elastika eksterna jelas terlihat tetapi tidak membentuk lapisan yang sepadat tunika elastika interna. Tunika adventitia terdiri atas jaringan ikat (Wonodirekso, 2003).

c. Arteriol

Arteriol merupakan arteri paling kecil. Pembuluh ini umumnya berlumen bundar atau agak lonjong. Tunika intima terdiri atas selapis sel endotel. Di bawah lapisan endotel terdapat lapisan tambahan yaitu tunika elastika interna yang terdiri atas serat elastin yang berkelok-kelok melingkari dinding pembuluh. Tunika media terdiri atas beberapa lapis serat otot polos yang tersusun melingkari dinding pembuluh (Wonodirekso, 2003).

2.6.3 Pembuluh Darah Vena

a. Vena besar

Ciri yang mencolok pada vena besar adalah tunika adventitia tebal dengan serat-serat otot polos tersusun panjang. Tunika media merupakan lapisan tipis yang terdiri atas serat-serat otot polos melingkar dan sedikit jaringan ikat yang lebih longgar. Tunika intima merupakan bagian endotel dengan sedikit jaringan penyokong. Vena besar umumnya memiliki lamina elastika interna yang kurang berkembang seperti pada arteri (Eroschenko, 2003).

b. Vena sedang

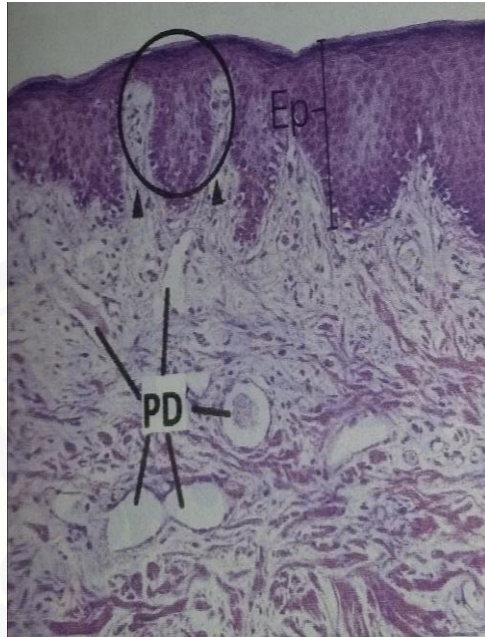
Vena sedang berdinding lebih tipis daripada arteri sedang. Lumennya jauh lebih lebar dan biasanya bergelombang. Tunika intima sama seperti arteri sedang, tetapi tunika elastika internanya tidak ada. Tunika media lebih tipis daripada arteri sedang. Tunika elastika eksterna tidak ada. Tunika adventitia terdiri atas jaringan ikat longgar (Wonodirekso, 2003).

c. Venula

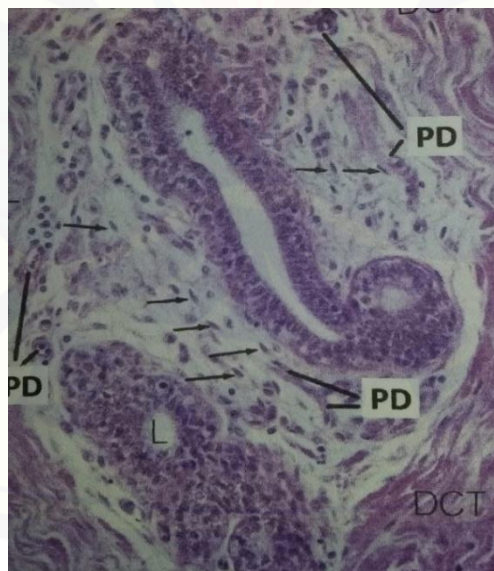
Bentuk lumen venula berbentuk lonjong mengarah gepeng terkadang dindingnya tempak bergelombang. Biasanya venula terlihat lebih besar daripada arteriol. Pada venula tidak ditemukan lapisan tambahan. Tunika intima terdiri atas sel endotel. Tunika media merupakan lapisan tipis yang terdiri atas otot polos. Tunika adventitia relatif lebih tebal (Wonodirekso, 2003).

2.6.4 Gambaran Histologi Pembuluh Darah

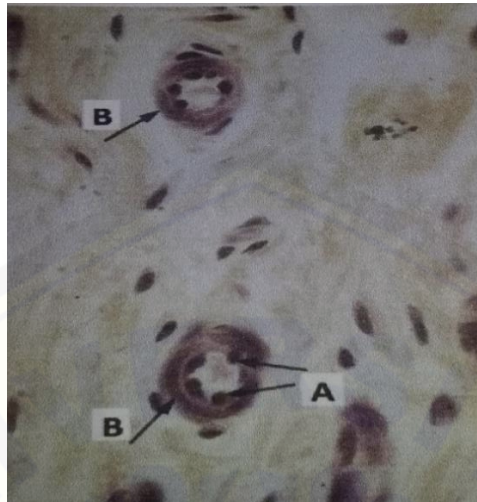
Bentuk dan ukuran tiap-tiap pembuluh darah dapat bervariasi, tergantung pada bidang potongan. Beberapa pembuluh darah dapat memperlihatkan potongan melintang atau memanjang. Semua variasi ini disebabkan oleh bidang yang berbeda pada irisan. Gambaran histologi pembuluh darah dengan potongan berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 2.4, 2.5 dan 2.6.



Gambar 2.4 Pembuluh darah (PD) pada jaringan mukokutan bibir manusia. Perbesaran 100x (H&E) (Sumber: Ross, 1985)



Gambar 2.5 Pembuluh darah (PD) pada jaringan ikat embrio manusia. Perbesaran 400x (H&E) (Sumber: Ross, 1985)



Gambar 2.6 Arterioli, Inti endotel bulat pada potongan melintang (A). Inti sel otot polos melingkari pembuluh (B) (H&E). (Sumber: Craigmyle, 1987)

2.7 Deteksi Bahan Aktif Dengan Metode *Immunohistochemistry* (IHC)

Immunohistochemistry (IHC) merupakan gabungan histologi/sitologi dan imunologi. *Immunohistochemistry* adalah suatu metode pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti-bahan aktif tersebut yang disebut antibodi. Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut di dalam jaringan (Nurhidayat, 2002).

Secara umum, bahan aktif yang diproduksi oleh tubuh baik berupa sekresi maupun ekskresi dapat dideteksi dengan menggunakan metode *immunohistochemistry*. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan sintetik. Ada beberapa syarat dari bahan aktif yang dapat dideteksi dengan metode ini yaitu bahan aktif tersebut

harus dapat membentuk antibodi yang spesifik terhadap bahan aktif tersebut bila disuntikkan ke host kedua yang berbeda dengan host tempat asal bahan aktif tersebut. Bahan aktif itu harus terakumulasi dalam jumlah yang cukup di dalam sel atau jaringan sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik dan dapat divisualisasikan (Nurhidayat, 2002).

Immunohistochemistry dapat diaplikasikan untuk pengamatan dengan mikroskop optik maupun mikroskop elektron. Dengan menggunakan mikroskop optik, keberadaan antigen di dalam sel dapat dideteksi, baik di dalam sitoplasma, inti sel dan axon pada sel-sel syaraf, juga pada jaringan ekstraseluler. Teknik ini dipakai secara luas dan merupakan teknik rutin dalam bidang anatomi. *Immunohistochemistry* sangat sesuai dipergunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu bahan aktif di dalam jaringan, sel-sel mana saja yang menghasilkan, juga dapat mendeteksi dimana bahan aktif tersebut diakumulasi. Selain dapat mendeteksi dan melokalisasi bahan-bahan aktif tersebut, sekaligus dapat memperlihatkan keadaan jaringan di tempat keberadaan bahan aktif tersebut secara utuh (Nurhidayat, 2002).

2.7.1 Antibodi

Antibodi adalah pusat dari teknik *immunohistochemistry* dalam deteksi suatu bahan aktif. Molekul antibodi berbentuk seperti huruf Y, dimana dua tangannya mempunyai sisi ikat dari antibodi yaitu Fab. Menurut Nurhidayat (2002) antibodi yang baik adalah suatu antibodi yang memenuhi beberapa syarat teknis yaitu:

1. Spesifikasi yang tinggi

Antibodi tersebut harus dapat berikatan secara spesifik dengan satu antigen saja. Antibodi ini tidak boleh mempunyai reaksi silang dengan antigen lain.

2. Titer yang cukup

Titer antibodi yang akan digunakan untuk *immunohistochemistry* harus cukup tinggi. Titer yang tinggi ini menggambarkan jumlah antibodi yang banyak dimana

jumlah antibodi yang cukup pada waktu pewarnaan *immunohistochemistry* akan dapat mengikat keseluruhan antigen yang terdapat di dalam jaringan.

3. Afinitas tinggi

Antibodi dapat berikatan dengan baik pada satu atau lebih dari sisi antigenik (epitop) spesifik dari suatu antigen.

4. Aviditas tinggi

Ikatan antara antigen-antibodi harus dalam suatu ikatan yang kuat yang tidak mudah mudah terlepas sewaktu proses pewarnaan *immunohistochemistry*.

Kedua jenis antibodi, baik antibodi monoklonal maupun poliklonal dapat dipergunakan untuk keperluan pewarnaan *immunohistochemistry*. Antibodi monoklonal adalah suatu antibodi yang murni mengandung satu jenis antibodi untuk satu sisi antigenik (epitop) yang khas dari antigen tersebut. Antibodi monoklonal biasa dipergunakan untuk reagen diagnostik dan untuk keperluan penelitian *immunohistochemistry* dengan spesifitas yang sempit, sehingga tidak memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain. Antibodi monoklonal ini sangat diperlukan untuk mendiagnosa suatu penyakit yang sangat berbahaya seperti untuk mendiagnosa jenis tumor, apakah tumor tersebut jinak atau ganas. Walaupun jenis antibodi ini mempunyai spesifitas yang tinggi karena hanya akan mengikat satu epitop saja dari antigen tersebut, sehingga penggunaan antibodi monoklonal ini sangat rawan terhadap kehilangan epitop pada antigen yang akan diikat. Proses fiksasi preparat, yang umumnya menggunakan formalin dapat mempengaruhi keberadaan epitop yang dapat bereaksi dengan antibodi tersebut, sehingga bila epitop yang spesifik terhadap antibodi tersebut hilang karena proses fiksasi, maka ikatan antara antibodi dan antigen tidak dapat terjadi. Biasanya penggunaan antibodi monoklonal untuk pewarnaan *immunohistochemistry*, titer antibodi yang digunakan lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan antibodi poliklonal (Nurhidayat, 2002).

Sedangkan antibodi poliklonal mempunyai spesifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, namun afinitasnya dalam berikatan dengan antigen lebih tinggi. Antibodi poliklonal merupakan campuran antibodi-antibodi yang berasal dari beberapa epitop spesifik dari suatu antigen, sehingga antibodi ini lebih toleran terhadap kehilangan satu atau lebih epitop spesifik akibat proses yang dilalui oleh preparat tersebut. Ikatan antara antigen dan antibodi masih mungkin terjadi dengan epitop yang masih tersisa pada antigen tersebut. Proses pembuatan antibodi poliklonal ini relatif lebih mudah dan murah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, dan umumnya lebih stabil terhadap perubahan pH dari medianya. Namun, karena antibodi poliklonal ini berasal dari beberapa epitop spesifik dari antigen maka kemungkinan terjadinya reaksi silang dengan antigen lain tetap ada, hal ini bertolak belakang dengan antibodi monoklonal, dimana antibodi ini tidak memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain (Nurhidayat, 2002).

Untuk keperluan *immunohistochemistry*, antibodi berasal dari antigen tertentu seperti hormon prolaktin mencit (host pertama), dimana hormon prolactin ini berfungsi sebagai antigen, kemudian hormon ini disuntikkan ke host yang berbeda (host kedua) biasanya menggunakan *rat*, *rabbit*, *goat*. Antibodi yang terbentuk dari hasil penyuntikan antigen tersebut disebut antibodi primer. Jika *rabbit* dipakai sebagai host kedua, maka antibodi yang terbentuk disebut *anti mouse prolactin rabbit serum* (Nurhidayat, 2002).

Antibodi primer ini dipakai untuk mengikat antigen dari mencit yang terdapat pada sayatan yang telah disiapkan. Bila antibodi primer diikatkan dengan bahan penanda, kemudian dapat digunakan untuk mewarnai hormon prolactin pada sel-sel prolactin yang terdapat di hipofisis mencit. Pada beberapa keadaan, *anti mouse prolactin rabbit serum* ini dapat memberikan reaksi positif pada sayatan hipofisis pada beberapa hewan lain seperti *rat*, hal ini disebut sebagai reaksi silang (*cross link*).

Reaksi positif dapat berarti positif sebenarnya atau positif palsu. Untuk itu apabila akan melakukan pewarnaan *immunohistochemistry* dengan menggunakan antibodi primer yang berlainan host, diperlukan suatu kontrol, dimana salah satu sayatan ditetesi dengan antibodi yang telah dinetralkan dengan antigen terhadap antibodi tersebut, sehingga apabila hanya sayatan yang dinetralkan tersebut saja yang negatif, maka sayatan yang bereaksi positif yang sebenarnya. Proses pewarnaan *immunohistochemistry* ini disebut pewarnaan *immunohistochemistry* secara langsung (Nurhidayat, 2002).

Pada pewarnaan *immunohistochemistry* tidak langsung, diperlukan suatu anti IgG dari host kedua yang disebut sebagai antibodi sekunder. Apabila menggunakan *rabbit* sebagai host kedua, maka diperlukan *rabbit* anti IgG untuk dapat berikatan dengan antibodi primer, sehingga terdapat dua tingkat ikatan antibodi; pertama antara antigen dengan antibodi primer, kedua antara antibodi primer dengan antibodi sekunder. Antibodi primer menjadi antigen bagi antibodi sekunder. Apabila antibodi sekunder diikatkan dengan bahan penanda sehingga dapat divisualisasikan dalam bentuk reaksi positif, maka proses ini disebut sebagai pewarnaan *immunohistochemistry* secara tidak langsung (Nurhidayat, 2002).

2.7.2 Kromogen

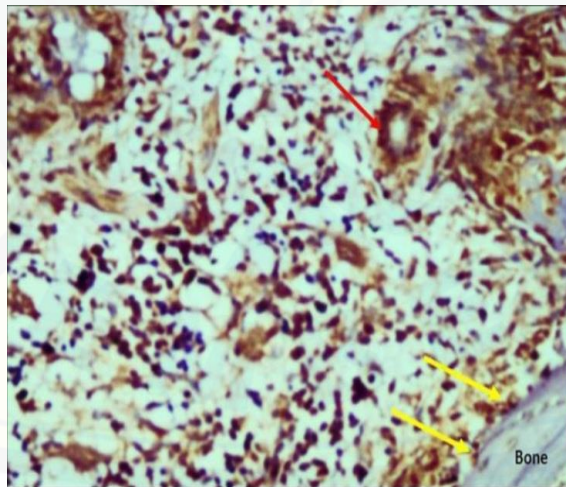
Kromogen adalah suatu zat yang dapat mem-visualisasikan substansi penanda pada ikatan immunokompleks pada pewarnaan *immunohistochemistry*. Zat ini biasanya dicampurkan dengan substrat dari enzim penanda sebelum digunakan. Diantara banyak kromogen, DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) adalah kromogen yang paling banyak digunakan. Kromogen ini dapat mem-visualisasikan warna coklat pada penggunaan penanda peroksidase. Kromogen ini juga mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida, sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna. Tetapi kromogen ini memiliki sifat

karsinogenik, untuk itu perlu hati-hati dalam penggunaannya. Zat kromogen lain adalah *3-amino-9-ethylcarbazol* yang memberikan kesan warna merah, sedangkan *4-chloro-1-naphthol* memberikan kesan warna biru tua (Nurhidayat, 2002).

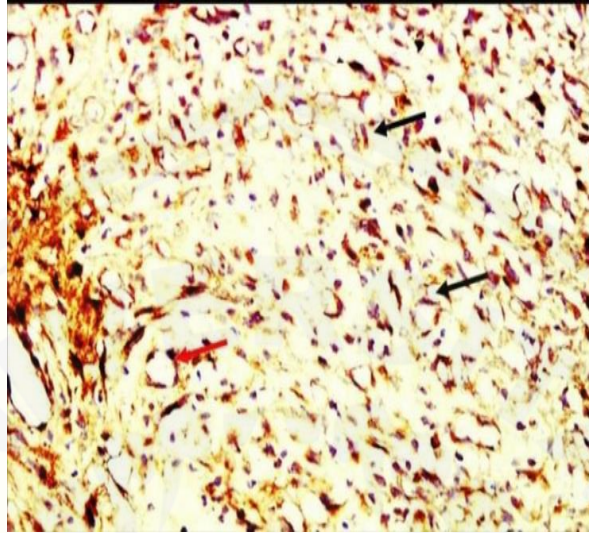
2.7.3 Counterstain

Counterstain ini bertujuan untuk mem-visualisasikan detil jaringan selain bagian yang terwarnai secara *immunohistochemistry*. Jika bagian sitoplasma sel yang terwarnai dengan *immunohistochemistry*, maka inti sel yang perlu di-*counterstain*, *haematoxilin* biasa digunakan untuk mewarnai inti sel. Sedangkan bila bagian sel yang terwarnai dengan *immunohistochemistry* adalah inti sel, maka yang perlu di-*counterstain* adalah sitoplasmanya. Dengan demikian, pewarnaan *immunohistochemistry* yang disertai dengan *counterstain* dapat menunjukkan detil lokasi immunopositif disertai detil jaringan sekitarnya (Nurhidayat, 2002).

2.8 Gambaran Histologis Pembuluh Darah dengan Pewarnaan IHC



Gambar 2.7 Immunostaining VEGF pada soket gigi pasca ekstraksi gigi hari ke-3. Sel endotel yang telah membentuk (panah merah), osteoblas (panah kuning) terwarnai coklat Perbesaran 100x (Sumber: el Hady *et al.*, 2015).



Gambar 2.8 Immunostaining VEGF pada soket gigi pasca ekstraksi gigi hari ke-7. Sel endotel yang telah membentuk lumen (panah merah) dan fibroblas (panah hitam) terwarnai coklat. Perbesaran 100x (Sumber: el Hady *et al.*, 2015).

2.9 Terapi Pencegahan Komplikasi Pasca Ekstraksi Gigi

2.9.1 Terapi insulin

Terapi insulin merupakan satu keharusan bagi penderita DM Tipe 1. Pada DM Tipe I, sel-sel β Langerhans kelenjar pankreas penderita rusak, sehingga tidak lagi dapat memproduksi insulin. Sebagai penggantinya, maka penderita DM Tipe I harus mendapat insulin eksogen untuk membantu agar metabolisme karbohidrat di dalam tubuhnya dapat berjalan normal. Walaupun sebagian besar penderita DM Tipe 2 tidak memerlukan terapi insulin, namun hampir 30% ternyata memerlukan terapi insulin disamping terapi hipoglikemik oral (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005).

Sediaan insulin saat ini tersedia dalam bentuk obat suntik yang umumnya dikemas dalam bentuk vial. Kecuali dinyatakan lain, penyuntikan dilakukan subkutan atau di bawah kulit (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005).

Penyerapan insulin dipengaruhi oleh beberapa hal. Penyerapan paling cepat terjadi di daerah abdomen, diikuti oleh daerah lengan, paha bagian atas dan bokong. Bila disuntikkan secara intramuskular dalam, maka penyerapan akan terjadi lebih cepat, dan masa kerjanya menjadi lebih singkat. Kegiatan fisik yang dilakukan segera setelah penyuntikan akan mempercepat waktu mula kerja (onset) dan juga mempersingkat masa kerja. Selain dalam bentuk obat suntik, saat ini juga tersedia insulin dalam bentuk pompa (*insulin pump*) atau *jet injector*, sebuah alat yang akan menyemprotkan larutan insulin ke dalam kulit (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005).

2.9.2 Terapi obat hipoglikemik oral (OHO)

Obat-obat hipoglikemik oral terutama ditujukan untuk membantu penanganan pasien DM Tipe II. Pemilihan obat hipoglikemik oral yang tepat sangat menentukan keberhasilan terapi diabetes. Bergantung pada tingkat keparahan penyakit dan kondisi pasien, farmakoterapi hipoglikemik oral dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau kombinasi dari dua jenis obat. Pemilihan dan penentuan rejimen hipoglikemik yang digunakan harus mempertimbangkan tingkat keparahan diabetes (tingkat glikemia) serta kondisi kesehatan pasien secara umum termasuk penyakit-penyakit lain dan komplikasi yang ada (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005).

Obat-obat hipoglikemik oral dapat dibagi menjadi 5 golongan, yaitu: sulfonilurea, meglitinida, biguanida, tiazolidindion, dan inhibitor α -glukosidase. Salah satu obat hipoglikemik oral golongan biguanida adalah metformin. Metformin masih banyak dipakai di beberapa negara termasuk Indonesia, karena frekuensi

terjadinya asidosis laktat cukup sedikit asal dosis tidak melebihi 1700 mg/hari dan tidak ada gangguan fungsi ginjal dan hati. Metformin bekerja menurunkan kadar glukosa darah dengan memperbaiki transport glukosa ke dalam sel-sel otot. Obat ini dapat memperbaiki *uptake* glukosa sampai sebesar 10-40%. Menurunkan produksi glukosa hati dengan jalan mengurangi glikogenolisis dan glukoneogenesis (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2005).

2.9.3 Terapi bahan alternatif

Beberapa tahun terakhir, cara diagnosa dan perawatan suatu penyakit dengan menggunakan obat-obatan modern berkembang sangat pesat. Namun, banyak penyakit yang tidak sembuh dengan obat-obatan modern. Selain itu, beberapa obat memiliki efek samping yang cukup serius. Pada situasi seperti ini, masyarakat mulai melirik pengobatan tradisional dan herbal. Jintan hitam (*Nigella sativa*) merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai obat berbagai penyakit. Jintan hitam berkhasiat sebagai anti-kanker, anti-inflamasi, immunomodulasi, dan anti-diabetik (Bamosa, 2015).

Efek anti-diabetik jintan hitam muncul melalui beberapa jalur, jalur pertama adalah dengan memperkuat pengeluaran insulin dari pankreas yang disebabkan karena jintan hitam mempunyai efek protektif terhadap kerusakan sel beta pankreas dan menjaga integritas sel pankreas. Selain itu, jintan hitam juga bekerja dengan cara meningkatkan proliferasi dan regenerasi sel beta pankreas yang telah rusak (Khader, 2012).

Thymoquinone (TQ) merupakan komponen terbanyak (30-48%) dari *essential oil* jintan hitam. *Thymoquinone* berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah. *Thymoquinone* dalam jintan hitam dapat meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan tubuh dan memperbaiki kerusakan sel β pankreas sehingga meningkatkan sekresi

insulin (Kanter *et al.*, 2003; Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2008). Selain itu, *Thymoquinone* juga berperan dalam mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dalam proses penyembuhan luka melalui peningkatan aktivitas protease dan migrasi sel endotel. Protease bekerja dengan menghancurkan jaringan yang rusak pada sekitar luka sebagai jalan migrasi sel endotel, mendorong migrasi dan proliferasi sel endotel, dan secara langsung membentuk tubulus pembuluh darah dari populasi sel endotel yang sedang berkembang (Omran, 2014).

2.9.3.1 Deskripsi Tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Nigella sativa merupakan tanaman tahunan yang berasal dari wilayah Mediterania. Di beberapa Negara tanaman ini memiliki nama yang berbeda-beda, di Inggris biasa disebut *black cumin*, di Arab disebut Habbatussauda dan di India dikenal dengan nama Kalonji. *Nigella sativa* memiliki rasa yang pahit dan pedas, biasanya digunakan sebagai rempah-rempah masakan. Selain itu, *Nigella sativa* telah lama dikenal dan digunakan secara tradisional untuk pengobatan di negara-negara seperti Arab, India dan Eropa. Sebagai bahan obat alami, jintan hitam dapat mengobati berbagai macam penyakit diantaranya asma, hipertensi, diabetes, radang, batuk, bronkitis, sakit kepala, demam dan influenza. Tumbuhan ini tumbuh hingga mencapai tinggi 20-30 cm, dengan daun hijau lonjong, ujung dan pangkal runcing, tepi beringgit dan pertulangan menyirip. Bunganya majemuk, bentuk karang, kepala sari berwarna kuning, mahkota berbentuk corong berwarna antara biru sampai putih, dengan 5-10 kelopak bunga dalam satu batang pohon (Ramadan, 2007).

Taksonomi *Nigella sativa* menurut Tjitrosoepomo (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom : *Tracheobionta*

Divisi : *Spermatophyta*

Subdivisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida dicotyledon*

Subkelas : *Magnolidae*

Ordo : *Ranunculales*

Famili : *Ranunculaceae*

Genus : *Nigella L*

Spesies : *Nigella sativa*



Jintan Hitam - *Nigella Sativa* Linn

Gambar 2.9 Bunga dan biji jintan hitam (Sumber: Ramadan, 2007)

Biji *Nigella sativa* mengandung 36-38% *fixed oil*, protein, tannin, alkaloid, saponin dan 0,4%-2,5% minyak esensial yang bersifat *folatile* (mudah menguap).

Minyak *Nigella sativa* memiliki kandungan zat aktif *thymoquinone*, *dithymoquinone*, *thymohydroquinone*, dan *thymol*. *Thymoquinone* adalah zat aktif utama dari *volatile oil* (minyak atsiri) *Nigella sativa*. *Thymoquinone* berfungsi sebagai anti-inflamasi dengan cara menghambat jalur siklo-oksigenase dan lipooksigenase yang berfungsi sebagai mediator alergi dan peradangan (Ringga, 2012). *Thymoquinone* berfungsi dalam tubuh sebagai anti inflamasi dan juga antimikroba. *Thymoquinone* merupakan derivat dari *quinine* dimana ada unsur *thymol* didalamnya. *Thymol* sendiri telah diteliti memiliki aktivitas sebagai suatu antibakteri (Adhiba, 2009).

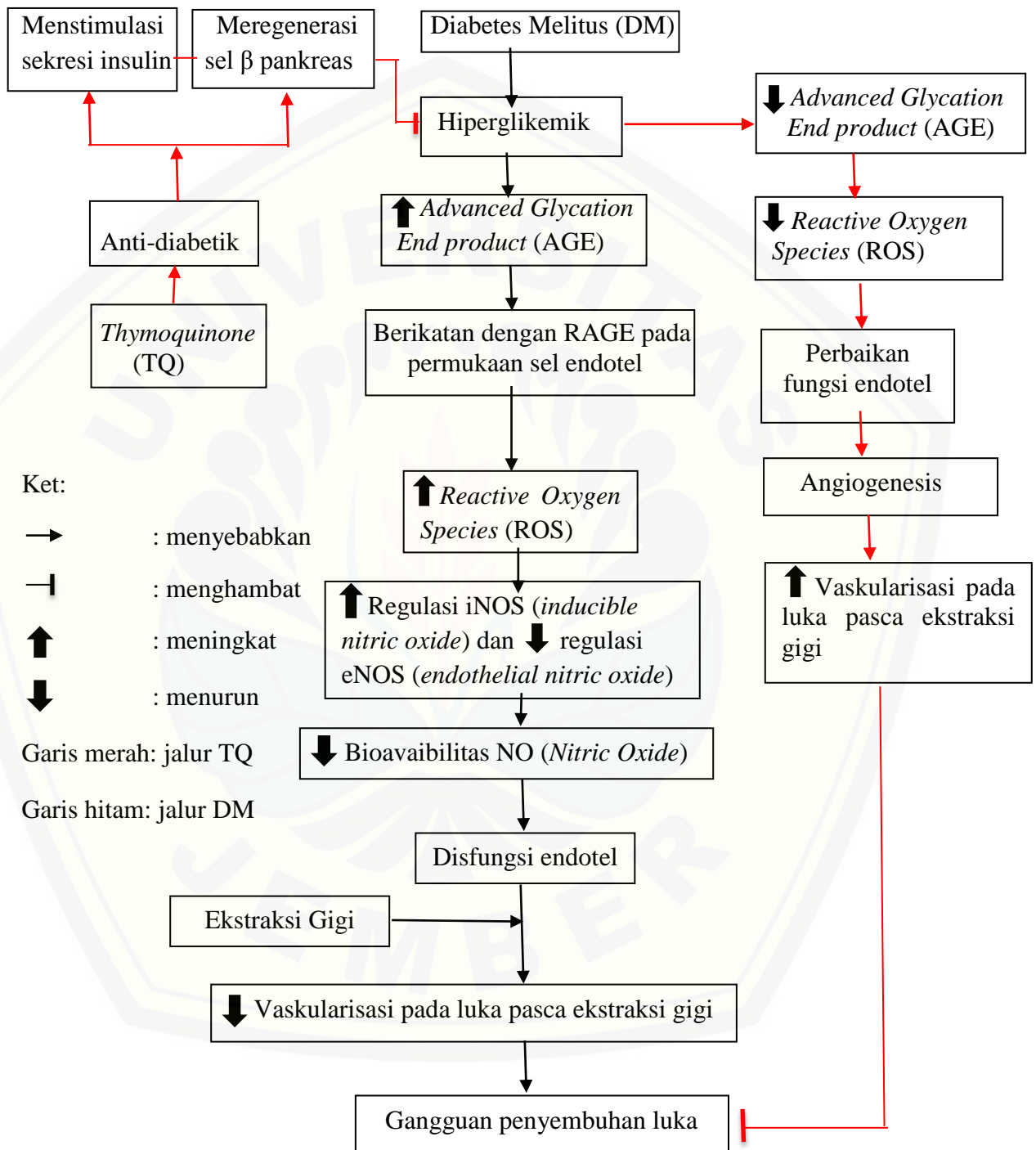
2.10 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin atau 2-Deoxy-2-[[*(methylnitrosoamino)-carbonyl*amino]-*D-glucopyranose* adalah salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat mendestruksi sel β pankreas. Secara struktur, STZ adalah derivat *N-nitrosurea* dari *D-glukosamin* yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* (Raza dan John, 2013). STZ ini dapat juga disebut sebagai salah satu agen anti-neoplastik sintetik yang digunakan untuk obat kemoterapi pada kanker, khususnya kanker pulau Langerhans pankreas (Akbarzadeh *et al.*, 2007).

STZ memiliki banyak sekali pengaruh terhadap proses biologis yaitu seperti produksi kerusakan sel akut dan kronik, karsinogenik, teratogenik, dan mutagenesis. Biasanya zat ini digunakan untuk menginduksi hewan percobaan menjadi mirip dengan kondisi diabetes. Dosis yang sering digunakan antara 40-60 mg/kg intravena namun efektif juga melalui intraperitoneal dengan dosis yang sama. Kerja dari STZ ini secara langsung membuat kerusakan pada proses degranulasi dan menurunkan kapasitas sekresi insulin pada sel β pankreas dengan menggunakan GLUT-2 sehingga dapat menyebabkan kerusakan DNA (Zafar dan Naqvi, 2010; Tian *et al.*, 2010).

Saat STZ berada dalam sel, akan meningkatkan *guanilil siklase* dan menambah formasi cGMP dan membebaskan nitrit oksida. Nitrit oksida merupakan stres oksidatif yang dapat merusak sel. Kemudian adanya defosforilasi ATP meningkatkan substrat *xantin oksidase* dimana sel β sangat peka terhadap enzim ini. *Xantin oksidase* akan memproduksi hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Akhirnya gabungan antara nitrit oksida dan macam-macam zat oksigen reaktif tersebut mengakibatkan fragmentasi DNA (Szkudelski, 2001). Selain itu, STZ dapat merusak DNA dengan proses metilasi DNA yang akan membentuk ion karbonium (CH_3^+) kemudian mengaktifkan enzim PARP. Dengan adanya aktivasi dari PARP, dalam upaya memperbaiki DNA yang rusak, akan menyebabkan deplesi NAD^+ dan persediaan ATP yang akhirnya terjadi nekrosis dari sel β pankreas (Eleazu *et al.*, 2013).

2.11 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.10 Kerangka Konsep Penelitian

Penjelasan kerangka konsep:

Diabetes melitus (DM) menyebabkan kondisi hiperglikemik yang akan meningkatkan AGEs. Ketika AGEs berikatan dengan reseptornya yaitu RAGE pada permukaan sel endotel maka terjadi peningkatan ROS. Peningkatan ROS akan menyebabkan peningkatan regulasi iNOS dan penurunan regulasi eNOS sehingga bioavailabilitas NO menurun dan berakibat terjadinya disfungsi endotel. Pada kondisi ini apabila dilakukan tindakan ekstraksi gigi dapat menyebabkan penurunan vaskularisasi pada luka pasca ekstraksi gigi sehingga menyebabkan gangguan penyembuhan luka.

Ekstrak *Thymoquinone* (TQ) yang bertindak sebagai anti-diabetik bekerja dengan cara menstimulasi sekresi insulin dan meregenerasi sel β pankreas diharapkan dapat memperbaiki kondisi hiperglikemik pada DM, sehingga terjadi penurunan AGEs yang diikuti dengan penurunan ROS. Penurunan AGEs dan ROS ini diharapkan dapat memperbaiki fungsi endotel melalui pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) sehingga terjadi peningkatan vaskularisasi pada luka pasca ekstraksi gigi dan gangguan penyembuhan luka dapat dihambat.

2.12 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka tersebut, dapat diambil hipotesis pemberian ekstrak *Thymoquinone* efektif dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) soket gigi pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *post test with control group design*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Bagian Biomedik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk proses perlakuan hewan coba. Untuk tahapan pemrosesan dan pengecatan jaringan dengan metode HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Untuk pengecatan dengan metode IHC dan penghitungan ekspresi VEGF sel endotel dan monosit dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-September 2016.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus putih galur Wistar (strain *Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan.

3.3.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria sampel dalam penelitian ini meliputi:

1. Kriteria inklusi
 - a. Tikus jenis Wistar (strain *Rattus norvegicus*)
 - b. Jenis kelamin jantan
 - c. Umur 2-3 bulan
 - d. Berat badan 150-250 gram
 - e. Kondisi sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dari tikus dan tidak ada cacat fisik.
2. Kriteria eksklusi
 - a. Kadar gula darah tikus <250 mg/dL.
 - b. Tikus mati selama pemberian perlakuan.
 - c. Jika hari ke 1-3 pasca induksi STZ, KGD tikus belum menunjukkan hiperglikemia.

b. 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 sub-kelompok yang disesuaikan dengan waktu *euthanasia* hewan coba yaitu hari ke-3, 7, dan 10 pasca ekstraksi gigi. Jumlah sampel minimum dihitung dengan menggunakan rumus Federer = $[(t-1)(n-1)] \geq 15$ (Ridwan, 2013).

Keterangan:

n = besar sampel dalam kelompok

t = jumlah kelompok (9 sub-kelompok)

Penghitungan:

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

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

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$n \geq 2,9$ dibulatkan menjadi 3.

Berdasarkan perhitungan rumus diatas, didapatkan 3 ekor tikus setiap sub-kelompok. Sehingga besar sampel dalam tiap kelompok adalah 9 ekor tikus dan jumlah sampel keseluruhan adalah 27 ekor tikus.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

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

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pembentukan pembuluh darah baru sebagai penanda angiogenesis yang diamati melalui jumlah ekspresi VEGF sel endotel dan monosit pada soket gigi pasca ekstraksi gigi.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba meliputi umur, berat badan, jenis kelamin, jenis tikus.
- b. Pemeliharaan tikus selama masa adaptasi dan perlakuan meliputi pemberian makan dan minum, jenis makanan dan minuman yang diberikan, kebersihan kandang, dan pemantauan kesehatan tikus.
- c. Dosis pemberian ekstrak *thymoquinone* (TQ), metformin, dan STZ.
- d. Prosedur penelitian.

3.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian

3.5.1 Ekstrak *thymoquinone* (TQ)

TQ adalah salah satu bahan aktif dalam kandungan minyak esensial jintan hitam. Ekstrak TQ yang digunakan adalah produk dari Sigma Aldrich (St. Louis, MO,

USA) dengan sediaan bentuk kristal. Dosis yang diberikan adalah dosis yang efektif sebagai anti-diabetik yaitu sebanyak 80 mg/kg BB (Pari dan Sankarayana, 2009) TQ akan dilarutkan ke dalam minyak zaitun karena sifatnya yang larut dalam lemak (Al-Ali *et al.*, 2008).

3.5.2 Induksi *streptozotocin* untuk membuat model tikus DM

Tikus diinjeksi *streptozotocin* (STZ) secara intravena pada ekor tikus sebanyak 50 mg/kg BB. STZ yang digunakan adalah produk Bioworld (USA) dengan sediaan bubuk. STZ bersifat toksisitas spesifik terhadap sel β pankreas dengan meningkatkan stres oksidatif pada sel sehingga sering digunakan untuk menginduksi diabetes tipe I pada hewan coba (Szkudelski, 2001).

3.5.3 Ekstraksi gigi

Ekstraksi gigi adalah pencabutan gigi molar satu kiri rahang bawah dibawah anestesi umum yang dilakukan dengan menggunakan sonde setengah lingkaran dan *artery clamp* yang dilanjutkan dengan perluasan luka menggunakan mikromotor *low speed* dan *diamond round bur* no. 1 dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 detik sehingga kondisi soket gigi tikus pasca ekstraksi menyerupai kondisi soket gigi manusia pasca ekstraksi gigi (Pawestri *et al.*, 2015).

3.5.4 Angiogenesis

Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru diamati melalui ekspresi VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Ekspresi VEGF adalah endapan sitoplasmik berwarna coklat pada sel endotel pada sediaan histopatologi yang dicat menggunakan immunohistokimia. Jumlah ekspresi VEGF dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma sel endotel dan monosit yang terwarnai coklat dan telah membentuk lumen. Sel endotel bentuknya memanjang dengan sedikit juluran sitoplasma dan berinti gepeng. Sedangkan monosit memiliki inti besar berbentuk oval

atau berlekuk. Untuk mengurangi subyektifitas pengamatan dilakukan oleh dua orang pengamat (Zlobec *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2014; Eroschenko, 2003).

3.6 Bahan dan Alat Penelitian

3.6.1 Bahan

1. Pakan standar hewan coba (Turbo, Indonesia) dan air minum
2. *Streptozotocin* (Bioworld, USA)
3. Ekstrak *thymoquinone* (Sigma Aldrich, USA),
4. Minyak zaitun (Bertolli, Italia)
5. Metformin 500 mg (Hexapharm, Indonesia)
6. Larutan *buffer* formalin 10% (Makmur Jaya, Indonesia)
7. Larutan *buffer* asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (FMIPA Biologi Unej, Indonesia)
8. Bahan *embedding* (McCormick-Scientific, USA)
9. Paraffin (Merck KgaA, Germany)
10. Asam formiat 1% (Merck KgaA, Germany)
11. Alkohol 100%, 95%, 80%, 75%, 70%
12. Alkohol absolut (Novapharin, Indonesia)
13. Xylol (Merck KgaA, Germany)
14. Akuades steril (Aditama Raya Farmindo, Indonesia)
15. Eosin (FK UGM, Indonesia)
16. Entellan (Merck KgaA, Germany)
17. *Phosphat Buffer Saline* (PBS) (pH 7,6)
18. *Citrat Buffer*, 0,01 M, pH 6.0, Sodium Citrate 3g, Citric acid 0,4g.
19. *Blocking serum* (kit)
20. Streptavidin peroksidase
21. *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB)
22. *Harry's Hematoxillin* (Gamma Scientific Biolab, Indonesia)

23. Hidrogen peroksida 3%
24. Antibodi primer VEGF
25. Antibodi sekunder biotin
26. Gliserin
27. Eter (Merck KgaA, Jerman)
28. Bahan sterilisasi yaitu, kapas, *cotton bud*
29. Ketamin 100 mg (KTM-100, Indonesia)
30. Povidone-Iodine (Indonesia)

3.6.2 Alat

1. Kandang tikus (Citra Plastics, Indonesia)
2. Tempat makan dan minum
3. Timbangan berat badan tikus (Camry EK 3650, China)
4. Timbangan digital (Pioneer, Ohaus Corp., USA)
5. Glukometer *Easy Touch* (GCU, Indonesia)
6. Strip tes glukosa (GCU, Indonesia)
7. Sonde lambung (Fakultas Farmasi Unej, Indonesia)
8. *Eppendorf* (Makmur Jaya, Indonesia)
9. *Disposable syringe 27 G 1 ml* (Onemed, Indonesia)
10. Excavator, sonde setengah lingkaran, *scalpel*, *arteri clamp*, pinset
11. Mikromotor *contra angle low speed*
12. *Diamond round bur no.1* (Edents, Switzerland)
13. Toples plastik
14. Pot jaringan (Makmur Jaya, Indonesia)
15. Kuas, kertas saring, label identitas
16. Mesin *processing* jaringan (Tissue Tek VIP 5 Jr, Jepang)
17. *Tissue cassette* (Jepang)
18. *Block mould* (Thermo Shandon, UK)

19. Pisau mikrotom
20. *Microtome Holder* (Feather, Jepang)
21. *Waterbath* (Memmert, Schwabach)
22. *Slide warmer* (Tissue Tek, Jepang)
23. *Deck glass* (Menzel Glaser, Jerman)
24. *Object glass* (Citoplus, China)
25. Wadah baskom
26. *Staining jar*
27. Mikroskop cahaya (Olympus CX21, Japan)
28. Kamera mikroskop optilab (Olympus CX41RF, Olympus DP 20, Japan)

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ethical Clearance

Sebelum penelitian, dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.7.2 Persiapan hewan coba

Sebanyak 27 ekor tikus wistar jantan diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu. 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 sebelum dilakukan penelitian (homogenitas) serta memenuhi kriteria penelitian.

3.7.3 Pembuatan larutan perlakuan

1. Larutan *streptozotocin* (STZ)

50 mg/kg BB STZ dilarutkan dalam 50 mg/ml larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Larutan harus dipersiapkan kurang dari 5 menit sebelum diinjeksikan karena sifatnya yang tidak stabil. Penghitungan

dosis volume larutan yang diberikan pada hewan coba dapat dilihat di Lampiran B.

2. Larutan *thymoquinone* (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 yaitu \pm 1,5 ml. Larutan TQ dipersiapkan dalam *ependorf* (Turner *et al.*, 2011; al-Ali *et al.*, 2008). Penghitungan dosis dan volume larutan yang diberikan pada hewan coba dapat dilihat di Lampiran B.

3. Larutan metformin

Bubuk metformin ditimbang sesuai dosis 100 mg/kg BB dan dilarutkan ke dalam *ependorf* berisi 1,5 ml aquadest (Cheng *et al.*, 2006). Penghitungan dosis dan volume larutan yang diberikan pada hewan coba dapat dilihat di Lampiran B.

3.7.5 Induksi *Streptozotocin*

1. Berat badan awal tikus ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan dosis STZ yang diberikan.
2. Sebelum diinjeksi STZ, tikus dipuasakan selama \pm 12 jam dan tetap diberi minum (Akbarzadeh *et al.*, 2007).
3. Kadar glukosa darah awal diukur menggunakan alat Glucometer. Pangkal ekor tikus dilukai dengan *scalpel* kemudian sampel darah diambil dari vena ekor. Setelah darah keluar, *test strip* ditempelkan di ujung ekor (Ayala *et al.*, 2010).
4. Larutan STZ diinjeksi sesuai dosis secara intravena pada ekor tikus. Penghitungan dosis dan volume yang diberikan dapat dilihat di Lampiran B.
5. 30 menit setelah induksi, tikus diberikan larutan glukosa untuk mengatasi syok hipoglikemik akibat induksi STZ (Pari dan Sankarayana, 2009).

6. Pada hari ke-1 pasca injeksi STZ, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Sampel darah diambil seperti cara sebelumnya (lihat poin 3).
7. Tikus dengan kadar glukosa darah ≥ 250 mg/dL dikategorikan DM.

3.7.6 Pengelompokan hewan dan perlakuan

1. Hewan coba dengan kondisi DM dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok K (Kontrol), kelompok P1 (Perlakuan 1) dan kelompok P2 (Perlakuan 2) yang masing-masing terdiri dari 9 ekor tikus. Setiap kelompok dibagi kembali menjadi 3 subkelompok berdasarkan waktu *euthanasia*, yaitu subkelompok hari ke-3, 7, dan 10 pasca ekstraksi gigi.
2. Perlakuan yang diberikan yaitu:
 - a. Kelompok K diberikan 1,5 ml aquadest steril secara sondasi 1x1 selama 17 hari.
 - b. Kelompok P1 diberi perlakuan 1,5 ml larutan TQ secara sondasi 1x1 selama 17 hari dengan dosis sesuai berat badan tikus. Perhitungan dosis dapat dilihat di Lampiran B.
 - c. Kelompok P2 diberi perlakuan 1,5 ml larutan Metformin secara sondasi 3x1 selama 17 hari dengan dosis sesuai berat badan tikus. Perhitungan dosis dapat dilihat di Lampiran B.
3. Kadar glukosa darah diukur menggunakan alat Glukometer pada hari ke-1 (saat dipastikan positif DM), 7, 10, 14 dan 17. Pangkal ekor tikus dilukai dengan *scalpel* kemudian sampel darah diambil dari vena ekor. Setelah darah keluar, *test strip* ditempelkan ujung ekor (Ayala *et al.*, 2010).
4. Pada hari ke-7 dilakukan pencabutan gigi molar satu kiri rahang bawah pada semua kelompok tikus. Tahapannya yaitu:
 - a. Tikus dianestesi menggunakan larutan ketamin dengan dosis 0,1 ml/100 gr BB yang diinjeksikan secara intramuskular (Gorustovich *et al.*, 2008).

- b. 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*.
- c. Luka pada soket diperluas dengan melakukan pengeboran pada soket menggunakan *low speed bur* dengan bur berbentuk *round end* no 1 dengan kecepatan 5000 rpm dengan waktu 2 detik. Pengeboran dilakukan dengan memutar mata bur satu pada dinding soket dan dasar soket. Tujuannya adalah mendapatkan homogenitas luka pada setiap tikus dan mencegah sembuhnya luka sebelum proses penelitian selesai (Pawestri *et al.*, 2015).

3.7.6 *Euthanasia* hewan coba

1. Pada hari ke-10, 14, dan 17 pasca ekstraksi gigi, 3 ekor tikus dari tiap kelompok dilakukan *euthanasia* menggunakan teknik inhalasi.
2. Tikus dimasukkan ke dalam toples kaca yang di dalamnya terdapat kapas yang dibasahi larutan eter. Toples ditutup rapat untuk beberapa saat hingga tikus mati.
3. Rahang bawah kiri dipotong dengan melakukan insisi mulai sudut mulut ke arah posterior sampai rahang bawah terlepas dari tengkorak.

3.7.7 Pembuatan preparat jaringan

Tahap pemrosesan jaringan menurut Syafriadi *et al.*, (2008) adalah sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel sediaan

Pemotongan rahang bawah kiri tikus pada region posterior sebesar soket gigi pasca ekstraksi molar satu. Jaringan difiksasi dengan menggunakan larutan formalin 10% selama minimal 12-18 jam untuk mencegah terjadinya autolisis,

mempertahankan morfologi dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci dengan air mengalir.

2. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi dilakukan dengan memakai larutan asam formiat 10% selama 7 hari.

3. Pemrosesan Jaringan

Tahapan pemrosesan jaringan adalah sebagai berikut:

a) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 jam.

b) *Clearing*

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan *xylol* sebanyak 3 kali pada 3 tabung yang berbeda dengan ketentuan waktu 1 jam pada tabung pertama dan 2 jam pada tabung kedua dan ketiga.

c) Impegnasi

Impegnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56-60° C. Caranya jaringan diletakkan di dalam biopsi *cassette* kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu parafin 56-60° C selama 2x3 jam.

d) *Embedding*

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu parafin. Tahapan antara lain:

1. Mempersiapkan alat cetak blok parafin (*base mould*), letakkan alat diatas permukaan yang rata. Alat dan alas diolesi gliserin untuk

mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok parafin yang sudah beku.

2. Menuangkan parafin cair kedalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi pada posisi yang sesuai sehingga nantinya didapatkan potongan dengan penampang bukal dan lingual. Ditunggu beberapa menit sampai parafin beku.
3. Parafin blok siap dipotong setelah dilepas dari alat cetakan.

e) Penyayatan

Penyayatan blok parafin dengan menggunakan mikrotom. Sebelum penyayatan jaringan, alat yang perlu dipersiapkan antara lain *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*. Tahapan penyayatan jaringan antara lain:

1. Penyayatan menggunakan mikrotom, sebelumnya dibersihkan pisau mikrotom dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan *xylol* arah tegak lurus.
2. Mengatur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6 mikron atau sesuai kebutuhan.
3. Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperature 56-58°C hingga sayatan mekar.
4. Mengambil sayatan yang sudah mekar dengan *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*, dikeringkan dengan suhu 30-35°C minimal selama 12 jam.

4. Pengecatan jaringan dengan teknik *Haematoxilin dan Eosin (H&E)*

Pengecatan preparat jaringan dilakukan dengan tahapan:

1. Deparafinisasi dengan menggunakan *xylol*, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 2-3 menit lalu diulangi dengan memasukkan kembali ke dalam wadah yang berbeda selama 2-3 menit.

2. Rehidrasi dengan larutan alkohol 100% dan 95% selama 3 menit.
 3. Preparat dibilas dengan air mengalir selama 10-15 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat untuk menghilangkan semua kelebihan alkohol.
 4. Preparat diwarnai dengan warna *Hematoxillin Mayer's* selama 15 menit.
 5. Bilas ulang dengan air mengalir selama 20 menit.
 6. Preparat direndam *eosin* selama 15 detik sampai 2 menit.
 7. Dehidrasi kembali dengan konsentrasi meningkat 95% dan 100% masing-masing 2-3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah yang berbeda.
 8. Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* tiga kali masing-masing 3 menit dengan wadah yang berbeda.
 9. *Mounting* menggunakan cairan *Entellan* lalu ditutup dengan *deck glass*.
5. Pengecatan Jaringan dengan *Immunohistochemistry* (IHC)

Prosedur pewarnaan dengan *immunohistochemistry* yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya adalah sebagai berikut:

1. Deparafinisasi dan rehidrasi slide
 - a. Deparafinisasi dengan *xylene* I, II, dan III masing-masing selama 3 menit.
 - b. Rehidrasi dengan alkohol 100%, 95%, dan 70% masing-masing selama 2 menit, 2 menit, satu menit, dan terakhir dengan air selama 1 menit.
2. Slide direndam dalam larutan 3% hidrogen peroksida selama 10 menit pada suhu ruangan.
3. Slide direndam pada *blocking serum* selama 10 menit pada suhu ruangan.
4. Slide diinkubasi dengan antibodi primer VEGF pada suhu 4°C selama 1 malam, atau pada suhu 37°C selama 1,5 jam.

5. Slide dibilas dengan *phospate buffer saline* (PBS) selama 5 menit.
6. Slide diinkubasi dengan antibodi sekunder biotin selama 10 menit pada suhu ruangan.
7. Slide dibilas dengan PBS selama 5 menit.
8. Slide diinkubasi dengan Streptavidin peroksidase selama 10 menit pada suhu ruangan.
9. Slide dibilas dengan PBS selama 5 menit.
10. Slide diinkubasi dengan larutan *diaminobenzinidase* (DAB) selama 10 menit.
11. Slide diberi *counterstain* dengan *Haematoxylin* selama 3-5 menit.
12. Slide dicuci dengan air mengalir.
13. Slide dibersihkan dan ditetesi dengan *mounting media*.
14. Slide ditutup dengan *coverslip*.

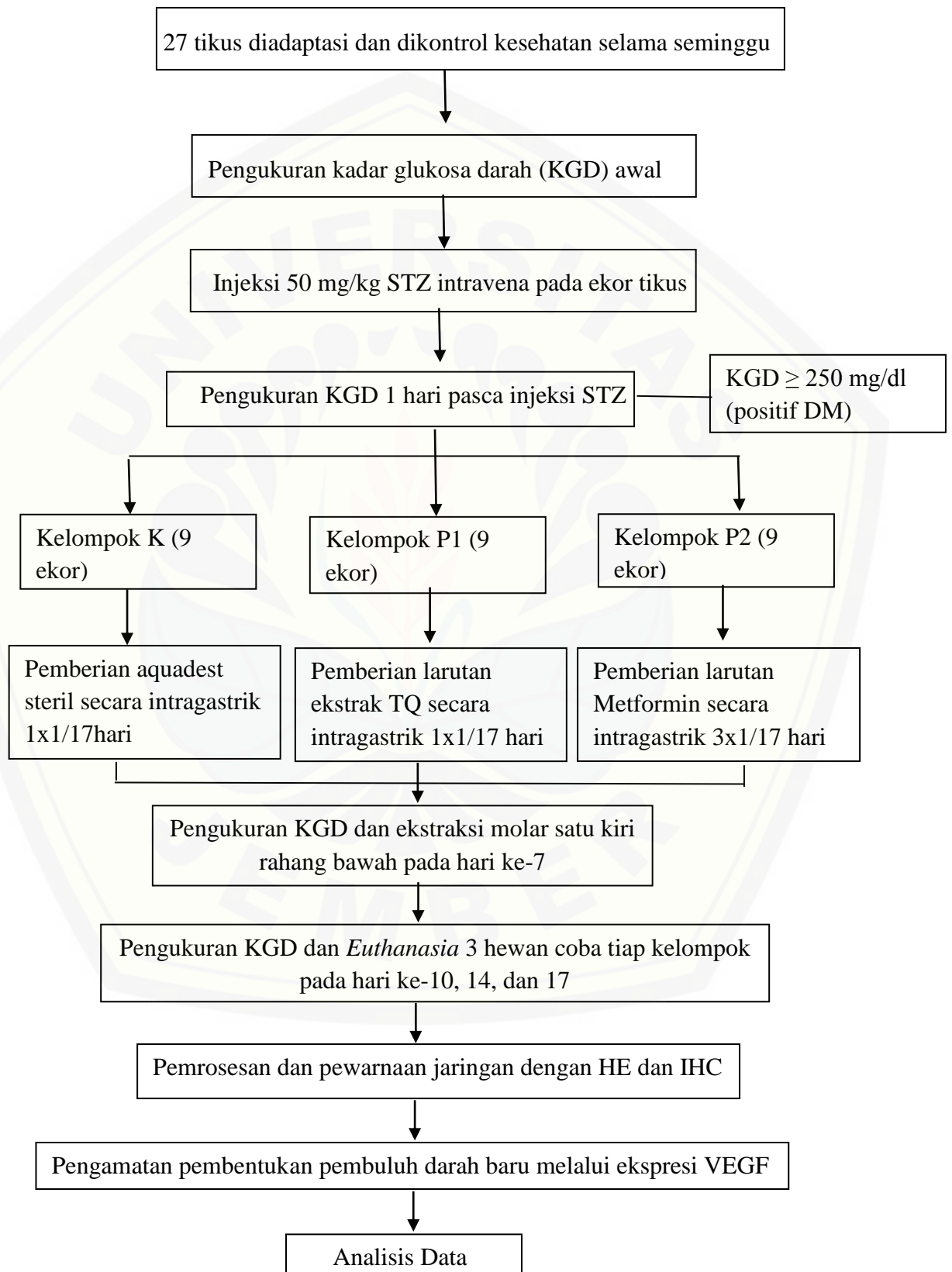
3.8 Prosedur Pengamatan Ekspresi VEGF

Pengamatan dan perhitungan jumlah ekspresi VEGF dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan menggunakan metode perhitungan ekspresi VEGF pada sel endotel dan monosit pada 1/3 apikal soket gigi (mesial dan distal) yang dilakukan dengan cara menurut Soini *et al.*, (1997) dan Pizem dan Cor (2003) sebagai berikut:

1. Penelitian ini menggunakan jaringan soket gigi pasca ekstraksi
2. Dengan nilai konfiden interfal 90% dan kekuatan uji 80% maka dengan desain eksperimental, bahwa subjek penelitian harus terdiri dari 27 sampel
3. Terdapat 27 slide, yang terdiri dari 27 replikasi x 3 kelompok pemeriksaan

4. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μm , kemudian dideteksi immunohistokimia terhadap ekspresi VEGF untuk melihat jumlah sel endotel dan monosit yang mengekspresikan protein VEGF
5. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sampel kelompok apa (*Blinding method*)
6. Pemeriksa terdiri dari 2 orang, dan dilakukan penghitungan 2x.
7. Pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa.
8. Pemeriksaan dan perhitungan ekspresi protein VEGF diamati ekspresinya dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel endotel dan monosit, yang dihitung pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang.
9. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
10. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.10 Analisa Data

Data hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas menggunakan tes *Kolmogorov Smirnov* dan uji homogenitasnya *Levene test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p > 0,05$), jika data yang diperoleh terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok, maka dilakukan uji beda dengan LSD (*Least Significance Difference*) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen ($p > 0,05$), analisis data yang digunakan adalah uji statistik non-parametrik yaitu *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing kelompok nilai signifikan (Notoatmojo, 2002).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan pemberian ekstrak *Thymoquinone* jintan hitam efektif dapat meningkatkan proses pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) soket gigi pasca ekstraksi gigi pada model tikus diabetes melalui mekanisme penurunan KGD yang diduga menurunkan produksi AGEs sehingga mengurangi interaksi AGEs-RAGE dan perbaikan fungsi endotel.

5.2 Saran

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

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu yang lebih lama hingga proses penyembuhan luka selesai untuk menganalisis pengaruh pemberian *Thymoquinone* terhadap kecepatan penyembuhan luka pada kondisi diabetes.
2. Perlu dilakukan pemberian metformin yang diberikan dalam kondisi puasa sehingga efek penurunan KGD-nya lebih optimal dengan memperhatikan waktu paruh obat metformin yaitu pemberian dilakukan per 8 jam.
3. Perlu dilakukan pengontrolan terhadap banyaknya pemberian pakan dan minum.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmeguid, Fakhoury, Kamal dan Wafai. 2010. Effect of Nigella Sativa and Thymoquinone on Biochemical and Subcellular Changes in Pancreatic B-cells of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes* 2:256-266.
- Adhiba, R. 2009. *Obat Kumur Jintan Hitam (Nigella sativa) 17,5% Terhadap Penurunan Gingivitis*. Surabaya: FKG Unair.
- Akbarzadeh, Norouzian, Mehrabi, Jamshidi, Farhangi, Verdi, Modifian dan Rad. 2007. Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(2): 60-64.
- Al-Ali, Alkhawajah, Randhawa dan Shaikh. 2008. Oral and Intraperitoneal LD_{50} of Thymoquinone, an Active Principle of Nigella sativa, in Mice and Rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 20(2):25-27.
- Alcher, Erturk dan Heath. 2002. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants. *J Exp Bot* 53(372): 1331-1341.
- Al-Farabi, M.J. 2013. Antibodi terhadap *Advanced Glycation End Product*, Cara Mutakhir Pencegahan Komplikasi Diabetes Melitus. *CDK-210* 40(11):807-813.
- American Diabetes Association. 2013. Standart of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 36(Supplement 1):S11-S66.
- Archer, W.H. 1975. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 5th ed. Philadelphia: Saunders Company.
- Ayala, J., T.V. Samuel, J.G. Morton, S. Obici, M.C. Croniger, I.G. Shulman, H.D. Wasserman dan P.O. McGuinness. 2010. Standart Operating Procedures for Describing and Performing Metabolic Test of Glucose Homeostatis in Mice. *Dis Model Mech* 3(9-10):525-534.

- Aydin, M., A. Kocarlan, S. Kocarlan, A. Kucuk, I. Eser, H. Sezen, E. Buyukrifat dan A. Hazar. 2015. Thymoquinone Protects end Organs from Abdominal Aorta Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model. *Cardiovascular* 30(1): 77-83
- Bamosa, A.O. 2015. The Hipoglycemic Effect of Nigella Sativa and Thymoquinone. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences* 3(1): 2-7.
- Bao, P., A. Kodra, A. Tomic-Canic, M. Golinko, M. S. Ehrlich dan H. P. Brem. 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research* 153:347-358.
- Benhaddou-Andaloussi, A., L.C. Martineau, D. Spoor, T. Voung, C. Leduc, E. Joly, A. Burt, B. Meddah, A. Settaf, J. T. Arnason, M. Prentki dan P. S. Haddad. 2008. Antidiabetic Activity of Nigella Sativa Seed Extract in Cultured Pancreatic β -cells, Skeletal Muscle Cells, and Adipocytes. *Pharmaceutical Biology* 96-104.
- Black, J.M. 2001. *Medical Surgical Nursing*. Philadelphia: Saunders Company.
- Campos, P.P., S.P. Andrade, N.B. Pereira, I.X. Barbosa, A.C. Vasconcelos dan T. Oviedo-Socarras. 2014. Diabetes Alters Imflammation, Angiogenesis, and Fibrogenesis in Intraperitoneal Implants in Rats. *National Center for Biotechnology Information* 9:23-93.
- Cheng, Huang, Liu, Tzeng dan Chang. 2006. Original Article Novel Mechanism for Plasma Glucose-Lowering Action of Metformin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *DIABETES* 55:819-852.
- Corwin, E.J. 2007. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi III. Alih bahasa oleh Nike Budhi Subekti. Jakarta: EGC.
- Craigmyle, M. B. L. 1987. *Atlas Berwarna Histologi*. Edisi II. Alih bahasa oleh Jan Tambajong. Jakarta: EGC.
- Depkes, R.I. 2009. *Sistem Kesehatan Nasional*. Jakarta.

- Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus*. Departemen Kesehatan RI.
- Eleazu, C. O., K.C. Eleazu, S. Chukwuma. 2013. Review of the Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, its Practical Use and Potential Risk to Humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12:60.
- El Hady, T., S. Karam, A. El Sawa dan N. Saad. 2015. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor During Healing of Extraction Sockets in Diabetic Rats. *Alexandria Dental Journal*. XX:120-125.
- Eming, S.A. dan T. Krieg. 2007. Gene Therapy and Wound Healing. *Clin Dermatol* 25(1):79-92.
- Eroschenko, V. P. 2003. *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. Edisi 9. Alih bahasa oleh Jan Tambayong. Jakarta: EGC.
- Food and Drug Administration (FDA). 2016. *Metformin hydrochloride tablets*, [serial online]<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/May02/053102/800471e6.pdf>. [16 Januari 2017].
- Frisca, C.T., Sardjono dan F. Sandra. 2009. ANGIOGENESIS: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. *JKM* 8(2): 174-187.
- Gajdosik, Gajdosikova, Stefek, Navarova dan Hozova. 1999. Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes in Male Wistar Rats. *Gen Physiol Biophys* 18: 54-62.
- Goodman, A. dan L. Gilman. 2006. *The Pharmacological Basic of Therapeutics*. New York: The McGraw-Hill Company.
- Gorustovich, A.A., T. Steimetz dan F.H. Nielsen. 2008. Histomorphometric Study of Alveolar Bone Healing in Rats Fed a Boron-Deficient Diet. *The Anatomical Record* 291:441-447.

- Gruendemann, B. J. dan B. Fernsebner. 2005. *Buku Ajar Keperawatan Perioperatif*. Alih bahasa oleh Brahm U. Jakarta: EGC.
- Guyton, A.C. dan J.E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Jakarta: EGC.
- Halim, J. 1989. *Atlas Praktikum Histologi*. Jakarta: EGC.
- Herliana, E. 2013. *Diabetes Kandas Berkat Herbal*. Jakarta: F Media.
- Howe, G.L. 1995. *Pencabutan Gigi Geligi*. Edisi II. Alih bahasa oleh Johan Arief. B. Jakarta: EGC.
- Kahn, C.R. 1995. Disorder of Fuel Metabolism dalam Becker, K.L (Ed.), *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd Ed., 48-54.
- Kanter, M., Z. Meral, H. Yener, H. Ozbek dan H. Demir. 2003. Partial Regeneration/Proliferation of the Beta-Cells in the Islets of Langerhans by *Nigella sativa L.* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Tohoku J Exp Med* 201(4): 213-9.
- Kasper, D. 2006. *Harrison's Principles of Internal Medicine, Volume 1*. Boston: McGraw-Hill, Medical Pub.
- Khader M, Majed. 2012. Thymoquinone: A Promising Antidiabetic Agent. *International Journal Diabetic in Developing Countries* 32:65-68.
- Khullar, S., A. Mittal dan P. Datta. 2012. Healing of Tooth Extraction Socket. *Heal Talk* 4(5):37-39.
- Larjava, H. 2012. *Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management*. Oxford: John Wiley & Sons, Inc.
- Mansjoer, A. 2007. *Kapita Selektta Kedokteran*. Jakarta: Media Aesculapius.

- Mendonca, R. J. dan J. Coutinho-Netto. 2009. Cellular Aspect of Wound Healing. *An Bras Dermatol* 84(3):257-62.
- Meral, I., D. Donmez, B. Baydas, F. Belge dan M. Kanter. 2004. Effect of *Nigella Sativa L.* on Heart Rate and Some Haematological Values of Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci* 1(31).
- Miller, A.L. dan D. MacKay. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. *Alternative Medicine Review* 8(4).
- Nababan, S., A. Purba, Frisca, N. Aini, B. Setiawan dan F. Sandra. 2007. Peranan Endothelial Progenitor Cell dalam Neovaskularisasi. *CDK* 34(5):158.
- Negre-Salvayre, Salvayre, Auge, Pamplona, dan Portero-Otin. 2009. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxid Redox Signal* 11(12): 3071-3109.
- Notoatmojo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia*. Institut Pertanian Bogor: Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan.
- Omran, O.M. 2014. Effect of Thymoquinone on STZ-induced Diabetic Nephropathy: an Immunohistochemical Study. *National Center for Biotechnology Information* 38(1):26-33.
- Pari, L. dan C. Sankarayanan. 2009. Beneficial Effect of Thymoquinone on Hepatic Kry Enzym in Streptozotocin-nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Life Science* 85:830-834.
- Pawestri, A.D., M. Syafriadi dan A. Rochim. 2015. Pengaruh Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Jumlah Neutrofil pada Soket Tikus Pasca Pencabutan Gigi Disertai Trauma Jaringan. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*.

- Pizem, J. dan A. Cor. 2003. Detection of Apoptosis Cells in Tomour Paraffin Section, *Radiol. Oncol* 37(4):225-232.
- Pratama, S.M., M. Syafriadi dan P. Astuti. 2016. Efek Ekstrak Thymoquinone Jintan Hitam Terhadap Proses Pembentukan Tulang Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*.
- Price, S.A. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC.
- Purkait, S. K. 2003. *Essential of Oral Pathology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher.
- Ramadan, M. F. 2007. Nutritional Value, Functional Properties and Nutraceutical Application of Black Cumin (*Nigella sativa* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 42(10):1208-1218.
- Raza, H. dan A. John. 2013. Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 51-67.
- Ribatti, D. 2009. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis: a Historical Review. *Leuk Res* 33(5):683-44.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc* 63:112-6.
- Ringga, N. 2012. Pemberian Salep Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Peningkatan Kepadatan Sabut Kolagen Pada Mukosa Oral Marmut (*Cavia cobaya*). *Oral Biology Dental Journal* 4: 30-34.
- Robbins, S.L., V. Kumar dan R.S. Conran. 2007. *Buku Ajar Patologi. Edisi VII. Alih bahasa oleh Awal Prasetyo et al.* Jakarta: EGC
- Robbins dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi 1. Edisi 4*. Jakarta: EGC.

- Ross, M. H. 1985. *Histology: A Text and Atlas*. New York: Harper International Edition.
- Rubin, E. dan H. Reisner. 2008. *Rubin's Pathology*. Edisi IV. Philadelphia: Lipipincott Williams & Wilkins.
- Saad, M., M. Taha, Abdelkhalek, M.S. Moustafa, M.A. Kamel, M. Youssef, S.H. Tawfik dan D. Helena. 2015. Insights into the Molecular Mechanisms of Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction: Focus on Oxidative Stress and Endothelial Progenitor Cells. *Endocrine* 15(4).
- Saptoyo, B. 1996. Pengaruh Aplikasi Getah Daun Pisang Pada Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi Cavia Cobaya. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)* 29(1): 117.
- Seed, M. P. dan D.A. Walsh. 2008. *Angiogenesis in Inflammation: Mechanisms and Clinical Correlates*. Berlin: Birkhauser.
- Shafer, W. G. 1983. *A Text Book of Oral Pathology*. Edisi IV. Philadelphia: W. B. Saunder.
- Sherwood, L. 2001. *Human Physiology: From Cells to System*. 4nd Ed. United States of America: Brooks/Cole.
- Singer, A.J. dan R.A.F. Clark. 1999. Cutaneous Wound Healing. *N England Medicine* 341(10): 738-754.
- Soini, Y., P. Paakko dan V.P Lehto. 1997. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology* 153(4): 1041-1048.
- Stojadinovic, O., M.S. Golinko, H. Brem dan M. Tomic-Canic. 2008. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *National Center for Biotechnology Information* 16(5):585-601.
- Sulistiyowati, Y., Septriana dan Rafika. 2013. Effect of Water Extract Herbs Ciplukan (*Physalis angulate L.*) on Blood Sugar and Lipid Profile of Sprague Dawley

Male Rats Injected Streptozotocin and Lipopolysaccharide. *Abstract book of Asia Pasific Congres of Clinical Nutrition*.

Syafriadi, Subiyantoro, Setyorini, dan Joelijanto. 2008. *Patologi Anatomi: Degenerasi dan Radang*. Tidak Dipublikasikan. Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res* 50:536-546.

Tian, H.L., L.S.Wei, Z. Xu, R.T. Zhao dan D.L. Jin. 2010. Correlation Between Blood Glucose Level and Diabetes Signs in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Global Journal of Pharmacology* 4(3):111-116.

Tjitrosoepomo. 2000. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Edisi V. Jakarta: Materia Medika Indonesia.

Triplitt, C. 2006. Pharmacy Update: Drug Interaction of Medication Commonly Used in Diabetes. *Diabets Spectr* 19(4): 202-211.

Turner, P.V., B. Brabb, C. Pekow dan M. Vasbinder. 2011. Administration of Substance to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50(5):600-613.

Unger R.H dan D.W. Foster. 1992. *Diabetes Mellitus*. London: WB Saunders Company.

Vernillo, A.T. 2003. Dental Consideration for the Treatment of Patient with Diabetes Mellitus. *Am Dent Assoc* 134: 24-33.

Viswanathan, V., C. Snehalatha, R. Kumutha, N. Mamtha dan A. Ramachandran. 2003. Validation of a Method to Determine Albumin Excretion Rate Type 2 Diabetes Mellitus. *The Indian Journal of Nephrology* 13:85-88.

Werner, S. dan R. Grose. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev* 83(3):853-70.

- William, W.Li dan W.Li Vincent. 2003. *Angiogenesis in Wound Healing*. USA: Dowden Health Media.
- Wilson dan LeDoux. 1989. Ozone Treatment Reduces Blood Oxidative Stress and Pancrease Damage in a Streptozotocin Induced Diabetes Model in Rats. *Acta Farm Bonaerense* 24:49-7.
- Wonodirekso, S. 2003. *Penuntun Praktikum Histologi*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Yang, K. dan Hanson. 2009. What is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase?. *JBC* 284(40): 27025-27029.
- Zafar, M. dan S.N. Naqvi. 2010. Effect of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weight of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *International Journal of Morphology* 28(1):135-142.
- Zlobec I., R. Steele, R.P. Michael, A. Lugli dan C. Compton. 2006. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 Immunohistochemistry and Interobserver Reliability in Colorectal Cancer. *Modern Pathology* 19:1236-1242.

Lampiran A. Surat Keterangan Etik Penelitian

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 966 /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEKTIVITAS EKSTRAK THYMOQUIONONE JINTAN HITAM TERHADAP PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH BARU SOKET GIGI PASCA EKSTRAKSI PADA TIKUS YANG DIINDUKSI DIABETES

Nama Peneliti Utama : Retno Trisnawati (NIM. 121610101023)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 29 Juni 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran B. Penghitungan Dosis dan Volume Larutan Perlakuan

Dalam memberikan perlakuan, volume maksimal 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 : 5-20 mL/kg BB tikus
2. Pemberian secara intravena : 5 mL/kg BB tikus (Turner *et al.*, 2011)

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

- Secara intragastrik

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

- Secara intravena

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

1. Larutan *streptozotocin* (STZ)

Dosis : 50 mg/kg BB tikus (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 yaitu:

- 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

$$\frac{50 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{12 \text{ mg}}{X \text{ ml}} = 0,2 \text{ ml}$$

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

2. Larutan *thymoquinone* (TQ)

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

Pelarut : Minyak zaitun

BB tikus rata- rata : 200 gr/ekor

Dosis yang diberikan :

- Berat bubuk TQ

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

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

3. Larutan metformin

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

Pelarut : Aquadest

BB tikus rata- rata : 200 gr/ekor

- Berat bubuk metformin

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

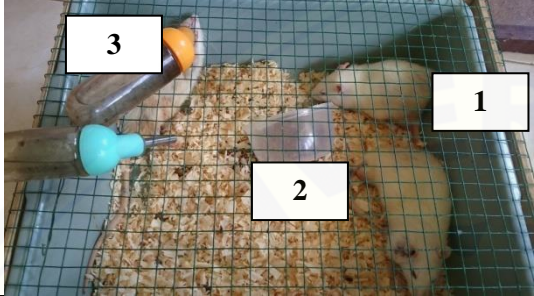
Metformin dihaluskan hingga menjadi bubuk kemudian dicampur sebanyak 20 mg ke dalam 2 ml aquadest. Pemberian larutan metformin tersebut diberikan menjadi 3 kali sehari.



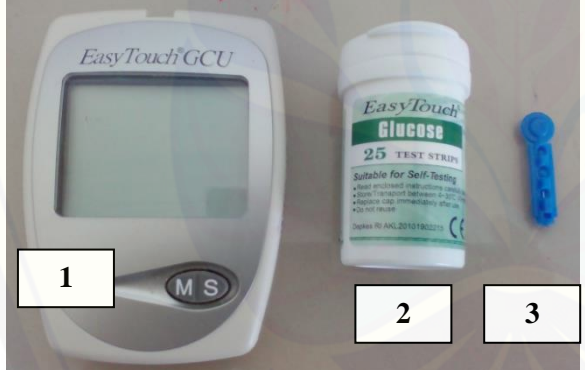
LAMPIRAN C. Alat dan Bahan Penelitian

C.1 Alat Penelitian



a. Alat Pemeliharaan Hewan Coba




Gambar	Keterangan
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kandang 2. Tempat Pakan 3. Tempat Minum

b. Alat Pengukuran Kadar Glukosa Darah


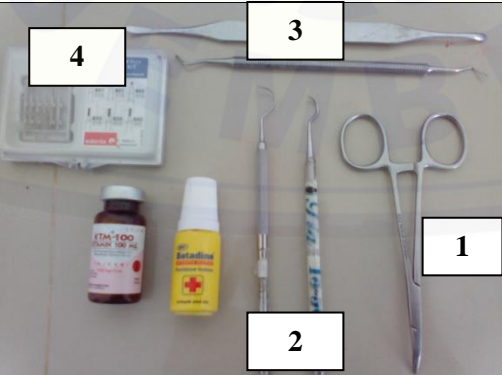
Gambar	Keterangan
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Glucometer 2. <i>Glucose test strip</i> 3. <i>Needle</i>

c. Alat Perlakuan Hewan Coba

Gambar	
 <p data-bbox="342 1782 716 1814">Timbangan berat badan tikus</p>	 <p data-bbox="943 1732 1084 1766"><i>Eppendorf</i></p>

 <p>Timbangan Digital</p>	 <p>Sonde Lambung</p>
 <p>Syringe 27 G 1 ml</p>	

d. Alat Ekstraksi Gigi dan Euthanasia

Gambar	Keterangan
 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">2</div> </div>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Contra angle low speed</i> 2. Mikromotor
 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">4</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">3</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">1</div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">2</div> </div>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Arteri clamp</i> 2. <i>Sonde setengah lingkaran</i> 3. <i>Ekskavator</i> 4. <i>Round bur no.1</i>



Rat dental chair



Toples eter






Scalpel, Pinset, Arteri clamp



Pot jaringan


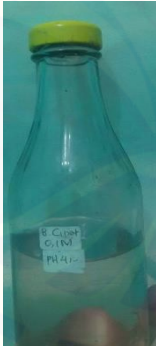
e. Alat Pewarnaan HE

Gambar	Keterangan
 <p><i>Tissue cassette</i></p>	 <p>Mesin processing jaringan</p>
 <p><i>Mould base</i></p>	 <p><i>Microtome Holder</i></p>
 <p>Pisau mikrotom</p>	 <p>Wadah baskom dan kuas</p>
 <p><i>Waterbath</i></p>	 <p><i>Slide warmer</i></p>

 <p style="text-align: center;"><i>Staining jar</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Object glass</i></p>
 <p style="text-align: center;"><i>Deck Glass</i></p>	

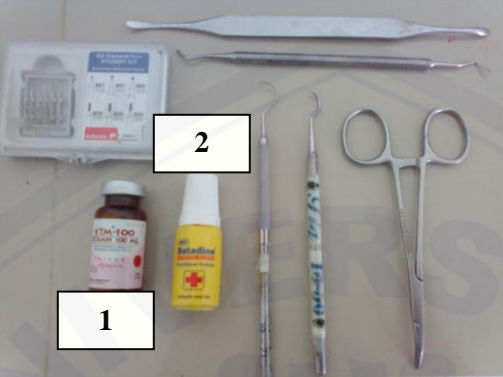

C.2 Bahan Penelitian

a. Bahan Perlakuan Hewan Coba





Gambar		Keterangan
<div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 30px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 0 auto;">1</div>	 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Streptozotocin</i> 2. Larutan buffer asam sitrat 0,1M pH 4.5

<p>1</p>		<p>2</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ekstrak murni <i>thymoquinone</i> 2. Minyak zaitun
<p>1</p>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Metformin 500 mg 2. Metformin yang sudah dihaluskan 	
<p>Akuades</p>			

b. Bahan Ekstraksi Gigi dan Euthanasia

Gambar	Keterangan
	1. Ketamin 100 mg 2. Povidine Iodine
 <p data-bbox="516 1402 782 1432"><i>Chloroform</i> atau eter</p>	

e. Bahan Pewarnaan HE

Gambar	Keterangan
 <p data-bbox="396 978 781 1010">Larutan Buffer Formalin 10%</p>	 <p data-bbox="980 953 1321 984">Larutan asam formiat 10%</p>
 <p data-bbox="537 1373 643 1404">Paraffin</p>	 <p data-bbox="1097 1383 1208 1415">Glyserin</p>



Cat Hematoxylin (ungu) dan Eosin (merah)



Entellan



1

2

3

1. Ethanol absolut
2. Alkohol 90%
3. Xylol

LAMPIRAN D. Prosedur Penelitian**D.1 Persiapan hewan coba**

Gambar D.1 Adaptasi hewan coba dengan lingkungan kandang.

D.2 Pengecekan kadar glukosa darah (KGD) sebelum diinduksi diabetes

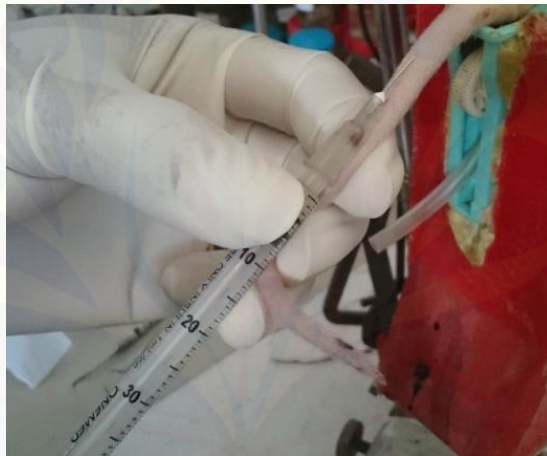
Gambar D.2 Pengecekan KGD menggunakan Glucometer dan *glucose test strip*

D.3 Penimbangan bahan perlakuan



Gambar D.3 Penimbangan dengan timbangan digital.

D.4 Induksi diabetes pada tikus menggunakan streptozotocin secara intravena pada ekor tikus



Gambar D.4 Injeksi STZ secara intravena pada vena ekor tikus

D.5 Pengecekan KGD hari ke-1 setelah diinduksi diabetes

Gambar D.5 Pengecekan KGD menggunakan Glucometer dan *glucose test strip*

D.6 Pemberian perlakuan

Gambar D.6 Pemberian larutan *thymoquinone*, metformin yang disiapkan dalam *eppendorf* dan akuades secara intragastrik

D.7 Anastesi umum sebelum ekstraksi



Gambar D.7 Injeksi 0,1 ml ketamin secara Intramuskular pada kaki tikus

D.8 Ekstraksi gigi molar kiri rahang bawah tikus



Gambar D.8 Tikus diletakkan pada *rat dental chair* untuk memudahkan prosedur ekstraksi

D.9 *Euthanasia* tikus



Gambar D.9 Metode overinhalasi eter kiri tikus

D.10 Pengambilan rahang bawah kiri tikus



Gambar D.10 Pengambilan rahang

D.11 Pewarnaan HE



Gambar D.10 Pewarnaan menggunakan *staining jar* sesuai urutan tahapan. Preparat yang siap diamati.

LAMPIRAN E. Data Kadar Glukosa Darah dan Berat Badan**E.1 Kadar Glukosa Darah (KGD)**1. KGD Kelompok P1 (Ekstrak *Thymoquinone*)

No. Tikus/KGD	H-1	H-7	H-10	H-14	H-17
2	340	511	458		
6	290	490	552		
8	386	572	525		
1	395	413		543	
5	356	544		434	
7	600	492		587	
3	448	600			361
4	402	594			296
9	532	537			346

2. KGD Kelompok K(Akuades)

No. Tikus/KGD	H-1	H-7	H-10	H-14	H-17
1	471	468	424		
3	372	362	600		
4	457	600	374		
2	402	487		437	
6	600	442		452	
7	556	305		386	
5	482	600			600
8	561	536			495
9	564	600			519

3. KGD Kelompok P2 (Metformin)

No. Tikus/KGD	H-1	H-7	H-10	H-14	H-17
6	265	469	519		
8	475	435	521		
9	504	531	600		
3	532	558		394	
4	479	572		402	
5	587	600		600	
1	600	600			600
2	495	377			525
7	468	600			600

Keterangan

H-1 : Hari ke-1 positif DM (perlakuan dimulai)

H-7 : Ekstraksi gigi

H-10 : H+3 pasca ekstraksi gigi (dekaputasi)

H-14 : H+7 pasca ekstraksi gigi (dekaputasi)

H-17 : H+10 pasca ekstraksi gigi (dekaputasi)

E.2 Berat Badan

1. Pengukuran Berat Badan Tikus (Kelompok P1)

Hari perlakuan/ No. Sampel	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2	197	199	189	183	179	168	168	173	174	169	170	165						
6	198	187	187	185	182	177	179	183	190	180	184	180						
8	190	177	170	163	163	158	156	161	153	157	152	153						
1	199	197	194	186	191	179	177	182	179	179	180	175	165	179	179			
5	202	196	183	178	179	169	163	167	170	164	164	164	162	161	162			
7	182	184	179	181	187	194	187	176	181	187	180	184	180	174	173			
3	176	168	166	158	161	153	152	159	157	155	158	154	149	157	159	163	158	149
4	212	203	201	189	193	185	180	188	189	187	189	186	184	193	204	205	200	191
9	183	177	173	168	168	161	159	165	163	160	160	157	149	149	157	160	157	155

2. Pengukuran Berat Badan Tikus (Kelompok P2)

Hari perlakuan/ No. Tikus	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
6	171	150	161	146	153	144	150	139	152	152	155							
8	163	162	150	154	155	152	155	150	151	147	147							
9	203	200	194	188	191	185	189	174	178	180	180							
3	188	189	188	182	192	185	190	184	191	199	200	200	203	199	203			
4	228	227	197	201	199	189	186	197	189	200	180	186	185	178	172			
5	164	161	155	151	157	149	146	140	154	151	154	148	156	159	157			
1	257	242	236	236	219	221	205	230	214	232	225	207	203	212	192	205	219	199
2	207	206	190	192	188	190	188	198	185	183	182	186	181	179	178	182	182	176
7	217	208	197	197	184	183	174	184	176	180	184	173	169	178	167	170	180	177

3. Pengukuran Berat Badan Tikus (Kelompok K)

Hari perlakuan/ No. Tikus	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	194	186	185	184	183	183	186	174	171	175	182							
3	176	170	166	158	153	177	150	136	132	138	146							
4	169	164	162	164	172	165	176	165	171	176	166							
2	222	224	220	217	216	215	207	204	213	215	213							
6	156	154	153	151	149	149	141	133	132	137	143	142	131	129	131			
7	208	207	204	202	202	202	204	191	186	201	207	204	200	207	205			
5	152	151	143	138	133	134	135	134	142	131	132	128	136	130	137	132	135	126
8	165	168	171	175	166	163	160	166	165	161	160	158	158	154	153	155	153	156
9	162	156	155	145	141	133	138	141	144	135	135	127	141	138	137	134	135	124

LAMPIRAN F. Data Penghitungan Ekspresi VEGF Soket Gigi Pasca Ekstraksi

F.1 Data Kelompok Kontrol (Aquadest)

Kode	Sediaan	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	Jumlah	Rata-rata
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
K3	1	2	2	3	3	3	7	6	4	3	6	6	2	4	2	5	3	5	7	3	4	80	4
	3	9	6	4	7	3	6	10	4	4	9	7	7	8	7	8	9	9	9	7	7	140	7
	4	6	5	8	7	8	11	4	3	7	5	7	8	5	6	11	9	8	11	8	3	140	7
																						6	
K7	2	9	7	13	9	17	8	15	9	18	12	16	19	14	15	11	16	11	11	12	18	260	13
	6	17	15	13	5	8	11	7	10	9	12	9	7	10	11	12	14	13	13	12	12	220	11
	7	12	9	14	11	14	15	15	10	11	5	8	5	7	8	11	7	9	10	9	10	200	10
																						11,3	
K10	5	11	4	6	9	10	3	5	14	12	4	6	7	7	12	10	10	16	17	9	8	180	9
	8	2	2	4	9	6	13	5	4	4	7	9	11	3	7	8	12	3	3	3	5	120	6
	9	7	12	8	19	23	18	17	18	6	6	9	10	16	24	16	12	20	22	20	17	300	15
																						10	

LP= Lapang Pandang

K7 = Kontrol Hari ke-7

K3= Kontrol Hari ke-3

K10= Kontrol Hari ke-10

F.2 Data Kelompok Perlakuan 1 (*Thymoquinone*)

Kode	Sediaan	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	LP 6	LP 7	LP 8	LP 9	LP 10	LP 11	LP 12	LP 13	LP 14	LP 15	LP 16	LP 17	LP 18	LP 19	LP 20	Jumlah	Rata-rata
P1(3)	2	8	5	7	9	12	15	19	27	18	15	19	20	12	7	5	15	17	15	7	8	260	13
	8	3	5	4	16	24	21	17	7	7	5	4	4	3	2	9	12	14	16	11	16	200	10
	6	3	4	4	7	11	8	3	5	9	13	6	7	4	12	9	8	3	3	4	5	130	6,5
																						9,8	
P1(7)	1	8	5	31	24	26	28	12	17	17	19	23	34	21	13	15	12	31	27	35	32	440	22
	5	12	11	27	38	31	35	33	37	37	13	16	33	44	52	41	47	18	36	44	55	660	33
	7	18	13	26	25	27	26	39	32	24	28	17	26	27	33	37	26	35	31	38	22	560	28
																						27,7	
P1(10)	3	14	10	9	25	23	17	18	28	29	18	20	21	13	16	15	12	11	10	24	7	340	17
	4	10	17	14	26	23	22	19	9	8	11	25	21	23	21	29	31	16	8	12	15	360	18
	9	8	12	9	17	17	29	26	37	43	12	30	35	38	39	47	31	19	45	25	41	560	28
																						21	

LP = Lapang Pandang

P1(7) = Perlakuan 1 (TQ) Hari ke-7

P1(3)= Perlakuan 1 (TQ) Hari ke-3

P1(10)= Perlakuan 1 (TQ) Hari ke-10

F.3 Data Kelompok Perlakuan 2 (Metformin)

Kode	Sediaan	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	LP 6	LP 7	LP 8	LP 9	LP 10	LP 11	LP 12	LP 13	LP 14	LP 15	LP 16	LP 17	LP 18	LP 19	LP 20	Jumlah	Rata- rata
P2(3)	6	9	13	14	18	11	22	24	27	29	18	21	17	12	9	15	13	7	12	17	12	320	16
	9	13	21	16	35	22	13	9	16	38	31	27	25	9	10	17	26	37	27	31	17	440	22
	7	24	18	15	17	18	15	19	22	17	21	27	23	11	15	22	24	16	14	28	14	380	19
																						19	
P2(7)	3	6	12	21	23	19	8	14	18	19	8	6	6	7	12	7	9	13	14	12	6	240	12
	4	11	9	19	15	12	12	8	13	14	8	4	7	14	4	11	17	7	16	9	10	220	11
	5	9	13	15	17	8	5	11	18	13	12	21	23	21	8	24	16	12	17	13	4	280	14
																						12,3	
P2(10)	1	3	6	9	18	12	7	10	19	16	9	16	5	11	7	19	13	9	15	23	13	240	12
	2	6	6	14	23	26	12	21	20	10	7	13	14	3	6	15	8	2	8	6	20	240	12
	8	7	5	12	17	11	8	10	13	9	12	15	14	21	13	11	11	8	12	14	17	240	12
																						12	

LP = Lapang Pandang

P2(7) = Perlakuan 2 (Met) Hari ke-7

P2(3)= Perlakuan 2 (Met) Hari ke-3

P2(10)= Perlakuan 2 (Met) Hari ke-10

LAMPIRAN H. Analisis Data Hasil Penelitian

H.1 Analisis Data K3-P1(3)-P2(3)

H.1.1 Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SEL
N		9
Normal Parameters ^a	Mean	11.2857
	Std. Deviation	6.21059
Most Extreme Differences	Absolute	.183
	Positive	.183
	Negative	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.485
Asymp. Sig. (2-tailed)		.972

a. Test distribution is Normal.

H.1.2 Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

SEL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.071	2	4	.023

H.1.3 Uji Kruskal Wallis

Ranks

	VAR00001	N	Mean Rank
SEL	K-3	3	2.00
	P1-3	3	4.50
	P2-3	3	6.50
	Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	SEL
Chi-Square	5.455
df	2
Asymp. Sig.	.065

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

VAR00001

H.2 Analisis Data K7-P1(7)-P2(7)

H.2.1 Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SEL
N		9
Normal Parameters ^a	Mean	17.1111
	Std. Deviation	8.46233
Most Extreme Differences	Absolute	.310
	Positive	.310
	Negative	-.200
Kolmogorov-Smirnov Z		.930
Asymp. Sig. (2-tailed)		.352

a. Test distribution is Normal.

H.2.2 Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

SEL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.157	2	6	.197

H.2.3 One Way ANOVA

ANOVA

SEL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	502.889	2	251.444	21.552	.002
Within Groups	70.000	6	11.667		
Total	572.889	8			

H.2.4 LSD (*Least Significance Difference*)

Multiple Comparisons

SEL

LSD

(I) VAR 0000 1	(J) VAR00001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K7	P1-7	-16.33333*	2.78887	.001	-23.1574	-9.5092
	P2-7	-1.00000	2.78887	.732	-7.8241	5.8241
P1-7	K7	16.33333*	2.78887	.001	9.5092	23.1574
	P2-7	15.33333*	2.78887	.002	8.5092	22.1574
P2-7	K7	1.00000	2.78887	.732	-5.8241	7.8241
	P1-7	-15.33333*	2.78887	.002	-22.1574	-8.5092

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

H.3 Analisis Data K10-P1(10)-P2(10)

H.3.1 Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SEL
N		9
Normal Parameters ^a	Mean	14.6250
	Std. Deviation	6.71751
Most Extreme Differences	Absolute	.183
	Positive	.183
	Negative	-.102
Kolmogorov-Smirnov Z		.517
Asymp. Sig. (2-tailed)		.952

a. Test distribution is Normal.

H.3.2 Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

SEL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.846	2	5	.097

H.3.3 One Way ANOVA

ANOVA

SEL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	199.875	2	99.938	4.308	.082
Within Groups	116.000	6	23.200		
Total	315.875	8			