

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Curcuma longa* LTERHADAP TITER INTERLEUKIN-6 (IL-6) DAN GAMBARAN HISTOLOGI PANKREAS PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 1

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

FRANSISKA PANASEA ANGGY
105130100111009



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma longa L* Terhadap Titer Interleukin-6(IL-6) Dan Gambaran Histologi Pankreas Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe 1

Oleh:
FRANSISKA PANASEA ANGGY
105130100111009

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 30 Juni 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Dr. Drh. Djoko Winarso, MS
NIP. 19530605 198403 1 001

Dr. Sri Murwani, Drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES
NIP. 19600903 1898802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fransiska Panasea Anggy

NIM : 105130100111009

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma Longa L* Terhadap Kadar Interleukin-6 dan Gambaran Histologi Pankreas pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan makan saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 30 Juni 2014
Yang Menyatakan,

Fransiska Panasea Anggy
NIM. 105130100111009

repository.ub.ac.id

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma longa L* Terhadap Titer Interleukin-6 (IL-6) dan Gambaran Histologi Pankreas pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe 1

ABSTRAK

Diabetes melitus tipe 1 (DMT1) merupakan kelainan defisiensi insulin akibat kerusakan pankreas yang ditandai oleh hiperglikemia kronis. Pembuatan hewan model diabetes melitus tipe 1 menggunakan *Streptozotocin* (STZ) yang dapat menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas dan inflamasi pada organ pankreas yang kemudian merusak sel-sel β . *Curcuma longa L* merupakan tumbuhan yang mengandung kurkumin yang bersifat antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma longa L* terhadap kadar IL-6 serta gambaran histologi pankreas pada tikus model DMT1. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan lima kelompok tikus yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan (dosis 1,2 gram/kg BB, 1,8 gram/kg BB, dan 2,7 gram/kg BB). Metode penelitian menggunakan *Posttest Only Group Design* dengan Rancangan Acak Lengkap. Titer Interleukin-6 (IL-6) diukur dengan *ELISA Assay Kit* dan gambaran histologi pankreas dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Analisa data titer IL-6 menggunakan *One-Way ANOVA* ($\alpha = 0,05$) serta gambaran histologi pankreas secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan kadar IL-6. Pengamatan preparat histologi pankreas menunjukkan terjadi penghambatan kerusakan pulau-pulau Langerhans. Simpulan dari penelitian ini yaitu pemberian ekstrak *Curcuma longa L* dapat menurunkan kadar IL-6 serta menghambat kerusakan pankreas pada tikus model DMT1.

Kata Kunci : *Curcuma longa L*, DMT1, IL-6, pulau Langerhans

Effect Of *Curcuma longa L* On Interleukin-6 (IL-6) Level and Pancreas Histology Image In Diabetes Mellitus Type 1 Rat (*Rattus norvegicus*) Model

Abstract

Diabetes mellitus is a deficiency of insulin disorder caused by pancreas damage that marked by chronic hyperglycemia. Diabetes mellitus type 1 animal model was made by induction of *Streptozotocin* (STZ) that can cause increasing of free radical level and inflammation in pancreas organ that lead to β cell damage. *Curcuma longa L* is a plant that contains curcumin that has antioxidant and antiinflammation in it. The purpose of this research was to determine effect of *Curcuma longa L* extract on level of IL-6 and pancreas histology image in diabetes melitus type 1 rat model. This research is experimental research, rats were divided into five groups which were negative control group, positive control group, and three groups of therapy (dosage 1,2 gram/kg weight, 1,8 gram/kg weight, and 2,7 gram/kg weight). This research uses *Posttest Only Group Design* method by *Completely Randomized Design*. Level of IL-6 was assesed by *ELISA Assay Kit* and pancreas histology image was stained by Hematoksilin Eosin (HE) staining. Analysis of IL-6 level uses *One Way ANOVA* ($\alpha = 0,05$) and pancreas histology image used descriptive analysis. The result shows that level of IL-6 decreases. The pancreas histology image shows that islet of Langerhans damage was blocked. In conclusion, *Curcuma longa L* decreases IL-6 level and islet of Langerhans damage in diabetes mellitus type 1 rat model.

Keywords: *Curcuma longa L*, DMT1, IL-6, islet of Langerhans

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena pertolongan serta penyertaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Curcuma longa L Terhadap Titer Interleukin-6 (IL-6) Dan Gambaran Histologi Pankreas Pada Tikus (Rattus norvegicus) Model Diabetes Melitus Tipe 1”**. Penelitian ini merupakan payung penelitian pengaruh ekstrak *Curcuma longa L* pada hewan model diabetes mellitus tipe 1 yang diketuai oleh Dr. Djoko Winarso, Drh., MS serta salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Djoko Winarso, Drh., MS dan Dr. Sri Murwani, Drh., MP selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran serta waktu yang telah diberikan.
2. Drh. Herlina Pratiwi dan Drh. Tiara Widyaputri selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang telah diberikan.
3. Papa, Bunda, Aurora serta keluarga atas kesabaran, kasih sayang, dukungan serta doa yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.

4. Seluruh staf dan asisten Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Faal FKUB yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
5. Drh. Herlina Pratiwi atas bimbingan dan arahan selama melaksanakan penelitian serta Bernadhita, Devi, Ninoek, Bimaldy dan Nunung teman seperjuangan melaksanakan penelitian.
6. Teman-teman PKH 2010 khususnya kelas A yang telah berbagi pengetahuan, keceriaan dan persahabatan yang luar biasa.
7. Guntar, Alex, Didit, Lucky, Rinda, Anis, Dio, dan Yoga sebagai keluarga kedua selama di Malang atas keceriaan, persahabatan, mimpi-mimpi serta inspirasi yang luar biasa.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Juli 2014

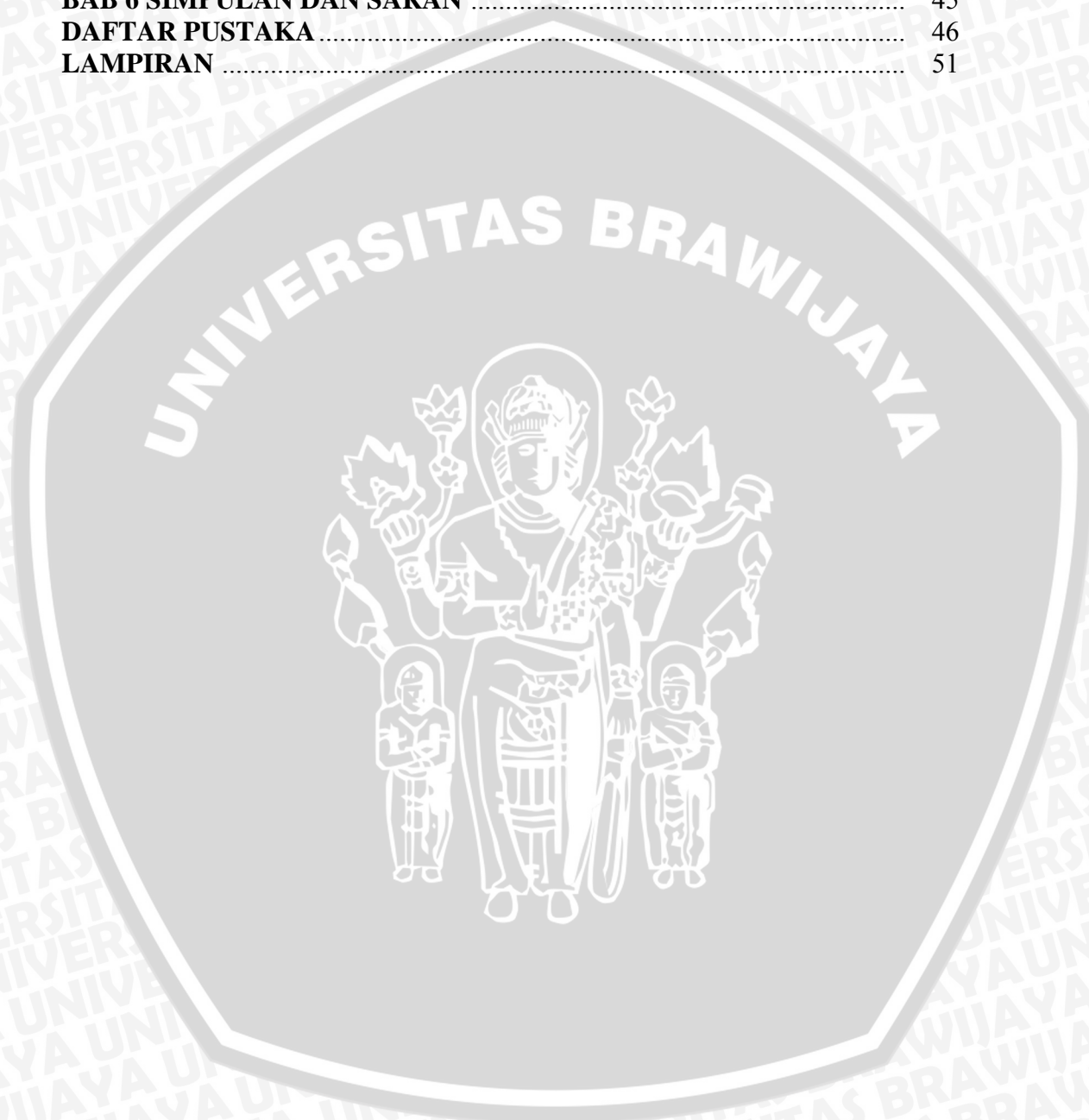
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Curcuma longa L</i>	6
2.2 Diabetes Melitus	9
2.3 Pankreas	12
2.4 Interleukin-6	14
2.5 <i>Rattus norvegicus</i>	15
2.6 Streptozotocin	16
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	18
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODE PENELITIAN	24
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	24
4.3 Tahapan Penelitian	24
4.4 Prosedur Kerja	25
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	25
4.4.2 Induksi Streptozotocin	26
4.4.3 Pembuatan dan Penghitungan Dosis Ekstrak Kunyit	26
4.4.4 Pemberian Ekstrak Kunyit	27
4.4.5 Isolasi Organ Pankreas	27
4.4.6 Isolasi Serum Darah	28
4.4.7 Pengukuran Kadar Interleukin-6 (IL-6)	28
4.4.8 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi	29
4.4.9 Pengamatan Histopatologi Pankreas	31
4.5 Analisis Data	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	32

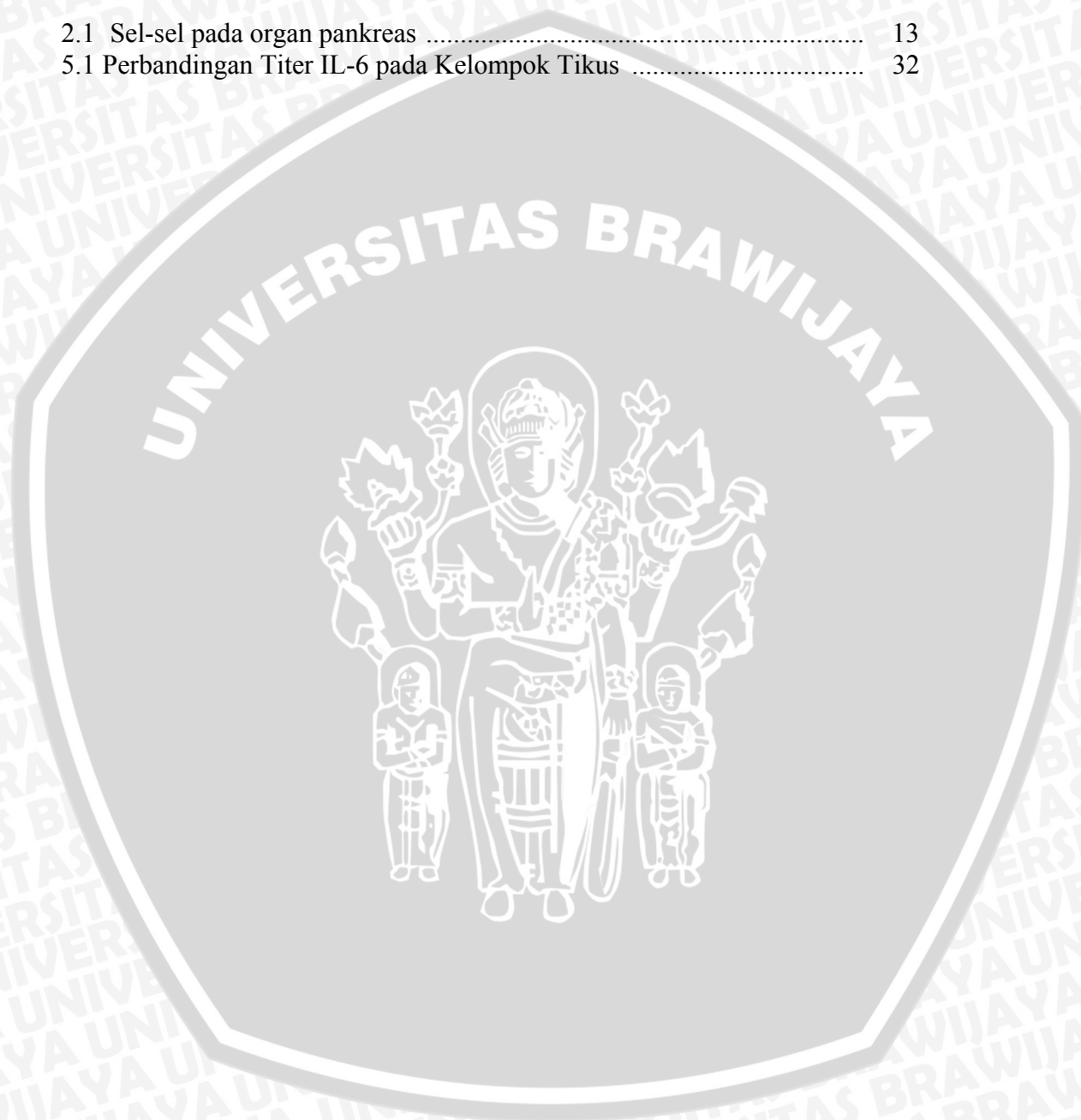


5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Curcuma longa L</i> terhadap Titer Interleukin-6 pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1	32
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Curcuma longa L</i> terhadap Gambaran Histopatologi Pankreas Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1 ...	37
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51



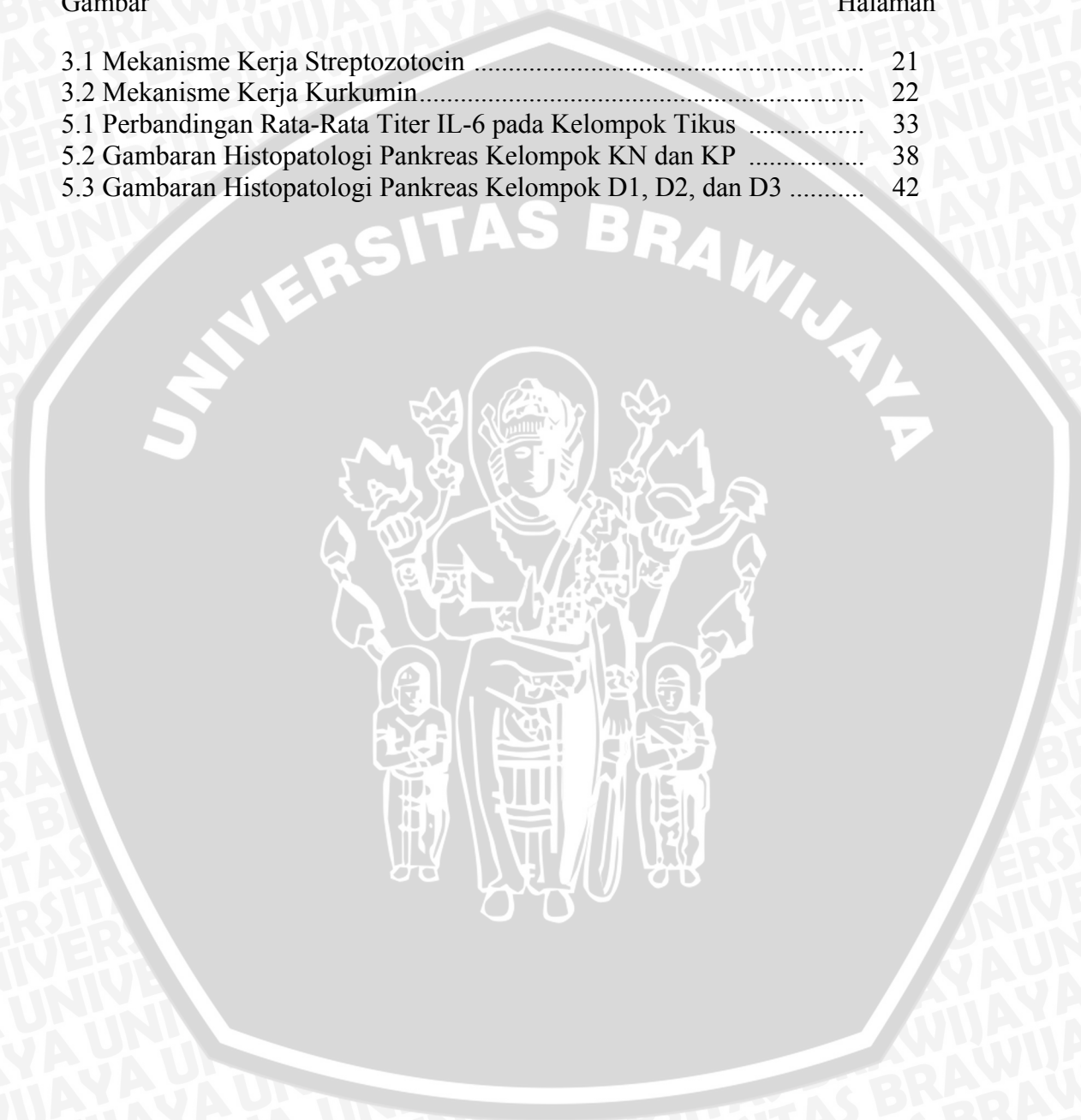
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Sel-sel pada organ pankreas	13
5.1 Perbandingan Titer IL-6 pada Kelompok Tikus	32



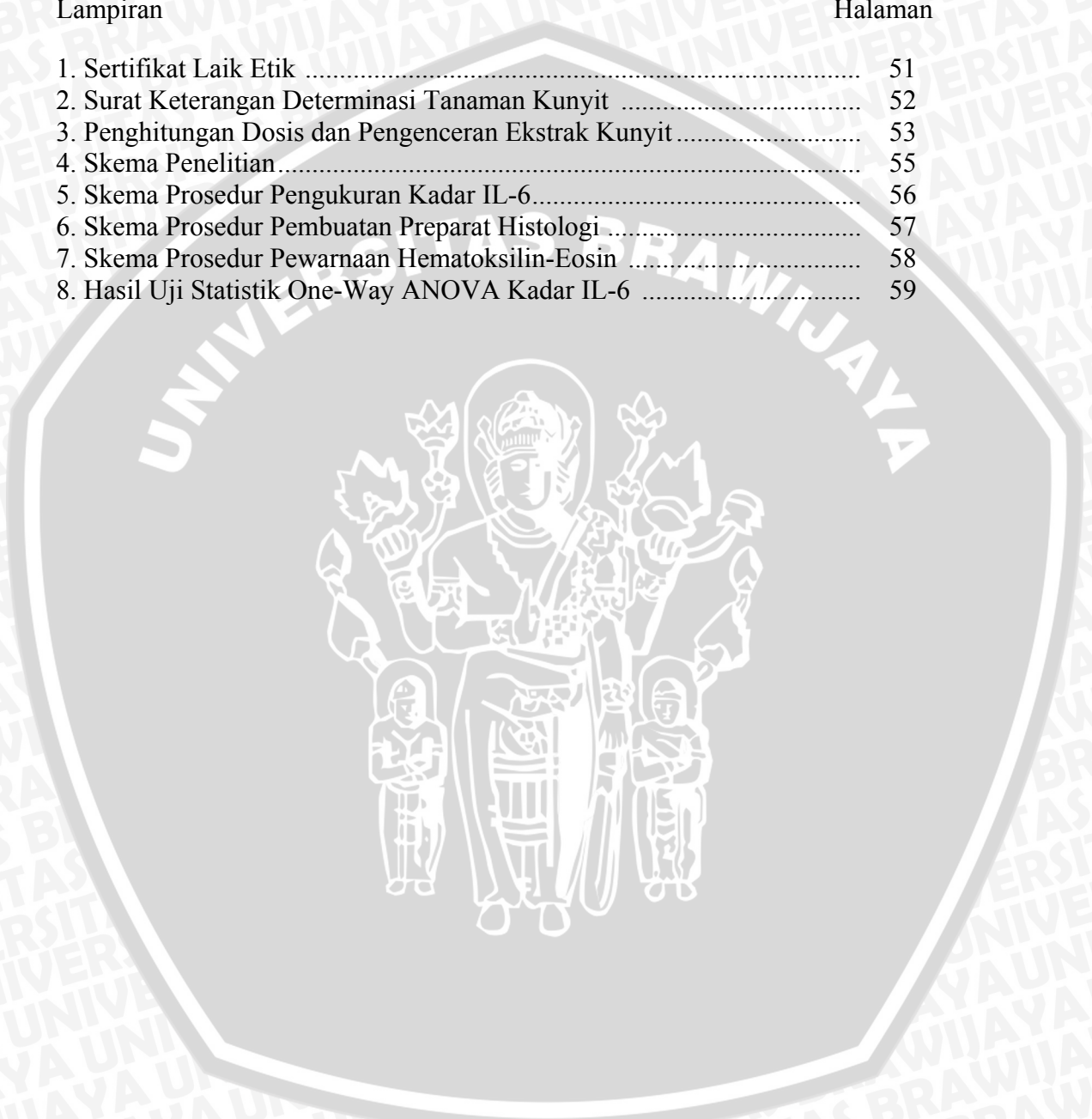
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Mekanisme Kerja Streptozotocin	21
3.2 Mekanisme Kerja Kurkumin	22
5.1 Perbandingan Rata-Rata Titer IL-6 pada Kelompok Tikus	33
5.2 Gambaran Histopatologi Pankreas Kelompok KN dan KP	38
5.3 Gambaran Histopatologi Pankreas Kelompok D1, D2, dan D3	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	51
2. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Kunyit	52
3. Penghitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Kunyit	53
4. Skema Penelitian	55
5. Skema Prosedur Pengukuran Kadar IL-6	56
6. Skema Prosedur Pembuatan Preparat Histologi	57
7. Skema Prosedur Pewarnaan Hematoksin-Eosin	58
8. Hasil Uji Statistik One-Way ANOVA Kadar IL-6	59



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of Variant</i>
D1	Dosis 1
D2	Dosis 2
D3	Dosis 3
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DM	Diabetes Melitus
DMT1	Diabetes Melitus Tipe 1
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
H ₂ SO ₄	Asam Sulfat
HE	Hematoksilin Eosin
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
IL-6	Interleukin-6
IP	Intraperitoneal
KN	Kontrol Negatif
KP	Kontrol Positif
MLD-STZ	<i>Multi Low Dose Streptozotocin</i>
Na ₂ CO ₃	Natrium Karbonat
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde Acid</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Spesies</i>
SA-HRP	<i>Streptavidin Horse Radish Peroxidase</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TMB	<i>Tetra Methyl Benzidine</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) tipe 1 merupakan kelainan sistemik akibat terjadinya gangguan metabolisme glukosa yang ditandai oleh hiperglikemia kronis. Penyakit ini menimbulkan komplikasi kronik sehingga memerlukan manajemen pengobatan yang berkelanjutan. Penyakit yang tidak terkontrol akan menimbulkan berbagai komplikasi metabolisme, gangguan makrovaskular dan mikrovaskular yang menyebabkan penurunan kualitas dan harapan hidup penderita (Denik, 2009).

Menurut data WHO, sebanyak 347 juta orang di seluruh dunia menderita penyakit diabetes melitus. Peningkatan kadar glukosa darah menyebabkan angka kematian sebesar 3,4 juta jiwa pada tahun 2004. Hal ini setara dengan 5,4 % dari seluruh kematian. Dalam beberapa kelompok usia, orang dengan diabetes melitus memiliki dua kali lipat peningkatan risiko stroke. Diabetes melitus adalah penyebab utama gagal ginjal, gangguan penglihatan dan kebutaan. Diabetes melitus diprediksi menjadi penyebab kematian ketujuh di dunia pada tahun 2030. Hal ini berarti kematian yang disebabkan oleh diabetes melitus meningkat lebih dari 50% dalam 10 tahun kedepan.

Diabetes melitus merupakan penyakit endokrin yang cukup banyak menyerang hewan peliharaan seperti anjing dan kucing. Kejadian diabetes melitus pada kucing adalah 1 dari 200 kucing di United Kingdom dan angka tersebut terus meningkat. Peningkatan kejadian diabetes melitus dapat disebabkan karena beberapa hal seperti *breed*, obesitas, kurangnya *exercise* pada hewan serta umur

hewan yang tua (Gunn-Moore, 2013). Prevalensi penyakit diabetes melitus pada anjing tahun 2005 di United Kingdom adalah 0.32% (Catchpole *et al.*, 2005). Diabetes melitus umumnya menyerang kucing pada usia antara 10 hingga 13 tahun sedangkan pada anjing terjadi pada hewan dengan usia antara 5 hingga 12 tahun. Jenis anjing seperti Samoyed, Tibetan Terrier dan Cairn Terrier merupakan anjing yang umumnya menderita diabetes melitus (Catchpole *et al.*, 2005; Gunn-Moore, 2013).

Diabetes melitus tipe 1 adalah penyakit inflamasi dari pulau pankreas di mana kehancuran sel beta yang dimediasi oleh sel T sitotoksik, *self antibody*, dan mediator inflamasi. Level biomarker inflamasi yang tinggi dapat dideteksi dari pasien yang baru saja didiagnosa menderita diabetes melitus tipe 1 dan hal ini menunjukkan bahwa respon inflamasi diaktifkan pada saat tahap awal penyakit. Hal ini mengungkapkan bahwa sejumlah mekanisme biokimia hiperglikemia yang berbeda tercakup dalam proses patogenesis dari komplikasi yang disebabkan oleh diabetes melitus. Salah satu akibat yang timbul dari proses patogenesis diabetes melitus tipe 1 adalah timbulnya peningkatan produksi sitokin inflamasi, terutama interleukin-6 (IL-6) yang dianggap sebagai mediator utama dari respon inflamasi akut (Reis *et al.*, 2012).

Pengobatan penyakit diabetes melitus cukup mahal, sehingga saat ini mulai dikembangkan pengobatan alternatif dengan menggunakan herbal. Selain harganya yang terjangkau, obat herbal juga memiliki efek samping yang relatif kecil. Penggunaan obat alami dalam masyarakat mulai berkembang pada dekade terakhir karena efek samping yang hampir tidak ada jika digunakan secara benar,

hal ini kemungkinan disebabkan karena tanaman obat bersifat kompleks dan organis yang cocok untuk tubuh sehingga tanaman obat dapat disetarakan dengan makanan, suatu bahan yang dikonsumsi dengan maksud merekonstruksi organ atau sistem yang rusak (Ockarini, 2010).

Kandungan utama kunyit kuning adalah kurkumin dan minyak atsiri yang berfungsi untuk pengobatan. Kandungan bahan kimia yang sangat berguna adalah kurkumin yaitu diarilhatanoid yang memberi warna kuning. Kandungan kimia lainnya adalah tumeron dan zingiberen yang berfungsi sebagai anti-bakteria, anti-oksidan dan anti-inflamasi (anti-radang) serta minyak pati yang terdiri dari turmerol, fellandren, curcumon dan lain-lain. Dari data tersebut peneliti ingin lebih dalam meneliti pengaruh pemberian ekstrak herbakunyit kuning terhadap gambaran histopatologi pankreas dan penurunan kadar IL-6 pada tikus model diabetes melitus.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak *Curcuma longa L* dapat menghambat kerusakan pankreas pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus?
2. Apakah pemberian ekstrak *Curcuma longa L* dapat menurunkan kadar IL-6 pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur 8 – 12 minggu dan berat badan 150 – 250 gram.
2. *Streptozotocin* (STZ) yang digunakan adalah STZ yang didapatkan dari Nacalai Tesque, INC. (no katalog 32238-91) dan diinduksikan dengan cara injeksi intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut.
3. Kunyit kuning (*Curcuma longa L*) yang digunakan berasal dari UPT Materia Medika Kota Batu dengan dosis ekstrak 1.2 gram/kg BB (dosis 1), 1.8 gram mg/kg BB (dosis 2) dan 2.7 gram/kg BB (dosis 3).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma longa L* terhadap gambaran histologi pankreas pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma longa L* terhadap penurunan kadar IL-6 pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.

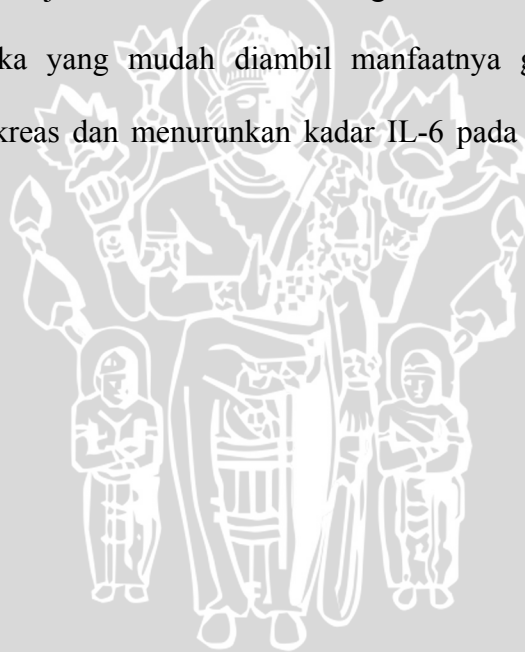
1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma longa L* terhadap gambaran histopatologi pankreas dan kadar IL-6 pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus (hasil induksi *streptozotocin*).

2. Manfaat aplikatif

Penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk mengolah herbal *Curcuma longa L* menjadi fitofarmaka yang mudah diambil manfaatnya guna menghambat kerusakan sel pankreas dan menurunkan kadar IL-6 pada penderita diabetes melitus tipe 1.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

!

2.1 *Curcuma longa* L

Curcuma longa L atau kunyit kuning termasuk salah satu tanaman rempah dan obat asli dari wilayah Asia Tenggara. Tanaman ini kemudian mengalami persebaran ke daerah Indo-Malaysia, Indonesia, Australia bahkan Afrika. Kunyit kuning adalah tanaman rimpang yang biasa digunakan untuk pengobatan tradisional. Tanaman ini tumbuh pada daerah yang bersuhu sekitar 20 – 30⁰ C (Rahmat, 1994).

Menurut Rahmat (1994), klasifikasi *Curcuma longa* L adalah sebagai berikut :



Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Family	: Zingiberaceae
Genus	: Curcuma
Spesies	: <i>Curcuma longa</i> L

Batang *Curcuma longa* L dapat tumbuh sampai satu meter dengan bunga berbentuk terompet berwarna kuning pucat. *Curcuma longa* L berkembang biak melalui rhizome. Rimpang berwarna kuning dan memiliki aroma yang khas karena kandungan kurkumin dan memiliki rasa pahit. Ada sekitar 80 – 120 spesies

dari genus *Curcuma* tapi baru 80 spesies yang teridentifikasi dengan baik (Prasetyo, 2011).

Menurut Prasetyo (2011) beberapa kandungan kimia dari *Curcuma longa* L antara lain :

1. Zat warna kurkuminoid yang merupakan suatu senyawa diarilheptanoid 3 – 4 % yang terdiri dari kurkumin, dihidrokurkumin, desmetoksikurkumin dan bisdesmetoksi-kurkumin.
2. Minyak atsiri 2 – 5 % yang terdiri dari seskuterpen dan turunan fenilpropana turmeron (aril-turmeron, alpha turmeron dan beta turmeron), kurlon kurkumol, atlanton, bisabolen, seskuifellandren, zingiberin, aril kurkumon, humulen.
3. Protein
4. Fosfor
5. Kalium
6. Besi
7. Vitamin C

Kurkumin merupakan komponen penting dari *Curcuma longa* L yang memberikan warna kuning yang khas. Kurkumin termasuk golongan senyawa polifenol. Kurkumin dapat berperan sebagai antioksidan karena mengandung senyawa fenolik. Atom H dari senyawa fenolik sangat potensial sebagai aktivitas antioksidan. Banyak senyawa fenolik diketahui potensial dalam aktivitas antioksidan serta beberapa diantaranya berperan untuk inhibitor melanogenesis (Barnes *et al.*, 2004).

Penelitian pada kurkumin telah menunjukkan spektrum efek terapi yang luas. Sebagai antioksidan, daya kerja kurkumin lebih kuat daripada tokopherol, hal ini ditunjukkan dalam Antony (2008). Aktivitas kurkumin sebagai antioksidan lebih kuat dari pada dehidrozingeron, analog kurkumin yang didapatkan dari isolat *Zingiber officinale*. Kurkumin juga memiliki efek lainnya seperti antiinflamasi, antibakteria, antivirus, antijamur, antitumor, antispasmodik dan hepatoproteksi (Kohli *et al.*, 2004).

Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan terhadap sel normal, protein dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas (Halliwell, 2000).

Beberapa sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu :

1. Antioksidan yang sudah ada di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan enzim antioksidan.
2. Antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan.
3. Antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari, juga dapat diperoleh dari hewan dan mikroba.

Jenis antioksidan yang banyak didapatkan dari bahan alami berupa vitamin C dan E, beta karoten, pigmen seperti antosianin dan klorofil, flavonoid dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas (Putu, 2011).

2.2 Diabetes Melitus

Diabetes diturunkan dari bahasa Yunani yang berarti pipa air melengkung (syphon). Diabetes dinyatakan sebagai keadaan di mana terjadi produksi urin yang melimpah pada penderita (Lawrence, 1994). Diabetes melitus (DM) merupakan suatu penyakit yang melibatkan hormon endokrin pankreas, antara lain insulin dan glukagon. Manifestasi utamanya mencakup gangguan metabolisme lipid, karbohidrat, dan protein yang pada gilirannya merangsang kondisi hiperglikemia (Unger and Fooster, 1992).

Diabetes melitus menurut Beenen (1996) adalah suatu sindrom yang mempunyai ciri kondisi hiperglikemik kronis, gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein, terkait dengan defisiensi sekresi dan/atau aksi insulin secara absolut atau relatif, sedangkan Kahn (1995) memberikan definisi diabetes melitus sebagai sindrom kompleks yang terkait dengan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein dengan ciri-ciri hiperglikemik dan gangguan metabolisme glukosa, serta terkait secara patologis dengan komplikasi mikrovaskuler yang spesifik, penyakit mikrovaskuler sekunder pada aterosklerosis, dan beberapa komplikasi yang lain meliputi neuropati, komplikasi dengan kehamilan, dan memperparah kondisi infeksi.

Berbagai proses patologis berperan dalam terjadinya DM, mulai dari kerusakan dari sel pankreas yang berakibat defisiensi insulin sampai kelainan yang menyebabkan resistensi terhadap kerja insulin. Kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein pada DM disebabkan kurangnya kerja insulin pada jaringan target (Adnyana *et al.*, 2006).

Menurut DiPiro *et al.* (2005) gejala utama diabetes melitus pada manusia yaitu *polifagia* (meningkatnya rasa lapar), *polidipsia* (meningkatnya rasa haus), dan *poliuria* (meningkatnya buang air kecil), serta kehilangan berat badan terutama pada diabetes melitus tipe 1 (DMT1). Gejala berupa *polidipsia* merupakan mekanisme kompensasi tubuh untuk mengatasi dehidrasi akibat *poliuria*. Adanya kejadian defisiensi glukosa intrasel, menyebabkan timbulnya kompensasi tubuh untuk merangsang saraf sehingga nafsu makan meningkat dan timbul *polifagia*. Meski terjadi peningkatan *intake* makanan, berat tubuh menurun secara progresif akibat efek defisiensi insulin pada metabolisme lemak dan protein. Sintesis trigliserida menurun saat lipolisis meningkat sehingga terjadi mobilisasi asam lemak berlebih dari simpanan trigliserida. Peningkatan asam lemak dalam darah sebagian besar digunakan oleh sel sebagai sumber energi alternatif (Santoso, 2001).

Menurut Soegondo (2005), diabetes melitus diklasifikasikan menjadi diabetes melitus tipe 1, diabetes melitus tipe 2, diabetes melitus gestasional, dan diabetes melitus tipe lain.

1. Diabetes Melitus Tipe 1 (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*)

Menurut Gustaviani (2007), pada diabetes melitus tipe ini terjadi destruksi sel beta, umumnya menjurus ke defisiensi insulin absolut, bisa melalui proses imunologik ataupun bisa idiopatik yang ditandai oleh tidak adanya sekresi insulin. Diabetes melitus tipe 1 dapat timbul pada umur muda (anak-anak, remaja) (Widowati, 2008).

2. Diabetes Melitus Tipe 2) *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus**

Menurut Widowati (2008), pada diabetes melitus tipe 2 terjadi kekurangan insulin, tetapi tidak seberat seperti pada diabetes melitus tipe 1. Pada diabetes melitus tipe 2 selain kekurangan insulin, juga disertai resistensi insulin yaitu adanya insulin tidak bisa mengatur kadar gula darah untuk keperluan tubuh secara optimal, sehingga ikut berperan terhadap meningkatnya kadar gula darah. Diabetes melitus tipe 2 biasanya timbul pada usia lebih dari 40 tahun. Kebanyakan pasien diabetes melitus tipe ini bertubuh gemuk, dan resistensi terhadap kerja insulin dapat ditemukan pada banyak kasus (Woodley and Whelant, 1995).

3. Diabetes Melitus Gestasional

Diabetes melitus gestasional merupakan diabetes melitus yang timbul selama masa kehamilan karena pada kehamilan terjadi perubahan hormonal dan metabolik sehingga ditemukan jumlah atau fungsi insulin yang tidak optimal yang dapat menyebabkan terjadinya komplikasi yang meliputi preeklampsia, kematian ibu, abortus spontan, kelainan kongenital, prematuritas, dan kematian neonatal. DM gestasional meliputi 2-5 % dari seluruh diabetes melitus (Arif dkk., 2001).

4. Diabetes Melitus Tipe Lain

Pada diabetes melitus tipe lain, hiperglikemia berkaitan dengan penyakit-penyakit lain yang jelas. Penyakit tersebut meliputi penyakit eksokrin pankreas, defek genetik fungsi sel beta, defek genetik fungsi insulin,

endokrinopati, karena obat / zat kimia, infeksi, imunologi, dan sindrom genetik (Soegondo, 2005).

2.3 Pankreas

Pankreas adalah organ majemuk, campuran kelenjar endokrin dan eksokrin (Subowo, 1992; Junqueira, 1995; Arief, 2004). Struktur organ pankreas mirip dengan kelenjar parotis. Namun berbeda dengan kelenjar parotis yang saluran keluarannya menempel pada tepi asinus, pankreas merupakan asinus serous murni dengan sel-sel sentro acinus pada tengah asinus karena duktus intralobularis lainnya di tengah-tengah asinus (Halim, 1990).

Pankreas menyilang korpus vertebra mulai dari duodenum sampai limpa, berbentuk irregular dan dilukiskan menjadi tiga bagian yaitu kepala (*caput*), badan (*corpus*), dan ekor (*cauda*) (Pearce, 2000). Dalam keadaan segar berwarna merah pucat atau putih dengan simpai yang tidak jelas. Diliputi oleh jaringan ikat yang jarang dan tipis dan membentuk septa ke dalam sehingga membagi kelenjar dalam lobulus yang nyata. Jaringan pankreas terdiri dari lobula sel sekretori yang tersusun mengitari saluran halus (Pearce, 2000). Pankreas merupakan campuran kelenjar eksokrin berupa asinus serous dan endokrin berupa Pulau Langerhans (Junqueira, 1995).

1. Endokrin pankreas

Pulau Langerhans adalah mikroorgan endokrin multihormonal dari pankreas, menempati 20% volume pankreas dan membentuk 1 – 2% berat pankreas.

Pada manusia ada 1 – 2 juta Pulau Langerhans. Pulau Langerhans banyak di dalam kauda dibandingkan korpus dan kaput (Ganong,1995).

Pulau Langerhans tampak sebagai kelompok sel berbentuk bulat, pucat, dikelilingi simpai halus, tidak memiliki saluran, dengan banyak pembuluh darah untuk penyaluran hormon kelenjar pankreas (Johnson, 1993; Subowo, 1992; Tambajong, 1995). Pulau-pulau kecil sel endokrin ditemukan berselang-seling diantara sel eksokrin pankreas (Ganong ,1995; Subowo, 1992). Simpai serat-serat retikulin halus mengelilingi setiap Pulau Langerhans dan memisahkannya dari eksokrin pankreas yang berdekatan. Sel-sel parenkim dan pembuluh darah di inervasi oleh serat saraf autonom (Junqueira, 1995).

Sel-sel dalam pulau ini dengan menggunakan imunohistokimia dapat dibagi berdasarkan sekresi dan morfologinya yaitu yaitu sel A, B, D dan F yang juga dinamai sel α , β , δ , PP (polipeptida pankreas)(Paulsen, 2000). Sel α mensekresikan glukagon, sel β mensekresikan insulin, sel δ mensekresikan somatostatin, sel PP menghasilkan polypeptida pankreas (Ganong, 1995; Paulsen, 2000).

Tabel 2.1 Sel-Sel pada Organ Pankreas (Underwood, 1992)

Tipe Sel	Hormon Yang Dihasilkan	Rata-rata (%)
Beta	Insulin	70%
Alfa	Glukagon	20%
Delta	Somastostatin	8%
PP	Pankreatik Polipeptida	2%

2. Eksokrin pankreas

Eksokrin pankreas mensekresi enzim dan proenzim sebagai berikut: tripsinogen, kemotripsinogen yang memecah protein; lipase yang menghidrolisis lemak netral menjadi gliserol dan asam lemak amilase, yang menghidrolisis tepung dan karbohidrat lainnya; ribonuklease, dan deoksiribonuklease (Tambajong, 1995; Junqueira, 1995; Leeson, 1990).

Pengaturan enzim pankreas diatur oleh hormon sekretin dan kolesitokinin, yang dihasilkan oleh mukosa duodenum; serta nervus vagus. Sekretin menimbulkan sekresi cairan dalam jumlah besar, sedikit protein, non enzimatik, dan kaya akan bikarbonat (Junqueira, 1995; Leeson, 1990).

2.4 Interleukin-6

Menurut Paraskevas (2009), interleukin-6 (IL-6) adalah suatu limfokin mediator inflamatori yang dihasilkan oleh rangsangan sel granulosit, megakariosit, dan monosit yang berasal dari sel endotel, fibroblas dan makrofag. IL-6 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1986 dan merupakan faktor yang diproduksi oleh limfosit T, berfungsi sebagai regulator sel B dan mempunyai efek pada aktivasi dan maturasi sel B dan T, makrofag, osteoklas, kondrosit dan sel endotel serta terlibat dalam proses hematopoiesis dalam sumsum tulang dan sintesis *acute-phase reactant* di hepar. Target respon sistemik IL-6 terhadap inflamasi adalah sistem syaraf, hepar dan sumsum tulang.

2.5 *Rattus norvegicus*

Rattus norvegicus memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm, bobot jantan dewasa berkisar 450 – 520 gram dan betina 250 – 300 gram. Masa sapih tikus hingga usia 21 hari dan memasuki masa dewasa pada usia 40 – 60 hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Sistem klasifikasi *Rattus norvegicus* menurut Sharp dan La Regina (1998) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Sprague Dawley, Wistar dan Long Evans

Sebagai hewan laboratorium, *Rattus norvegicus* memiliki beberapa keunggulan, antara lain: penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Malole dan Pramono, 1989).

2.6 Streptozotocin

Streptozotocin (streptozosin, STZ, Zanosar) merupakan senyawa hasil sintesis dari *Streptomyces achromogenes* yang berfungsi sebagai antibakteri spektrum luas, antitumor, bahan karsinogenik dan secara selektif menghancurkan sel beta pada pulau Langerhans (Cooperstein, 1981). Hewan diabetes melitus dapat ditimbulkan dengan pankreatektomi, pemberian aloksan, STZ atau toksin lain. Pemberian bahan yang menghambat sekresi insulin dan oleh pemberian antibodi anti-insulin dalam dosis tepat menyebabkan kerusakan selektif sel beta pulau Langerhans pankreas (Ganong, 1995).

Streptozotocin sering digunakan sebagai induksi *insulin-dependent* dan *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM dan NIDDM) pada hewan uji karena selektif merusak sel β pankreas (Pathak *et al.*, 2008). STZ bekerja langsung pada sel β pankreas, dengan aksi sitotoksiknya dimediasi oleh *reactive oxygen species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi DM.

Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 adalah 40 – 60 mg/kg BB secara intravena sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. *Streptozotocin* juga dapat diberikan secara berulang, pemberian berulang dapat menggunakan dosis 20 mg/kg BB dengan induksi selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am dkk., 2005).

Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8 – 10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Di lain pihak, sel α dan δ

tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian STZ pada neonatal tersebut sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somastostatin.

Keadaan patologi tersebut identik pada DM tipe 2 (Bonner-Weir *et al.*, 1981; Jackerott *et al.*, 2006; Tormo *et al.*, 2006).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Diabetes melitus merupakan kelainan metabolisme yang disebabkan oleh terjadinya kerusakan pada sel-sel β pulau Langerhans dalam kelenjar pankreas sehingga hormon insulin disekresikan dalam jumlah sedikit bahkan tidak sama sekali. Senyawa diabetogenik seperti STZ dapat mengakibatkan kerusakan sel β Langerhans. Oleh karena itu, senyawa tersebut dapat digunakan untuk membuat hewan uji DMT1. STZ dapat menyebabkan efek diabetogenik dengan meningkatkan konsentrasi intraseluler radikal bebas atau menurunkan kemampuan sel β untuk mengatur/mempertahankan antioksidan.

Injeksi STZ dengan dosis yang tepat pada mencit jantan dewasa dapat menyebabkan kerusakan sel β pankreas dan menginduksi DM dalam 2-4 hari. STZ mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Terjadi pembentukan anion superoksida dan peningkatan aktivitas xantin oksidase karena aksi STZ dalam mitokondria. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas.

Reactive oxygen species (ROS) adalah radikal bebas dan senyawa yang mudah membentuk radikal bebas yang cenderung reaktif bereaksi dengan senyawa lain. Di dalam tubuh, ROS cenderung bereaksi dengan jaringan sehingga menimbulkan reaksi berantai yang menimbulkan kerusakan jaringan. Stres

oksidatif memberi kontribusi nyata pada kerusakan fungsi sel β pankreas dan resistensi insulin. Peningkatan level ROS menstimulasi protein kinase C melalui *diacylglycerol* (DAG) dan meningkatkan produksi dari sitokin inflamatori, khususnya IL-6 yang merupakan mediator utama bagi respon inflamatori akut.

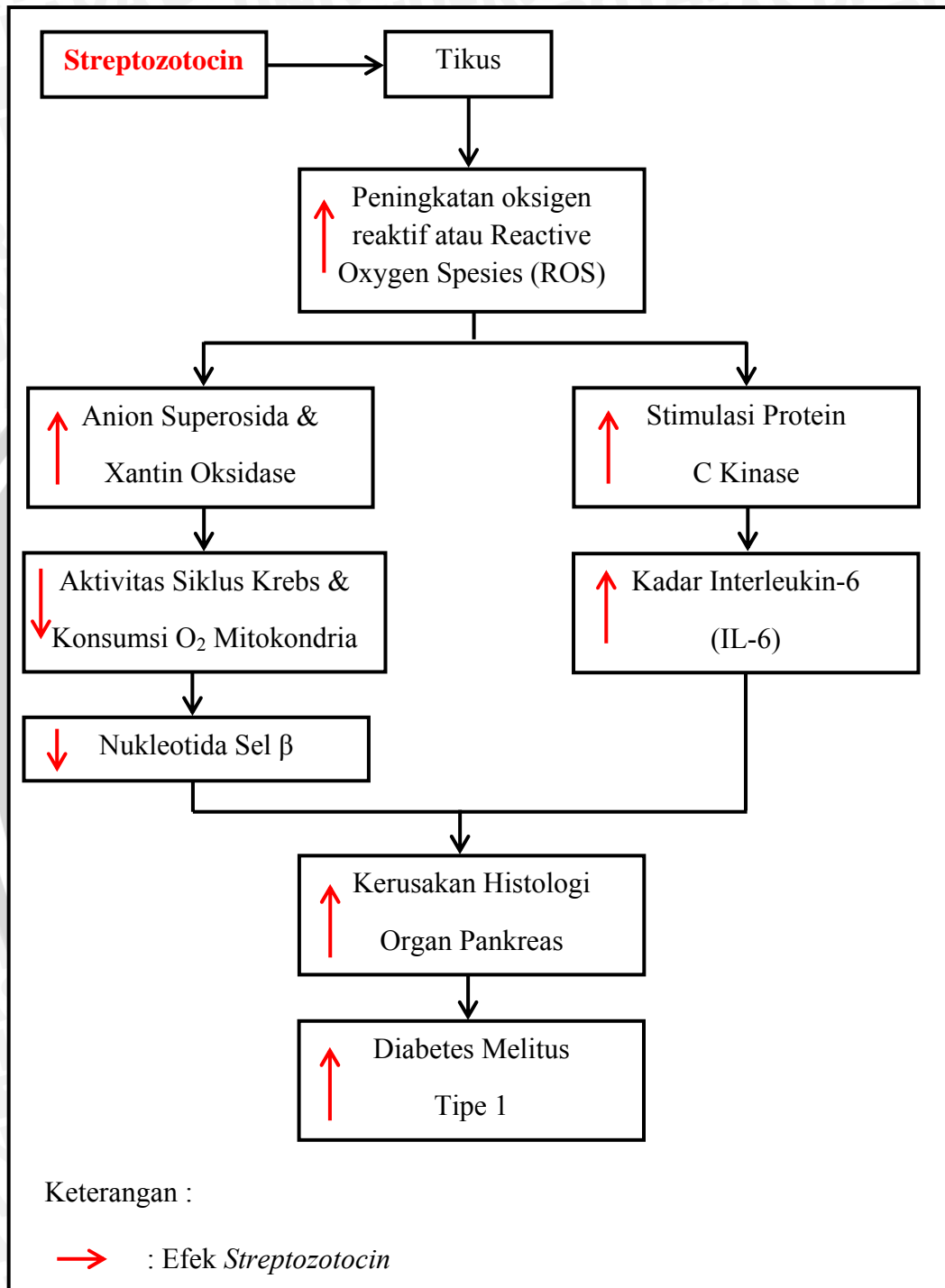
Curcuma longa L telah dikenal luas di Indonesia sebagai bahan pewarna dan penyedap makanan. Senyawa utama yang terkandung dalam rimpang kunyit adalah senyawa kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin, desmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin. Dari ketiga senyawa kurkuminoid tersebut, kurkumin merupakan komponen terbesar. Kurkumin termasuk golongan senyawa polifenol. Polifenol merupakan senyawa yang bersifat antioksidan. Menurut Pemberian antioksidan atau komponen senyawa polifenol menunjukkan dapat menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Senyawa fitokimia mampu mengurangi komplikasi diabetes melitus melalui pengurangan stres oksidatif dan ROS.

Kurkumin yang merupakan antioksidan yang terkandung di dalam kunyit ini dapat menghambat kerusakan sel-sel Pulau Langerhans pankreas yang disebabkan karena penyakit DMT1 pada tikus yang diinduksi dengan STZ. Kurkumin memiliki efek penghambatan terhadap sitokin proinflamasi seperti IL-6. Selain itu, kurkumin sebagai antioksidan juga mempunyai efek menghambat radikal bebas, superoxid dan hidroperoksida.

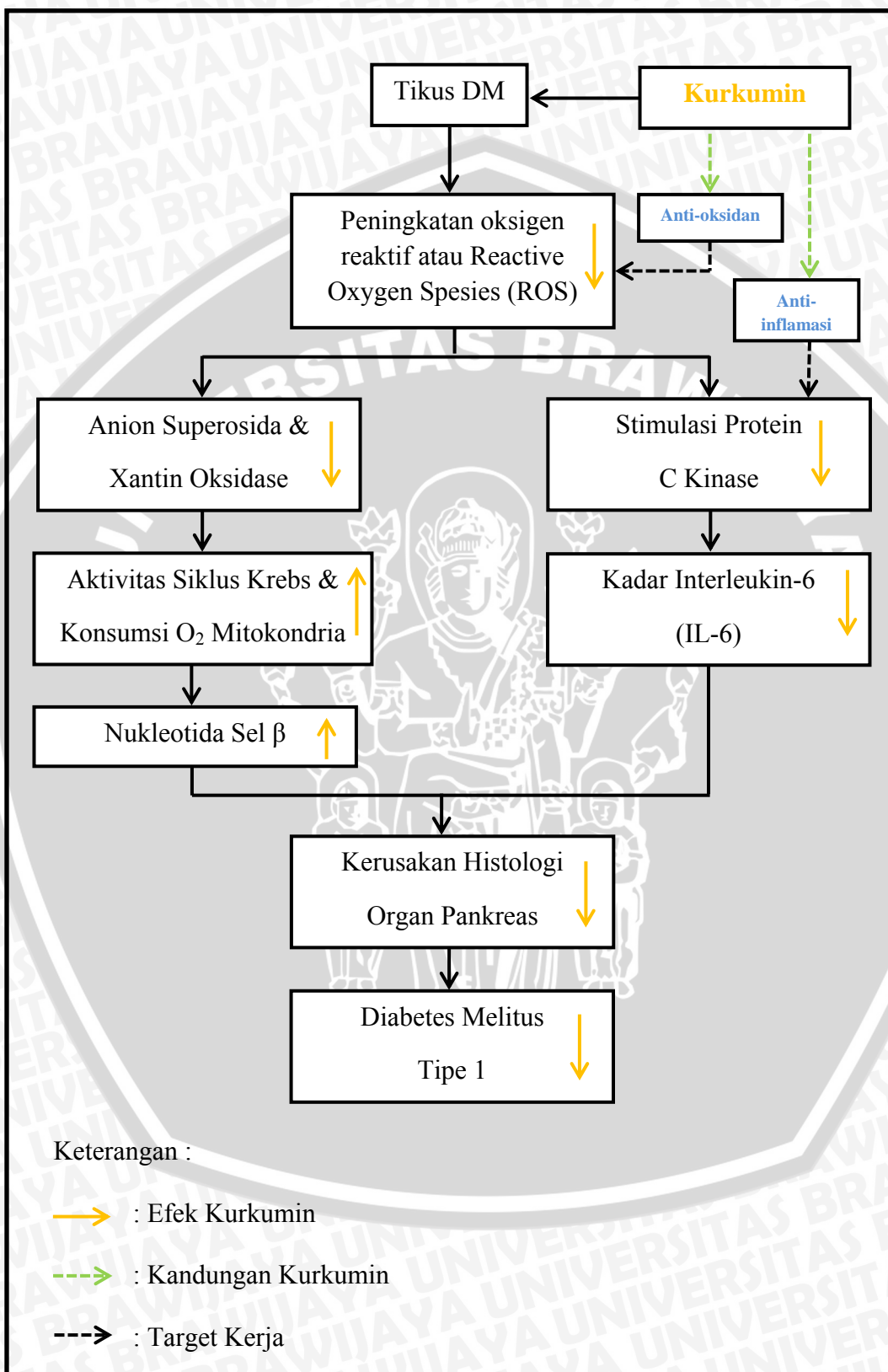
Kandungan kurkumin dalam ekstrak *Curcuma longa L* diharapkan mampu menurunkan kadar radikal bebas pada hewan coba diabetes melitus. Kadar IL-

6 dan tingkat kerusakan histologi pankreas dapat ditekan dengan adanya antioksidan.





Gambar 3.1 Mekanisme kerja streptozotocin



Gambar 3.2 Mekanisme kerja kurkumin

3.2 Hipotesis Penelitian

Sesuai dengan rumusan masalah yang telah ada, hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : pemberian ekstrak *Curcuma longa L* pada hewan coba DMT1 hasil induksi STZ dapat menurunkan kadar IL-6 serta menghambat kerusakan sel-sel pankreas.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 – Mei 2014 di Laboratorium Farmakologi FK-UB, Laboratorium Faal FK-UB, Laboratorium Patologi Anatomi FK-UB, Laboratorium Teknologi Reproduksi PKH-UB, Laboratorium Biokimia FMIPA-UB dan RS. Dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, spuit *tuberculin* 1 cc, *blender*, timbangan, *beaker glass*, oven, sonde, kapas, *scalpel*, gunting, pinset, pot spesimen, tabung *ependorf*, spuit 5 cc, *object glass*, mikroskop, mikropipet, *yellow tip*, sentrifugator, *Rat IL-6 ELISA Kit* (Koma Biotech Inc., Nomor Katalog K0331229).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*), STZ, simplisia *Curcuma longa L*, etanol, NaCl fisiologis, *cloroform*, *Paraformaldehyde Acid* (PFA), alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, *xylol*, *paraffin*, aquades, Na_2CO_3 dan pewarna histologi hematoksilin eosin.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Induksi STZ
3. Pembuatan dan penghitungan ekstrak *Curcuma longa L*

4. Pemberian ekstrak *Curcuma longa L*
5. Isolasi organ pankreas
6. Pengambilan serum darah
7. Pengukuran titer IL-6
8. Pembuatan dan pengamatan preparat histologi
9. Pengamatan histopatologi pankreas
10. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif, kelompok dosis ekstrak 1, kelompok dosis ekstrak 2, kelompok dosis ekstrak 3 dan kelompok kontrol negatif. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Dosis STZ dan ekstrak *Curcuma longa L*

Variabel tergantung : Titer IL-6 dan histologi pankreas

Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), kandang, pakan dan minum tikus

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan antara 150 – 250 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk

menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4.2 Induksi STZ (Aulanni'am dkk., 2005)

Induksi STZ menggunakan spuit *tuberculin* 1 cc melalui intraperitoneal (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (*Multi Low Dose Streptozotocin*).

4.4.3 Pembuatan dan Penentuan Dosis Ekstrak *Curcuma longa L* (Gennaro, 2002)

Pembuatan ekstrak etanol kunyit ini dengan menggunakan metode maserasi, tahapannya dimulai dengan mencuci bersih kunyit dan dipotong tipis – tipis, kemudian dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C hingga kunyit kering. Tahapan selanjutnya yaitu proses ekstraksi, kunyit yang telah kering dihaluskan dengan blender sampai halus, ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter . Kunyit kering tersebut ditambahkan dengan etanol 96% sampai menjadi 1 liter dan dikocok hingga benar – benar

tercampur. Rendaman kunyit dan etanol didiamkan selama satu hari hingga mengendap, kemudian diambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Larutan campuran etanol dan zat aktif kunyit tersebut kemudian dievaporasi menggunakan penangas air dengan suhu 80°C hingga ekstrak menjadi kental dan ditimbang berat ekstraknya, kemudian di evaporasi kembali dengan menggunakan oven untuk menghilangkan etanol yang tersisa. Evaporasi dengan oven dengan suhu 70°C, setiap 15 menit ekstrak ditimbang hingga sebanyak tiga kali penimbangan berat ekstrak sama. Ekstrak kunyit yang telah dievaporasi diencerkan dengan akuades dan Na_2CO_3 agar mudah untuk disondekan.

Penentuan dosis ekstrak kunyit dibedakan menjadi 3 yaitu dosis 1 yaitu 1,2 gram/kg BB, dosis 2 yaitu 1,8 gram/kg BB, dan dosis 3 yaitu 2,7 gram/kg BB.

4.4.4 Pemberian Ekstrak *Curcuma longa*L

Pemberian ekstrak *Curcuma longa* L dilakukan selama 42 hari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

4.4.5 Isolasi Organ Pankreas (Dayatri, 2009)

Sebelum dilakukan isolasi pankreas, tikus dimatikan dengan dislokasi leher kemudian dibedah. Organ pankreas lalu dicuci dengan NaCl fisiologis dan direndam dengan larutan *Paraformaldehyde Acid* 10% dan disimpan dalam freezer.

4.4.6 Pengambilan Serum Darah (Ganong, 2002)

Sesaat setelah tikus dibedah, darah diambil melalui *intracardial* dengan menggunakan spuit 5 cc. Darah dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan selama \pm 6 jam agar terbentuk serum darah. Serum dipindahkan ke dalam tabung ependorf dengan menggunakan mikropipet dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000rpm selama 15 menit. Serum yang dihasilkan dipindah dengan mikropipet ke tabung ependorf lain dan disimpan dalam *freezer*.

4.4.7 Pengukuran Titer IL-6

Prosedur pengukuran titer IL-6 dari serum diawali dengan persiapan larutan reagen dan sampel. Larutan sampel diencerkan dengan menggunakan PBS (*Assay Diluent*). Perbandingan pengenceran yaitu sampel : pengencer adalah 1:2. Larutan substrat dibuat dengan mencampur *Tetra Methyl Benzidinedan* H₂O₂ dengan perbandingan 1:2. Kemudian sampel dimasukkan pada tiap *well* sebanyak 100 μ l. *Plate* ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama dua jam. Setelah itu, tiap *well* diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan *plate* dicuci sebanyak empat kali. Antibodi deteksi (Goat anti- Rat IL-6) ditambahkan sebanyak 100 μ l pada tiap *well*. *Plate* ditutup dengan menggunakan *plate sealer* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama dua jam. Setelah inkubasi, *well* diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan *plate* dicuci sebanyak empat kali. *Streptavidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP) ditambahkan sebanyak 100 μ l sebagai enzim. *Plate* ditutup menggunakan *plate sealer* dan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian tiap *well* diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan *plate* dicuci sebanyak empat kali. Larutan substrat dtambahkan sebanyak 100

μ l. *Plate* ditutup menggunakan *plate sealer* dan inkubasi pada suhu ruangan selama 15 – 25 menit. *Stop solution* berupa H_2SO_4 ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Langkah terakhir adalah nilai absorbansi diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm. Penghitungan kadar IL-6 menggunakan persamaan :

$$y = 0.0001x + 0.1644$$

Keterangan :

y : titer IL-6

x : nilai absorbansi ELISA

4.4.8 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi (Jusuf, 2009)

Sampel organ pankreas yang diambil lalu dibuat preparat histologi. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di *object glass* serta pewarnaan.

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologis dan histologis, serta mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara dimasukkan ke dalam larutan formaldehid.

Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam serta etanol 90%, 95% dan absolut selama 20 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke larutan penjernih yaitu xylol I selama 20 menit dan xylol II

selama 30 menit. Selanjutnya adalah proses infiltrasi dan *embedding* yang dilakukan dalam paraffin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58° – 60°C. Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair sampai memadat. Setelah membeku, cetakan diletakkan dalam penjepit mikrotom dan dipotong dengan ketebalan $\pm 5 \mu\text{m}$. Jaringan dipotong untuk merapikan bagian yang tidak terpotong secara sempurna pada awal pemotongan. Sediaan disimpan dalam inkubator dengan suhu 38° – 40°C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I dan II selama 5 menit lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air selama 30 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah itu, sediaan diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit. Setelah terwarnai, sediaan didehidrasi dengan etanol 80%, 90% dan 95% selama 5 menit. Langkah terakhir, sediaan dikeringanginkan dan dilapisi (*mounting*) dengan menggunakan *entellan*.

4.4.9 Pengamatan Histopatologi Pankreas

Hasil pembuatan preparat histologi pankreas diamati secara visual menggunakan mikroskop Olympus BX51 perbesaran lemah (100x) dilanjutkan perbesaran kuat (400x) untuk melihat gambaran Pulau Langerhans.

4.5 Analisis data

Variabel titer Il-6 dihitung menggunakan *IL-6 ELISA Kit* dianalisa secara kuantitatif dan perubahan histopatologi pankreas berupa kerusakan pada Pulau-Pulau Langerhans dianalisa secara kualitatif. Data kuantitatif IL-6 yang diperoleh dari hasil perlakuan ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan dianalisis menggunakan SPSS 17.0 for Windows dengan analisis ragam *One-Way ANOVA*. Apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 0.05$

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma longa L* Terhadap Titer Interleukin-6 (IL-6) Pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1

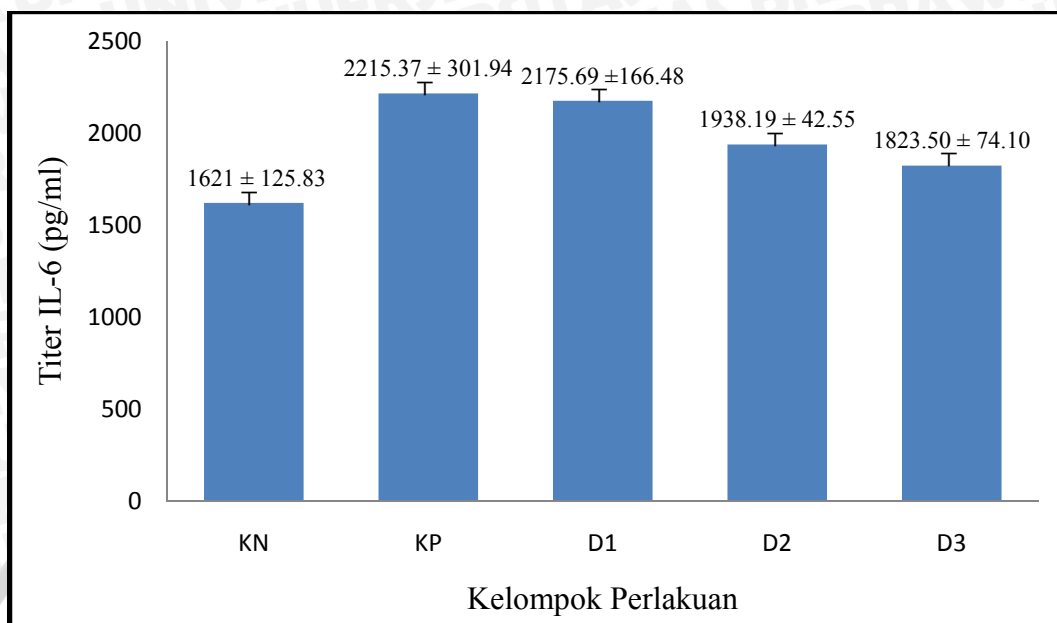
Hasil pengukuran titer IL-6 serum dari hewan coba tikus didapatkan data yang tertera pada tabel 5.1 berikut ini:

Tabel 5.1 Perbandingan titer IL-6 pada kelompok tikus

Kelompok	Titer IL-6				Rata-Rata
	Tikus Ke-				
	1	2	3	4	
KN	1446.00	1746.00	1646.00	1646.00	1621.00 ± 125.83 ^a
KP	2506.00	2446.00	1954.75	1954.75	2215.37 ± 301.94 ^c
D1	2246.00	2156.00	2346.00	1954.75	2175.69 ± 166.48 ^{bc}
D2	1886.00	1926.00	1986.00	1954.75	1938.19 ± 42.55 ^{abc}
D3	1746.00	1786.00	1916.00	1846.00	1823.50 ± 74.10 ^{ab}

Keterangan : Notasi a, b, c menunjukkan adanya yang signifikan antar satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Interleukin-6 merupakan sitokin intermediet yang dikatakan mempunyai fungsi ganda dimana padakeadaan inflamasi produksinya akan meningkat sebagai sitokin pro-inflamasi dan selanjutnya dapat mengaktifkan makrofag dan neutrofil untuk menghasilkan sitokin anti-inflamasi (Wiryan, 2008). Perbandingan rata-rata titer IL-6 yang telah dianalisis disajikan pada gambar grafik 5.1 berikut ini:



Gambar 5.1 Perbandingan rata-rata titer IL-6 (pg/ml) pada kelompok tikus

Gambar 5.1 menunjukkan adanya penurunan titer IL-6 pada kelompok tikus model diabetes melitus tipe 1 yang diberi ekstrak *Curcuma longa L.* Kelompok D1 memiliki titer IL-6 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok KN. Kelompok D2 memiliki titer IL-6 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok D1. Kelompok D3 memiliki titer IL-6 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok D2. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* dapat menurunkan titer IL-6 pada tikus model diabetes melitus tipe 1.

Hasil uji lanjutan menggunakan *Tukey Test* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan perbedaan subset yang terbentuk (Lampiran 6). Nilai titer IL-6 pada kelompok D2 dan D3 tidak berbeda nyata dengan KN. Perbedaan yang nyata terjadi pada D3 terhadap KP sedangkan D1 dan D2 tidak berbeda nyata dengan KN tetapi tetap terjadi penurunan titer IL-6. Hal ini menunjukkan bahwa

pemberian ekstrak *Curcuma longa L* pada tikus model diabetes melitus tipe 1 berpengaruh terhadap penurunan titer IL-6. Penurunan titer IL-6 ini terjadi karena pengaruh kandungan kurkumin dalam ekstrak *Curcuma longa L*.

Diabetes melitus tipe 1 merupakan penyakit inflamasi pada pulau Langerhans pankreas yaitu dengan adanya kerusakan dari sel-sel β akibat dari proses apoptosis (kematian sel yang terprogram) yang ditimbulkan karena sel β berinteraksi dengan sel T teraktivasi dan sitokin proinflamasi. Pembuatan hewan coba diabetes melitus tipe 1 menggunakan STZ sebagai agen diabetik. STZ yang diinduksi ke hewan coba akan merusak masa sel β Langerhans secara langsung. STZ mampu membangkitkan oksigen reaktif atau *Reactive Oksigen Species* (ROS) yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β (Akpan *et al.*, 1987; Szkudelski, 2001). Titer ROS yang tinggi dalam tubuh dapat menstimulasi peningkatan produksi sitokin inflamasi terutama IL-6. Perubahan kadar oksidan tanpa diikuti dengan peningkatan kadar antioksidan akan menimbulkan stres oksidatif (Reis *et al.*, 2012).

Menurut Kristiansen dan Thomas (2005), terdapat adanya hubungan antara IL-6 dengan kejadian diabetes melitus tipe 1. Tingginya titer IL-6 dapat memicu terjadinya kerusakan pada pankreas. IL-6 bersinergi dengan sitokin proinflamasi lain di pankreas dapat menyebabkan kerusakan pada sel β . IL-6 dan IL-1 menginduksi sintesis NO pada pulau Langerhans.

Pemberian ekstrak *Curcuma longa L* selama 6 minggu telah menunjukkan adanya penurunan titer IL-6 pada hewan coba diabetes melitus tipe 1. Senyawa fitokimia mampu memanipulasi dengan berbagai mekanisme sehingga dapat

mengurangi komplikasi diabetes melitus (Tiwari dan Rao, 2002). Salah satu kandungan bioaktif dari *Curcuma longa L* yaitu kurkumin yang termasuk senyawa golongan polifenol. Polifenol merupakan senyawa yang mempunyai peran penting dalam pemeliharaan kesehatan dan pencegahan penyakit. Banyak penelitian yang menyatakan bahwa senyawa polifenol dari tumbuh-tumbuhan mempunyai sifat antioksidan dan antiinflamasi yang kuat (Basnet dan Natasa, 2011).

Penurunan titer IL-6 menunjukkan adanya aktivitas penghambatan oksidasi oleh kurkumin. Penghambatan proses oksidasi disebabkan oleh adanya antioksidan polifenol (flavonoid) yang terkandung dalam ekstrak *Curcuma longa L*. Flavonoid mempunyai struktur yang ideal sebagai antioksidan yaitu sebagai *scavanger* radikal dengan adanya senyawa fenol lebih dari satu yang tersusun oleh gugus aromatik dan gugus OH serta adanya ikatan rangkap terkonjugasi dimana struktur tersebut dibutuhkan dalam penangkapan radikal bebas (Aulanni'am dkk., 2012).

Pemberian antioksidan dapat mengurangi stres oksidatif bagi penderita diabetes melitus tipe 1. Pemberian antioksidan dan komponen senyawa polifenol menunjukkan dapat menangkap radikal bebas serta mengurangi stres oksidatif. Atom H dari senyawa fenolik sangat potensial sebagai aktivitas antioksidan (Priyadarsani *et al.*, 2003).

Selain berperan sebagai antioksidan, kurkumin juga berperan sebagai antiinflamasi. Kurkumin memodulasi respon inflamasi menurunkan aktivitas dari *cyclooxygenase-2* (COX-2), *lypoxigenase* dan menginduksi enzim *nitric oxide synthase* (iNOS). Mekanisme antiinflamasi lainnya yaitu kurkumin mampu

menghambat produksi sitokin inflamasi seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), interleukin (IL) -1, -2, -6, -8, dan -12 (Jurenka, 2009).

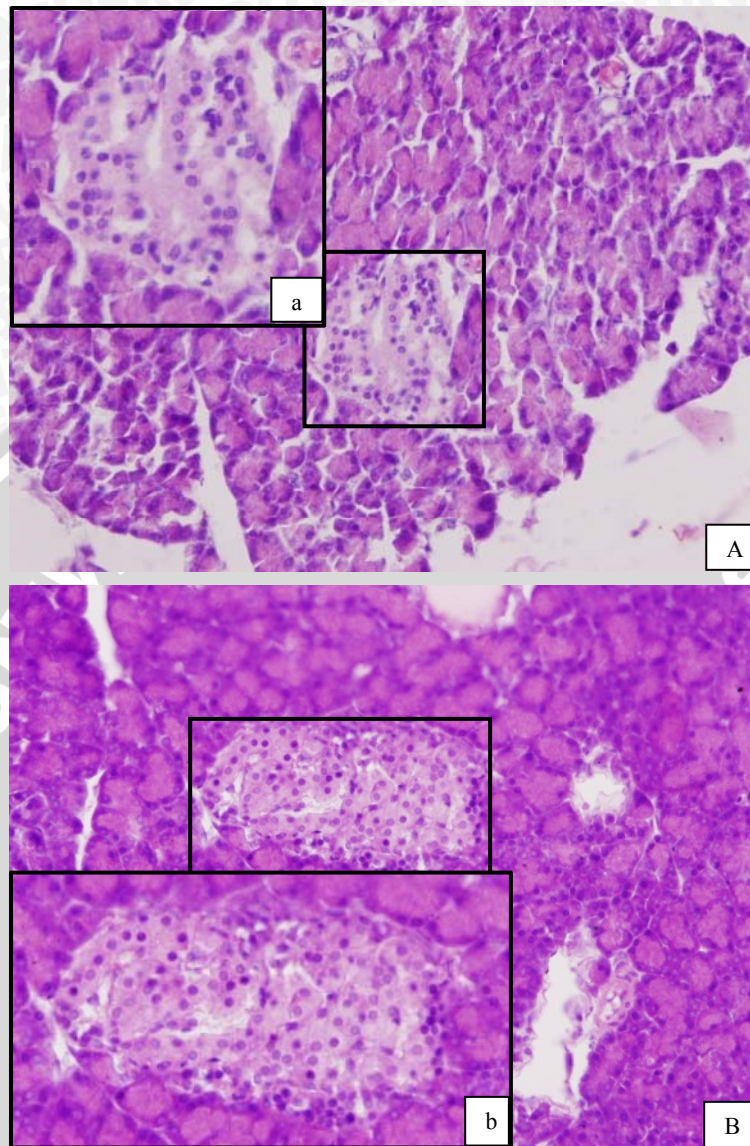
Menurut Jurenka (2009), penghambatan COX-2 dan iNOS dicapai melalui penekanan aktivasi dari *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) oleh kurkumin. NF- κ B merupakan faktor transkripsi eukaryotik yang meliputi regulasi inflamasi, proliferasi selular, transformasi dan tumorigenesis. Penekanan aktivasi NF- κ B menyebabkan penurunan regulasi ekspresi dari COX-2 dan iNOS sehingga menghambat proses inflamasi.

Menurut Liu *et al.*(1993) kurkumin dapat menghambat produksi sitokin seperti IL-6 dengan cara menurunkan regulasi dari protein *signalling* interselular seperti protein kinase C (PKC). Penghambatan regulasi PKC terjadi karena kurkumin bersifat menghambat fosforilasi phosphatidylserine. Phosphatidylserine merupakan senyawa fosfolipid yang berperan dalam proses aktivasi PKC melalui jalur DAG.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma longa L* Terhadap Gambaran Histopatologi Pankreas Pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1

Diabetes melitus tipe 1 merupakan penyakit dengan keadaan kadar gula yang tinggi dalam darah atau hiperglikemia yang disebabkan karena adanya defisiensi insulin dalam tubuh. Diabetes melitus tipe ini sering juga disebut dengan *Insulin Dependent Diabetes Melittus* (IDDM). Defisiensi insulin disebabkan karena adanya kerusakan pada sel-sel endokrin pada organ pankreas yang menghasilkan hormon insulin yaitu sel β pada pulau Langerhans. Sel β terletak di dalam pulau Langerhans dan memenuhi sekitar 80% dari volume pulau Langerhans (BoormanandBeth, 1999). Induksi STZ dapat menyebabkan terjadinya degenarasi pada sel β ditunjukkan dengan perubahan bentuk inti sel (Denik, 2009).

Perubahan pada sel-sel endokrin pankreas dapat dilihat melalui preparat histopatologi pankreas yang diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Hematoksilin merupakan zat warna yang bersifat basa dan berfungsi untuk mewarnai sel yang bersifat asam sedangkan eosin adalah zat warna yang bersifat asam dan berfungsi untuk mewarnai sitoplasma yang bersifat basa (Dayatri, 2009). Pengamatan preparat pankreas hewan coba pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan menggunakan perbesaran 400x. Perbandingan preparat pankreas pada kelompok KP dan KN dapat dilihat pada gambar 5.2 berikut ini:



Gambar 5.2 Gambaran histopatologi pankreas kelompok KN dan KP dengan perbesaran 400x; (A) Pankreas kelompok KP; (B) Pankreas kelompok KN

Pengamatan histopatologi pankreas dilakukan dengan mengamati bentuk morfologi struktur jaringan pankreas tikus yang diwarnai dengan pewarnaan HE. Hasil pewarnaan HE pada potongan jaringan pankreas semua kelompok diamati terhadap morfologi sel-sel jaringan pankreas. Pada pewarnaan HE bagian endokrin (pulau Langerhans) mengambil warna lebih muda (merah muda) daripada bagian

eksokrin dan di dalamnya ditemukan banyak pembuluh darah kapiler (Wheater, 1979).

Terjadi perubahan histologi pankreas pada kelompok KP yang diinduksi dengan STZ tanpa diberi ekstrak *Curcuma longa L* dibandingkan dengan kelompok KN yang tidak diinduksi dengan STZ. Preparat histopatologi pada kelompok KP menunjukkan adanya degenerasi sel endokrin yang intinya berubah bentuk menjadi polimorf (tidak seragam). Perubahan yang terjadi yaitu inti sel endokrin menjadi lebih kecil bahkan mulai menghilang sehingga hanya terlihat sitoplasma yang kosong. Selain itu, inti sel endokrin pada gambaran pankreas kelompok KP tidak tersebar secara merata di pulau Langerhans. Ukuran pulau Langerhans pada preparat kelompok KN memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan pulau Langerhans pada preparat kelompok KP. Pada preparat kelompok KP juga terlihat morfologi dari organ pankreas yang terdapat adanya celah-celah atau rongga baik di daerah endokrin (pulau Langerhans) maupun di daerah eksokrin (sel-sel asinar) yang menunjukkan adanya proses degenerasi. Hal ini menjelaskan bahwa pemberian STZ dapat merusak sel endokrin pankreas khususnya sel β sehingga sekresi insulin ke dalam pembuluh darah menurun.

Menurut Dayatri (2009) perubahan-perubahan pada sel-sel yang ditimbulkan oleh zat yang mempunyai efek sitotoksik yaitu pengecilan pulau-pulau Langerhans, pengurangan jumlah sel β dan degranulasi, vakuolisasi pada sel-sel tersebut. Pada penderita diabetes melitus, beberapa sel β menunjukkan degranulasi lengkap dan sitoplasma yang kosong.

Diabetes melitus tipe 1 diperantarai oleh degenerasi sel β Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (Streptozotisin, Aloksan), atau secara genetik (*wolfram syndrome*) yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali. Hal tersebut mengakibatkan penurunan pemasukan glukosa dalam otot dan jaringan adiposa. Gejala yang sering mengiringi DMTI yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Peningkatan volume urin terjadi disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik) dan benda-benda keton dalam urin. Lebih lanjut, diuresis osmotik tersebut akan mengakibatkan kondisi dehidrasi, kelaparan dan *shock*. Gejala haus dan lapar merupakan akibat dari kehilangan cairan dan ketidakmampuan tubuh menggunakan nutrisi (Lawrence, 1994).

Salah satu jenis senyawa diabetogenik yang sering digunakan adalah *Streptozotocin* (STZ). Mekanisme aksi dari STZ yaitu mampu membangkitkan ROS yang dapat merusak sel β pankreas. Setelah itu terjadi pembentukan anion superoksida karena adanya peningkatan aktivitas xantin oksidase di dalam mitokondria. Hal tersebut menyebabkan produksi ATP di mitokondria menurun dan mengakibatkan pengurangan nukleotida sel β pankreas (Akpan *et al.*, 1987; Szkudelski, 2001).

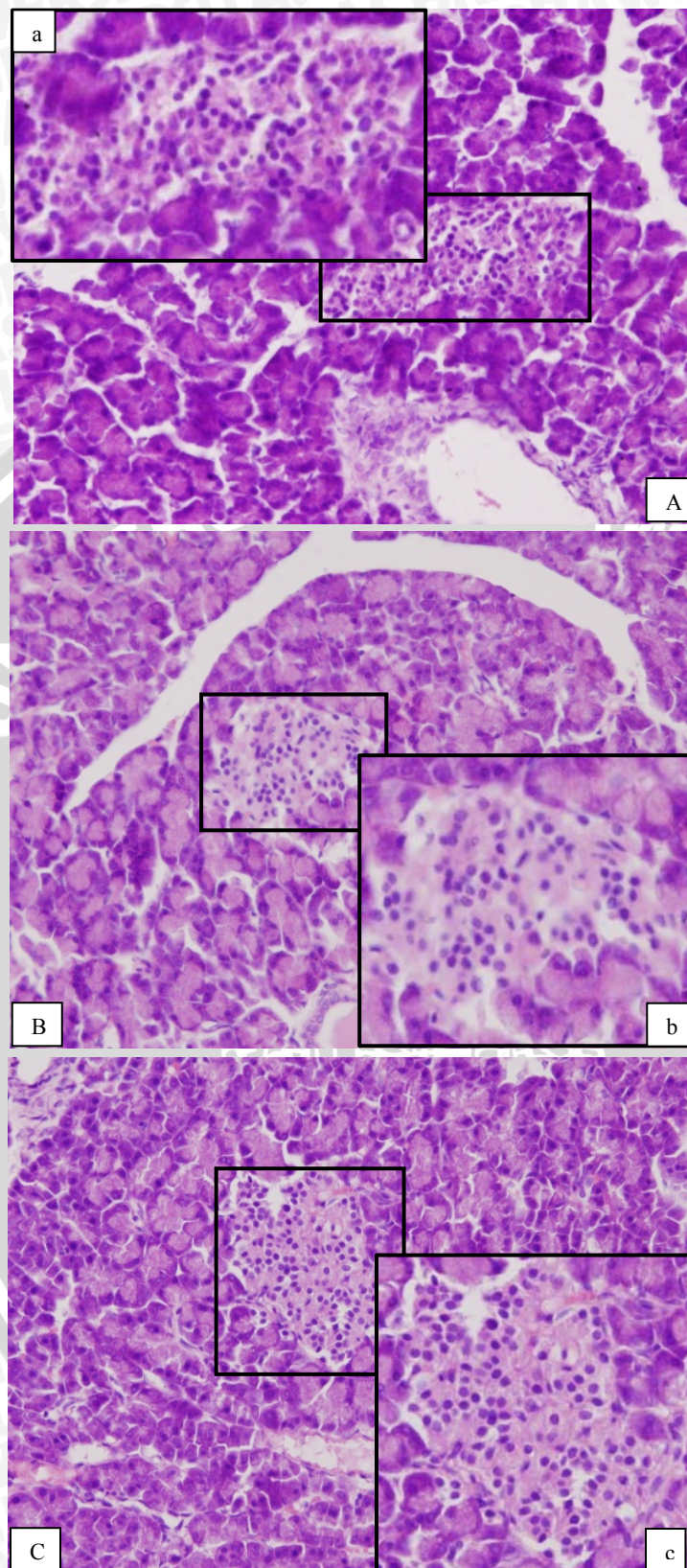
Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase. Xantin oksidase mengkatalis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Dari pembangkitan anion superoksida terbentuk hidrogen

peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel.

Pada keadaan normal, pankreas mampu melakukan regenerasi pada sel-selnya. Jika pankreas mengalami nekrosis, organ ini akan kehilangan kemampuan untuk beregenerasi membentuk sel-sel baru. Hal ini menyebabkan kerusakan yang semakin parah pada pankreas tikus kontrol positif. Pemberian STZ dapat menyebabkan nekrosis pada pankreas tikus sehingga pankreas tidak dapat beregenerasi.

Pada gambar 5.3 terlihat adanya perubahan pada preparat histologi pankreas. Perubahan yang terjadi antara lain jumlah sel-sel β yang lebih banyak, sel-sel β tersebar ke seluruh pulau Langerhans, ukuran pulau Langerhans yang lebih besar serta rongga di daerah endokrin pankreas semakin sedikit dibandingkan dengan pankreas pada kelompok KP. Perubahan ini menunjukkan sel endokrin yang mulai melakukan regenerasi menuju bentuk normal.

Hasil pengamatan preparat histopatologi pankreas dari hewan coba tikus yang diberi ekstrak *Curcuma longa L* menunjukkan adanya pulau Langerhans yang lebih baik daripada pankreas tikus kelompok KP. Gambaran pulau Langerhans dari kelompok D3 (diinduksi STZ dan diberi ekstrak dengan dosis 2,7 gram/kg BB) menunjukkan adanya perubahan yang paling baik dibandingkan dengan gambaran pulau Langerhans dari kelompok D1 (diinduksi STZ dan diberi terapi ekstrak dengan dosis 1,2 gram/kg BB) dan D2 (diinduksi STZ dan diberi terapi ekstrak dengan dosis 1,8 gram/kg BB).



Gambar 5.3 Gambaran histopatologi pankreas kelompok D1, D2 dan D3 dengan perbesaran 400x; (A) Pankreas kelompok D1; (B) Pankreas kelompok D2; (C) Pankreas kelompok D3

Pulau Langerhans pada kelompok D3 sudah hampir mendekati pulau Langerhans pada kelompok KN. Perbedaan yang nyata terlihat dari gambaran pulau Langerhans kelompok D1 terhadap KN serta kelompok D3 terhadap KP. Gambaran pulau Langerhans antara kelompok D3 dan D2 tidak terlalu berbeda yaitu terlihat ukuran pulau Langerhans yang besar serta jumlah sel β yang lebih banyak dibandingkan kelompok KP dan merata ke seluruh pulau Langerhans. Rongga atau celah masih terlihat pada kelompok D3 meski tidak sebanyak pada kelompok KP. Hal ini disebabkan karena pada *Curcuma longa L* hanya terkandung kurkumin yang bersifat antioksidan dan antiinflamasi dan tidak dapat terdapat senyawa yang mampu memicu pertumbuhan sel-sel (*growth factor*) sehingga sel-sel di pankreas yang telah rusak akibat induksi STZ tidak dapat beregenerasi secara cepat. Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa ekstrak *Curcuma longa L* mampu menghambat kerusakan pada sel endokrin pankreas namun tidak dapat memperbaiki kerusakan pankreas secara signifikan.

Streptozotocin mampu meningkatkan kadar ROS dalam tubuh yang menstimulasi peningkatan produksi sitokin inflamasi terutama IL-6 oleh sel-sel makrofag. IL-6 merupakan sitokin pleiotropik dapat memberikan efek inflamasi dan sekaligus anti-inflamasi. IL-6 ini kemudian akan menarik neutrofil ke pankreas. Akumulasi neutrofil di pankreas menyebabkan kerusakan dari sel-sel β selama proses fagositosis. Proses fagositosis juga akan menghasilkan ROS di dalam tubuh sehingga kadar ROS akan semakin meningkat. Hal tersebut akan menyebabkan penurunan fungsi dan peningkatan laju kerusakan sel β pankreas.

Pada histopatologi pankreas D1, D2 dan D3 terlihat pulau Langerhans yang lebih baik dibandingkan dengan histopatologi pankreas dari kelompok KP. Hal ini disebabkan karena perlakuan pemberian ekstrak *Curcuma longa L* yang dapat menghambat kerusakan sel β . Kandungan terpenting dari *Curcuma longa L* adalah kurkumin yang termasuk ke dalam senyawa fenolik golongan flavonoid yang mempunyai sifat antioksidan tinggi. Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Flavonoid berfungsi sebagai penangkap (*scavenger*) anion superoksida dan radikal hidroksi. Flavonoid juga mendonorkan atom hidrogen ke radikal peroksida membentuk radikal flavonoid yang mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga reaksi radikal rantai berhenti (Gusti, 2013). Pemberian antioksidan berupa kurkumin dapat menetralkan radikal bebas yang ada di dalam sel akibat dari induksi STZ dan proses inflamasi yang terjadi di organ pankreas sehingga kerusakan sel β oleh radikal bebas dapat dihambat dan tidak terjadi kerusakan yang lebih lanjut.

BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini, yaitu:

1. Terjadi penurunan kadar Interleukin-6 hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes melitus tipe 1 yang diberi ekstrak *Curcuma longa L.*
2. Terjadi penghambatan kerusakan organ pankreas hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes melitus tipe 1 yang diberi ekstrak *Curcuma longa L.*

6.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai variasi dosis ekstrak *Curcuma longa L* dan jangka waktu pemberian ekstrak *Curcuma longa L.*
2. Diperlukan penelitian lanjutan dengan pengamatan kuantitatif sel β pulau Langerhans pada preparat pankreas secara imunohistokimia.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi *Curcuma longa L* dan senyawa lain yang dapat memicu pertumbuhan sel agar perbaikan pankreas lebih signifikan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana, L., Hensen, dan Budhiarta A.A.G. 2006. Penatalaksanaan Pasien Diabetes melitus di Poliklinik Rumah Sakit Sanglah Denpasar. *Jurnal Penyakit Dalam*. 7:1863
- Akbarzadeh, A, Norouzian D, Mehrabi M.R., Jamshidi S., and Farhangi A. 2007. Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. *Indian Journal of Chemical Biochemistry*. 22 (2):60-64
- Akpan, J.O., Wright, P.H., and Dulin, W.E. 1987. A Comparison Of The Effects Of Streptozotocin, N-methylnitrosourea And Alloxan On Isolated Islets Of Langerhans. *Diabetes & Metabolism*. 13(2):122-128
- Antony, B., Merina B., Iyer V.S., Judy N., Lennert K., and Joyal S. 2008. Apilot Crossover Study To Evaluate Human Oralbioavaibility of BCM-95 (Biocurcumax™); A Novel Bioenhanced Preparation of Curcumin. *Indian J Pharm Sci*. 70(4):445-449
- Araujo, C.A.C., and Leon, L.L. 2001. Biological Activities Curcuma Longa L. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 96(5):723-728
- Arief, M.T.Q. 2004. *Pengantar Metodologi Penelitian untuk Ilmu Kesehatan*. Team CSGF. Klaten
- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, and B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 Auto Antibodies Of type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Produce From Bovine Brain Tissue. *Medical Journal of Indonesia*. 14:109-205
- Arif, M., Kuspuji T., Rakhmi S., Wahyu I.W., Wiwiek S., dan Anantha D.T. 2001. *Kapita Selekt kedokteran. Edisi ke-3*. Media Aesculapius. Jakarta
- Arifin H., dan Delvita V. 2007. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Fetus Pada Mencit Diabetes. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*.12(1): 32-40
- Aulanni'am, A. Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences*, 6:144-154
- Barnes, S., D'Alessandro T., Marion C.K., Rakesh P.P., Brenda J.B., and Victor M.D. 2004. *The Importance of In Vivo Metabolism of Polyphenols And Their Biological Actions, Phytochemicals, Mechanism of Action*. CRC Press

- Basnet, P., and Natasa S.B. 2011. Curcumin; An Anti-Inflammatory Meolecule from A Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules*.16:4567-4598
- Beenen, H.M. 1996. *Diabetes mellitus And Hypertension, General Introduction* [Dissertation]. Universiteit Van Amsterdam. Netherlands
- Booner-Weir, S., Trent D.F., Honey R.N.,and Weir G.C. 1981. Responses of Neonatal Rat Islets to Streptozotocin : Limited β -Cell Regeneration And Hyperglycemia. *Diabetes*. 30:64-69
- Boorman, G.A., and Beth W.G. 1999. *Pathology of the Mouse*. Cache River Press. USA
- Catchpole, B., Ristic J.M., and Fleeman, L.M. 2005. Canine Diabetes Mellitus: Can Old Dogs Teach Us New Trick. *Diabetologia*. 48:1948-1956
- Cooperstein, S.J. and Watkins D. 1981. *The Islet of Langerhans*. Academic Press. New York
- Dayatri, U.A. 2009. *Profil Sel β Pulau Langerhans Jaaringan Pankreas Tikus Diabetes Melitus Yang Diberi Virgin Coconut Oil (VCO)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Denik, Eka. 2009. *Distribusi Sel Insulin Pankreas Pada Tikus Hiperglikemia Yang Diberi Diet Tempe* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- DiPiro, T., Tarbet L., Yee C., Matzke R., Wells G., and Posey M. 2005. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Medical Publishing Division. New York
- Ganong, W.F. 2002. *Fisiologi Kedokteran Edisi ke-20*. EGC. Jakarta
- Gennaro, A.R. 2002. *Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition*. New York ; Lippincott Wiliams and Wilkins
- Gunn-Moore, D. 2013. *Diabetes Mellitus In Cats*. Crieff 2 Day Small Animal CPD Meeting. United Kingdom. 284-304
- Gustaviani R. 2007. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Mellitus*. Pusat PenerbitanDepartemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran UniversitasIndonesia. Jakarta
- Gusti, I.A. 2013. *Suplementasi Kombinasi Tempe M-2 dengan Wortel (Daucus carrota) Meningkatkan HDL dan Antioksidan Total, Serta menurunkan*

LDL, F₂-isoprostan, dan IL-6 pada Tikus Wistar Aterosklerosis [Disertasi]. Program Pascasarjana. Universitas Udayana

Halim, J. 1990. *Atlas Praktikum Histologi Edisi Keempat*. EGC. Jakarta

Halliwell, B. 2002. *Food-Derived Antioxidant: How to Evaluate Their Importance in Food and in Vivo*. Marcel Dekker. Los Angeles

Jackerott, M., Moldrup A., Thams P., Galsgaard E.D., Knudsen J., Lee Y.C., and Nielsen, J.H. 2006. STAT5 Activity In Pancreatic Beta-cells Influences The Severity of Diabetes In Animal Models of Type 1 and 2 Diabetes. *Diabetes*. 55(10):2705-2712

Johnson, K.E. 1993. *Histology and Cell Biology 1st Edition*. Binarupa Aksara. Jakarta

Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi FKUI. Jakarta

Junqueira L.C. 1995. *Histologi dasar Edisi Pertama*. EGC. Jakarta

Jurenka, J.S. 2009. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a major Constituent of Curcuma longa: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Alternative Medicine Review*. 14(2):141-153

Kahn, C.R. 1995. Disorder of Fuel Metabolism. Dalam Becker, K.L. (Ed.), *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd Ed. 1148-54

Kohli K., Ali J., Ansari M.J., and Raheman Z. 2004. Curcumin: A Natural Antiinflammatory Agent. *Indian Jurnal of Pharmacology*. 37(3):141-147

Kristiansen, P. and Thomas M.P. 2005. Interleukin-6 and Diabetes; The Good, The Bad, or The Indifferent. *Diabetes*. 54(2):114-124

Lawrence, J.C. 1994. *Insulin and Oral Hypoglycemic Agents*. Mosby. London

Leeson C.R. 1990. *Textbook of Histology 6th Edition*. WB Saunders. Philadelphia

Liu J.Y., Lin S.J., and Lin J.K. 1993. Inhibitory Effects of Curcumin On Protein Kinase C Activity Induced By 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate In NIH 3T3 Cells. *Carcinogenesis*. 14:857-861

Malole, M.B.M., dan Pramono C.S.U. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor

- Ocktarini, Rizky. 2010. *Pengaruh Ekstrak Herba Anting-Anting (Acalypha australis L.) Terhadap kadar Glukosa Darah Mencit Balb/C Induksi Streptozotocin* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret
- Paraskevas, F. 2009. *Effector Mechanism In Immunity. In: Wintrobe's Clinical Hematology Volume I Twelfth Edition*. Lippincot Wiliams and Wilkins. Philadelphia
- Pathak, S., Dorfmüller H.C., Borodkin V.S., and Aalten M.F. 2008 . Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Pubmed Central J.* 15(8): 799–807
- Paulsen D.F. 2000. *Histology and Cell Biology Examination and Board review* 1st Edition. McGraw-Hill. Singapore
- Pearce E.C. 2000. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis* Edisi Ke-23. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Prasetyo, Y. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kunyit Kuning (*Curcuma longa*) Dalam Mencegah Kerusakan Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Alkohol [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret
- Putu, L.W. 2011. Karakter Dan Toksisitas Ekstrak Bubuk Simplisia Bunga Kamboja Cendana (*Plumeria alba*) Serta Peranannya Dalam Meningkatkan Aktivitas Antioksidan Enzimatis Pada Tikus Sprague Dawley [Disertasi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana
- Rahmat, R. 1994. *Kunyit*. Kanisius. Jogjakarta
- Reis, J.S., C.A.V. Amaral, C.M.O. Volpe, J.S. Fernandes, E.A. Borges, C.A. Isoni, P.M.F. Dos Anjos, and J.A.N. Machado. 2012. Oxidative Stress And Interleukin-6 Secretion During The Progression Of Type 1 Diabetes. *Arg Bras Endocrinol Metab.* 56(7):441-448
- Santoso, B.I. 2001. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem*. EGC. Jakarta
- Sharp, P.E., and La Regina M.C. 1998. *The Laboratory Rat*. CRC Press LLC. America
- Smith, J.B., dan Mankowidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakkan, dan Penggunaan Hewan percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Soegondo S. 2005. *Diagnosis Dan Klasifikasi Diabetes Melitus Terkini*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta

- Subowo.1992. *Histologi Umum Edisi Kedua*. Bumi Aksara. Jakarta
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In β Cells Of The Rat Pancreas. *Physiology Research*. 50: 536-54
- Tambajong J. 1995. *Sinopsis Histologi Edisi Pertama*. EGC. Jakarta
- Tormo, M.A., Gil-Exojo I., Romero de Tejada A., and Campillo J.E. 2006. White Bean Amylase Inhibitor Administered Orally Reduces Glycaemia in Type 2 Diabetic Rats. *British Journal of Nutrition*. 96(3):539-544
- Underwood, J.C.E. 1992. *General and Systemic Pathology*. Churchill Livingstone. London
- Unger, R.H., and Foster, D.W. 1992. *Diabetes Mellitus*. W.B Saunders Company. London.
- Widowati, W. 2007. Peran Antioksidan sebagai Agen Hipoklesterolemia. *Majalah Kedokteran Damianus*. 6(3):228-230
- Wiryananda, Made. 2008. Peranan Terapi Insulin Intensif terhadap Interleukin-6 (IL-6) dan Luaran Klinik pada Penderita Kritis dengan Hiperglikemia. *Jurnal Penyakit Dalam*. 9(2):109-118
- Woodley, M. dan Whelant A. 1995. *Pedoman Pengobatan*. Andioffset Essensia Medica. Jogjakarta

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik

51



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 195-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH PEMBERIAN CURCUMIN (*Curcuma longa*
L) SEBAGAI TERAPI DIABETES MILITUS : KAJIAN
SECARA IN VIVO PADA TIKUS MODEL (HASIL INDUKSI
STZ)

PENELITI : HERLINA PRATIWI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : PENDIDIKAN KEDOKTERAN HEWAN / UNIVERSITAS
BRAWIJAYA




DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 2 Januari 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Surat keterangan determinasi tanaman kunyit

 DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR UPT MATERIA MEDICA Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313) KOTA BATU	
Nomor	: 074 / 0215/ 101.8 / 2013
Sifat	: Biasa
Perihal	: <u>Keterangan Determinasi Tanaman Kunyit</u>
Memenuhi permohonan saudara :	
Nama	: BERNADHITA GAUDIA S.
N I M	: 105130104111002
Fakultas	: Program Kedokteran- Hewan Universitas Brawijaya Malang
<p>1. Perihal determinasi tanaman kunyit</p> <p>Kingdom : Plantae Divisi : Spermatophyta Sub divisi : Angiospermae Kelas : Monocotyledonae Bangsa : Zingiberales Suku : Zingiberaceae Marga : Curcuma Jenis : <i>Curcuma domestica</i> Val. Sinonim : <i>Curcuma longa</i> Linn, <i>C. domestica</i> Rumph. <i>C. longa</i> Auct. <i>Amomum curcuma</i> Murs.</p> <p>Nama Daerah Sumatera ; Kakunye (Enggano) Kuning (Gayo) Hunik (Batak) Odil (Simalur) Kunyit (Lampung) Kunyit (Melayu). Jawa Kunyir (Sunda) Kunir (Jawa Tengah) Temo koneng (Madura). Kalimantan Kunit (Banjar) Henda (Ngayu) Nusa Tenggara Kunyit (Sasak) Huni (Bima). Sulawesi Kuni (Toraja) Kunyi (Ujungpandang) Unyi (Bugis) Kuni (Mandar), Maluku : Kurlai (Leti) Lulu malai (Babar)</p> <p>Kunci determinasi : 1b-2b -3b - 4b - 6b - 7b -9b -10b - 11b- 12b -13b -14a- 15a-109a-110b-111b-112a -113b-116a -119b -120b-128b-129a-130b-132a</p> <p>2. Morfologi : Habitus Semak, tinggi ± 70 cm. Batang Semu, tegak, bulat, membentuk rimpang, hijau kekuningan. Daun Tunggal, lanset memanjang, helai daun tiga sampai delapan, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 20-40 cm, lebar 8-12,5 cm, pertulangan menyirip, hijau pucat. Bunga Majemuk, berambut, bersisik, tangkai panjang 16-40 cm, mahkota panjang ± 3 cm, lebar ± 1,5 cm, kuning, kelopak silindris, bercangap tiga, tipis, ungu, pangkal daun pelindung pulih, ungu. Akar Serabut, coklat muda.</p> <p>3. Nama Simplisia : Curcuma domestica Rhizoma / Rimpang Kunyit.</p> <p>4. Kandungan kimia : Kunyit mengandung senyawa yang berkhasiat obat, yang disebut kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin, desmetoksikurkumin dan bidesmetoksikurkumin dan zat-zat manfaat lainnya Kandungan Zat : Kurkumin , Demetoksikurkumin , Bisdemetoksikurkumin, Minyak atsiri / Volatil oil (Keton sesquiterpen, turmeron, tumeon 60%, Zingiberen 25%, felandren, sabinen, borneol dan sineil) Lemak 1 -3 %, Karbohidrat 3 %, Protein 30%, Pati 8%, Vitamin C 45-55%, Garam-garam Mineral (Zat besi, fosfor, dan kalsium) sisanya. Minyak atsiri (tumeron, zingiberon, sesquiterpena alkohol), kurkumin, desmetoksikurkumin, bidesmetoksikurkumin, zat pahit, minyak lemak, dan hars. Rimpang mengandung saponin, flavonoida dan polifenol, di samping minyak atsiri.</p> <p>5. Penggunaan : Penelitian</p> <p>6. Daftar Pustaka :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anonim, http://www.tanaman.obat.com/kunyit. Diakses tanggal 9 Januari 2009 • Anonim, Serial Tanaman Obat "Kunyit", BPOM, Jakarta, 2006 • Steenis, CGGJ Van Dr. <i>FLORA</i>, 2008, Pradnya Paramita, Jakarta. • Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia I</i>, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan. 	
Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.	
 Batu, 5 September 2013 Kepala UPT Materia Medica Batu  Drs. Husin RM, Apt. MKes. NIP.19611102 199103 1 003	

Lampiran 3. Penghitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Kunyit

Penghitungan dosis ekstrak dengan asumsi rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram, terdapat 4 ekor tikus tiap kelompok serta tiap ekor tikus disonde dengan ekstrak sebanyak 2 ml adalah sebagai berikut:

Dosis I

Dosis ekstrakkunyit 1,2gram/kg BB.

$$D_1 = 0.2 \text{ kg} \times 1,2 \text{ gram/kg BB} \times 4 \text{ ekor} \\ = 0,96\text{gram}$$

Ekstrak Kunyit

- Ditimbang sebanyak 0,96 gram
- Dimasukkan ke dalam labu ukur
- Ditambah pengencer hingga volume menjadi 8 ml
- Diaduk hingga homogen

Hasil

Dosis II

Dosis ekstrak kunyit 1,8gram/kg BB.

$$D_2 = 0.2 \text{ kg} \times 1,8\text{gram/kg BB} \times 4 \text{ ekor} \\ = 1,44 \text{ gram}$$

Ekstrak Kunyit

- Ditimbang sebanyak 1,44gram
- Dimasukkan ke dalam labu ukur
- Ditambah pengencer hingga volume menjadi 8 ml
- Diaduk hingga homogen

Hasil

Dosis III

Dosis ekstrak kunyit 2,7gram/kg BB.

$$D_3 = 0.2 \text{ kg} \times 2,7\text{gram/kg BB} \times 4 \text{ ekor} \\ = 2,16 \text{ gram}$$

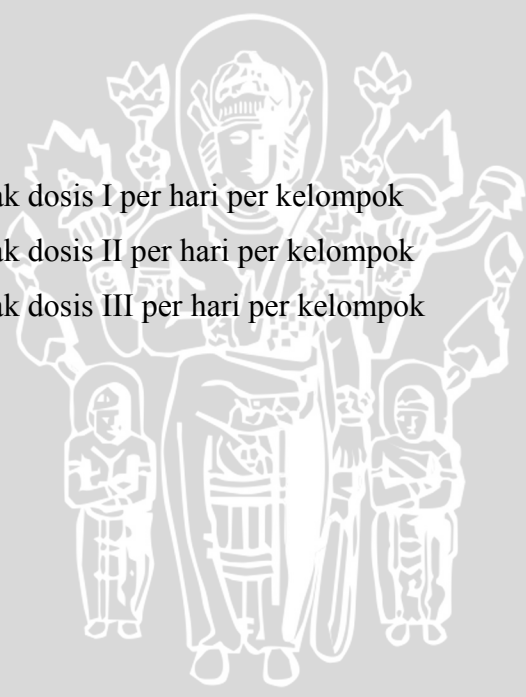
Ekstrak Kunyit

- Ditimbang sebanyak 2,16 g
- Dimasukkan ke dalam labu ukur
- Ditambah pengencer hingga volume menjadi 8 ml
- Diaduk hingga homogen

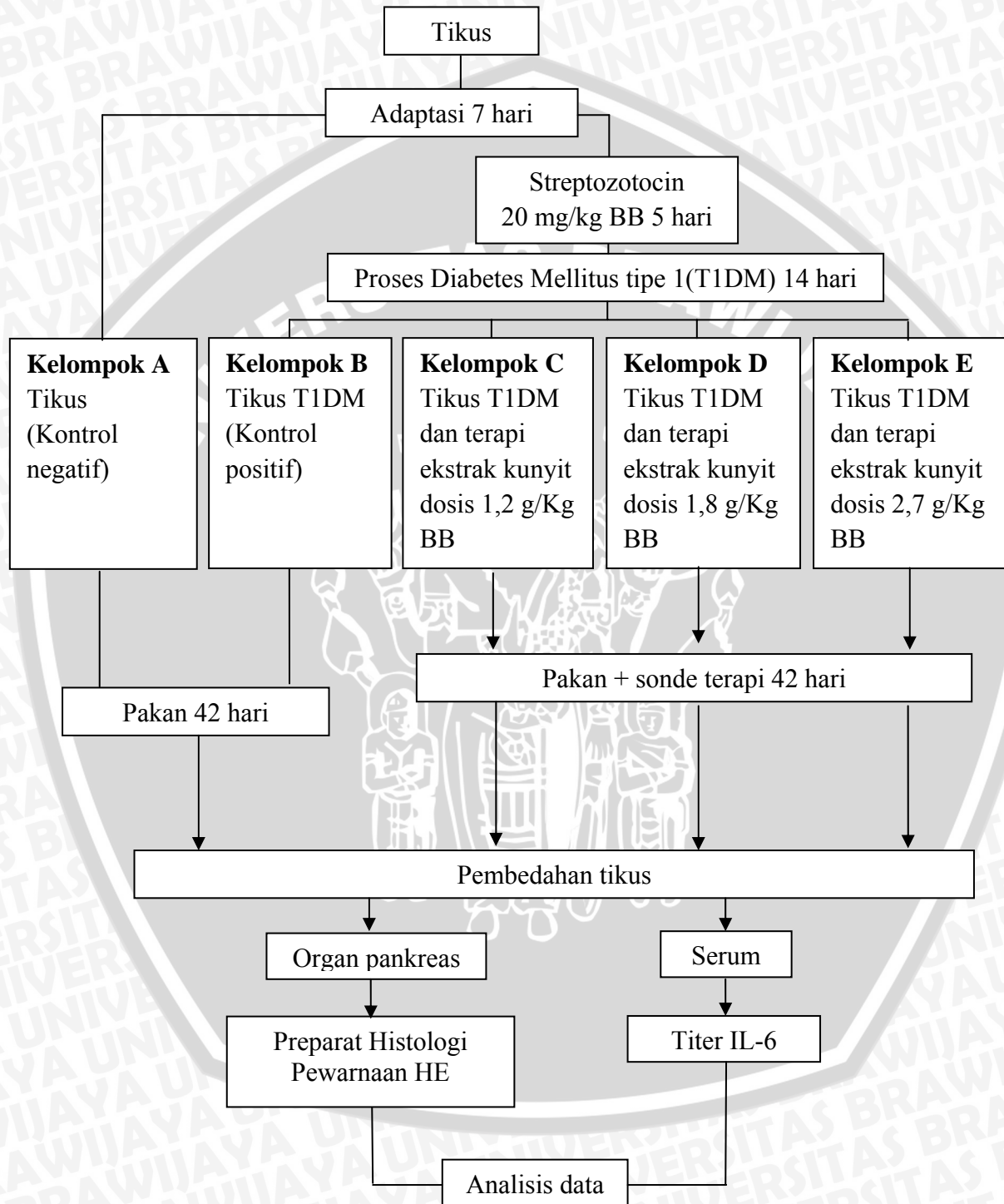
Hasil

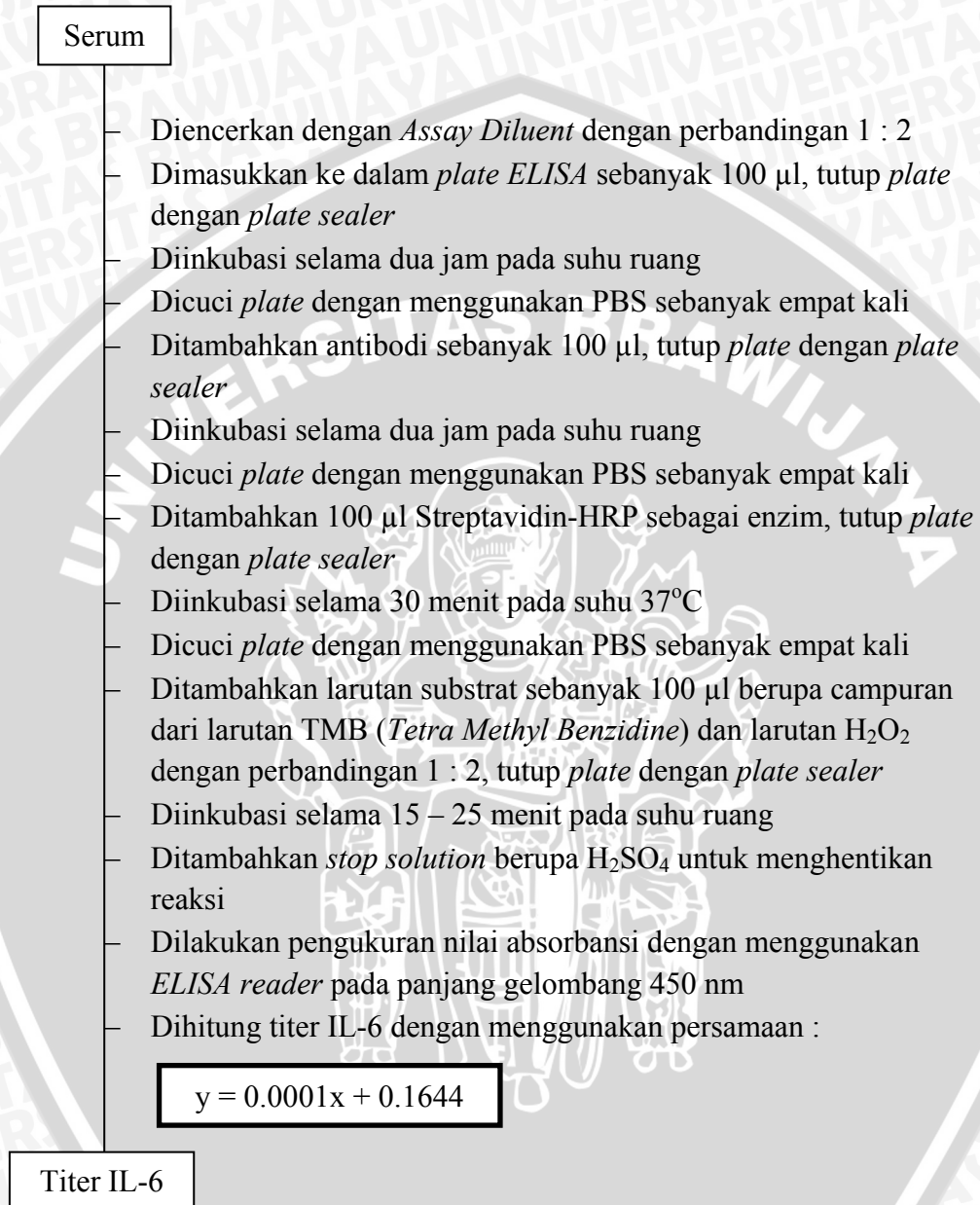
Keterangan:

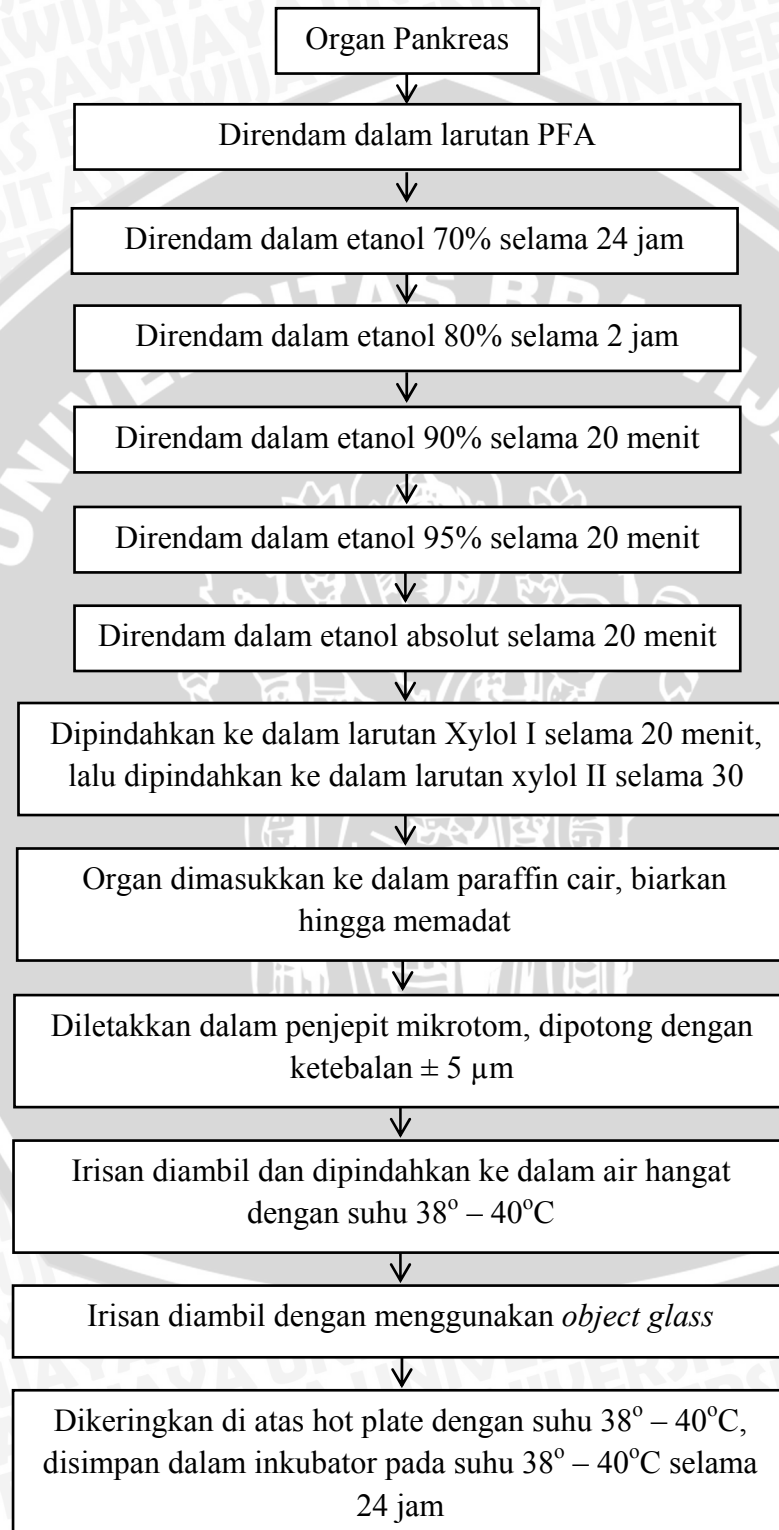
- D_1 : berat ekstrak dosis I per hari per kelompok
- D_2 : berat ekstrak dosis II per hari per kelompok
- D_3 : berat ekstrak dosis III per hari per kelompok

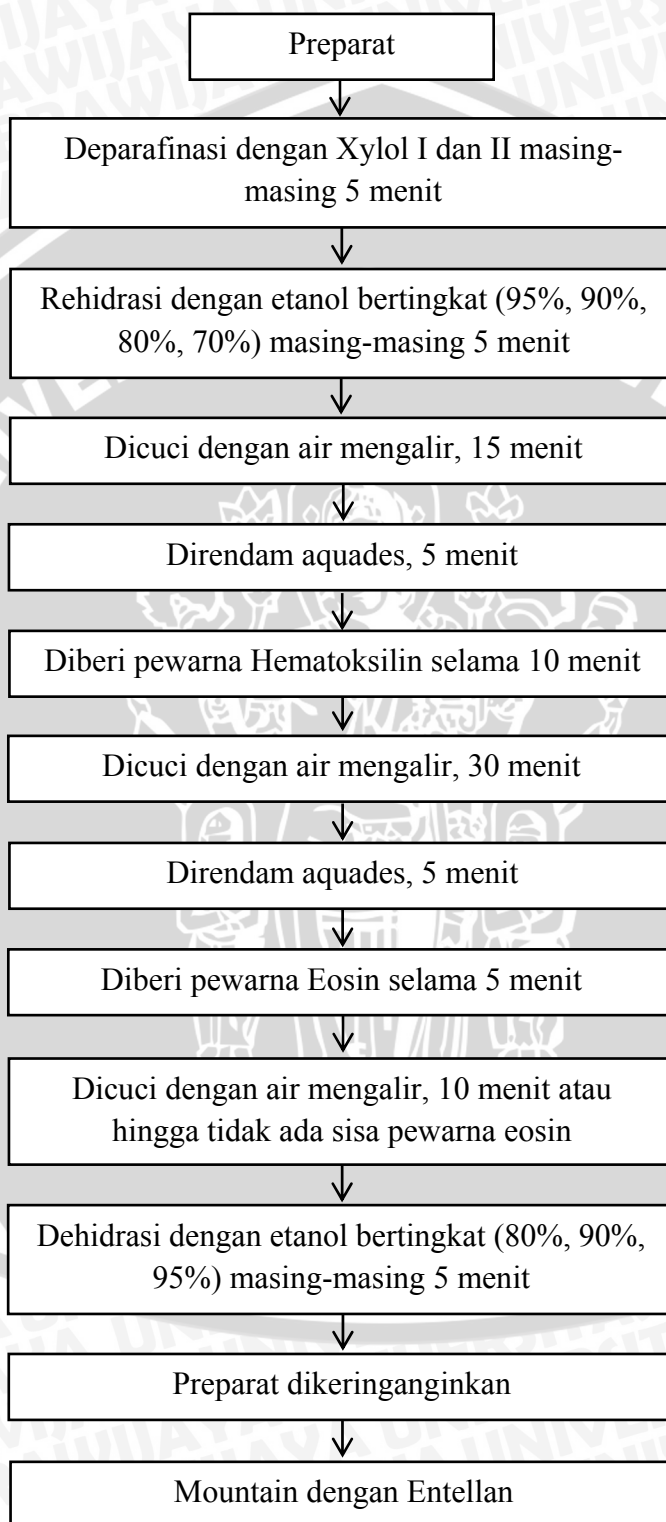


Lampiran 4. Skema Penelitian



Lampiran 5. Skema Prosedur Pengukuran Kadar IL-6

Lampiran 6. Skema Prosedur Pembuatan Preparat Histologi (Jusuf, 2009)

Lampiran 7. Skema Prosedur Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (Jusuf, 2009)

Lampiran 8. Hasil uji statistik One-Way ANOVA kadar Interleukin-6 untuk pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma longa L* pada hewan coba diabetes melitus tipe 1

ANOVA					
Kadar IL6					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	982514.844	4	245628.711	8.648	.001
Within Groups	426060.156	15	28404.010		
Total	1408575.000	19			

Homogeneous Subsets				
Kadar IL6				
Tukey HSD ^a				
KLMPK	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
KN	4	1621.0000		
D3	4	1823.5000	1823.5000	
D2	4	1938.1875	1938.1875	1938.1875
D1	4		2175.6875	2175.6875
KP	4			2215.3750
Sig.		.108	.064	.190

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Kadar IL6
Tukey HSD

(I) KLMPK	(J) KLMPK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	-594.37500*	119.17217	.001	-962.3697	-226.3803
	D1	-554.68750*	119.17217	.002	-922.6822	-186.6928
	D2	-317.18750	119.17217	.108	-685.1822	50.8072
	D3	-202.50000	119.17217	.463	-570.4947	165.4947
KP	KN	594.37500*	119.17217	.001	226.3803	962.3697
	D1	39.68750	119.17217	.997	-328.3072	407.6822
	D2	277.18750	119.17217	.190	-90.8072	645.1822
	D3	391.87500*	119.17217	.034	23.8803	759.8697
D1	KN	554.68750*	119.17217	.002	186.6928	922.6822
	KP	-39.68750	119.17217	.997	-407.6822	328.3072
	D2	237.50000	119.17217	.315	-130.4947	605.4947
	D3	352.18750	119.17217	.064	-15.8072	720.1822
D2	KN	317.18750	119.17217	.108	-50.8072	685.1822
	KP	-277.18750	119.17217	.190	-645.1822	90.8072
	D1	-237.50000	119.17217	.315	-605.4947	130.4947
	D3	114.68750	119.17217	.868	-253.3072	482.6822
D3	KN	202.50000	119.17217	.463	-165.4947	570.4947
	KP	-391.87500*	119.17217	.034	-759.8697	-23.8803
	D1	-352.18750	119.17217	.064	-720.1822	15.8072
	D2	-114.68750	119.17217	.868	-482.6822	253.3072

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