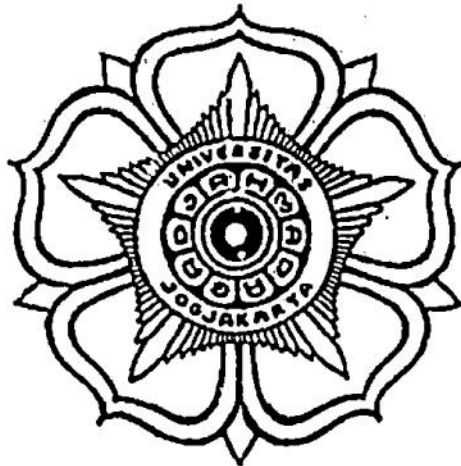


**PENGARUH KURKUMIN SINTETIK
TERHADAP PRODUKSI PROGESTERON
OLEH KULTUR SEL LUTEAL TIKUS
DENGAN PERANGSANGAN hCG DAN PGF_{2α}**

TESIS

Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan Mencapai Derajat Sarjana S-2

Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Jurusan Ilmu-ilmu Kesehatan
Minat Utama Fisiologi



Diajukan oleh :

Zulkhah Noor
7711/III-2/486/96

Kepada :

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2000**

Tesis

Pengaruh Kurkumin Sintetik terhadap Produksi Progesteron
oleh Kultur Sel Luteal Tikus dengan perangsangan hCG dan PGF_{2a}

dipersiapkan dan disusun oleh

Zulkhah Noor

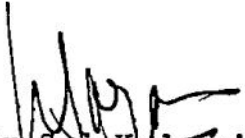
telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal 31 Januari 2000

Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama

Anggota Dewan Penguji Lain



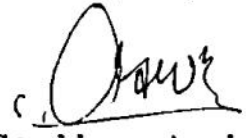
Prof. dr. Sri Kedarsih Soejono, M.Sc., Ph.D. Prof. dr. Sugeng Juwono M, M.Sc.

Pembimbing Pendamping I



dr. Suwono

Pembimbing Pendamping II

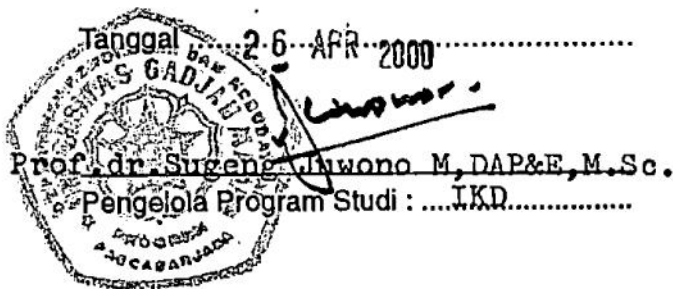


Prof. dr. Saedjono Aswin, Ph.D.



Prof. dr. Mansetyawan HNE, M.Sc, Ph.D.

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Magister



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di Perguruan Tinggi, dan sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 6 Desember 1999

Zulkhah Noor

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim. Segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT atas rahmat, hidayah dan inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis yang berjudul **“pengaruh kurkumin sintetik terhadap produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus dengan perangsangan hCG dan PGF_{2α}”**. Tesis ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna memperoleh derajat S-2 dalam Ilmu Kedokteran Dasar di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Dengan selesainya penulisan tesis ini, penulis mengucapkan terimakasih dan menyampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, yang telah memberi ijin, pembiayaan dan bantuan selama studi dan penelitian hingga tesis ini dapat diselesaikan.
2. Rektor Universitas Gadjah Mada, Direktur Program Pasca Sarjana, Dekan Fakultas Kedokteran UGM, Pengelola S-2 Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis serta Ketua Minat Ilmu Faal, yang telah **memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program pendidikan S-2 di bidang studi ilmu faal.**

3. Prof. dr. Sri Kadarsih Soejono, MSc., PhD selaku pembimbing utama yang telah banyak memberikan bantuan, pengarahan, bimbingan dan pendampingan mulai dari penelitian hingga selesainya tesis.
4. dr. Suwono selaku pembimbing pendamping yang telah banyak memberi pengarahan dan bimbingan dalam penulisan tesis.
5. Prof. dr. Noerhajati Soeripto, DTM & H. yang telah memberi ijin dan fasilitas Laboratorium Ilmu Hayati UGM selama penelitian.
6. Dr. Soepardjan, Apt. yang telah memberi bantuan kurkumin sintetik murni untuk pelaksanaan penelitian.
7. DR. Iman Supriatna, Kepala Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, yang telah memberi beberapa jenis hormon untuk pelaksanaan penelitian.
8. Kepala Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM yang telah memudahkan penulis untuk mendapatkan hewan coba.
9. Para dosen pengajar S-2 Program Pasca Sarjana UGM yang telah memberi ilmu dan mentransformasikan pengalaman bagi penulis.
10. Segenap staf edukatif dan non edukatif Bagian Ilmu Faal FK UGM yang telah banyak membantu penulis dan memberi suasana menyenangkan selama studi, penelitian dan penulisan tesis.
11. Segenap staf Laboratorium Ilmu Hayati UGM khususnya bapak Surajiman yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

12. Segenap staf pelaksana perpustakaan FK UGM, perpustakaan Pasca Sarjana dan CD Room Biomedis UGM yang telah memfasilitasi penelusuran rujukan jurnal dan makalah untuk penulisan tesis.
13. Drh. Heru Nurcahyo, MKes., yang telah membantu selama persiapan dan penelitian.
14. Semua pihak yang tidak dapat kami sebut satu per satu, yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu kelancaran studi.
15. Keluarga inti, keluarga besar serta yang teristimewa mas Idham Ibtu dan anak-anakku Ida Rufaida, Izza Rahmatina, Iwan A. Musawwa, Ira Safira yang telah banyak berkorban, memberi semangat dan memberikan doa bagi keberhasilan studi.

Semoga Allah yang Maha Pengasih, Pemurah dan Penyayang membalas semua kebaikan dengan berlipat ganda dan semoga menjadi amal saleh yang diridloi-Nya. Amin. Akhir kata, semoga tesis ini berguna dalam pengembangan ilmu endokrin reproduksi, dapat memberi informasi ilmiah dan dorongan untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Yogyakarta, Desember 1999

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ARTI SINGKATAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
I. PENGANTAR	1
1.1. Latar Belakang	1
1.1.1. Perumusan Masalah	4
1.1.2. Masalah	5
1.1.3. Keaslian Penelitian	5
1.1.4. Manfaat Penelitian	6
1.2. Tujuan Penelitian	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Tinjauan Pustaka	8
2.1.1. Korpus Luteum	8
2.1.2. Mekanisme Kerja LH/hCG	13
2.1.3. Prostaglandin $F_{2\alpha}$	16
2.1.4. Kurkumin	18
2.2. Landasan Teori	24
2.3. Hipotesis	25
2.4. Rencana Penelitian	26
III. CARA PENELITIAN	29
3.1. Bahan Penelitian	29
3.2. Alat penelitian	30

3.3.	Jalannya Penelitian	31
3.4.	Penyiapan Zat-zat Perlakuan	33
3.5.	Pemberian Zat-zat Perlakuan	34
3.6.	Analisis Data	35
3.7.	Kesulitan dan Keterbatasan Penelitian	36
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1.	Hasil	38
4.2.	Pembahasan	42
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1.	Kesimpulan	48
5.2.	Saran	48
VI.	RINGKASAN	50
VII.	DAFTAR PUSTAKA	64
Lampiran	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1: Metabolisme kolesterol pada sel steroidogenik	15
Gambar 2: Struktur kimia kurkumin dan sisi-sisi aktif	19
Gambar 3: Kemiripan struktur molekul dan reseptor antara kurkumin dan prostaglandin	24
Gambar 4: Skema hubungan variabel bebas dengan variabel tergantung	27
Gambar 5: Diagram balok pengaruh kurkumin terhadap produksi progesteron kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG dan atau $\text{PGF}_{2\alpha}$	41

DAFTAR TABEL

Tabel 1: Kadar progesteron kultur sel luteal pada kelompok perlakuan hCG, PGF _{2α} , hCG + PGF _{2α} . dengan atau tanpa kurkumin	39
--	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	:	Hasil Pengukuran Kadar Progesteron	69
Lampiran 2	:	Prosedur Pembuatan Media	70
Lampiran 3	:	Pengukuran Progesteron dengan Metode Immulite	72
Lampiran 4	:	Uji Statistik	73

ARTI SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AMP	: <i>Adenosine monophosphate</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
Bu ₂ cAMP	: <i>Dibutiril cAMP</i>
cAMP	: <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CPE ₅₀	: <i>Cytopathic Effect 50</i>
FCS	: <i>Fetal Calf Serum</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
HCG	: <i>human Chorionic Gonadotropin</i>
3 β -HSD	: <i>3 β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
Hepes	: <i>N-2-hydroxyethyl piperazine N-2-ethane sulfonate</i>
KL	: <i>korpus luteum</i>
KSL	: <i>kultur sel luteal</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
MEM	: <i>minimal essential medium</i>
P	: <i>phosphate</i>
PBS	: <i>phosphate buffer saline</i>
Penstrep	: <i>penisilin dan streptomisin</i>
PGE ₂	: <i>prostaglandin E₂</i>
PGF _{2α}	: <i>prostaglandin F_{2α}</i>
PMSG	: <i>pregnant mare's serum gonadotropin</i>
R	: <i>reseptor di membran sel</i>
TSH	: <i>Tyroid Stimulating Hormone</i>

INTISARI

Kurkumin, salah satu zat aktif dalam kunyit/temulawak merupakan substansi antifertilitas, akan tetapi belum diketahui bagaimana kurkumin dapat menyebabkan infertilitas. Penelitian kajian fungsi kultur sel luteal dilakukan untuk mengetahui pengaruh kurkumin sintetik terhadap sekresi progesteron dengan perangsangan *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$).

Sampel yang digunakan adalah kultur sel luteal korpus luteum umur 5 hari dari tikus Sprague Dawley prepubertal yang mendapat induksi ovulasi dengan 8 iu *Pregnan't Mare's Serum Gonadotrophin* (PMSG). Korpus luteum setelah didispersi dan homogen mengandung 24×10^4 sel luteal/ml dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 7 kelompok perlakuan masing-masing mendapat kurkumin, hCG, hCG + kurkumin, $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$ + kurkumin, hCG + $PGF_{2\alpha}$, dan hCG + $PGF_{2\alpha}$ + kurkumin. Untuk mengetahui efek perlakuannya diukur kadar progesteron pada media kultur dengan metode *Immuno chemiluminesence* (Immulite).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi progesteron (ng/ml) dari 8 kelompok perlakuan, masing-masing $n = 3$, adalah: ① $28,66 \pm 5,51$ (pelarut); ② $32,86 \pm 3,93$ (kurkumin); ③ $72,60 \pm 9,21$ (hCG); ④ $34,43 \pm 5,40$ (hCG + kurkumin); ⑤ $32,33 \pm 3,67$ ($PGF_{2\alpha}$); ⑥ $34,33 \pm 3,01$ ($PGF_{2\alpha}$ + kurkumin); ⑦ $62,60 \pm 6,88$ (hCG + $PGF_{2\alpha}$) ⑧ $34,60 \pm 1,39$ (hCG + $PGF_{2\alpha}$ + kurkumin). Analisis statistik uji beda Kruskal Wallis pada 8 kelompok penelitian menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Uji yang sama dilakukan pada 4 kelompok yang tidak mendapat kurkumin (nomor 1, 3, 5, 7) menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$), sedangkan pada 4 kelompok yang mendapat kurkumin (nomor 2, 4, 6, 8) diperoleh hasil tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Uji beda antar 2 kelompok perlakuan dengan U-Mann Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok yang diberi hCG (nomor 3) dan hCG + $PGF_{2\alpha}$ (nomor 7) dengan 6 kelompok lainnya.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kurkumin tidak berpengaruh terhadap produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus dengan atau tanpa $PGF_{2\alpha}$. Selain itu, pemberian kurkumin menurunkan produksi progesteron oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG atau hCG + $PGF_{2\alpha}$.

Kata Kunci: Kurkumin, hCG, $PGF_{2\alpha}$, Progesteron, Sel Luteal

ABSTRACT

Curcumin, which is one of active agents in turmeric, is found to be anti-fertility substance. Yet, the mechanism of how it effects fertility is, so far, still unknown. Therefore, the study on function of rat luteal cell culture is done to find out the effect of curcumin on progesterone synthesis by giving stimuli of *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) and *Prostaglandin F_{2α}* (PGF_{2α}).

The sample used in this study is 5-day-old *corpus luteum* (CL) of Sprague Dawley's immature rat, which receives ovulation induction of 8 iu *Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin* (PMSG). After the CL is dispersed and homogenized into 24×10^4 cells, the luteal cell is divided into 8 groups consisting of the one control group and 7 experimental groups, each of which is given curcumin, hCG, hCG + curcumin, PGF_{2α}, PGF_{2α} + curcumin, hCG + PGF_{2α}, hCG + PGF_{2α} + curcumin. To know the behavioral effect of the experiment, the progesterone level contained in the culture medium is measured using the method *immunochemiluminescence* (Immulite).

The result shows that the progesterone production (ng/ml) by the 8 experimental groups, which each having n=3, is as follow: ① $28,66 \pm 5,51$ (vehicle); ② $32,86 \pm 3,93$ (curcumin); ③ $72,60 \pm 9,21$ (hCG); ④ $34,43 \pm 5,40$ (hCG + curcumin); ⑤ $32,33 \pm 3,67$ (PGF_{2α}); ⑥ $34,33 \pm 3,01$ (PGF_{2α} + curcumin); ⑦ $62,60 \pm 6,88$ (hCG + PGF_{2α}); ⑧ $34,60 \pm 1,39$ (hCG + PGF_{2α} + curcumin). The different test of Kruskal Wallis for the 8 groups shows a statistically significant difference ($p < 0.05$). The same test conducted for the 4 groups that do not receive curcumin (number 1, 3, 5, 7) also shows the difference significantly ($p < 0.05$), whereas for the 4 groups that receive curcumin (number 2, 4, 6, 8) no significant difference is shown ($p > 0.05$). Furthermore, the difference between the 2 experimentals (the group with hCG (number 3) and the group with hCG + PGF_{2α} (number 7) and the 6 others is also tested using U-Mann Whitney and the result shows that they are statistically different ($p < 0.05$).

In conclusion, curcumin influences insignificantly the production of progesterone by luteal cell culture of rat with or without PGF_{2α}. In addition, curcumin reduces the production of progesterone by luteal cell culture stimulated by hCG or hCG + PGF_{2α}.

Key word: Curcumin, hCG, PGF_{2α}, Progesterone, Luteal Cell

I. PENGANTAR

1.1. Latar Belakang

Kurkumin adalah suatu pigmen berwarna kuning yang secara alamiah terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa Val.*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza Robx.*). Kurkumin sudah banyak digunakan sebagai bahan kosmetika, pewarna pakaian, bumbu masakan dan obat (jamu). Pada dasawarsa terakhir, kurkumin banyak diteliti dengan tujuan untuk digunakan sebagai obat. Animon & Wahl (1991) melaporkan bahwa kurkumin merupakan substansi koleretik, anti-radang, hipotensif (penurun tekanan darah), anti-hepatotoksis, anti-koagulan, penurun kolesterol darah, anti-bakteri, anti-jamur, anti-tumor dan anti-fertilitas.

Kurkumin dalam bentuk perasan atau ekstrak kunyit selama ini telah dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia sebagai jamu tradisional untuk membatasi kelahiran maupun mengatasi gangguan-gangguan yang timbul pada saat menstruasi. Beberapa tahun terakhir ini kurkumin sintetik dalam bentuk serbuk dalam kapsul dengan berbagai merek paten juga telah digunakan oleh masyarakat secara bebas maupun atas petunjuk dokter untuk mengobati suatu penyakit.

Penelitian tentang efek kurkumin pada sistem reproduksi masih sangat sedikit dan kebanyakan dilakukan secara *in vivo*, antara lain: Garg (1974) melaporkan bahwa pemberian kurkumin pada tikus menunjukkan efek antifertilitas (gagal bunting), sedang pada kelinci menunjukkan efek antiovulasi. Menurut Yang (1974 *cit* Ammon & Wahl, 1991) kurkumin menghambat implantasi, sedangkan menurut Rao & Katogi (1984 *cit* Ammon & Wahl, 1991) kurkumin menyebabkan penurunan berat testes dan kadar testosteron darah pada tikus.

Oleh karena penelitian-penelitian tersebut di atas merupakan penelitian *in vivo*, maka kurang dapat menjelaskan mekanisme kerja kurkumin secara spesifik pada sistem reproduksi dalam kaitannya dengan pengaturan fertilitas. Pengaruh kurkumin hingga menyebabkan anovulasi mungkin dapat melalui berbagai cara. Kemungkinan kurkumin mengganggu perkembangan folikel ovarii, atau mengganggu fungsi korpus luteum (KL) dengan mengganggu hormon-hormon pengatur gonad.

Dipilih sel luteal korpus luteum sebagai sampel karena korpus luteum merupakan kelenjar yang hidupnya singkat kemudian mengalami regresi (luteolisis) menjadi korpus albikan. Peristiwa luteolisis ini merupakan kejadian yang amat penting dalam mengatur siklus ovarium, sebab proses pemasakan folikel ovarii tidak terjadi selama masih ada korpus luteum. Pada kebanyakan mamalia, terdapat mekanisme biologis yang

telah tersusun sedemikian rupa dan menyebabkan kemunduran fungsi korpus luteum secara spontan. Indikator luteolisis yang karakteristik adalah penurunan kadar progesteron secara cepat dan mendadak. Lama umur korpus luteum menentukan panjang siklus menstruasi, yang selanjutnya akan menentukan ovulasi.

Fungsi dan umur korpus luteum diatur oleh hormon-hormon antara lain *Luteinizing Hormone* (LH), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), progesteron, estrogen, prolaktin, *human Chorionic Gonadotropin* (hCG), dan Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Dari berbagai hasil penelitian, LH dan hCG terbukti merupakan hormon luteotrop yang merangsang produksi progesteron dan memperpanjang umur KL. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ terbukti merupakan luteolisin fisiologis terlihat dari kemampuannya menghambat rangsangan LH/hCG sehingga menurunkan fungsi luteal *in vivo* dan *in vitro* pada berbagai spesies. Akan tetapi penghambatan $PGF_{2\alpha}$ terhadap LH/hCG tergantung dari umur korpus luteum. Semakin tua umur korpus luteum, semakin sensitif terhadap $PGF_{2\alpha}$ (Behrman *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1978; Niswender, 1981; dan Soejono, 1981).

Berbagai hasil penelitian membuktikan bahwa jika $PGF_{2\alpha}$ ditiadakan dengan cara histerektomi atau dihambat dengan berbagai preparat anti prostaglandin, maka siklus menstruasi akan terganggu. Huang *et al.* (1991), melaporkan bahwa sintesis prostaglandin dihambat oleh kurkumin melalui

penghambatan siklooksigenase. Mukhopadyay *et al.* (1982) dan Scherer (1974 *cit* Nurfina, 1994) menduga bahwa penghambatan ini terjadi karena kurkumin diduga mempunyai struktur molekul dan reseptor yang mirip dengan prostaglandin

1.1.1. *Perumusan Masalah*

- a. *Kurkumin* dalam bentuk perasan atau ekstrak kunyit/temulawak telah digunakan dan dikonsumsi secara luas sebagai jamu maupun obat pengatur fertilitas belum memiliki landasan ilmiah.
- b. *Kurkumin* memiliki aktifitas anti-fertilitas pada tikus dan kelinci secara *in vivo* dapat menyebabkan anti ovulasi dan gagal bunting. Dalam hal ini mekanisme anti-fertilitasnya belum jelas.
- c. *Kurkumin* telah terbukti sebagai substrat penghambat sintesis prostaglandin melalui inaktivasi enzim siklooksigenase. Penghambatan ini diduga karena kurkumin memiliki struktur molekul dan reseptor yang mirip prostaglandin.
- d. *Prostaglandin* merupakan hormon luteolisin fisiologis yang utama bekerja melalui mekanisme penghambatan induksi LH/hCG dalam memproduksi progesteron.

- e. *Penghambatan* $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap LH/hCG tergantung umur korpus luteum. Semakin tua umur korpus luteum, akan semakin peka terhadap rangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$.

1.1.2. Masalah

- a. *Apakah kurkumin* berpengaruh terhadap kadar progesteron basal yang diproduksi oleh kultur sel luteal ?
- b. *Apakah kurkumin* berpengaruh terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal mendapat rangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$?
- c. *Apakah kurkumin* menurunkan kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG?
- d. *Apakah kurkumin* menurunkan kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG dan $\text{PGF}_{2\alpha}$?

1.1.3. Keaslian Penelitian

Penelitian tentang pengaruh LH/hCG dan $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap korpus luteum berbagai umur telah banyak dilakukan, juga tentang efek kurkumin terhadap sintesis prostaglandin dalam kaitannya sebagai substansi inhibitor

siklooksigenase dan lipoksigenase. Efek kurkumin terhadap jaringan/organ yang telah diteliti adalah yang berkaitan dengan aktivitas anti-inflamasi, anti-rematik dan anti-kanker. Adapun penelitian pengaruh kurkumin terhadap ovarium tikus dan kelinci secara *in vivo* yang pernah dilakukan, belum dapat menjelaskan mekanisme kerja kurkumin terhadap ovarium khususnya korpus luteum. Berbeda dengan penelitian terdahulu, pada penelitian ini diberikan kurkumin terhadap korpus luteum *in vitro* dengan perangsangan hCG dan PGF_{2α}.

1.1.4. *Manfaat yang diharapkan*

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah:

- a. *Memberi* sumbangan dalam pengembangan ilmu pengetahuan terutama endokrinologi reproduksi, khususnya mengenai pengaruh kurkumin terhadap fungsi korpus luteum.
- b. *Memberi* landasan ilmiah bagi pemakaian kurkumin sebagai zat aktif dalam rimpang kunyit, yang selama ini dikenal sebagai pengetahuan asli masyarakat (*indigenous knowledge*) dan telah digunakan secara luas sebagai jamu untuk pengatur fertilitas.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dikerjakan untuk mengetahui efek kurkumin sintetik terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal korpus luteum umur 5 (lima) hari dari tikus dengan perangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$, hCG, dan hCG + $\text{PGF}_{2\alpha}$.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1 *Korpus Luteum*

Secara normal, beberapa jam pertama setelah ovum keluar dari folikelnya (ovulasi), sel-sel granulosa mulai berubah dengan cepat menjadi sel lutein. Sel ini tumbuh hingga diameternya bertambah besar dua kali atau lebih dari sel granulosa dan terisi dengan lipid sehingga tampak kekuningan. Proses ini disebut luteinisasi. Masa total jaringan keseluruhan disebut korpus luteum. Selama proses perkembangan folikel ovarii mulai folikel kecil hingga menjadi masak, terjadi juga perubahan reseptor-reseptor hormon secara kuantitatif dan kualitatif (Becker, 1990). Khusus untuk reseptor-LH di membran sel teka folikel ovarii, mulai terdapat pada folikel sekunder kemudian bertambah jumlahnya hingga menjadi folikel de Graaf. Terbentuknya reseptor-LH di membran adalah penting karena LH lah yang memacu terjadinya ovulasi dan pembentukan korpus luteum (luteinisasi).

Kejadian penting yang terjadi semasa pre-ovulasi, setelah *surge* gonadotropin, adalah barier darah folikel atau lamina basalis yang terdiri dari kolagen akan robek dan kapiler-kapiler terlihat menembus lamina



basalis yang rusak kemudian terbentuk vaskularisasi yang baik untuk pembentukan korpus luteum. Vaskularisasi yang berkembang itu disebut neovaskularisasi. Adanya neovaskularisasi, sel korpus luteum memperlihatkan bentuk sel sekretori yang aktif. Pembentukan neovaskularisasi ini diduga akibat adanya faktor angiogenik yang belum diketahui dengan jelas, yang diperkirakan aktif karena steroid tertentu. Selain itu ternyata pada folikel de Graaf yang tidak menjadi korpus luteum tidak ada neovaskularisasi (Keyes *et al.*, 1983 *cit* Soejono, 1988).

Dua hal yang dapat menyebabkan proses luteinisasi, yakni keluarnya ovum dari folikel de Graaf dan adanya rangsang LH dosis tinggi. Pada proses reproduksi normal, kedua mekanisme tersebut terjadi bersama. Beberapa peneliti mengamati bahwa sel-sel folikel yang dikultur akan berluteinisasi secara spontan, akan tetapi lama hidup dan fungsinya menurun dibanding normal. Peneliti lain melaporkan bahwa pemberian LH dosis tinggi akan meluteinisasi sel-sel folikel dengan ovum yang tetap berada dalam folikel (Best & Taylor, 1979).

Luteinisasi *in vivo* yang terjadi secara normal merupakan tanda bahwa sel granulosa sudah tidak mengadakan replikasi dan akan membentuk sel dengan sifat yang lain, yang sistem enzim dan organelnya berubah kemudian sel mampu menyekresikan progesteron lebih banyak dibanding sebelumnya. Pada spesies tertentu, selain menyekresikan

progesteron, sel luteal juga menyekresikan estrogen dan hormon kelamin lain (Keyes *et al.*, 1983 *cit* Soejono, 1988). Disamping itu, beberapa peneliti mengatakan bahwa FSH murni manusia akan menstimuli sintesis progesteron dalam folikel de Graaf tikus dan terjadi luteinisasi. Demikian halnya dengan penambahan dibutiril cAMP.

Koos & Hansel (1981), mempelajari pemisahan sel-sel luteal dengan memakai kolagenase dan mengidentifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu: (1) Sel-sel luteal besar (diameter $> 25 \mu\text{m}$), (2) Sel-sel luteal kecil (diameter $10 - 20 \mu\text{m}$), dan (3) Sel-sel non-steroidogenik, banyak dan paling kecil (diameter $< 10 \mu\text{m}$). Sel-sel luteal tersebut ada yang berasal dari sel granulosa maupun sel teka folikuli atau keduanya tergantung pada spesiesnya.

Secara *in vitro*, sel-sel luteal besar maupun kecil menyekresi progesteron. Tanpa LH, sel luteal besar menyekresikan progesteron dua kali lebih banyak dari pada sel luteal kecil. Akan tetapi jika ada LH, sel luteal kecil menyekresikan progesteron enam kali lebih banyak, sedang sel luteal besar hanya dua kali dibanding tanpa LH. Sel luteal kecil lebih peka terhadap LH karena sel luteal kecil lebih penuh reseptor-LH daripada sel luteal besar. Sel-sel luteal kecil akan tumbuh menjadi sel-sel luteal besar sejalan perkembangan korpus luteum (Koos dan Hansel, 1981).

Fungsi utama korpus luteum adalah memproduksi progesteron dan mengontrol panjangnya siklus menstruasi. Dalam hal ini korpus luteum dapat dikatakan sebagai kelenjar endokrin yang hidupnya hanya sekilas, dapat 2 hari sampai dengan 2 minggu atau lebih pada kehamilan tergantung spesiesnya. Fungsi dan umur korpus luteum diatur oleh interaksi beberapa hormon dan faktor pertumbuhan. Beberapa hormon/faktor luteotrop antara lain hormon/faktor pertumbuhan jaringan, hormon/faktor perangsang sekresi progesteron, dan hormon/faktor yang disekresi selama proses implantasi. Gulyas & Hodgen (1981) melaporkan bahwa terjadi penurunan fungsi kultur sel luteal primata akibat bertambahnya umur kultur.

Korpus luteum memiliki kemampuan instrinsik untuk tumbuh dan menyekresikan progesteron. Kemampuan ini akan meningkat jika ada stimulasi-stimulasi ekstrinsik. Hormon-hormon ekstrinsik yang bersifat luteotrop antara lain: LH, prolaktin, dan hCG, sedang estradiol/estrogen dan FSH dapat bersifat luteotrop atau luteolisis tergantung dosis dan spesiesnya.

Infusi LH pada domba akan menyebabkan perpanjangan lama hidup korpus luteum, demikian juga hCG. Luteolisis akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan tetap berlangsung walaupun diberi LH atau LH tambah prolaktin. Lain halnya dengan hCG dosis tinggi dapat mencegah luteolisis akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada domba (Bolt, 1979 *cit* Niswender, 1981). Dari penelitian Ellinwood *et al.* (1979 *cit* Niswender, 1981) didapatkan hasil

bahwa pada hewan bunting terdapat faktor yang mencegah luteolisis oleh $\text{PGF}_{2\alpha}$, yaitu hCG dan molekul mirip prolaktin yang berasal dari embrio.

Thomas *et al.* (1978), melaporkan bahwa bila kultur sel luteal hanya diberi LH dosis tertentu akan merangsang produksi progesteron enam kali produksi basal. Demikian juga dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ atau PGE_2 dosis 0,56 μmol akan merangsang produksi progesteron kurang lebih dua kali lipat produksi basal. Akan tetapi bila LH diberikan bersama-sama $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan menghambat LH lebih kuat dibanding PGE_2 . Sementara Ahren *et al.* (1980), mengatakan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ menghambat LH dalam menginduksi peningkatan cAMP pada korpus luteum umur 3 dan 7 hari, dan tidak pada umur 1 hari. Thomas *et al.* (1978), mengatakan bahwa $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ meningkatkan produksi progesteron sel luteal yang tidak dihambat oleh $\text{PGF}_{2\alpha}$. Adapun Khan & Rosberg (1979), telah melaporkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ menyebabkan penurunan signifikan adenilat siklase membran KL yang mendapat rangsangan LH. Lahav *et al.* (1976 *cit* Khan & Rosberg, 1979), melaporkan bahwa penambahan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada medium inkubasi setelah respon maksimal terhadap LH menyebabkan konsentrasi cAMP kembali sama dengan kondisi basal selama 15 menit. Grazul (1985), melaporkan bahwa sekresi progesteron basal oleh korpus luteum tergantung umur

korpus luteum dan efek LH, prolaktin serta $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap sekresi progesteron tergantung pada siklus estrus dan dosis yang digunakan.

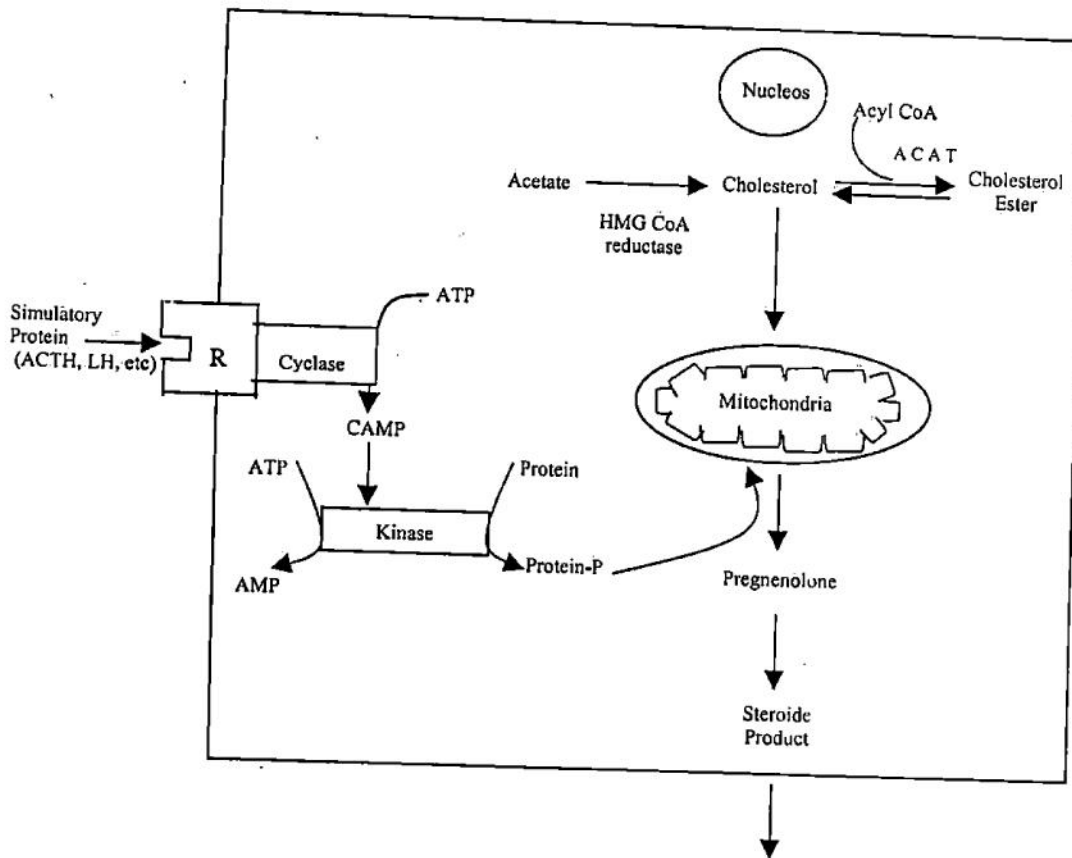
Luteolisis diperlukan untuk mengatur siklus ovarium, sebab pertumbuhan folikel yang baru hanya akan dimulai setelah kematian korpus luteum. Luteolisis ditandai penurunan dengan cepat produksi progesteron oleh korpus luteum. $\text{PGF}_{2\alpha}$ terbukti merupakan luteolisin fisiologis terlihat dari kemampuannya mengurangi fungsi luteal *in vivo* dan *in vitro* pada berbagai spesies (Behrman *et al.*, 1979; Niswender, 1981). Pada beberapa mamalia seperti kelinci dan tikus, estrogen terutama estradiol (E_2), memiliki efek luteotropik dan dapat meningkatkan sintesis progesteron oleh korpus luteum. Lain halnya dengan pemberian estrogen eksogen pada manusia dan kera menyebabkan luteolisis terutama berpengaruh pada pulsatil LH. Estrogen yang ditambahkan pada kultur sel luteal manusia akan menghambat perubahan pregnenolon menjadi progesteron akibat penghambatan secara langsung pada aktivitas sistem enzim 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase (3β -HSD) (Vega *et al.*, 1994).

2.1.2. Mekanisme kerja LH/hCG pada produksi progesteron

Luteinizing hormone adalah suatu glikoprotein gonadotropin yang disekresi secara siklis oleh kelenjar hipofise anterior. Pada wanita, LH

bersama dengan FSH merangsang ovarium untuk memproduksi estrogen dan progesteron. *Surge* LH pada pertengahan siklus menstruasi akan menyebabkan ovulasi, dan selanjutnya sekresi LH secara kontinyu akan merangsang KL untuk memproduksi progesteron dengan meningkatkan perubahan kolesterol menjadi pregnenolon.

Human Chorionic Gonadotropin adalah hormon glikoprotein yang disekresi oleh sel sinsitio - trofoblas plasenta, memiliki struktur mirip dengan LH. *Human Chorionic Gonadotropin* dan hormon glikoprotein lain (TSH, FSH) terdiri dari 2 (dua) sub-unit. Sub-unit α hormon tersebut bersifat spesies-spesifik dan memiliki urutan yang identik, sedangkan sub-unit β menentukan kemampuan interaksi dengan reseptor sel target yang merupakan pokok dari efek biologis yang terjadi. Sub-unit β -LH dan β -hCG memiliki urutan struktur yang homolog. Dari 145 asam amino β -hCG, 97 (67%) identik dengan β -LH. *Human Chorionic Gonadotropin* memiliki ruas karboksi-terminal dari 30 asam amino yang tidak ditemukan pada LH. *Luteinizing Hormone* dan hCG bersifat luteotrop dan KL memiliki reseptor dengan afinitas yang tinggi terhadap hCG (Greenspan, 1991). Reseptor LH/hCG pada membran sel luteal juga terdiri dari dua domain, yaitu eksodomain (separah N-terminal ekstraseluler) dan endodomain (separah membran yang berhubungan dengan C-terminal) (Hong *et al.*, 1999).



Gambar 1: Metabolisme kolesterol pada sel steroidogenik (Becker, 1990).
 (R = Reseptor, Cyclase = Adenilat Siklase, Kinase = Protein Kinase, ACAT: Acyl CoA: Cholestreryl Acyltransferase)

Efek LH/hCG pada produksi progesteron oleh KL dimulai dengan interaksi LH/hCG dengan reseptor eksodomain, kemudian kompleks hCG-eksodomain berinteraksi dengan endodomain. Hong *et al.* (1999) mendemonstrasikan bahwa subunit β -hCG berikatan secara langsung dengan eksodomain pada membran sel luteal dan kemudian akan mengaktifkan adenilat siklase dan meningkatkan cAMP. Siklik AMP

kemudian mengaktifkan enzim-enzim yang berkaitan dengan sintesis progesteron (Becker, 1990; Greenspan, 1991). Mekanisme kerja hormon gonadotropin dalam steroidogenesis dapat dilihat pada gambar 1.

2.1.3. *Prostaglandin F_{2α}*

Prostaglandin dan derivat asam lemak terkait yaitu tromboksan dan leukotrien yang sering disebut *eicosanoid* adalah substansi pengatur yang penting pada berbagai organ dan jaringan. Mereka merupakan hormon difus yang dapat bersifat hemokrin, parakrin maupun otokrin (Becker, 1990).

Disebut *eicosanoid* karena terbentuk dari asam lemak yang terdiri dari 20 rantai karbon seperti asam arachidonat (*all - cis - 5, 8, 11, 14 - eicosa tetraenoic acid*). Asam arachidonat dibentuk dari fosfolipid membran sel yang bereaksi dengan fosfolipase C atau fosfolipase A₂ dan diglisericid lipase yang aktif karena berbagai stimuli yang dapat meningkatkan ion Ca²⁺, selanjutnya asam arachidonat akan dimetabolisme secara enzimatis menjadi mediator inflamasi melalui berbagai jalur (Greenspan, 1991).

Beberapa mekanisme PGF_{2α} sebagai penyebab luteolisis yang telah diteliti yaitu:

- a. *Mengurangi aliran darah korpus luteum.* Pharris *et al.* (1970 *cit* Niswender, 1981) melaporkan bahwa penyuntikan PGF_{2α} dosis tinggi

menyebabkan pengurangan akut aliran darah vena ovari pada tikus dan kelinci pseudopregnant. Akan tetapi sebaliknya, Auletta *et al.* (1973 *cit* Niswender, 1981) menemukan bahwa tidak ada perubahan bermakna yang terjadi pada aliran darah ovari setelah pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$. Kontroversi itu dapat ditengahi oleh hasil penelitian Novy & Cook, (1973 *cit* Niswender, 1981), bahwa aliran darah ke korpus luteum menurun setelah pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ dosis luteolitik, tetapi aliran darah yang ke jaringan interstitial dan jaringan follikular meningkat. Dengan demikian dapat dimengerti bahwa total aliran darah yang menuju ovarium hanya sedikit berubah. Nett & Niswender (1980 *cit* Niswender, 1981) mengukur aliran darah korpus luteum dengan *radioactive micropheres* dan menemukan penurunan yang dramatis (lebih dari 90%) pada aliran darah ovari dan korpus luteum domba setelah 6-8 jam pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ dosis luteolitik. Fenomena ini kelihatannya sangat mungkin berperan dalam menurunkan kadar progesteron serum.

- b. *Mengurangi jumlah reseptor gonadotropik dan menghambat LH untuk menstimulasi aktivitas adenilat siklase.* Thomas *et al.* (1978), mengemukakan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada waktu yang singkat akan menghambat pembentukan adenilat siklase dan cAMP, sedangkan pada

waktu yang lama $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan mengurangi jumlah reseptor LH/hCG. Behrman *et al.* (1976), melaporkan efek $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada tikus dengan korpus luteum umur tua akan menurunkan dengan cepat kadar progesteron yang bersirkulasi, dan hal ini tidak terjadi pada korpus luteum umur muda.

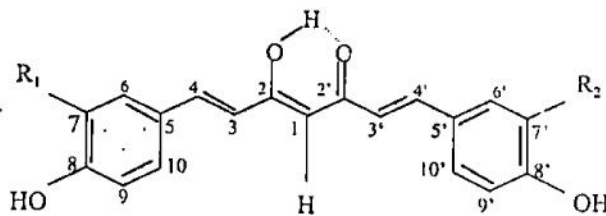
Khan & Rosberg (1979), melaporkan bahwa injeksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ 250 μg /tikus 15 menit sebelum isolasi korpus luteum umur 7 menyebabkan penurunan adenilat siklase secara signifikan dan tidak kembali normal setelah 24 jam pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ walaupun selalu dirangsang LH. Dalam penelitian yang lain, Khan (1979 *cit* Soejono, 1986) melaporkan bahwa suntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ 250 μg /tikus 12 jam dan 24 jam sebelum isolasi menunjukkan adanya penurunan hebat jumlah cAMP karena berkurangnya stimulasi reseptor LH yang hanya terjadi pada umur korpus luteum 7 hari dan tidak pada umur korpus luteum 3 hari. Dari studi yang dilakukannya, Khan (1979 *cit* Soejono, 1986) membuat satu teori kemungkinan mekanisme kerja $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dalam hal ini $\text{PGF}_{2\alpha}$ mengikat reseptor LH atau memodifikasi menjadi bentuk lain sehingga adenilat siklase tidak dapat terpacu oleh LH, epineprin, dan fluoride, kemudian setelah ikatan LH - reseptor - $\text{PGF}_{2\alpha}$ degradasi dari adenilat siklase, enzim ini baru dapat

terpacu lagi oleh epineprin dan fluoride, tetapi tidak oleh LH sebab reseptor LH telah hilang/rusak.

2.1.4. Kurkumin

Kurkumin adalah salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcumin longa Val.*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza Robx.*). Selain kurkumin, dalam kunyit terkandung senyawa analog kurkumin yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, sedangkan pada temulawak tidak terdapat bisdemetoksikurkumin (Srinivaran, 1953; Jentzsch, 1959 *cit* Ammon & Wahl, 1991).

Kurkumin untuk pertama kali diisolasi pada tahun 1870, kemudian struktur kimia kurkumin ditetapkan oleh Lampe *et al.* (1910 *cit* Nurfina, 1994) seperti gambar 2.



$R_1 = R_2 = OCH_3$:	Kurkumin
$R_1 = OCH_3$ dan $R_2 = H$:	Demetoksikurkumin
$R_1 = R_2 = H$:	Bisdemetoksikurkumin

Gambar 2: Struktur kimia kurkumin dan sisi-sisi aktifnya (Nurfina, 1995, Van Der Goot, 1995)

Kurkumin banyak memiliki aktivitas biologis. Banyaknya aktivitas biologis ini mungkin terkait dengan struktur molekulnya yang banyak memiliki sisi aktif. Hubungan struktur-aktivitas biologis kurkumin (gambar 2) dikarenakan kurkumin memiliki: ① ikatan rangkap olefinik pada C_{3, 4} dan C_{3', 4'}, ② kelompok hidroksil (OH) pada posisi C_{8, 8'}; ③ OCH₃ (R_{1,2}) pada C_{7, 7'}. (Nurfina, 1995, Van Der Goot, 1995)

Dengan metoda kristalografi sinar x, bentuk kristal kurkumin adalah monosiklik, dengan berat molekul 368,37. Pada hakekatnya kurkumin berupa kristal kuning tidak larut dalam air, tapi larut dalam etanol, aseton, butanol dietil etel, benzen dan metanol (Majeed *et al.*, 1995 dan Tonnesen 1986).

Stabilitas kurkumin dalam medium cair pada berbagai pH telah dipelajari oleh Tonnesen & Karlsten (1983) dan telah ditemukan bahwa kurkumin dalam pelarut cair pada pH<7 cukup stabil. Akan tetapi pada pH>7 terdapat peningkatan rasio dekomposisi bersama dengan meningkatnya pH. Dalam keadaan basa, kurkumin akan terdegradasi dengan cepat menjadi asam ferulat, vanillin, feruloilmetan dan produk terkondensasi. Oleh karena itu perlu diperhatikan untuk menghindari kondisi basa selama analisis. Bukan hanya pH tinggi, cahaya atau

ultraviolet dapat menyebabkan dekomposisi pada kurkumin baik dalam bentuk padat atau dalam pelarut (Tonnesen, 1986).

Telah banyak penelitian dilakukan terhadap kurkumin, dan ternyata kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologis. Berkenaan dengan aktivitas anti-fertilitas, Garg (1974) melaporkan bahwa kurkumin dosis 200 mg/kg pakan peroral pada tikus menyebabkan gagal bunting (anti-fertilitas) sedang pada kelinci menyebabkan anovulasi. Yang (1974 *cit* Ammon & Wahl, 1991) mengemukakan bahwa dosis 100–200 mg/kg, oral, dapat menghambat proses implantasi. Rao & Katogi (1984 *cit* Amman & Wahl, 1991) telah mendemonstrasikan pemberian 0,1 ml/hari ekstrak alkohol akan menyebabkan penurunan berat testes dan konsentrasi testosteron secara signifikan. Gunster (1943 *cit* Hadi, 1995) mengatakan bahwa minyak atsiri dari temulawak dapat menyebabkan kontraksi uterus.

Beberapa aktivitas kurkumin dari berbagai penelitian yang telah dilaporkan oleh Ammon & Wahl (1991) dan Hadi (1995), bahwa kurkumin merupakan substansi yang meningkatkan sekresi pankreas, meningkatkan sekresi empedu (koleretik), anti-infamasi, sebagai zat hipotensif (penurun tekanan darah), antikoagulan, penurun kadar kolesterol darah, anti-bakteri, anti-fungi, anti-tumor dan anti-fertilitas. Kiso *et al.* (1983), mengatakan bahwa kurkumin telah terbukti dapat memperbaiki kerusakan sel-sel hati

pada hewan yang diberi zat hepatotoksik seperti carbon tetraklorida dan D-galaktosamin.

Aktivitas penghambatan siklooksigenase dan lipoksigenase digunakan untuk meneliti obat-obat anti-inflamasi karena kedua enzim katalisator tersebut berperan dalam mediator inflamasi (radang). Analog anti-inflamasi seperti 2, 6 di - tert - buthyl - 4 - (2-arylethenyl) phenols merupakan inhibitor siklooksigenase dan lipoksigenase telah dipelajari oleh Lazar *et al.* (1989 *cit* Nurfina, 1994) memiliki struktur yang mirip dengan kurkumin.

Kini telah banyak peneliti melaporkan bahwa kurkumin menghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase. Salah satunya ialah Huang *et al.* (1991), yang melaporkan bahwa efek penghambatan kurkumin terhadap efektivitas siklooksigenase terlihat dari metabolisme asam arachidonat menjadi PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 oleh mikrosom epidermal dihambat $\pm 50\%$ dengan penambahan 5 - 10 μM kurkumin *in vitro*. Adapun efek penghambatan pada lipooksigenase terlihat bahwa penambahan kurkumin akan menghambat metabolisme asam arakhidonat menjadi asam 5 - hidroksi eikosatetraenoid (5-HETE) maupun 8-HETE.

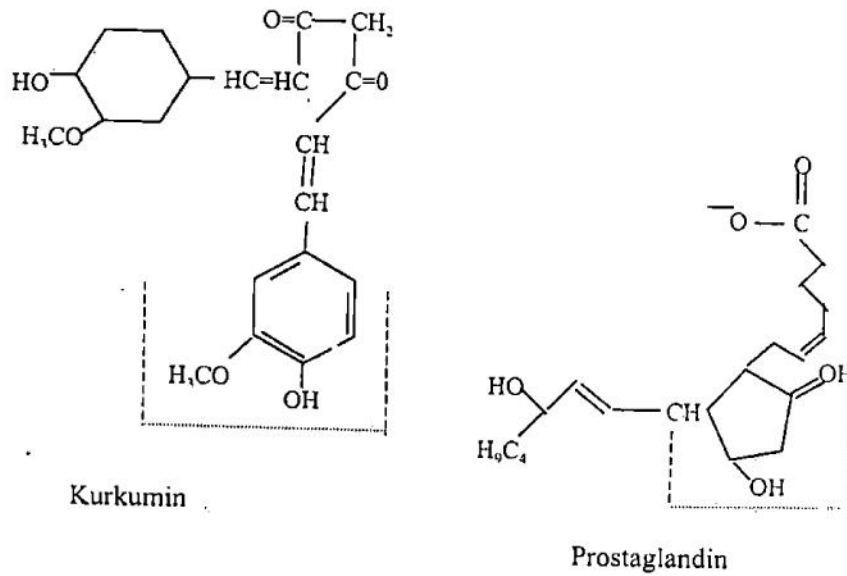
Huang *et al.* (1995) telah melaporkan bahwa kurkumin merupakan substansi inhibitor yang kuat terhadap 'promoter' tumor seperti *N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-azoxymethane* dan *12-Otetradecanoyl-phorbol-*

13- acetate. Osawa *et al.* (1995) melaporkan bahwa kurkuminoid yang diubah dengan hidrogenase membentuk *tetrahydrocurcuminoid* akan memiliki aktivitas antioksidatif yang cukup kuat, sedang Oetari *et al.* (1996) melaporkan bahwa kurkumin merupakan penghambat yang kuat terhadap aktivitas glutathione S-transferase (GST) dan memiliki aktivitas penghambat yang bersifat kompetitif terhadap oksidan.

Studi kinetik yang dilakukan Ham *et al.* 1972 (*cit* Nurfina, 1994) mengindikasikan bahwa perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin secara kompetitif dihambat oleh indometasin. Ini berarti secara alami ada kemiripan dalam struktur kimia antara substrat-produk dengan agen penghambat. Indometasin dan kurkumin telah terbukti sebagai substansi inhibitor siklooksigenase dalam sintesis prostaglandin. Mukhopadyay *et al.* (1982) dan Scherer (1974 *cit* Nurfina, 1994) mengatakan bahwa antara *fenil butason*, kurkumin, prostaglandin dan indometasin memiliki struktur yang mirip dan diduga sebagai reseptor anti-inflamasi. Kemiripan struktur molekul dan reseptor antara kurkumin dan prostaglandin dapat dilihat pada gambar 3.

Budiman (1989) melakukan uji toksisitas kurkumin pada kultur sel fibroblas (sel Vero) dan menyatakan bahwa semakin tinggi kadar kurkumin yang diberikan akan semakin besar menimbulkan kematian sel, dan diperoleh nilai *Cytopathic Effect* (CPE₅₀) sebesar 0,8077 mg/ml. Noor

(1999) melaporkan bahwa CPE_{50} kurkumin pada sel luteal umur 3 hari sebesar 0,548 mg/ml dan 85% sel luteal akan tetap hidup dengan pemberian kurkumin kadar 0,15 mg/ml.



Gambar 3: Kemiripan struktur molekul dan reseptor antara kurkumin dan prostaglandin (Mukhopadyay, *et al.*, 1982), Scherer (1974 *cit* Nurfina, 1994)

2.2. Landasan Teori

Dari hasil penelitian *in vivo*, ditemukan efek anti fertilitas kurkumin pada tikus dan kelinci betina yaitu menyebabkan anovulasi, gagal implantasi dan gagal bunting, sedangkan apada tikus jantan kurkumin menyebabkan penurunan berat testes dan kadar testosteron. Mukhopadyay

et al. (1982) dan Scherer (1974 *cit* Nurfina, 1994), mengatakan bahwa kurkumin memiliki struktur molekul dan reseptor mirip dengan prostaglandin.

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) jika diberikan sendiri pada kultur sel luteal akan sedikit meningkatkan produksi progesteron. Akan tetapi jika $PGF_{2\alpha}$ diberikan bersama-sama LH/hCG maka $PGF_{2\alpha}$ akan menghambat efek LH/hCG dalam proses produksi dan sekresi progesteron. Dengan demikian, jika kurkumin ditambahkan pada kultur sel luteal yang mendapat rangsangan LH dan $PGF_{2\alpha}$, mungkin akan terjadi interaksi antara kurkumin, LH dan $PGF_{2\alpha}$, serta berpengaruh terhadap produksi progesteron oleh sel luteal.

2.3. Hipotesis

- a. *Kurkumin* berpengaruh terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal .
- b. *Kurkumin* berpengaruh terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan $PGF_{2\alpha}$.
- c. *Kurkumin* menurunkan kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG.

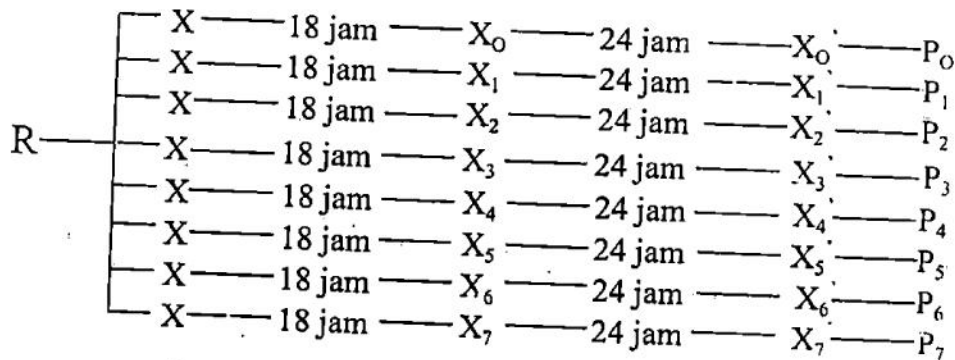
- d. *Kurkumin* menurunkan kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG + PGF_{2α}.

2.4. Rencana Penelitian

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah kultur sel luteal dari korpus luteum umur 5 hari. Korpus luteum diperoleh dari tikus Sprague Dawley prepubertal yang mendapat induksi ovulasi dengan 8 iu PMSG.

Rancangan penelitian berupa penelitian eksperimental murni, yang termasuk rancangan perlakuan sederhana. Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas ialah jenis perlakuan terhadap kultur sel luteal, yaitu pemberian kurkumin, hCG dan PGF_{2α}. Variabel tergantung, ialah kadar progesteron yang diproduksi/ disekresi oleh kultur-sel luteal sebagai akibat perlakuan dengan kurkumin, hCG dan PGF_{2α}. Kadar progesteron ini dianalisa dari medium kultur.

Sampel dikelompokkan menjadi 8 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 subyek. Pengelompokan dilakukan secara random setelah sel luteal dalam keadaan homogen (jumlah selnya sama). Skema rancangan penelitian terlihat pada gambar 4.



Gambar 4: Skema rancangan penelitian

Keterangan:

- R = Suspensi sel luteal homogen, mengandung 24×10^4 sel/ml
- X = Kultur sel luteal sebelum perlakuan
- X₀ = Sel luteal diberi perlakuan pelarut
- X₁ = Sel luteal diberi perlakuan kurkumin
- X₂ = Sel luteal diberi perlakuan hCG
- X₃ = Sel luteal diberi perlakuan hCG + kurkumin
- X₄ = Sel luteal diberi perlakuan PGF_{2 α}
- X₅ = Sel luteal diberi perlakuan PGF_{2 α} + kurkumin
- X₆ = Sel luteal diberi perlakuan hCG + PGF_{2 α}
- X₇ = Sel luteal diberi perlakuan hCG + PGF_{2 α} + kurkumin
- X₀' = Kultur sel luteal dengan perlakuan pelarut, diambil medianya
- X₁' = Kultur sel luteal dengan perlakuan kurkumin, diambil medianya
- X₂' = Kultur sel luteal dengan perlakuan hCG, diambil medianya
- X₃' = Kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + kurkumin, diambil medianya
- X₄' = Kultur sel luteal dengan perlakuan PGF_{2 α} , diambil medianya
- X₅' = Kultur sel luteal dengan perlakuan PGF_{2 α} + kurkumin, diambil medianya
- X₆' = Kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + PGF_{2 α} , diambil medianya
- X₇' = Kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + PGF_{2 α} + kurkumin, diambil medianya
- P₀ = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan pelarut
- P₁ = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan kurkumin

- P_2 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan hCG
- P_3 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + kurkumin
- P_4 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan $PGF_{2\alpha}$
- P_5 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan $PGF_{2\alpha}$ + kurkumin
- P_6 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + $PGF_{2\alpha}$
- P_7 = Kadar progesteron dari media kultur sel luteal dengan perlakuan hCG + $PGF_{2\alpha}$ + kurkumin.

III. CARA PENELITIAN

3.1. Bahan Penelitian

- a. Kurkumin yang dipakai adalah kurkumin sintetik murni yang disintesis oleh Dr. Supardjan AM., Apt., M.Sc. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- b. Kultur sel luteal tikus strain Sprague Dawley prepubertal. Tikus diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP), diinduksi ovulasi dengan *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG). Pembuatan kultur dilakukan di Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada.
- c. *Minimal esensial medium* (MEM), mengandung 25 mM bufer Hepes (*N-2-hydroxyethyl piperazine, N-2-ethane sulfonate* dan garam Earle, dengan pH 7,4 (GIBCO).
- d. PMSG, Folligon (Intervet).
- e. Phosphate Buffer Saline (PBS), yang mengandung 0,85% NaCl (145 mM) dalam 150 mM bufer fosfat, dengan pH 7,4 (Sigma).
- f. Kolagenase powder (Sigma).
- g. Deoksiribonuklease (DNase) , (Sigma).

- h. Fetal calf serum (FCS) (GIBCO).
- i. Penisilin dan streptomisin (Penstrep) mengandung 10.000 i μ /ml penisilin dan 10 mg/ml streptomisin (GIBCO).
- j. Fungizon (GIBCO).
- k. Cawan kultur 24 sumuran (Nunclon).
- l. human Chorionic Hormone (hCG) (Serono).
- m. PGF_{2 α} , Reprodin (Bayer).
- n. *Trypan blue* (Sigma).
- o. Trypsin (GIBCO).
- p. Spuit sekali pakai.
- q. Tip pipet mikro
- r. Tabung ultra sentrifugasi

3.2. Alat Penelitian

- a. Pipet mikro
- b. Botol-botol steril
- c. Hemositometer
- d. Mikroskop deseksi
- e. Alat *vortex*
- f. Sentrifus dingin.
- g. Saringan millipore dengan membran filter ukuran 0,22 μ m.

- h. Inkubator CO₂ 5%
- i. *Laminar flow hood*
- j. Seperangkat alat sistem Immulite, Prodia
- k. Spektrofotometer
- l. Tabung Erlenmeyer
- m. Gelas ukur, pipet ukur
- n. Alat pendukung lain, seperti kapas, tisu dan lain-lain.

3.3. Jalannya Penelitian

3.3.1. *Induksi Ovulasi*. Untuk mendapatkan korpus luteum tikus, setiap tikus diberi suntikan tunggal 8 IU PMSG untuk menginduksi super ovulasi. Suntikan diberikan pada jam 09.⁰⁰ bertepatan dengan umur tikus 28 hari. Ovulasi akan terjadi pada saat umur tikus 30 hari sekitar jam 03.⁰⁰ - 05.⁰⁰. Pada umur tikus 31 hari terbentuk korpus luteum umur 1 hari (Ahren *et al.*, 1980; Thomas *et al.*, 1978).

3.3.2. *Isolasi korpus Luteum*. Tikus yang sudah berumur 35 hari dibunuh dengan memberi eter sebelumnya. Ovarium segera diambil dan ditempatkan dalam PBS dingin steril yang mengandung penstrep 3% dan dibawa ke laboratorium dalam termos/foam es. Pengambilan korpus luteum dari ovarium dilakukan dengan forsep tumpul di

bawah mikroskop deseksi dan dibersihkan dari jaringan interstitial lainnya. Selama preparasi korpus luteum tetap dalam PBS dingin (Soejono, 1981).

- 3.3.3. *Pembuatan kultur sel luteal.* Korpus luteum yang telah bersih didispersi secara enzimatik dalam MEM yang mengandung 2000 IU kolagenase, 3000 IU DNase per mg jaringan dan 3% penstrep, dikocok dan diinkubasi pada CO₂ 5%, 37° C selama satu jam, kemudian disaring dengan kasa nilon, selanjutnya disentrifus 400 x g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci 3 kali dengan MEM segar. Pellet yang telah dicuci diresuspensi dengan MEM yang mengandung 25 ml bufer hepes, garam Earle, 10% FBS, 3% antibiotik (penstrep) dan 0,7% fungizon. Penghitungan sel yang hidup dilakukan dengan hemositometer menggunakan *trypan blue*. Prosentase sel hidup minimal 60%. Konsentrasi sel hidup yang dipakai 10⁵ sel/ml. Sel ditanam pada cawan kultur 24 sumuran, kemudian preinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37° C selama 18 jam. Sel hidup akan menempel (*plating*), sedangkan sel-sel mati akan berada pada mediumnya. Medium dibuang dan diganti dengan medium yang telah diberi zat-zat perlakuan.

3.4. Penyiapan Zat-zat Perlakuan

3.4.1. *Kurkumin*; Kurkumin sintetik murni ditimbang sebanyak 15 mg dan ditaruh dalam tabung erlemeyer steril, kemudian dilarutkan dengan 10 ml metanol 95% hingga larut sempurna, sehingga diperoleh larutan kurkumin dalam metanol dengan konsentrasi 1,5 mg/ml. Selanjutnya konsentrasi kurkumin tersebut dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 425 nm. Larutan kurkumin disterilisasi dengan saringan millipore berdiameter 0,22 μ m, kemudian diperiksa ulang absorbansinya. Konsentrasi kurkumin tidak berubah karena proses sterilisasi. Penentuan dosis kurkumin yang ditambahkan berdasarkan hasil uji toksisitas kurkumin terhadap kultur sel luteal umur 3 hari, diperoleh nilai CPE_{50} sebesar 0,548 mg/ml dan \pm 85% sel luteal tetap hidup selama 24 jam atau lebih dengan pemberian kurkumin kadar 0,15 mg/ml. .

3.4.2 *Human Chorionic Gonadotropin* berbentuk *powder* mengandung 1000 iu dilarutkan dalam 1 ml NaCl fisiologis, pelarut yang disertakan dalam kemasan, selanjutnya diambil 0,1 ml dan ditambah 0,9 Aquabidest steril sehingga diperoleh kadar 100 iu/ml.

Dosis yang digunakan adalah 10 $\mu\text{g/ml}$ sesuai dengan dosis yang digunakan oleh Vega *et al.* (1994) dan Devoto *et al.* (1989).

3.4.3. *Prostaglandin F_{2 α}* yang digunakan adalah Reprodin (Bayer). Setiap 1 ml mengandung 3 mg luprostiol yang setara dengan 3mg/ml PGF_{2 α} atau 3×10^6 ng. Ambil 0,1 ml diencerkan dengan 9,9 ml Aquabidest steril sehingga diperoleh kadar 3×10^4 ng/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran 100 x lagi dengan MEM sehingga diperoleh kadar 300 ng/ml. Dosis yang digunakan adalah 50 ng/ml dengan dosis yang digunakan oleh Henderson & Mc Natty (1977). Dosis tersebut memberikan hasil perbedaan yang paling signifikan dibanding dosis-dosis lain yang digunakan.

3.5. Pemberian Zat-zat Perlakuan

Zat-zat perlakuan disiapkan dalam 8 tabung menggunakan pelarut MEM penumbuh lengkap, masing-masing tabung mengandung zat perlakuan sesuai kelompoknya. Seluruh zat perlakuan telah dicampur dalam satu tabung dan diberikan sekaligus pada kultur sel luteal.

Kultur sel luteal yang telah siap menerima perlakuan dikelompokkan menjadi 8 kelompok. Media dibuang dan diganti dengan media baru yang telah mengandung zat-zat perlakuan dengan dosis tersebut di atas. Kultur

sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Media diambil untuk dihitung kadar progesteronnya. Kadar progesteron dihitung dengan metoda *immunochemiluminescence (Immulite)* di Laboratorium klinik Prodia. Prinsip prosedur pengukuran progesteron dengan metode *immulite* ini dapat dilihat pada lampiran 3.

3.6. Analisis Data

Dasar pemilihan uji statistik:

- a. Jenis uji: perbedaan
- b. Tingkat pengukuran variabel tergantung (kadar progesteron) adalah: rasio
- c. Jumlah kelompok perlakuan: 8 (delapan) kelompok.
- d. Jumlah sampel tiap kelompok: 3 (tiga)
- e. Jumlah variabel bebas: 1 (satu)
- f. Sifat kelompok pengamatan: lain subyek.
- g. Uji homogenitas: tidak homogen.

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas dipilih uji beda nonparametrik Kruskal Wallis dan U-Mann Whitney. Uji Kruskal Wallis dimaksudkan untuk mengetahui adanya perbedaan efek karena perlakuan yang berbeda-beda antar 8 kelompok sekaligus, dan antar 4 kelompok tanpa kurkumin,

serta antar 4 kelompok dengan kurkumin. Sedangkan uji U-Mann Whitney digunakan untuk mengetahui perbedaan efek antar 2 kelompok perlakuan. Perbedaan dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.

3.7. Kesulitan dan Keterbatasan Penelitian

Kesulitan dan keterbatasan yang dihadapi dalam pelaksanaan penelitian ini adalah:

- a. *Kesulitan dalam pembuatan suspensi kurkumin* dengan kadar tinggi dalam pelarut air. Kesulitan ini terjadi karena sifat kurkumin yang tidak larut dalam air, dan kurkumin akan mengendap jika suspensi berkadar tinggi.
- b. *Kurkumin akan cepat terdegradasi* pada $\text{pH} > 7$, sedangkan kehidupan dan pertumbuhan kultur sel paling baik pada $\text{pH} 7,2 - 7,4$. Demikian halnya suhu lingkungan (inkubator) 37° dalam waktu yang lama akan berpengaruh terhadap stabilitas kurkumin. Oleh karena itu perlu dicari teknik yang tepat dalam preparasi kurkumin ini.
- c. *Pengukuran kadar progesteron* yang semula direncanakan menggunakan metode *radioimmunoassey* (RIA) tidak terlaksana dikarenakan kelangkaan reagensia (kit) RIA sehingga sulit

diperoleh akibat krisis ekonomi yang terjadi. Pengukuran kadar progesteron akhirnya diukur dengan metode *immulite* di Laboratorium Klinik Prodia dengan jumlah sampel (n) = 3 untuk masing-masing kelompok .

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Sekresi progesteron kultur sel luteal setelah diinkubasi 24 jam dengan diberi pelarut (*vehicle*) saja disebut sebagai sekresi progesteron basal. Kadar progesteron yang diukur dari medium kultur tersebut sebesar $28,66 \pm 5,51$ ng/ml. Kadar progesteron dari kelompok kultur sel luteal yang diberi kurkumin (0,15 mg/ml) sebesar $32,86 \pm 3,39$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi dari kadar progesteron basal, akan tetapi peningkatannya berbeda secara tidak bermakna ($p > 0,05$) (tabel 1).

Dari tabel 1 dapat dikemukakan bahwa pemberian hCG (10 μ /ml) pada kultur sel luteal menyebabkan sekresi progesteron sebesar $72,60 \pm 9,21$ ng/ml. Kadar progesteron tersebut 2,5 kali lebih besar dibanding kadar progesteron basal ($p < 0,05$). Pemberian hCG + kurkumin secara bersamaan pada kultur sel luteal akan menyebabkan sekresi progesteron sebesar $34,43 \pm 5,40$ ng/ml. Kadar ini kira-kira setengah dari kadar progesteron yang disekresi oleh kultur sel luteal yang diberi hCG ($p < 0,05$). Perbedaan sekresi progesteron antara kelompok yang diberi

kurkumin dengan kelompok yang diberi hCG + kurkumin menunjukkan berbeda tidak bermakna ($p > 0,05$).

Tabel 1: Kadar Progesteron kultur sel luteal pada kelompok perlakuan hCG, $\text{PGF}_{2\alpha}$, hCG + $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan atau tanpa kurkumin.

Penambahan	Kadar Progesteron ng/ml $24 \times 10^4 / 24$ jam	
	Kelompok Tanpa Kurkumin	Kelompok Dengan Kurkumin 0,15 mg/ml
Pelarut	$28,66 \pm 5,51$	$32,86 \pm 3,39$
hCG (10i μ /ml)	$72,60 \pm 9,21^*$	$34,43 \pm 5,40$
$\text{PGF}_{2\alpha}$ (50 ng/ml)	$32,33 \pm 3,67$	$34,33 \pm 3,01$
hCG (10i μ /ml) + $\text{PGF}_{2\alpha}$ (50 ng/ml)	$62,60 \pm 6,88^*$	$34,60 \pm 1,39$

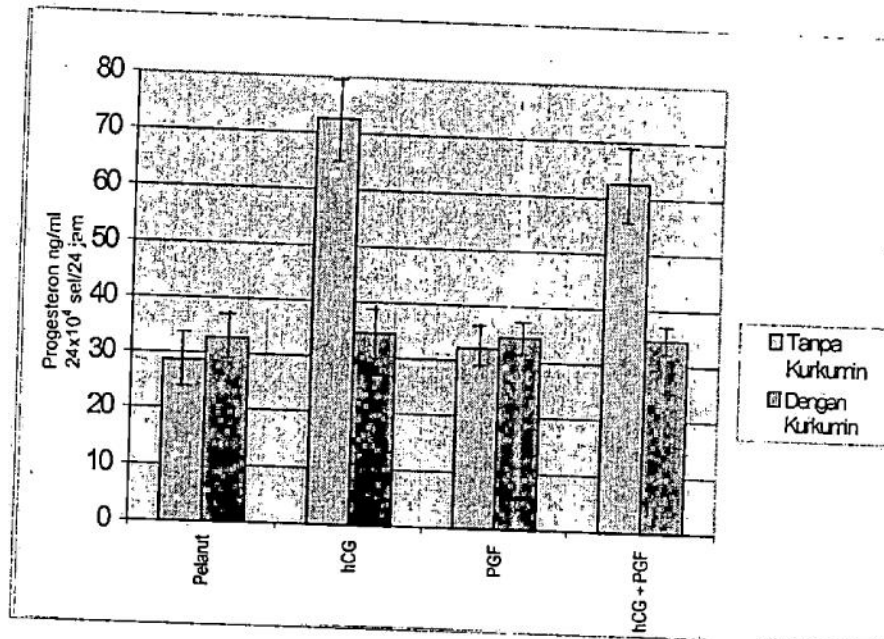
Keterangan *): Uji U-Mann Whitney $p < 0,05$ dibandingkan dengan 6 (enam) kelompok yang lain.

Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ (50 ng/ml) pada kultur sel luteal menyebabkan sekresi progesteronnya sebesar $32,33 \pm 3,67$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi dibanding kadar progesteron basal, akan tetapi perbedaannya tidak bermakna ($p > 0,05$). Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ + kurkumin menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $34,33 \pm 3,01$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi

dari sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi $\text{PGF}_{2\alpha}$ saja atau kurkumin saja, namun perbedaannya juga tidak bermakna ($p > 0,05$) (tabel 1, gambar 5).

Pemberian $\text{hCG} + \text{PGF}_{2\alpha}$ menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $62,60 \pm 6,88$ ng/ml. Kadar ini $\pm 2,2$ lebih besar dibandingkan dengan kadar progesteron basal ($p < 0,05$), 14% lebih rendah dibandingkan kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi hCG ($p > 0,05$), dan kira-kira 2 (dua) kali lebih besar dibanding kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0,05$).

Pemberian $\text{hCG} + \text{PGF}_{2\alpha} +$ kurkumin menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $34,60 \pm 1,39$ ng/ml. Kadar tersebut 53% lebih rendah dibandingkan dengan kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi hCG saja ($p < 0,05$), dan 45% lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar progesteron kultur sel luteal yang diberi $\text{hCG} + \text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0,05$). Kadar progesteron kultur sel luteal yang diberi $\text{hCG} + \text{PGF}_{2\alpha} +$ kurkumin ini berbeda tidak bermakna jika dibandingkan dengan kadar progesteron kultur sel luteal yang diberi pelarut, kurkumin, $\text{PGF}_{2\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha} +$ kurkumin, dan $\text{hCG} +$ kurkumin. Secara ringkas paparan hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 5.



Gambar 5: Diagram balok pengaruh penambahan kurkumin terhadap produksi progesteron kultur sel luteal dengan rangsangan hCG dan atau $PGF_{2\alpha}$

Uji perbedaan Kruskal Wallis terhadap 8 kelompok diperoleh hasil berbeda bermakna ($p < 0,05$). Demikian halnya uji beda terhadap 4 kelompok tanpa kurkumin, menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Akan tetapi uji beda pada 4 kelompok yang mendapat kurkumin diperoleh hasil berbeda tidak bermakna ($p > 0,05$).

4.2 . Pembahasan

Pada penelitian ini sekresi progesteron basal kultur sel luteal 24 jam tetap terlihat. Hal ini mungkin dikarenakan gonadotropin terikat sel *in situ* telah terbawa bersama sel luteal di dalam kultur, meskipun sel telah mengalami preinkubasi selama 20 jam dengan medium yang tidak mengandung hormon atau zat perlakuan lain.

Pengaruh pemberian kurkumin pada kultur sel luteal meningkatkan sekresi progesteron yang tidak bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa kultur sel luteal tidak berespon terhadap pemberian kurkumin. Respon biologis suatu sistem dianggap sebagai hasil akhir dari serangkaian peristiwa berurutan yang timbul setelah terjadi pengikatan suatu molekul terhadap reseptor. Menurut Verloop (1989 *cit* Nurfina, 1994) bahwa kemampuan pengikatan molekul terhadap reseptor tergantung adanya faktor hidrofobik, elektronik dan sterik dari molekul tersebut. Terdapat 4 (empat) tipe bioproses yang sangat berperan dalam interaksi antara molekul dengan sistem biologik yaitu penyerapan, pengeluaran, biotransformasi dan interaksi dengan reseptor. Jika suatu molekul dapat mencapai dan berinteraksi dengan reseptor, maka akan menimbulkan efek biologis. Dalam penelitian ini, mengapa kurkumin tidak berpengaruh terhadap sekresi progesteron oleh korpus sel luteal belum diketahui dengan jelas, seberapa

jauh kultur sel luteal mampu menyerap kurkumin dan apakah ada komponen-komponen pada kultur sel luteal yang memiliki kepekaan terhadap kurkumin, perlu dilakukan kajian lebih mendalam.

Dari hasil penelitian terlihat bahwa pemberian hCG meningkatkan sekresi progesteron 2,5 kali sekresi progesteron basal. Hal ini sesuai dengan hasil-hasil penelitian terdahulu bahwa pemberian hCG atau LH akan meningkatkan sekresi progesteron sel luteal *in vivo* maupun *in vitro* pada berbagai spesies mamalia dan manusia. Luteinizing Hormone/hCG meningkatkan sekresi progesteron melalui interaksi dengan reseptor LH/hCG yang kemudian menimbulkan kaskade stereogenik (gambar 1), sehingga efek pacuan LH/hCG selain dapat diukur dari jumlah sekresi progesteron juga dapat diukur komponen-komponen yang terlibat dalam proses steroidogenesis antara lain seperti adenilat siklase, cAMP, aktivitas enzim 3β -hidroksisteroid dehidrogenase.

Khan & Rosberg (1979) antara lain mengemukakan bahwa pemberian LH (5 ng/ml) pada sel luteal tikus meningkatkan \pm 4,5 kali adenilat siklase aktif. Thomas *et al.* (1978) menyatakan bahwa sekresi progesteron kultur sel luteal akan meningkat dengan peningkatan dosis LH dan peningkatan paling optimum yaitu pada dosis antara 50 – 100 ng/ml. Devoto *et al.* (1989) melaporkan hasil penelitian pada kultur sel luteal

manusia bahwa efek pemberian hCG (10 i μ /ml) terhadap sekresi progesteron, hampir sama dengan pemberian Bu₂cAMP (dcAMP). Ottander *et al.* (1999) menyatakan bahwa pemberian hCG pada kultur sel luteal manusia akan meningkatkan sekresi progesteron paling tinggi pada fase luteal tengah (*mid luteal phase*), kemudian fase luteal akhir (*late luteal phase*) dan terendah pada fase luteal awal (*early luteal phase*). Selain memacu proses stereodogenesis hCG juga meningkatkan jumlah mRNA pengkode untuk pembentukan reseptor LH. Pola peningkatan mRNA ini sama dengan pola peningkatan progesteron.

Respon kultur sel luteal terhadap pemberian gabungan hCG dan kurkumin dalam produksi progesteron terlihat menurun sebanyak 53% dari produksi progesteron kultur sel luteal yang hanya mendapat rangsangan hCG ($p < 0,05$) (tabel 1). Dari fakta ini dapat dikatakan bahwa ada interaksi antara hCG dan kurkumin dalam proses produksi progesteron oleh kultur sel luteal, kemungkinan kurkumin menghambat hCG.

Mekanisme kerja kurkumin dalam menghambat sekresi progesteron belum dapat terungkap dengan jelas dari hasil penelitian ini, mengingat kurkumin memiliki banyak sisi aktif dan terbukti bahwa kurkumin memiliki banyak aktivitas biologi. Terdapat beberapa kemungkinan penghambatan kurkumin pada tahapan steroidogenesis yaitu: ① Inaktivasi hCG sebelum berinteraksi dengan reseptor; ② Menghambat interaksi hCG dengan

reseptor; ③ Inaktivasi protein G / adenilat siklase ; ④ Inaktivasi cAMP; ⑤ Inaktivasi protein kinase-aktif; ⑥ Inaktivasi enzim 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase, dan lain-lain.

Sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi $\text{PGF}_{2\alpha}$ sedikit lebih tinggi dibanding sekresi progesteron basal, tapi perbedaannya tidak bermakna ($p > 0,05$) (tabel 2). Thomas *et al.* (1978) melaporkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan PGE_2 meningkatkan produksi progesteron yang tergantung dosisnya. Maksimum pada dosis $1\mu\text{M}$. Kuehl *et al.* (1970 cit Thomas *et al.* 1978) melaporkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan PGE_2 merangsang aktivitas adenilat siklase.

Efek rangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap sel luteal selain tergantung pada dosisnya, lebih ditentukan oleh jumlah reseptor $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada sel luteal. Behrman *et al.* (1976), Khan & Rosberg (1979) melaporkan bahwa tikus dengan korpus luteum muda tidak peka terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$, kepekaani terlihat nyata pada tikus dengan korpus luteum umur 7 (tujuh) hari. Ottander *et al.* (1999) menyatakan bahwa jumlah mRNA pengkode reseptor $\text{PGF}_{2\alpha}$ paling rendah pada sel luteal muda dan meningkat dengan bertambahnya umur korpus luteum.

Kultur sel luteal yang diberi perlakuan $\text{PGF}_{2\alpha}$ + kurkumin memiliki kadar progesteron lebih tinggi dibanding kultur sel luteal yang diberi $\text{PGF}_{2\alpha}$

saja atau kurkumin saja walaupun perbedaannya tidak bermakna. Sehingga dapat dikatakan bahwa kultur sel luteal dari korpus luteum umur 5 (lima) hari tidak peka terhadap pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$, kurkumin, atau $\text{PGF}_{2\alpha}$ + kurkumin.

Sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi $\text{PGF}_{2\alpha}$ atau kurkumin secara sendiri-sendiri, berbeda tidak bermakna dengan sekresi progesteron basal. Akan tetapi jika diberikan bersama-sama dengan hCG, maka baik $\text{PGF}_{2\alpha}$ maupun kurkumin akan menurunkan produksi progesteron secara bermakna. Artinya, terjadi interaksi antara $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan hCG atau kurkumin dan hCG. Dengan demikian, kemungkinan baik $\text{PGF}_{2\alpha}$ maupun kurkumin menghambat hCG dalam proses produksi progesteron kultur sel luteal.

Pada penelitian ini terlihat bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ menghambat sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG sebesar $\pm 14\%$, sedangkan dengan pemberian kurkumin menghambat sebesar $\pm 53\%$ (tabel 1). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa efek penghambatan kurkumin terhadap hCG 4 kali lebih kuat dibanding efek penghambatan $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap hCG.

Thomas *et al.* (1978) melaporkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ dosis $0,11 \mu\text{M}$ telah mampu menghambat LH dosis 50 ng/ml secara optimal, akan tetapi $\text{PGF}_{2\alpha}$

tidak menurunkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang dirangsang oleh Bu₂cAMP. Bolt (1979 *cit* Niswender, 1981) melaporkan penelitian pada domba, bahwa luteolisis akibat PGF_{2α} akan tetap berlangsung walaupun diberi LH atau LH dan prolaktin. Lain halnya dengan hCG dosis tinggi, mampu mencegah luteolisis akibat pemberian PGF_{2α}. Vaananen *et al.* (1998) menyatakan bahwa PGF_{2α} (10 μM) menghambat hCG (1 iu/ml), isoproterenol (100 μM), toksin kolera (1 μg/ml), dan forskolin (100 μM) dalam merangsang produksi progesteron, tetapi PGF_{2α} tidak menghambat produksi progesteron yang dirangsang Bu₂cAMP. Lebih lanjut dinyatakan bahwa PGF_{2α} penghambatan terhadap rangsangan hCG pada tingkat sebelum adenilat siklase dan setelah aktivasi protein kinase A oleh cAMP.

Dari keseluruhan data hasil penelitian ini, interaksi yang terlihat dengan jelas antara zat-zat perlakuan hanya antara kurkumin dan hCG. Hal ini terbukti dengan adanya perbedaan yang bermakna pada produksi progesteron kultur sel luteal.

- a. *Perlu dicari* teknik yang lebih baik dalam preparasi kurkumin agar tidak terjadi kerusakan kurkumin akibat kondisi alkalis dan suhu inkubator 37° C, sekaligus aman untuk kehidupan kultur sel luteal.
- b. *Perlu dilakukan* penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme antigonadotropin kurkumin dalam proses steroidogenesis, apakah penghambatan terjadi di ekstra-seluler, di membran sel (reseptor dan protein G), atau di intra-seluler misalnya pada cAMP, enzim-enzim di sitochirom, dan enzim 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase (3 β -HSD), dan lain-lain dengan mengukur reseptor LH/hCG, menghitung jumlah adenilat siklase aktif, akumulasi cAMP, mengetahui aktifitas enzim-enzim intra seluler dalam proses steroidogenesis, dan lain sebagainya.
- c. *Perlu dilakukan* penelitian lebih lanjut menggunakan kurkumin berbagai dosis, sehingga dapat diketahui dosis optimal kurkumin dalam menghambat hCG.

VI. RINGKASAN

6.1. Pengantar

Kurkumin dalam bentuk perasan atau ekstrak kunyit/temulawak telah digunakan dan dikonsumsi secara luas sebagai jamu maupun obat pengatur fertilitas belum memiliki landasan ilmiah. Kurkumin memiliki aktifitas anti-fertilitas pada tikus dan kelinci secara *in vivo* dapat menyebabkan anti-ovulasi dan gagal bunting (Garg, 1974). Dalam hal ini mekanisme antifertilitasnya belum jelas. Kurkumin telah terbukti sebagai substrat penghambat sintesis prostaglandin melalui inaktivasi enzim siklooksigenase (Nurfina, 1994). Penghambat ini diduga karena kurkumin memiliki struktur molekul dan reseptor yang mirip prostaglandin. Adapun prostaglandin merupakan hormon luteolisin fisiologis yang utama bekerja melalui mekanisme penghambatan induksi LH/hCG dalam memproduksi progesteron.

Permasalahannya adalah apakah kurkumin berpengaruh terhadap produksi progesteron basal? Apakah kurkumin berpengaruh terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh korpus luteum dengan rangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$? Apakah kurkumin menurunkan kadar progesteron kultur sel luteal yang mendapat rangsangan hCG, atau hCG + $\text{PGF}_{2\alpha}$?



Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah memberi sumbangan dalam pengembangan ilmu pengetahuan terutama endokrinologi reproduksi, khususnya mengenai pengaruh kurkumin terhadap fungsi korpus luteum. Selain itu diharapkan dapat dijadikan landasan ilmiah bagi pemakaian kurkumin sebagai jamu pengatur fertilitas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kurkumin terhadap kadar progesteron yang diproduksi oleh kultur sel luteal korpus luteum umur 5 (lima) hari dari tikus dengan perangsangan $\text{PGF}_{2\alpha}$, hCG, dan hCG + $\text{PGF}_{2\alpha}$.

6.2. Tinjauan Pustaka

6.2.1 *Korpus Luteum*

Merujuk beberapa literatur, secara normal pada beberapa jam pertama setelah ovum keluar dari folikelnya (ovulasi), sel-sel granulosa mulai berubah dengan cepat menjadi sel lutein. Sel ini tumbuh hingga diameternya bertambah besar dua kali atau lebih dari sel granulosa dan terisi dengan lipid sehingga tampak kekuningan. Proses ini disebut luteinisasi. Masa total jaringan keseluruhan disebut korpus luteum. Selama proses perkembangan folikel ovarii mulai folikel kecil hingga menjadi masak, terjadi juga perubahan reseptor-reseptor hormon secara kuantitatif dan kualitatif.

Koos & Hansel (1981), mempelajari pemisahan sel-sel luteal dengan memakai kolagenase dan mengidentifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu: (1) Sel-sel luteal besar (diameter $> 25 \mu\text{m}$), (2) Sel-sel luteal kecil (diameter $10-20 \mu\text{m}$), dan (3) Sel-sel non-steroidogenik, banyak dan paling kecil (diameter $< 10 \mu\text{m}$). Sel-sel luteal tersebut ada yang berasal dari sel granulosa maupun sel teka folikuli atau keduanya tergantung pada spesiesnya.

Secara *in vitro*, sel-sel luteal besar maupun kecil menyekresi progesteron. Tanpa LH, sel luteal besar menyekresikan progesteron dua kali lebih banyak dari pada sel luteal kecil. Akan tetapi jika ada LH, sel luteal kecil menyekresikan progesteron enam kali lebih banyak, sedang sel luteal besar hanya dua kali dibanding tanpa LH. Sel luteal kecil lebih peka terhadap LH karena sel luteal kecil lebih penuh reseptor-LH daripada sel luteal besar. Sel-sel luteal kecil akan tumbuh menjadi sel-sel luteal besar sejalan perkembangan korpus luteum (Koos & Hansel, 1981).

Fungsi utama korpus luteum adalah memproduksi progesteron dan mengontrol panjangnya siklus menstruasi. Fungsi dan umur korpus luteum diatur oleh interaksi beberapa hormon dan faktor pertumbuhan. Gulyas & Hodgen (1981) melaporkan bahwa terjadi penurunan fungsi kultur sel luteal primata akibat bertambahnya umur kultur. Korpus luteum memiliki kemampuan instrinsik untuk tumbuh dan menyekresikan progesteron.

Kemampuan ini akan meningkat jika ada stimulasi-stimulasi ekstrinsik, antara lain: LH, prolaktin, dan hCG, sedang estradiol/estrogen dan FSH dapat bersifat luteotrop atau luteolisis tergantung dosis dan spesiesnya.

Luteolisis akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan tetap berlangsung walaupun diberi LH atau LH tambah prolaktin. Lain halnya dengan hCG dosis tinggi dapat mencegah luteolisis akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada domba (Bolt, 1979 *cit* Niswender, 1981). Dari penelitian Ellinwood *et al.* (1979 *cit* Niswender, 1981) didapatkan hasil bahwa pada hewan bunting terdapat faktor yang mencegah luteolisis oleh $\text{PGF}_{2\alpha}$, yaitu hCG dan molekul mirip prolaktin yang berasal dari embrio.

Thomas *et al.* (1978), melaporkan bahwa bila kultur sel luteal diberi LH dosis tertentu akan merangsang produksi progesteron 6 kali produksi basal. Sedangkan $\text{PGF}_{2\alpha}$ atau PGE_2 dosis $0,56 \mu\text{mol}$ akan merangsang produksi progesteron kurang lebih 2 kali lipat produksi basal. Akan tetapi bila LH diberikan bersama-sama $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan menghambat LH lebih kuat dibanding PGE_2 . Ahren *et al.* (1980), mengatakan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ menghambat LH dalam menginduksi peningkatan cAMP pada korpus luteum umur 3 dan 7 hari, dan tidak pada umur 1 hari. Khan dan Rosberg (1979), telah melaporkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ menyebabkan penurunan signifikan adenilat siklase membran KL yang mendapat rangsangan LH. Grazul

(1985), melaporkan bahwa sekresi progesteron oleh korpus luteum tergantung umur korpus luteum dan dosis stimulan yang digunakan.

HCG adalah hormon glikoprotein yang disekresi oleh sel sinsitio-trofoblas plasenta, memiliki struktur mirip dengan LH, terdiri dari 2 (dua) sub-unit. Sub-unit α hormon tersebut bersifat spesies-spesifik dan memiliki urutan yang identik, sedang sub-unit β menentukan kemampuan interaksi dengan reseptor sel target yang merupakan pokok dari efek biologis yang terjadi. Sub-unit β -LH dan β -hCG memiliki urutan struktur yang homolog. Dari 145 asam amino β -hCG, 97 (67%) identik dengan β -LH. hCG memiliki ruas karboksi-terminal dari 30 asam amino yang tidak ditemukan pada LH. Luteinizing Hormone dan hCG bersifat luteotrop dan KL memiliki reseptor dengan afinitas yang tinggi terhadap hCG (Greenspan, 1991). Reseptor LH/hCG pada membran sel luteal juga terdiri dari dua domain, yaitu eksodomain (separah N-terminal ekstraseluler) dan endodomain (separah membran yang berhubungan dengan C-terminal) (Hong *et al.*, 1999).

Merujuk Becker (1990), Greenspan (1991), dan Hong *et al.* (1999), efek LH/hCG pada produksi progesteron oleh KL dimulai dengan interaksi LH/hCG dengan reseptor eksodomain, kemudian kompleks hCG-eksodomain berinteraksi dengan endodomain. Hong *et al.* (1999) memdemonstrasikan bahwa sub-unit β -hCG berikatan secara langsung

dengan eksodomain pada membran sel luteal dan kemudian akan mengaktifkan adenilat siklase dan meningkatkan cAMP. Siklik AMP kemudian mengaktifkan enzim-enzim yang berkaitan dengan sintesis progesteron.

6.2.2. Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Prostaglandin disebut *eicosanoid* karena terbentuk dari asam lemak yang terdiri dari 20 rantai karbon seperti asam arachidonat (*all - cis - 5, 8, 11, 14 - eicosa tetraenoic acid*). Asam arachidonat dibentuk dari fosfolipid membran sel yang bereaksi dengan fosfolipase C atau fosfolipase A_2 dan diglisericid lipase yang aktif karena berbagai stimuli yang dapat meningkatkan ion Ca^{2+} , selanjutnya asam arachidonat akan dimetabolisme secara enzimatis menjadi mediator inflamasi melalui berbagai jalur (Greenspan, 1991).

Beberapa mekanisme $PGF_{2\alpha}$ sebagai penyebab luteolisis yang telah diteliti yaitu: a) Mengurangi aliran darah korpus luteum. Pharris *et al.* (1970 *cit* Niswender, 1982) melaporkan bahwa penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ dosis tinggi menyebabkan pengurangan akut aliran darah vena ovari pada tikus dan kelinci pseudopregnant. Nett dan Niswender (1980 *cit* Niswender *et al.*, 1981) mengukur aliran darah korpus luteum dengan *radioactive microphores* dan menemukan penurunan yang dramatis (lebih dari 90%)

pada aliran darah ovari dan korpus luteum domba setelah 6-8 jam pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ dosis luteolitik. b). Mengurangi jumlah reseptor gonadotropik dan menghambat LH untuk menstimulasi aktivitas adenilat siklase (Thomas *et al.*, 1978; Khan, 1979 cit Soejono, 1986).

Behrman *et al.* (1976), Khan & Rosberg (1979) dan Ottender *et al.* (1999) menyatakan bahwa korpus luteum muda tidak peka terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ karena rendahnya respetor $\text{PGF}_{2\alpha}$, kepekaan korpus luteum terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ akan meningkat dengan meningkatnya umur korpus luteum.

6.2.3. Kurkumin

Kurkumin adalah salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcumin longa Val.*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza Robx.*). Selain kurkumin, dalam kunyit terkandung senyawa analog kurkumin yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, sedangkan pada temulawak tidak terdapat bisdemetoksi kurkumin (Srinivaran, 1953; Jentzsch, 1959 cit Ammon & Wahl, 1991). Kurkumin untuk pertama kali diisolasi pada tahun 1870, kemudian struktur kimia kurkumin ditetapkan oleh Lampe *et al.* (1910 cit Nurfina, 1994). Kurkumin banyak memiliki aktivitas biologis. Banyaknya aktivitas biologis ini mungkin terkait dengan stuktur molekulnya yang banyak memiliki sisi aktif (Nurfina, 1995; Van Der Goot, 1995).

Dengan metoda kristalografi sinar x, bentuk kristal kurkumin adalah monosiklik dengan berat molekul 368,37. Pada hakekatnya kurkumin berupa kristal tidak larut dalam air, tapi larut dalam etanol, aseton, butanol dietil etel, benzen dan metanol (Majeed *et al.*, 1995 dan Tonnesen, 1986). Stabilitas kurkumin dalam medium cair pada berbagai pH telah dipelajari oleh Tonnesen dan Karlsten (1983) dan telah ditemukan bahwa kurkumin dalam pelarut cair pada pH < 7 cukup stabil. Akan tetapi pada pH > 7 terdapat peningkatan rasio dekomposisi bersama dengan meningkatnya pH. Dalam keadaan basa, kurkumin akan terdegradasi dengan cepat menjadi asam ferulat, vanillin, feruloilmetan dan produk terkondensasi. Oleh karena itu perlu diperhatikan untuk menghindari kondisi basa selama analisis.

Telah banyak penelitian dilakukan terhadap kurkumin, dan ternyata kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologis. Berkenaan dengan aktivitas anti-fertilitas, Garg (1974) melaporkan bahwa kurkumin dosis 200 mg/kg pakan peroral pada tikus menyebabkan gagal bunting (anti-fertilitas), sedang pada kelinci menyebabkan anovulasi. Yang (1974 *cit* Ammon & Wahl, 1991) mengemukakan bahwa dosis 100–200 mg/kg, oral, dapat menghambat proses implantasi. Rao & Katogi (1984 *cit* Amman & Wahl, 1991) telah mendemonstrasikan pemberian 0,1 ml/hari ekstrak alkohol akan menyebabkan penurunan berat testes dan konsentrasi testosteron secara

signifikan. Gunster (1943 *cit* Hadi, 1995) mengatakan bahwa minyak atsiri dari temulawak dapat menyebabkan kontraksi uterus.

Beberapa aktivitas kurkumin dari berbagai penelitian yang telah dilaporkan oleh Ammon & Wahl (1991) dan Hadi (1995), bahwa kurkumin merupakan substansi yang meningkatkan sekresi pankreas, meningkatkan sekresi empedu (koleretik), anti-infamasi, sebagai zat hipotensif (penurun tekanan darah), antikoagulan, penurun kadar kolesterol darah, anti-bakteri, anti-fungi, anti-tumor dan anti-fertilitas. Kiso *et al.* (1983), mengatakan bahwa kurkumin telah terbukti dapat memperbaiki kerusakan sel-sel hati pada hewan yang diberi zat hepatotoksik seperti carbon tetraklorida dan D-galaktosamin. Studi kinetik yang dilakukan Ham *et al.* (1972 *cit* Nurfina, 1994) mengindikasikan bahwa perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin secara kompetitif dihambat oleh indometasin. Ini berarti secara alami ada kemiripan dalam struktur kimia antara substrat-produk dengan agen penghambat dugaan ini mungkin juga terjadi antara prostaglandin dan kurkumin. Budiman (1999) melakukan uji toksisitas kurkumin pada kultur sel fibroblas (sel Vero), dan diperoleh nilai *Cytopathic Effect* (CPE₅₀) sebesar 0,8077 mg/ml. Noor (1999) melaporkan bahwa CPE₅₀ kurkumin pada sel luteal umur 3 hari sebesar 0,548 mg/ml dan 85% sel luteal akan tetap hidup dengan pemberian kurkumin kadar 0,15 mg/ml.

6.5. Metoda Penelitian

Bahan yang digunakan terutama: Kurkumin sintetik murni diperoleh dari Dr. Supardjan AM., Apt., MSc. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Kultur sel luteal tikus strain Sprague Dawley prepubertal. Tikus diperoleh dari UHP, di induksi ovulasi dengan PMSG. Pembuatan kultur dilakukan di Laboratorium Hayati Universitas Gadjah Mada. MEM (GIBCO). PMSG, Folligon (Intervet). PBS (Sigma). Kolagenase (Sigma). Deoksiribonuklease (DNase) (Sigma). Penisilin dan streptomisin (Penstrep) (GIBCO). Fungizon (GIBCO).

Tikus disuntik 8 iu PMSG pada jam 09.⁰⁰ bertepatan dengan umur tikus 28 hari. Ovulasi akan terjadi pada saat umur tikus 30 hari sekitar jam 03.⁰⁰ - 05.⁰⁰. Pada umur tikus 31 hari terbentuk korpus luteum umur 1 hari. Tikus yang sudah berumur 35 hari dibunuh. Ovarium segera diambil. Korpus luteum dibersihkan dari jaringan interstitial lainnya, dan dibuat sel luteal.

Dispersi dilakukan secara enzimatis dalam MEM yang mengandung 2000 iu kolagenase, 3000 iu DNase per mg jaringan dan 3% penstrep, dikocok dan diinkubasi pada CO₂ 5% , 37° C selama satu jam, kemudian disaring dengan kasa nilon, selanjutnya disentrifus 400 x g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci 3 kali dengan MEM dan diresuspensi dengan MEM yang mengandung buffer hepes, garam Earle,

10% FBS, 3% penstrep dan 0,7% fungizon. Sel dihitung dengan hemositometer menggunakan *trypan blue*. Konsentrasi sel hidup yang dipakai 10^5 sel/ml. Sel ditanam pada cawan kultur 24 sumuran, kemudian preinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37° C selama 18 jam. Suspensi sel yang mengandung 24×10^4 dibuat menjadi 8 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 subyek. 1 kelompok sebagai kontrol mendapat vehicle dan 7 kelompok perlakuan masing-masing diberi kurkumin, hCG, hCG + kurkumin, PGF_{2α}, PGF_{2α} + kurkumin, hCG + PGF_{2α}, hCG + PGF_{2α} + kurkumin. Seterusnya, medium dibuang dan diganti dengan medium yang telah diberi zat-zat perlakuan dengan dosis: kurkumin (0,15 mg/ml), hCG (10 iμ/ml), dan PGF_{2α} (50 mg/ml).

Inkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Media diambil untuk dihitung kadar progesteronnya. Kadar progesteron dihitung dengan metoda *Immuno Chemiluminescence (Immulite)* di laboratorium Klinik Prodia. Data-data yang telah diperoleh dianalisis dengan uji Kruskal Wallis dan U-Mann Whitney menggunakan $p < 0,05$.

6.6. Hasil

Sekresi progesteron kultur sel luteal setelah diinkubasi 24 jam dengan diberi pelarut (*vehicle*) saja disebut sebagai sekresi progesteron

basal. Kadar progesteron yang diukur dari medium kultur tersebut sebesar $28,66 \pm 5,51$ ng/ml. Kadar progesteron dari kelompok kultur sel luteal yang diberi kurkumin ($0,15$ mg/ml) sebesar $32,86 \pm 3,39$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi dari kadar progesteron basal, akan tetapi peningkatannya berbeda secara tidak bermakna ($p > 0,05$).

Pemberian hCG (10 iu/ml) pada kultur sel luteal menyebabkan sekresi progesteron sebesar $72,60 \pm 9,21$ ng/ml. Kadar progesteron tersebut $2,5$ kali lebih besar dibanding kadar progesteron basal ($p < 0,05$). Pemberian hCG + kurkumin secara bersamaan pada kultur sel luteal akan menyebabkan sekresi progesteron sebesar $34,43 \pm 5,40$ ng/ml. Kadar ini kira-kira setengah dari kadar progesteron yang disekresi oleh kultur sel luteal yang diberi hCG ($p < 0,05$). Perbedaan sekresi progesteron antara kelompok yang diberi kurkumin dengan kelompok yang diberi hCG + kurkumin menunjukkan berbeda tidak bermakna ($p > 0,05$).

Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ (50 ng/ml) pada kultur sel luteal menyebabkan sekresi progesteronnya sebesar $32,33 \pm 3,67$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi dibanding kadar progesteron basal, akan tetapi perbedaannya tidak bermakna ($p > 0,05$). Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ + kurkumin menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $34,33 \pm 3,01$ ng/ml. Kadar ini lebih tinggi dari sekresi progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi

PGF_{2α} saja atau kurkumin saja, namun perbedaannya juga tidak bermakna ($p > 0,05$). Pemberian hCG + PGF_{2α} menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $62,60 \pm 6,88$ ng/ml. Kadar ini $\pm 2,2$ lebih besar dibandingkan dengan kadar progesteron basal ($p < 0,05$), 14% lebih rendah dibandingkan kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi hCG ($p > 0,05$), dan kira-kira 2 (dua) kali lebih besar dibanding kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi PGF_{2α} ($p < 0,05$).

Pemberian hCG + PGF_{2α} + kurkumin menyebabkan sekresi progesteron oleh kultur sel luteal sebesar $34,60 \pm 1,39$ ng/ml. Kadar tersebut 53% lebih rendah dibandingkan dengan kadar progesteron oleh kultur sel luteal yang diberi hCG saja ($p < 0,05$), dan 45% lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar progesteron kultur sel luteal yang diberi hCG + PGF_{2α} ($p < 0,05$). Perbedaan kadar progesteron KSL yang diberi hCG + PGF_{2α} + kurkumin dengan KSL yang diberi pelarut, kurkumin, PGF_{2α}, PGF_{2α} + kurkumin atau hCG + kurkumin tidak bermakna.

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian kurkumin tidak berpengaruh terhadap produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus dengan atau tanpa perangsangan PGF_{2α}. Selain itu, kurkumin menurunkan produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus yang mendapat rangsangan hCG atau hCG + PGF_{2α}.

VII. DAFTAR PUSTAKA

- Ahren, K., Rosberg, S., Khan, I. 1980. On the Mechanism of Tropic Hormone Action in the Ovary. *Hormone and Cells Regulation* Vol. 4, J. Dumont and J. Numez eds. Elsevier North-Holland Biomedical Press.
- Ammon, H.P., N. Wahl, N.A. 1991. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Medica* 57; 1-7.
- Becher, K.L. 1990, *Principles and Practise of Endocrinology and Metabolism*. J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
- Behrman, H.R., Grinwich, D.L., and Hichens, M. 1976. Studies on the Mechanism of PGF_{2α} and Gonadotrophin Interaction on LH Receptor Function in Corpora Lutea. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Reseach*. Edt. B. Samuelsson and R. Pauletti. Raven Press, New York.
- Behrman, H.R. Luborrsky-Moore, J.L., Pang, C.Y., Wright, K., and Dorflinger, L.J., 1979. Mechanism of PGF_{2α} Action in Functional Luteolysis in: *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function*. Channing, C.P., Marsh, J.M., and Sadler, W.A., eds. Plenum Publishing Co.: 557
- Best and Taylor. 1979. *Physiological Basic of Medical Practice*. Edt. John R. Brobeck. 10th Ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, USA.
- Budiman, N., Soejono, S.K. 1999. Model Kultur Jaringan dalam Mempelajari Toksisitas Kurkumin pada Kultur Fibroblas. *Mediagama* 1(3): 37-44.
- Devoto, L., Vega, M., Navarro, V., Sir, T., Alba, F., Castro, O. 1989. Regulation of Steroid Hormon Synthesis by Human Corpora Lutea: Failure of Follicle-Stimulating Hormon to Support Steroidogenesis In vivo and In vitro. *Fertil-Steril*. 51 (4): 628-633

- Garg, S.K. 1974. Effect of *Curcuma Longa* (Rhizomes) on Fertility in Experimental Animals. *Planta Medica*. 26:225-227.
- Grazul, A. 1985. Release of Progesterone by Porcine Luteal Cells from Different Days of Estrous Cycles: Effect of LH, PRL, and PGF_{2α}. *Endocrinol. Experiment*. 19: 117-128.
- Greenspan, F.S. 1991. *Basic and Clinical Endocrinology*. 3rd Ed. Prentice Hall International Inc. USA.
- Gulyas, B.J. and Hodgen, G.D. 1981. In vitro Studies on Luteolysis in the Rhesus Monkey. *Dinamic of Ovarian Function*, ed N.B. Schwartz and Hunzikker-Dunn, Raven Press, New York, 191-196.
- Hadi, S. 1995. Manfaat Temulawak Ditinjau dari Segi Kedokteran. *Prosiding Simposium Nasional Temulawak*. Lembaga Penelitian Universitas Padjajaran: 139-144.
- Hasmeda, M. and Polya G.M. 1995. Inhibition of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase by Kurkumin. In: Pramono S. et al., editors. *Recent Developments in Curcumin Pharmacochemistry*. Yogyakarta: Aditya Media, 66-78.
- Henderson, K.M. and Mc Natty, K.P. 1997. A Possible Interrelationship between Gonadotrophin Stimulation and Prostaglandin F_{2α} Inhibition of Steroidogenesis by Granulosa-Luteal Cells In vitro. *J. Endocr.* 73:71-78
- Hong, S.H., Ji, I.H., Ji, T.H. 1999. The Beta-subunit of Human Choriogonadotropin Interact with the Exodomain of the Luteinizing Hormon/Choriogonadotropin Receptor and Changesits interaction with the alpha-subunit. *Mol. Endocrinol.* 13(8): 1285-1294.
- Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D., and Conney, A.H. 1991. Inhibitory Effects of Curcumin on In vitro Lipoxygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis. *Cancer-Res.* 1991 Feb.; 51(3); 813-9.
- Huang, M.T., Ma, W., Lu, Y.P., Chang, R.L., Fisher, C., Manchand, P.S., New Mark, H.L., Conney, A.H. 1995. Effect of Kurkumin,

- Demethoxycurcumin, Bisdemethoxy-Curcumin, and Tetrahydro-Curcumin on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Tumor Promotion. *Carcinogenesis*, 16(10): 2493-2497.
- Khan, M.I., and Rosberg, S. 1979. Acute Suppression by $\text{PGF}_{2\alpha}$ on LH, Epinephrine, and Fluoride Stimulation of Adenylate Cyclase in Rat Luteal Tissue. *J. Cyclic Nuc. Res.* 6 (1): 55-63.
- Koos, R. D. and Hansel, W., 1981. The Large and Small Cells of the Bovine Corpus Luteum: Ultrastructural and Functional Differences. *Dynamic of Ovarian Function*, Edt. N. B. Schwartz and M. Hunzicker-Dunn, Raven Press, New York.
- Kiso, Y., Suzuki, Y., Wanatabe, N. Oshima, Y. and Hikino, H. 1983. Antihepatotoxic Principles of Curcuma longa Rhizoma. *Planta Medica*, 49: 185-187.
- Majeed, M., Badmaev, V., Shivakumar, U., Rajendran, R. 1995. *Curcuminoid, Antioxidant Phytonutrients*. Piscataway. Nutriscience Publishers, Inc. New Jersey.
- Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N. and Gujral, P.K. 1982. Anti-inflammatory and Irritant Activities of Curcumin Analogues in Rats. *Agents and Actions*. 12:508-515.
- Niswender, G.D. 1981. Mechanism Controlling Luteolysis, *Dynamic of Ovarian Function*, ed N.B. Schwartz and Hunzicker-Dunn, Raven Press, New York, 153-160.
- Noor Z., 1999. Uji Toksisitas Kurkumin pada Kultur Sel Luteal Tikus. Laporan Penelitian. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Kantor Koordinasi Perguruan Tinggi Wilayah V Yogyakarta.
- Nurfina, A. 1994. The Synthesis of Some Symmetrical Kurkumin Derivates and The Study of Their Anti-inflammatory Activities as well as Structure-activity Relationships. *Desertation*. Gadjah Mada University Yogyakarta.
- Nurfina, A., Samhudi, M.R., Timmerman, H., Jenie, U.A., Sugiyanto, and Van der Goot, H., 1995. The Relationship between Structure and Inhibition of Lipoygenase Activity of Curcumin Derivatives. In:

- Pramono S. et al., editors. *Recent Developments in Curcumin Pharmacochemistry*. Yogyakarta: Aditya Media, 66-78.
- Oetari, S., Sudibyoy, M., Commandeur, J.N.M., Samhoedi, R. and Vermulen, N.P.E. 1996. Effect of Curcumin on Cytochrome P 450 N Glutathione S-Transferase Activities in Rats Liver. *Biochem. Pharmacol.* 51:19-45.
- Osawa, T., Sugiyama Y., Inayoshi, M., Kawakishi, S., 1995. Antioxidative activity of Tetrahydrocurcuminoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(9): 1609-1612
- Ottander, U., Leung, C.H., Oloffson, J.I. 1999. Functional Evidence for Divergent Receptor Activation Mechanisms of Luteotropic and Luteolytic events in the Human Corpus Luteum. *Mol. Hum. Reprod.* 5(5): 391-395
- Soejono, S.K. 1981. Effect of $PGF_{2\alpha}$ on Progesteron Secretion by Perifused Rat Corpora Lutea in Response to LH Stimulation. *Thesis*. Dept. of Physiology & Biophysics University of Illinois. USA.
- Soejono, S.K. 1986. Pengaruh LH pada Korpus Luteum karena Adanya $PGF_{2\alpha}$. Dalam Peranan Bio Membran dalam Pengembangan Teknologi untuk Menunjang Pembangunan Nasional. *Prosiding Simposium Nasional Bio Membran*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Soejono, S.K. 1988. Korpus Luteum. *Bahan Pengajaran*. Pusat Antar Universitas Bidang Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Thomas, J.P., Dolflinger, L.J., Behrman, H.R. 1978. Mechanism of Rapid Antigonadotrophic Action of Prostaglandin in Cultured Luteal Cells. *Praoc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol., 75 No.3, pp. 1344-1348.
- Tonnesen, H.H., Karlsen, J. 1983. High Performance Liquid Chromatography of Curcumin and Related Compounds. *Journal of Chromatography*. 259: 367-371.

- Tonnesen, H.H. 1986. *Chemistry, Stability and Analysis of Curcumin A Naturally Occuring Drug Molecule*. Institute of Pharmacy. University of Oslo. Norway.
- Vaananen, J.E., Lee, S., Vaananen, C.C., Yuen, B.H., Leung, P.C. 1998. Stepwise Activation on the Gonadotropic Signal Transduction Pathway, and the Ability of Prostaglandin F_{2α} to Inhibit this Activated Pathway. *Endocrin.* 8 (3): 301-307.
- Van Der Goot, H. 1995 . The Chemistry and Qualitative Structure-Activity Relationship of Curcumin. In: Pramono S. et al., editors. *Recent Developments in Curcumin Pharmacochemistry*. Yogyakarta : Aditya Media, 66-78
- Vega, M., Devoto, L., Castro, O., and Kohen, P. 1994. Progesterone Synthesis by Human Luteal Cells. *Endocrinol. Metab.* 79: 466-469.

Lampiran 1

**DATA HASIL PENGUKURAN KADAR PROGESTERON MEDIA
KULTUR PADA KELOMPOK PENELITIAN**

No	Kekompok/ Penambahan	Kadar Progesteron/ng/ml		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1	Pelarut	26,0	35,0	27,0
2	Kurkumin	37,1	30,4	30,8
3	hCG	78,6	77,2	62,0
4	hCG + Kurkumin	28,3	34,5	3,4
5	PGF _{2α}	28,1	34,5	34,4
6	PGF _{2α} + Kurkumin	37,8	32,8	32,4
7	hCG + PGF _{2α}	60,0	57,4	70,4
8	hCG + PGF _{2α} + Kurkumin	33,8	36,2	33,8

Lampiran 2

PROSEDUR PEMBUATAN MEDIA

I. Pembuatan MEM

1. Siapkan aquadest 0,95 L dalam tabung Becker, diaduk dengan pengaduk magnet perlahan-lahan jangan sampai timbul gelembung.
2. Tambahkan medium powder kedalam aquadest pada suhu kamar (15-30 °C).
3. Bilas wadah dengan aquadest untuk membersihkan sisa medium yang menempel.
4. Tambahkan 2,2 gram NaHCO₃ per liter medium.
5. Aduk terus hingga larut sempurna.
6. Tambahkan aquadest hingga volume tepat 1 L.
7. Ukur pH, jika belum tepat tambahkan HCl 1 N atau NaOH 1 N hingga tepat 7,4, tetap terus diaduk perlahan-lahan.
8. Sterilisasi segera dengan filter membran 0,22 µm, kemudian simpan dalam botol tertutup rapat pada suhu 4-8°C (refrigerated).

II. Pembuatan PBS

Pembuatan PBS dapat dari ramuan yang telah jadi atau meramu sendiri dari zat-zat sebagai berikut :

- a. NaCl.....8.000 mg
- b. KCl.....200 mg
- c. Na₂(HPO₄).....1.150 mg
- d. K(HPO₄).....200 mg

Cara Membuat :

1. Siapkan aquadest 0,95 L dalam tabung Becker, diaduk dengan pengaduk magnet perlahan-lahan jangan sampai timbul gelembung.
2. Tambahkan medium kedalam aquadest pada suhu kamar (15-30 °C)
3. Bilas wadah dengan aquadest untuk membersihkan sisa medium yang menempel.
4. Aduk terus hingga larut sempurna.
5. Tambahkan aquadest hingga volume tepat 1 L
6. Ukur pH, jika belum tepat tambahkan HCl 1 N atau NaOH 1 N hingga tepat 7,4 ,tetap terus diaduk perlahan-lahan.
7. Sterilisasi dengan filter membran 0,22 µm atau dengan otoclave pada 121 °C selama 15 menit.



Lampiran 3

PENGUKURAN PROGESTERON METODE IMMULITE

Prinsip Prosedur

Immulite progesteron merupakan fase padat, ligan yang dilabel, *chemiluminescent immuno assay*, yang bersifat kompetitif. Fase padat adalah serangkaian polysterene yang tertutup dengan unit tes immulite dengan dilapisi anti bodi poliklonal kelinci khusus untuk progesteron.

Sampel dan ligan yang dilabel progesteron secara serentak dimasukkan ke dalam unit tes, dan diinkubasi kira-kira 30 menit pada 37°C dengan sebentar-sebentar dikocok. Selama diinkubasi tersebut progesteron sampel berkompetisi dengan ligan yang dilabel progesteron untuk mengikat sisi ikatan anti bodi pada rangkaian polysterene tadi. Bahan yang tidak terikat kemudian dipisahkan, dibersihkan secara sentrifuse.

Alkalin phosphatase yang dilabel anti ligan dimasukkan dan unit tes diinkubasi lagi selama 30 menit. Enzim konjugat yang tidak terikat dipisahkan, dibersihkan secara sentrifuse. Kemudian substrat ditambahkan dan unit tes diinkubasi selama 10 menit.

Substrat chemiluminescent yaitu ester fosfat dari adamantyl dioxetan akan menghidrolisis dengan adanya alkalin phosphatase untuk menghasilkan suatu hasil antara yang tidak stabil. Produk lanjutan dari hasil antara akan menyerap emisi cahaya, sehingga memperbaiki ketelitian melalui celah dalam pembacaan sekaligus banyak. Komplek ikatan yang terbentuk dan juga keluarnya photon diukur dengan luminometer, adalah berbanding terbalik dengan konsentrasi sampel.

Lampiran 4

UJI STATISTIK

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

DATA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,899	7	16	,037

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5803,303	7	800,472	28,398	,000
Within Groups	450,993	16	28,187		
Total	6054,296	23			

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
DATA	Vehicle	3	5,33
	Kurkumin	3	9,00
	hCG	3	22,67
	hCG+Kurkumin	3	12,33
	PGF2	3	8,67
	PGF2 +Kurkumin	3	10,67
	hCG+PGF2	3	20,33
	hCG+PGF2 +Kurk	3	11,00
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	DATA
Chi-Square	14,926
df	7
Asymp. Sig.	,037

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Mean Rank	N	Kelompok
3,00	3	DATA
10,67	3	hCG
4,00	3	PGF2
8,33	3	hCG+PGF2
	12	Total

Test Statistics^a

DATA	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	9,051	3	,028

a. Kruskal-Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
DATA	Kurkumin	3	5,00
	hCG+Kurkumin	3	7,33
	PGF2 +Kurkumin	3	6,67
	hCG+PGF2 +Kurk	3	7,00
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	DATA
Chi-Square	,748
df	3
Asymp. Sig.	,862

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	2,67	3	KELP = 1	Vehicle	
	4,33	3	KELP = 2	Kurkumin	
		--			
		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	2,0	8,0		,4000	-1,0911
					,2752

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	2,00	3	KELP = 1	Vehicle	
	5,00	3	KELP = 3	nCG	

		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	,0	6,0		,1000	-1,9640
					,0495

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	2,33	3	KELP = 1	Vehicle	
	4,67	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin	
		--			
		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	1,0	7,0		,2000	-1,5275
					,1266

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP		Kelompok			
Mean Rank	Cases				
3,00	3	KELP = 1	Vehicle		
4,00	3	KELP = 5	PGF2		
	--				
	6	Total			
U	W	Exact		Corrected for ties	
3,0	9,0	2-Tailed P		Z	2-Tailed P
		,7000		-,6547	,5127

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP		Kelompok			
Mean Rank	Cases				
2,67	3	KELP = 1	Vehicle		
4,33	3	KELP = 6	PGF2 +Rurkumin		
	--				
	6	Total			
U	W	Exact		Corrected for ties	
2,0	8,0	2-Tailed P		Z	2-Tailed P
		,4000		-1,0911	,2752

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP		Kelompok			
Mean Rank	Cases				
2,00	3	KELP = 1	Vehicle		
5,00	3	KELP = 7	hCG+PGF2		
	--				
	6	Total			
U	W	Exact		Corrected for ties	
,0	6,0	2-Tailed P		Z	2-Tailed P
		,1000		-1,9640	,0495

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP	Kelompok					
Mean Rank	Cases					
2,67	3	KELP = 1	Vehicle			
4,33	3	KELP = 8	hCG+PGF2 +Kurk			
	--					
	6	Total				
				Exact		Corrected for ties
U	W		2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
2,0	8,0		,4000	-1,1070	,2683	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP	Kelompok					
Mean Rank	Cases					
2,00	3	KELP = 2	Kurkumin			
5,00	3	KELP = 3	hCG			
	--					
	6	Total				
				Exact		Corrected for ties
U	W		2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
,0	6,0		,1000	-1,9640	,0495	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA by KELP	Kelompok					
Mean Rank	Cases					
3,33	3	KELP = 2	Kurkumin			
3,67	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin			
	--					
	6	Total				
				Exact		Corrected for ties
U	W		2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
4,0	10,0		1,0000	-,2182	,8273	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	3,67	3	KELP = 2	Kurkumin	
	3,33	3	KELP = 5	PGF2	
		--			
		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	4,0	11,0		1,0000	-2,2102
					,8273

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	2,67	3	KELP = 2	Kurkumin	
	4,33	3	KELP = 6	PGF2 +Kurkumin	
		--			
		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	2,0	8,0		,4000	-1,0911
					,2752

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok			
by KELP	Mean Rank	Cases			
	2,00	3	KELP = 2	Kurkumin	
	5,00	3	KELP = 7	hCG+PGF2	
		--			
		6	Total		
				Exact	Corrected for ties
	U	W		2-Tailed P	Z
	,0	6,0		,1000	-1,9640
					,0495

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean Rank Cases

3,00	3	KELP = 2	Kurkumin
4,00	3	KELP = 8	hCG+PGF2 +Kurk
--			
	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
3,0	9,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		,7000	-,6642 ,5066

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean Rank Cases

5,00	3	KELP = 3	hCG
2,00	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin
--			
	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
,0	15,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		,1000	-1,9640 ,0495

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean Rank Cases

5,00	3	KELP = 3	hCG
2,00	3	KELP = 5	PGF2

	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
,0	15,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		,1000	-1,9640 ,0495

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		by KELP		Kelompok	
Mean Rank	Cases				
4,33	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin		
2,67	3	KELP = 5	PGF2		
	--				
	6	Total			
				Exact	Corrected for ties
U	W	2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
2,0	13,0	,4000	-1,0911	,2752	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		by KELP		Kelompok	
Mean Rank	Cases				
3,67	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin		
3,33	3	KELP = 6	PGF2 +Kurkumin		
	--				
	6	Total			
				Exact	Corrected for ties
U	W	2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
4,0	11,0	1,0000	-,2182	,8273	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		by KELP		Kelompok	
Mean Rank	Cases				
2,00	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin		
5,00	3	KELP = 7	hCG+PGF2		
	--				
	6	Total			
				Exact	Corrected for ties
U	W	2-Tailed P	Z	2-Tailed P	
,0	6,0	,1000	-1,9640	,0495	

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean Rank Cases

4,00	3	KELP = 4	hCG+Kurkumin
3,00	3	KELP = 8	hCG+PGF2 +Kurk
	--		
	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
3,0	12,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		,7000	-,6642 ,5066

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean rank Cases

3,33	3	KELP = 5	PGF2
3,67	3	KELP = 6	PGF2 +Kurkumin
	--		
	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
4,0	10,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		1,0000	-,2182 ,8273

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Kelompok

Mean Rank Cases

2,00	3	KELP = 5	PGF2
5,00	3	KELP = 7	hCG+PGF2
	--		
	6	Total	

U	W	Exact	Corrected for ties
,0	6,0	2-Tailed P	Z 2-Tailed P
		,1000	-1,9640 ,0495

- - - - - Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok	
by KELP	Mean Rank	Cases	
	3,33	3	KELP = 5 PGF2
	3,67	3	KELP = 8 hCG+PGF2 +Kurk
		--	
		6	Total

U	W	Exact 2-Tailed P	Corrected for ties Z	2-Tailed P
4,0	10,0	1,0000	-,2214	,8248

- - - - - Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok	
by KELP	Mean Rank	Cases	
	2,00	3	KELP = 6 PGF2 +Kurkumin
	5,00	3	KELP = 7 hCG+PGF2
		--	
		6	Total

U	W	Exact 2-Tailed P	Corrected for ties Z	2-Tailed P
,0	6,0	,1000	-1,9640	,0495

- - - - - Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA		Kelompok	
by KELP	Mean Rank	Cases	
	3,00	3	KELP = 6 PGF2 +Kurkumin
	4,00	3	KELP = 8 hCG+PGF2 +Kurk
		--	
		6	Total

U	W	Exact 2-Tailed P	Corrected for ties Z	2-Tailed P
3,0	9,0	,7000	-,6642	,5066

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

DATA
by KELP Relompok

Mean Rank Cases

5,00	3	KELP = 7	hCG+PGF2
2,00	3	KELP = 8	hCG+PGF2 +Kurk
	--		
	6	Total	

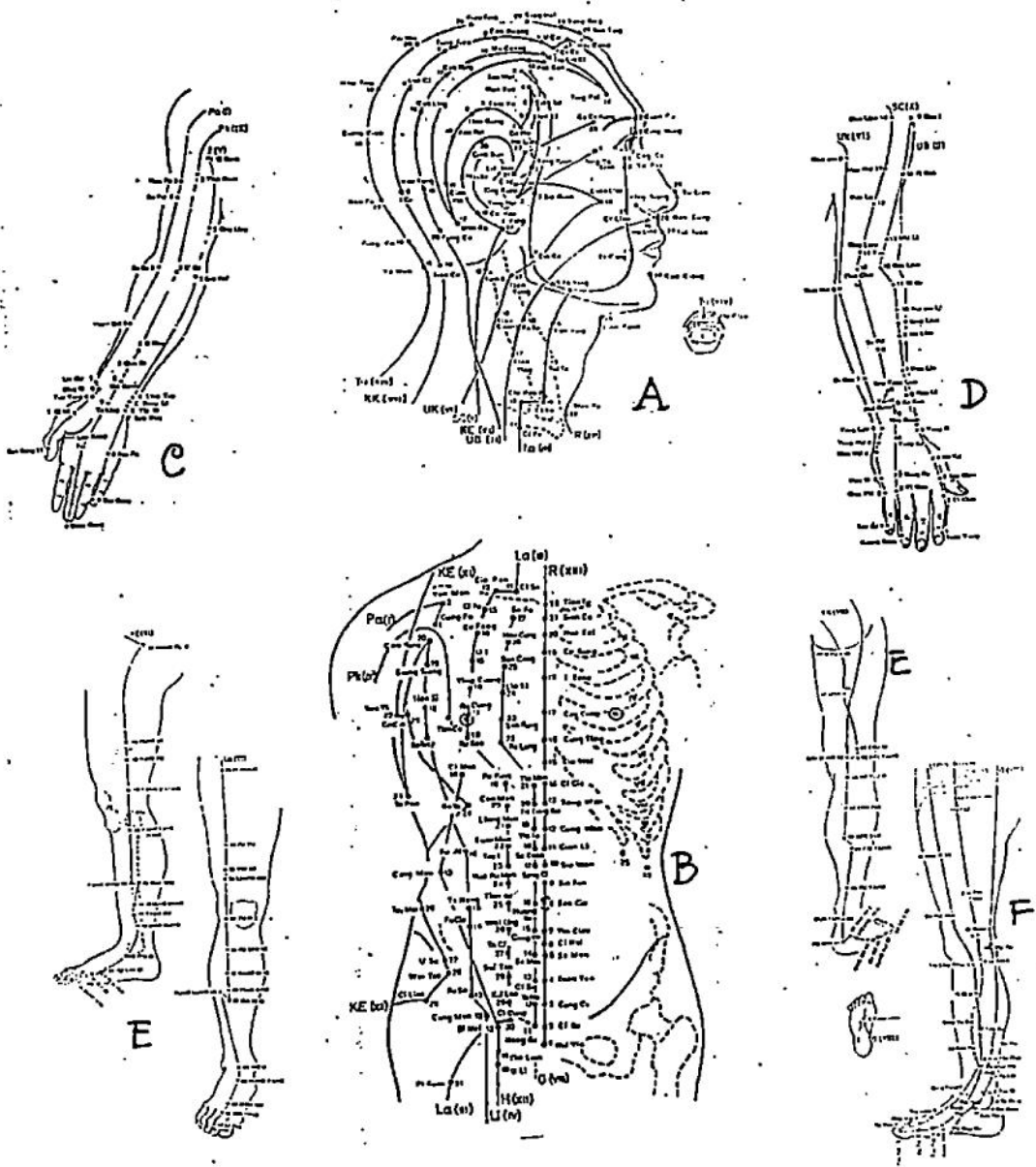
U
,0

W
15,0

Exact
2-Tailed P
,1000

Corrected for ties
Z
-1,9926 2-Tailed P
 ,0463

Lampiran 1. Gambar skematis 12 meridian umum pada manusia



DUA BELAS MERIDIAN UMUM PADA MANUSIA

Terbentang di kepala (A), badan (B) dan anggota atas maupun bawah. Menurut perjalanannya dibagi menjadi 6 meridian tangan, terdiri atas 3 meridian Yin Tangan (C) dan 3 meridian Yang Tangan (D); dan 6 meridian kaki, terdiri atas 3 meridian Yin Kaki (E) dan 3 meridian Yang Kaki (F).

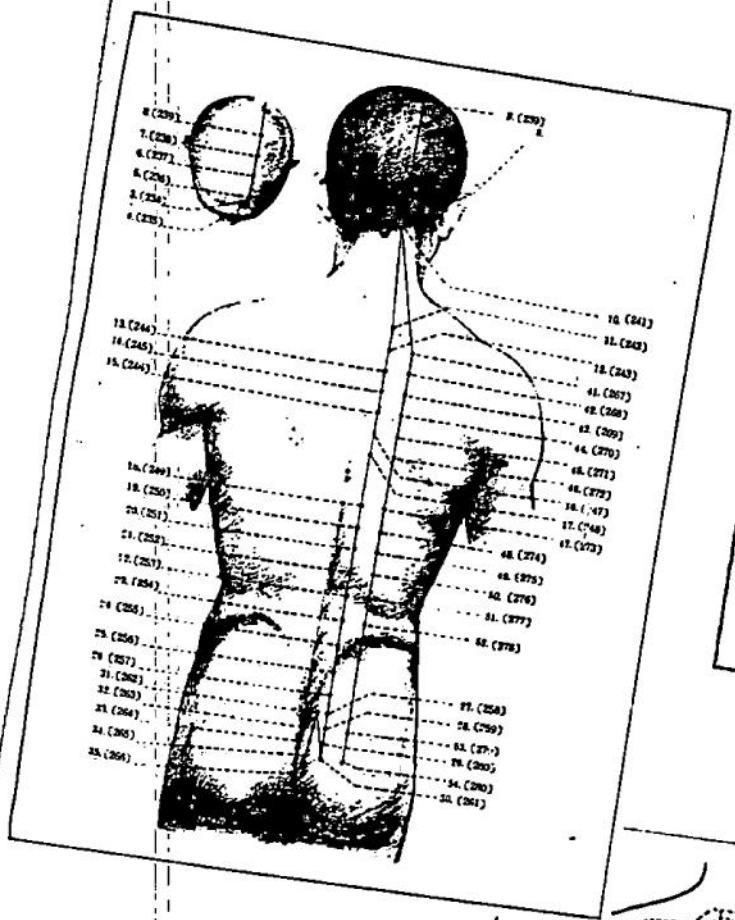
Lampiran 2. Gambar skematis meridian pankreas pada manusia



MERIDIAN PANKREAS

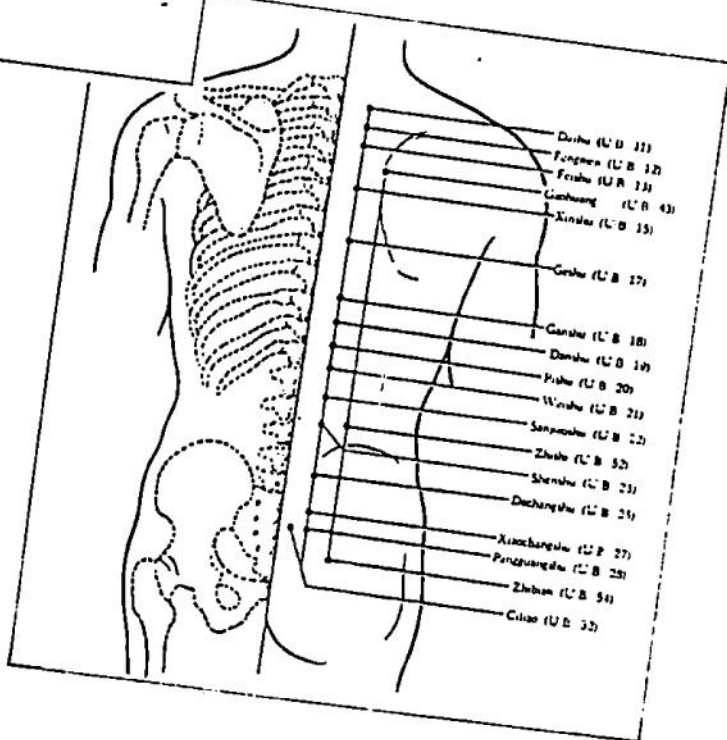
Berawal dari titik pertama *Yin Pai* di ujung ibu jari kaki terus menyusur di daerah medial tungkai, ke atas sampai titik ke-21 di spatium intercostalis VI pada titik tangan garis yang ditarik dari fossa axillaris ke ujung costa XI.

Lampiran 3. Gambar skematis titik-titik Su-belakang pada manusia

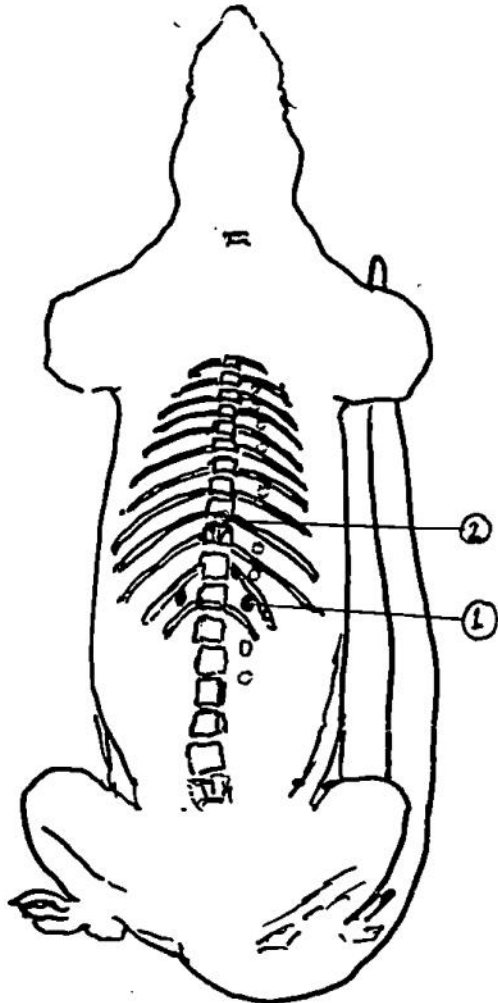
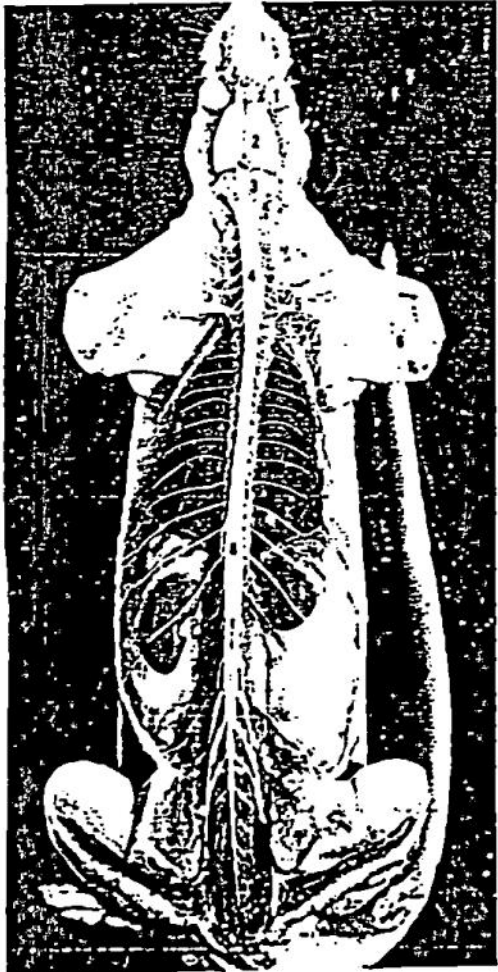


**TITIK SU-BELAKANG
PADA MANUSIA**

Berderet dari atas ke bawah mulai dari titik *Fei Shu* di VT III-IV (Su-belakang paru) sampai dengan *Pang Kuang Shu* di VS II-III (Su-belakang kandung kemih). *Pi Shu* (Su-belakang pankreas) berada di VT XI-XII).



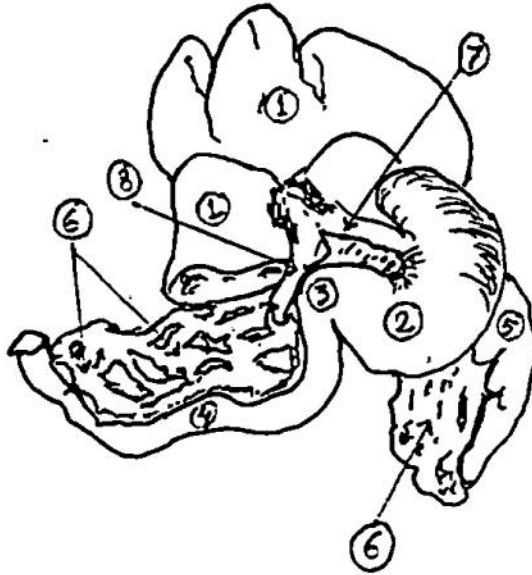
Lampiran 4. Gambar skematis titik-titik Su belakang pada tikus



TITIK SU-BELAKANG PADA TIKUS

Belum dikenal secara lengkap seperti pada manusia. Beberapa titik yang sudah banyak diteliti adalah: *Pi Shu* (pankreas), *Sen Shu* (ginjal), *Kan Shu* (hati) dan *Sin Shu* (jantung).
GAMBAR: (1) *Pi Shu*; (2) titik referens pada saat perekaman titik *Pi Shu*.

Lampiran 5. Gambar skematis pankreas pada manusia dan tikus



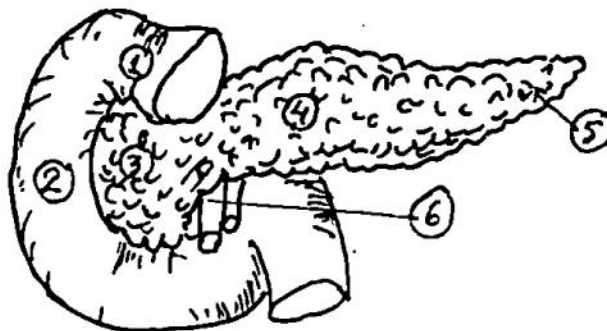
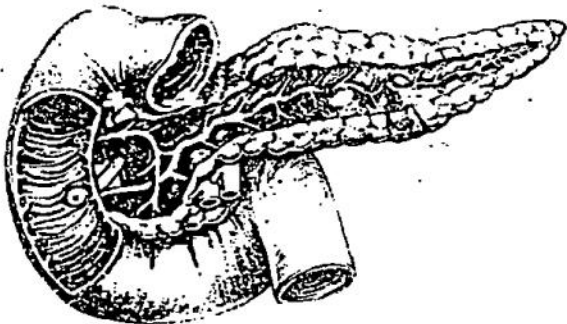
PANKREAS DAN ORGAN SEKITARNYA

ATAS: PADA TIKUS

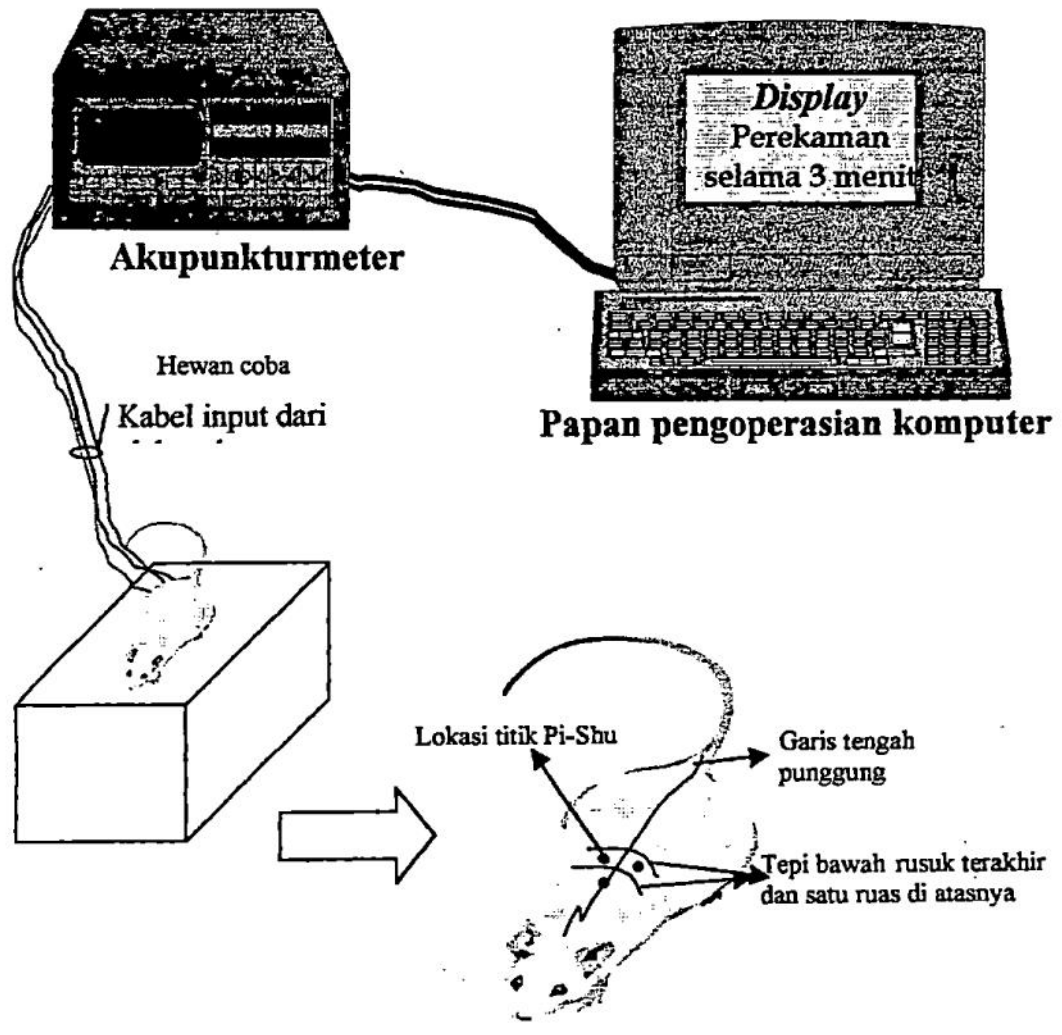
(1) hepar (2) gaster (3) pylorus (4) duodenum (5) lien (6) PANKREAS (7) oesophagus
(8) ductus biliaris

BAWAH: PADA MANUSIA

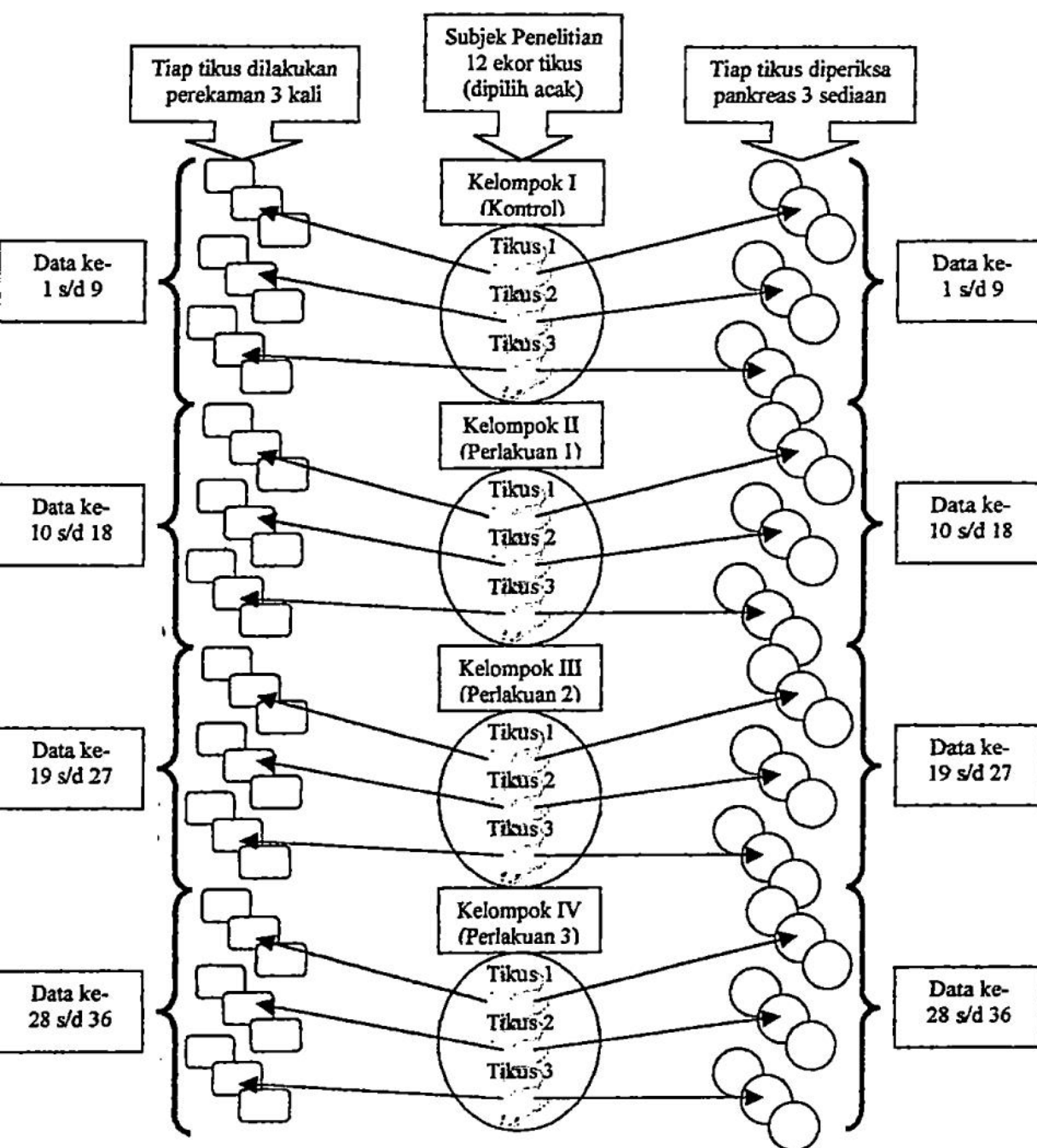
(1) pylorus (2) duodenum (3) caput pancreas (4) corpus pancreas (5) cauda pancreas
(6) a/v. mesenterica superior.



Lampiran 6. Gambar skematis letak titik dan rangkaian alat Akupunkturmeter



Lampiran 7. Bagan pembagian kelompok subjek penelitian



Lampiran 8. Berat badan tikus -

Subjek ke	Berat pada saat penyuntikan aloksan monohidrat (gram)	Berat pada saat perekaman beda tegangan listrik (gram)
1.	285	290
2.	290	280
3.	310	305
4.	300	300
5.	305	300
6.	305	295
7.	275	270
8.	290	280
9.	320	290
10.	315	290
11.	305	310
12.	295	290
Rerata	299.58	291.67

Lampiran 9. Prosedur perekaman beda tegangan listrik titik Su-belakang pankreas

PERSIAPAN HEWAN COBA

1. Dilakukan pencukuran rambut pada daerah perekaman sampai bersih.
2. Makan dan minum diberikan secukupnya .
3. Dilakukan penyesuaian dari kandang ke tempat/ruang perekaman beberapa saat.
4. Dilakukan pembiusan dengan obat Ketalar.

PERSIAPAN ALAT

1. Semua komponen alat dirangkai secara baik dan benar
2. Nyalakan Power Supply -
3. Lakukan kalibrasi ke-4 kabel penyadap elektrode perekam
4. Siapkan jarum akupunktur ½ Cun untuk elektrode

PEREKAMAN

1. Tempatkan hewan coba pada meja hewan coba
2. Tusukkan jarum akupunktur ½ Cun pada daerah yang ditentukan
3. Pasanglah kabel-kabel sadapan
4. Mulailah mengaktifkan program perekaman
5. Tentukan satuan/unit serta lama waktu perekaman
6. Simpan data perekaman dalam *file* tersendiri
7. Selesai binatang diistirahatkan sejenak untuk memasuki tahap berikutnya.

Lampiran 10. Prosedur pemulasan pankreas dengan metode *Victoria blue*

Fixation, Embedding and Sectioning

1. Bahan dimasukkan dalam larutan fiksatif Bouin's selama 24 jam
2. Dicuci dengan alcohol 70% sampai jernih → 1 hari 2 kali selama 5 hari

Proses Dehidrasi :

Masukkan dalam larutan alcohol 80%; 90%; 95% dan alcohol absolut, masing-masing selama 10 menit, diulang tiga kali tiap konsentrasi larutan.

Proses Clearing:

Gunakan larutan alcohol 70% dicampur Toluene perbandingan 1:1, masukkan selama 15 menit. Kemudian masukkan ke dalam Toluene murni selama \pm 1 jam (sampai transparan)

Proses Embedding:

Gunakan parafin jenuh dalam Toluene, 18 jam → paraffin murni I; II; III; IV, 7 menit, dalam incubator suhu 60 derajat C.

3. Diiris 6 micron dengan mikrotom

Staining

1. Siapkan larutan pemulasan *Victoria blue* yang sudah disimpan selama 10 hari
2. Setelah objek gelas dibersihkan dari paraffin kemudian masukkan dalam larutan mordant selama 24 jam diincubator suhu 27 derajat C.
3. dicuci air mengalir sampai tidak berwarna (\pm 30 menit)
4. kemudian objek gelas ditetesi larutan oksidasi selama 3-5 menit
5. dicuci dengan aquadest
6. kemudian dimasukkan ke dalam larutan sodium disulphite 2-5% 1 menit (sampai putih)
7. dicuci dengan aquadest
8. kemudian dimasukkan ke dalam larutan alcohol 70% 1 menit
9. diwarnai dengan larutan pewarna 15 menit – 24 jam pada suhu kamar sampai yang kelihatan β cell terwarnai biru gelap, sel lain tidak berwarna
10. dicuci kelebihannya dengan aquadest
11. diwarnai dalam 0,5% phloxin, 3 menit warna merah
12. dehidrasi alcohol-xylol
13. ditutup *mounting agent* DPX → siap diperiksa dibawah mikroskop.

Lampiran 11. Data pemeriksaan sedian pankreas dan hasil perekaman
 beda tegangan listrik titik akupunktur

Tabel Rasio jumlah sel β per jumlah sel di satu pulau Langerhans (satu subjek diperiksa 3 sedian).

Subjek/sedian	Rasio sel β per jumlah sel di satu pulau Langerhans			
	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
1/1	0.538	0.364	0.201	0.293
1/2	0.366	0.497	0.199	0.38
1/3	0.346	0.333	0.269	0.325
2/1	0.503	0.35	0.307	0.171
2/2	0.798	0.322	0.199	0.311
2/3	0.638	0.375	0.22	0.358
3/1	0.529	0.369	0.305	0.347
3/2	0.742	0.431	0.295	0.128
3/3	0.676	0.454	0.365	0.199

Tabel Rerata beda tegangan listrik titik akupunktur Su-belakang pankreas (satu subjek direkam 3 kali).

Subjek/perekaman	Rerata beda tegangan listrik			
	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
1/1	19.2	41.6	51.9	30.6
1/2	12.8	29.3	16.9	17.6
1/3	24.8	12.6	14.4	39
2/1	6.2	13.4	26.3	27.3
2/2	31.7	30.1	26.3	15.6
2/3	5	43.2	30.7	50.4
3/1	9.8	22.1	36.7	16.9
3/2	7.8	14.6	14.3	13.8
3/3	5.6	65.4	42.3	18.6

Lampiran 12. Analisis statistik data penelitian

-Test (profil I vs II)

Group Statistics

kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
uji beda dari beda i_ii kontrol	1629	-6,6611	15,7079	,3892
perlakuan 70 mg/kgBB	1629	40,6796	44,3205	1,0981

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
uji beda dari beda i_ii	Equal variances assumed	528,388	,000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
uji beda dari beda i_ii	Equal variances assumed	-40,635	3256	,000	-47,3407
	Equal variances not assumed	-40,635	2030,637	,000	-47,3407

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
uji beda dari beda i_ii	Equal variances assumed	1,1650	-49,6250	-45,0564
	Equal variances not assumed	1,1650	-49,6255	-45,0559

test (profil klp.1 vs 3)

Group Statistics

kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
beda dari beda klp1_3 kontrol	1629	-6,6611	15,7079	,3892
perlakuan 140 mg/kgBB	1629	11,9024	49,1924	1,2188

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
beda dari beda klp1_3	Equal variances assumed	220,978	,000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
beda dari beda klp1_3	Equal variances assumed	-14,509	3256	,000	-18,5635
	Equal variances not assumed	-14,509	1956,575	,000	-18,5635

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
beda dari beda klp1_3	Equal variances assumed	1,2794	-21,0721	-16,0549
	Equal variances not assumed	1,2794	-21,0727	-16,0543

T-Test (profil klp.1 vs 4)

Group Statistics

	kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
uji beda dari beda klp1_4	kontrol	1629	-6,6611	15,7079	,3892
	perlakuan 210 mg/kgBB	1629	4,2376	47,4059	1,1746

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
uji beda dari beda klp1_4	Equal variances assumed	182,870	,000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
uji beda dari beda klp1_4	Equal variances assumed	-8,808	3256	,000	-10,8987
	Equal variances not assumed	-8,808	1981,226	,000	-10,8987

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
uji beda dari beda klp1_4	Equal variances assumed	1,2374	-13,3248	-8,4726
	Equal variances not assumed	1,2374	-13,3254	-8,4721

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

UJI BEDA 4 KLP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
104,950	3	6512	,000

ANOVA

UJI BEDA 4 KLP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2003434,6	3	667811,52	388,361	,000
Within Groups	11197806	6512	1719,565		
Total	13201241	6515			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: UJI BEDA 4 KLP

	(I) kelompok penelitian	(J) kelompok penelitian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	kontrol	perlakuan 70 MG/KGBB	-47,3407*	1,4530	,000	-50,1890	-44,4924
		PERLAKUAN 140 MG/KGBB	-18,5635*	1,4530	,000	-21,4119	-15,7152
		PERLAKUAN 210 MG/KGBB	-10,8987*	1,4530	,000	-13,7471	-8,0504
	perlakuan 70 MG/KGBB	kontrol	47,3407*	1,4530	,000	44,4924	50,1890
		PERLAKUAN 140 MG/KGBB	28,7772*	1,4530	,000	25,9288	31,6255
		PERLAKUAN 210 MG/KGBB	36,4420*	1,4530	,000	33,5936	39,2903

Multiple Comparisons

Dependent Variable: UJI BEDA 4 KLP

	(I) kelompok penelitian	(J) kelompok penelitian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	PERLAKUAN 140 MG/KGGB	kontrol	18,5635*	1,4530	,000	15,7152	21,4119
		perlakuan 70 MG/KGGB	-28,7772*	1,4530	,000	-31,6255	-25,9288
		PERLAKUAN 210 MG/KGGB	7,6648*	1,4530	,000	4,8165	10,5132
	PERLAKUAN 210 MG/KGGB	kontrol	10,8987*	1,4530	,000	8,0504	13,7471
		perlakuan 70 MG/KGGB	-36,4420*	1,4530	,000	-39,2903	-33,5936
		PERLAKUAN 140 MG/KGGB	-7,6648*	1,4530	,000	-10,5132	-4,8165
Dunnell T3	kontrol	perlakuan 70 MG/KGGB	-47,3407*	1,4530	,000	-50,4177	-44,2637
		PERLAKUAN 140 MG/KGGB	-18,5635*	1,4530	,000	-21,9427	-15,1844
		PERLAKUAN 210 MG/KGGB	-10,8987*	1,4530	,000	-14,1667	-7,6307
	perlakuan 70 MG/KGGB	kontrol	47,3407*	1,4530	,000	44,2637	50,4177
		PERLAKUAN 140 MG/KGGB	28,7772*	1,4530	,000	24,4443	33,1100
		PERLAKUAN 210 MG/KGGB	36,4420*	1,4530	,000	32,1953	40,6887
	PERLAKUAN 140 MG/KGGB	kontrol	18,5635*	1,4530	,000	15,1844	21,9427
		perlakuan 70 MG/KGGB	-28,7772*	1,4530	,000	-33,1100	-24,4443
		PERLAKUAN 210 MG/KGGB	7,6648*	1,4530	,000	3,1943	12,1353
	PERLAKUAN 210 MG/KGGB	kontrol	10,8987*	1,4530	,000	7,6307	14,1667
		perlakuan 70 MG/KGGB	-36,4420*	1,4530	,000	-40,6887	-32,1953
		PERLAKUAN 140 MG/KGGB	-7,6648*	1,4530	,000	-12,1353	-3,1943

*. The mean difference is significant at the .05 level.

T-Test (pankreas klp.1 vs 2)

Group Statistics

kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
beda pankreas kontrol	9	,5707	,1567	5,223E-02
klp1 dan 2 perlakuan 1	9	,3883	5,918E-02	1,973E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
beda pankreas klp1 dan 2	Equal variances assumed	7,641	,014
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
beda pankreas klp1 dan 2	Equal variances assumed	3,266	16	,005	,1823
	Equal variances not assumed	3,266	10,237	,008	,1823

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
beda pankreas klp1 dan 2	Equal variances assumed	5,583E-02	6,398E-02	,3007
	Equal variances not assumed	5,583E-02	5,832E-02	,3063

T-Test (pankreas klp.1 vs 3)

Group Statistics

kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error -- Mean
uji beda pankreas klp1 dan 3 kontrol	9	,5707	,1567	5,223E-02
perlakuan 140mg/kgbb	9	,2622	6,025E-02	2,008E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
uji beda pankreas klp1 dan 3	Equal variances assumed	7,287	,016
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
uji beda pankreas klp1 dan 3	Equal variances assumed	5,512	16	,000	,3084
	Equal variances not assumed	5,512	10,315	,000	,3084

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
uji beda pankreas klp1 dan 3	Equal variances assumed	5,596E-02	,1898	,4271
	Equal variances not assumed	5,596E-02	,1843	,4326

T-Test (pankreas klp.1 vs 4)

Group Statistics

kelompok penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ujibeda pankreas klp1 dan 4 kontrol	9	,5707	,1567	5,223E-02
ujibeda pankreas klp1 dan 4 perlakuan 210mg/kgbb	9	,2791	9,032E-02	3,011E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ujibeda pankreas klp1 dan 4	Equal variances assumed	2,925	,107
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
ujibeda pankreas klp1 dan 4	Equal variances assumed	4,836	16	,000	,2916
	Equal variances not assumed	4,836	12,788	,000	,2916

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

PAN36

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,905	3	32	,006

ANOVA

PAN36

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,543	3	,181	18,185	,000
Within Groups	,319	32	9,961E-03		
Total	,862	35			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PAN36

	(I) kelompok penelitian	(J) kelompok penelitian	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	kontrol	perlakuan 70mg/kgbb	.1823*	4,705E-02	.000	8,650E-02	.2782
		perlakuan 140mg/kgbb	.3084*	4,705E-02	.000	.2126	.4043
		perlakuan 210 mg/kgbb	.2916*	4,705E-02	.000	.1957	.3874
	perlakuan 70mg/kgbb	kontrol	-.1823*	4,705E-02	.000	-.2782	-8,65E-02
		perlakuan 140mg/kgbb	.1261*	4,705E-02	.012	3,028E-02	.2219
		perlakuan 210 mg/kgbb	.1092*	4,705E-02	.027	1,339E-02	.2051
	perlakuan 140mg/kgbb	kontrol	-.3084*	4,705E-02	.000	-.4043	-.2126
		perlakuan 70mg/kgbb	-.1261*	4,705E-02	.012	-.2219	-3,03E-02
		perlakuan 210 mg/kgbb	-1,6889E-02	4,705E-02	.722	-.1127	7,894E-02
	perlakuan 210 mg/kgbb	kontrol	-.2916*	4,705E-02	.000	-.3874	-.1957
		perlakuan 70mg/kgbb	-.1092*	4,705E-02	.027	-.2051	-1,34E-02
		perlakuan 140mg/kgbb	1,689E-02	4,705E-02	.722	-7,89E-02	.1127
Dunnett T3	kontrol	perlakuan 70mg/kgbb	.1823*	4,705E-02	.045	3,720E-03	.3609
		perlakuan 140mg/kgbb	.3084*	4,705E-02	.001	.1294	.4875
		perlakuan 210 mg/kgbb	.2916*	4,705E-02	.002	.1074	.4757
	perlakuan 70mg/kgbb	kontrol	-.1823*	4,705E-02	.045	-.3609	-3,72E-03
		perlakuan 140mg/kgbb	.1261*	4,705E-02	.002	4,252E-02	.2097
		perlakuan 210 mg/kgbb	.1092*	4,705E-02	.049	4,350E-04	.2180
	perlakuan 140mg/kgbb	kontrol	-.3084*	4,705E-02	.001	-.4875	-.1294
		perlakuan 70mg/kgbb	-.1261*	4,705E-02	.002	-.2097	-4,25E-02
		perlakuan 210 mg/kgbb	-1,6889E-02	4,705E-02	.997	-.1263	9,250E-02
	perlakuan 210 mg/kgbb	kontrol	-.2916*	4,705E-02	.002	-.4757	-.1074
		perlakuan 70mg/kgbb	-.1092*	4,705E-02	.049	-.2180	-4,35E-04
		perlakuan 140mg/kgbb	1,689E-02	4,705E-02	.997	-9,25E-02	.1263

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Regression

Variables Entered/Removed^{b,c}

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PAN36 ^a		Enter

- a. All requested variables entered.
- b. Dependent Variable: L36SIGMA
- c. Models are based only on cases for which kelompok penelitian = kontrol

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
	kelompok penelitian = kontrol (Selected)			
1	,021 ^a	,000	-,142	14,4221

- a. Predictors: (Constant), PAN36

ANOVA^{b,c}

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,629	1	,629	,003	,958 ^a
	Residual	1455,971	7	207,996		
	Total	1456,600	8			

- a. Predictors: (Constant), PAN36
- b. Dependent Variable: L36SIGMA
- c. Selecting only cases for which kelompok penelitian = kontrol

Coefficients^{a,b}

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-7,145	19,183		-,372	,721
	PAN36	-1,790	32,542	-,021	-,055	,958

- a. Dependent Variable: L36SIGMA
- b. Selecting only cases for which kelompok penelitian = kontrol

Regression

Variables Entered/Removed^{b,c}

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PAN36 ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Models are based only on cases for which kelompok penelitian = perlakuan 70mg/kgbb

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.457 ^a	.209	.096	41,7386

a. Predictors: (Constant), PAN36

ANOVA^{b,c}

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3217,509	1	3217,509	1,847	,216 ^a
	Residual	12194,751	7	1742,107		
	Total	15412,260	8			

a. Predictors: (Constant), PAN36

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 70mg/kgbb

Coefficients^{a,b}

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-89,168	97,831		-,911	,392
	PAN36	338,888	249,364	,457	1,359	,216

a. Dependent Variable: L36SIGMA

b. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 70mg/kgbb

Regression

Variables Entered/Removed^{b,c}

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PAN36 ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Models are based only on cases for which kelompok penelitian = perlakuan 140mg/kgbb

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
	kelompok penelitian = perlakuan 140mg/kgb b (Selected)			
1	,739 ^a	,547	,482	20,5893

a. Predictors: (Constant), PAN36

ANOVA^{b,c}

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3578,578	1	3578,578	8,442	,023 ^a
	Residual	2967,422	7	423,917		
	Total	6546,000	8			

a. Predictors: (Constant), PAN36

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 140mg/kgbb

Coefficients^{a,b}

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	104,712	32,415		3,230	,014
	PAN36	-351,019	120,814	-,739	-2,905	,023

a. Dependent Variable: L36SIGMA

b. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 140mg/kgbb

Regression

Variables Entered/Removed^{b,c}

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PAN36 ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Models are based only on cases for which kelompok penelitian = perlakuan 210 mg/kgbb

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
	kelompok penelitian = perlakuan 210 mg/kgbb (Selected)			
1	,278 ^a	,077	-,054	28,0594

a. Predictors: (Constant), PAN36

ANOVA^{b,c}

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	462,512	1	462,512	,587	,468 ^a
	Residual	5511,290	7	787,327		
	Total	5973,802	8			

a. Predictors: (Constant), PAN36

b. Dependent Variable: L36SIGMA

c. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 210 mg/kgbb

Coefficients^{a,b}

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	26,540	32,051		,828	,435
	PAN36	-84,181	109,833	-,278	-,766	,468

a. Dependent Variable: L36SIGMA

b. Selecting only cases for which kelompok penelitian = perlakuan 210 mg/kgbb

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PAN36 ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: L36SIGMA

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,165 ^a	,027	-,002	34,7093

a. Predictors: (Constant), PAN36

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1140,535	1	1140,535	,947	,337 ^a
	Residual	40961,084	34	1204,738		
	Total	42101,619	35			

a. Predictors: (Constant), PAN36

b. Dependent Variable: L36SIGMA

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	26,137	15,168		1,723	,094
	PAN36	-36,372	37,382	-,165	-,973	,337

a. Dependent Variable: L36SIGMA

Lampiran 1

Oneway

Descriptives

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (ALPHA)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CONDONG CATUR (DEPOK)	107	1,5296	,7166	6,928E-02
MINOMARTANI (NGAGLIK)	144	1,3588	,5835	4,862E-02
PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	214	1,2274	,4324	2,956E-02
WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	107	1,3769	,5419	5,239E-02
Total	572	1,3450	,5627	2,353E-02

Descriptives

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (ALPHA)

	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
	Lower Bound	Upper Bound		
CONDONG CATUR (DEPOK)	1,3922	1,6669	1,00	3,00
MINOMARTANI (NGAGLIK)	1,2627	1,4549	1,00	3,00
PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	1,1692	1,2857	1,00	3,00
WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	1,2731	1,4808	1,00	3,00
Total	1,2988	1,3912	1,00	3,00

Test of Homogeneity of Variances

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (ALPHA)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
27,298	3	568	,000

ANOVA

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (ALPHA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,742	3	2,247	7,333	,000
Within Groups	174,070	568	,306		
Total	180,811	571			

Lampiran 2

Oneway

Descriptives

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (BETA)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CONDONG CATUR (DEPOK)	107	1,4237	,6644	6,423E-02
MINOMARTANI (NGAGLIK)	144	1,4028	,6041	5,035E-02
PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	214	1,1371	,3681	2,517E-02
WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	107	1,2960	,5326	5,149E-02
Total	572	1,2873	,5403	2,259E-02

Descriptives

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (BETA)

	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
	Lower Bound	Upper Bound		
CONDONG CATUR (DEPOK)	1,2963	1,5510	1,00	3,00
MINOMARTANI (NGAGLIK)	1,3033	1,5023	1,00	3,00
PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	1,0875	1,1867	1,00	3,00
WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	1,1939	1,3980	1,00	3,00
Total	1,2429	1,3317	1,00	3,00

Test of Homogeneity of Variances

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (BETA)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
32,963	3	568	,000

ANOVA

MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (BETA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,748	3	2,916	10,488	,000
Within Groups	157,929	568	,278		
Total	166,677	571			

Lampiran 4

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MEAN PENGAMBILAN SAMPEL (BETA)

Tukey HSD

(I) KELOMPOK LOKASI PENGAMBILAN SAMPEL	(J) KELOMPOK LOKASI PENGAMBILAN SAMPEL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CONDONG CATUR (DEPOK)	MINOMARTANI (NGAGLIK)	2,090E-02	6,730E-02	,990
	PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	,2866*	6,243E-02	,000
	WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	,1277	7,209E-02	,287
MINOMARTANI (NGAGLIK)	CONDONG CATUR (DEPOK)	-2,0898E-02	6,730E-02	,990
	PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	,2657*	5,683E-02	,000
	WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	,1068	6,730E-02	,386
PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	CONDONG CATUR (DEPOK)	-,2866*	6,243E-02	,000
	MINOMARTANI (NGAGLIK)	-,2657*	5,683E-02	,000
	WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	-,1589	6,243E-02	,053
WUKIRSARI (CANGKRINGAN)	CONDONG CATUR (DEPOK)	-,1277	7,209E-02	,287
	MINOMARTANI (NGAGLIK)	-,1068	6,730E-02	,386
	PERUM GEBANG (NGEMPLAK)	,1589	6,243E-02	,053

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
LAMANYA DIAPLIKASI	5,69	2,40	465
PROSENTASE RR (ALPHA)	6,8867	3,8721	465

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROSENTASE RR (ALPHA) ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LAMANYA DIAPLIKASI

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,950 ^a	,902	,902	,75

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	,902	4270,092	1	463	,000

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (ALPHA)

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	2406,476	1	2406,476	4270,092	,000 ^a
Residual	260,931	463	,564		
Total	2667,406	464			

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (ALPHA)

b. Dependent Variable: LAMANYA DIAPLIKASI

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1,640	,071		23,069	,000
	PROSENTASE RR (ALPHA)	,588	,009	,950	65,346	nnn

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
FREQ/TH	2,1080	,9039	465
PROSENTASE RR (ALPHA)	6,8867	3,8721	465

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROSENTASE RR (ALPHA) ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: FREQ/TH

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,998 ^a	,997	,997	5,020E-02

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	,997	149956,98	1	463	,000

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (ALPHA)

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	377,954	1	377,954	149956,98	,000 ^a
Residual	1,167	463	2,520E-03		
Total	379,121	464			

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (ALPHA)

b. Dependent Variable: FREQ/TH

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,503	,005		105,760	,000
	PROSENTASE RR (ALPHA)	,233	,001	,998	387,243	,000

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
LAMANYA DIAPLIKASI	5,69	2,40	465
PROSENTASE RR (BETA)	6,8600	2,9590	465

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROSENTASE RR (BETA) ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: LAMANYA DIAPLIKASI

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,764 ^a	,584	,584	1,55

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	,584	651,201	1	463	,000

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (BETA)

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1558,981	1	1558,981	651,201	,000 ^a
Residual	1108,426	463	2,394		
Total	2667,406	464			

Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (BETA)

Dependent Variable: LAMANYA DIAPLIKASI

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1,441	,181		7,946	,000
	PROSENTASE RR (BETA)	,619	.024	.764	25.510	,000

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
FREQ/TH	2,1080	,9039	465
PROSENTASE RR (BETA)	6,8600	2,9590	465

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	PROSENTASE RR _a (BETA)		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: FREQ/TH

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,906 ^a	,820	,820	,3837

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	,820	2111,499	1	463	,000

a. Predictors: (Constant), PROSENTASE RR (BETA)

ANOVA^b

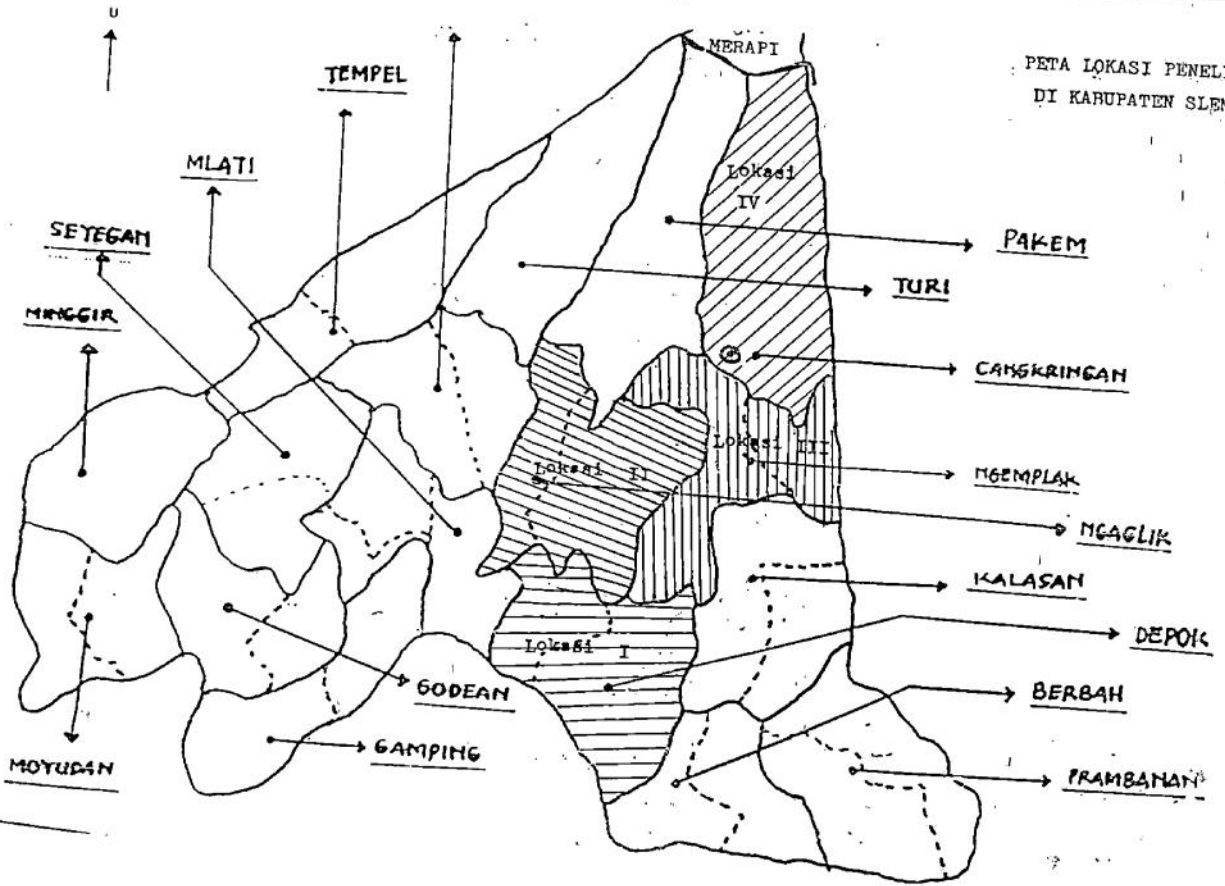
=

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	310,939	1	310,939	2111,499	,000 ^a
	Residual	68,181	463	,147		
	Total	379,121	464			

Coefficients^a

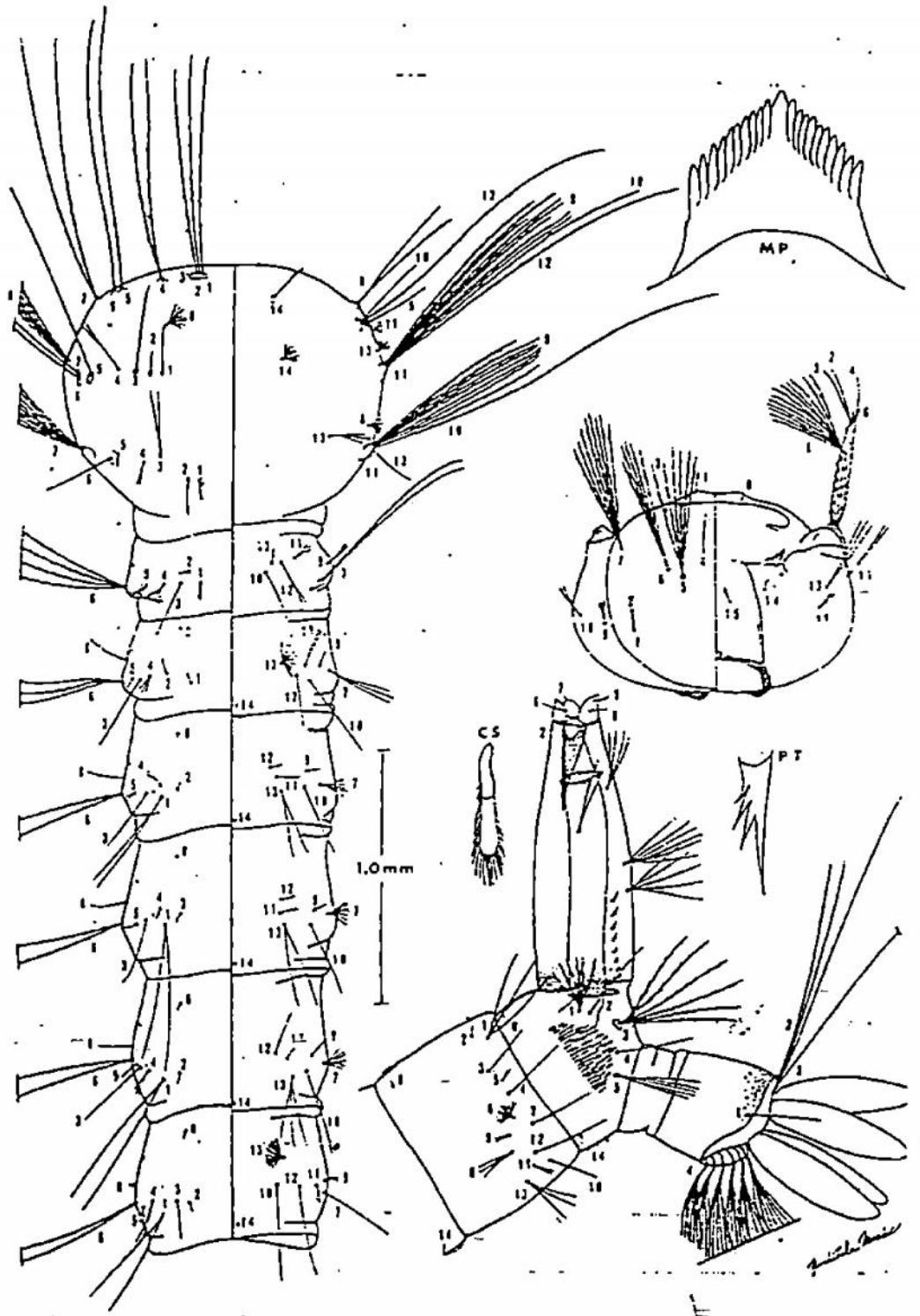
del	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	.210	.045		4,672	.000
PROSENTASE RR (BETA)	.277	.006	.906	45.951	nnn

PETA LOKASI PENELITIAN
DI KABUPATEN SLEMAN



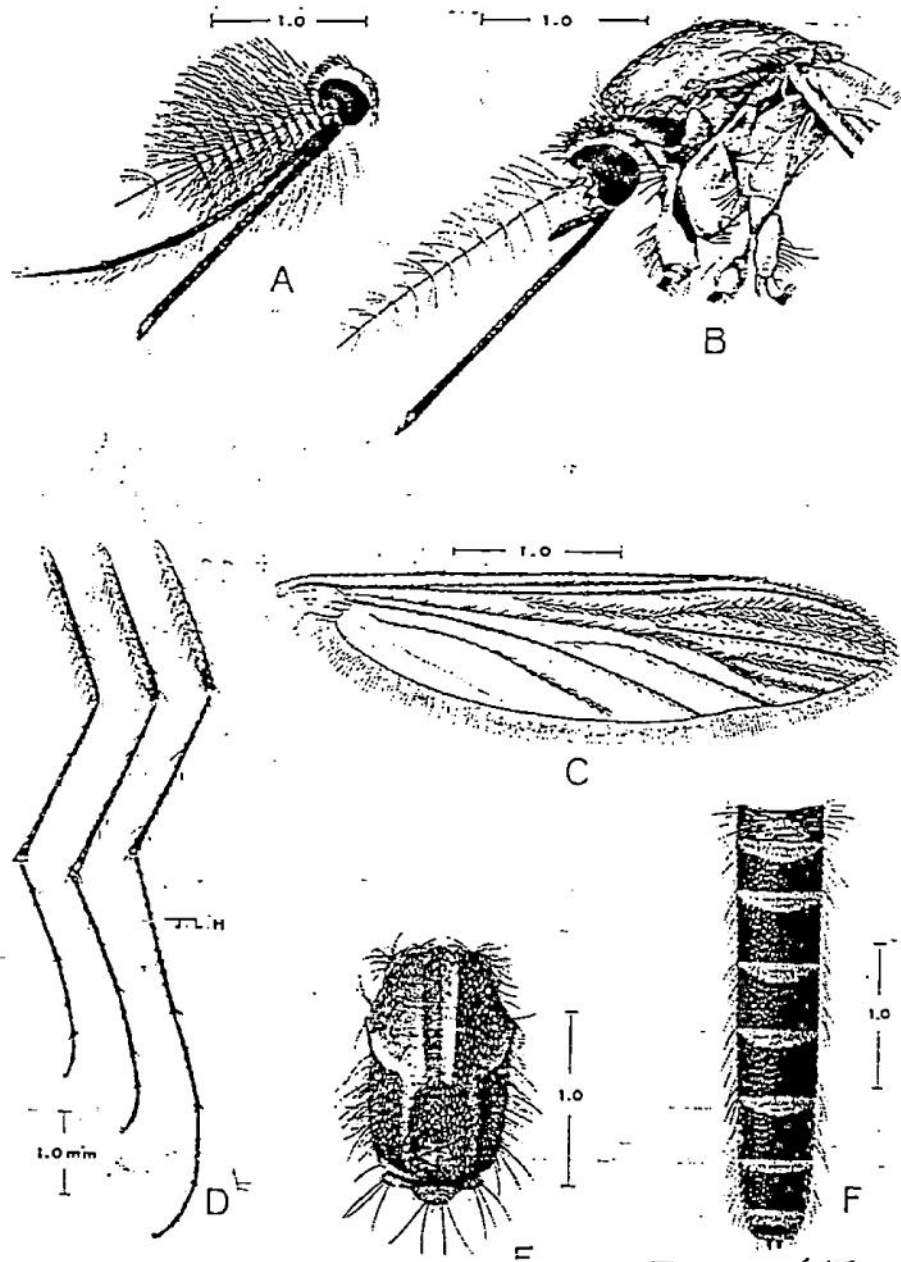
Tabel 8g. Besar Sampel untuk Uji Proporsi Kecil Dua Sampel
(Tingkat Kemaknaan : 10%; Kekuatan : 90%; Hipotesis alternatif : 1 sisi)

P ₂	P ₁												
	0.0001	0.0002	0.0003	0.0004	0.0005	0.0010	0.0025	0.0050	0.0075	0.0100	0.0200	0.0300	0.0400
0.0001		191555	61325	32863	21508	7027	2052	890	559	404	189	122	90
0.0002	191555		325303	95763	48648	10751	2554	1025	624	444	201	128	94
0.0003	61325	325303		457667	129343	16059	3074	1151	683	479	212	134	97
0.0004	32863	95763	457667		589572	24316	3648	1275	739	511	221	138	100
0.0005	21508	48648	129343	589572		38288	4297	1403	794	543	230	143	103
0.0010	7027	10751	16059	24316	38288		9717	2145	1083	700	270	162	114
0.0025	2052	2554	3074	3648	4297	9717		7635	2442	1307	389	214	144
0.0050	890	1025	1151	1275	1403	2145	7635		12935	3803	650	308	193
0.0075	559	624	683	739	794	1083	2442	12935		18153	1079	431	250
0.0100	404	444	479	511	543	700	1307	3803	18153		1888	602	321
0.0200	189	201	212	221	230	270	389	650	1079	1888		3173	930
0.0300	122	128	134	138	143	162	214	308	431	602	3173		4419
0.0400	90	94	97	100	103	114	144	193	250	321	930	4419	
0.0500	71	74	76	78	80	87	107	137	171	209	470	1243	5633



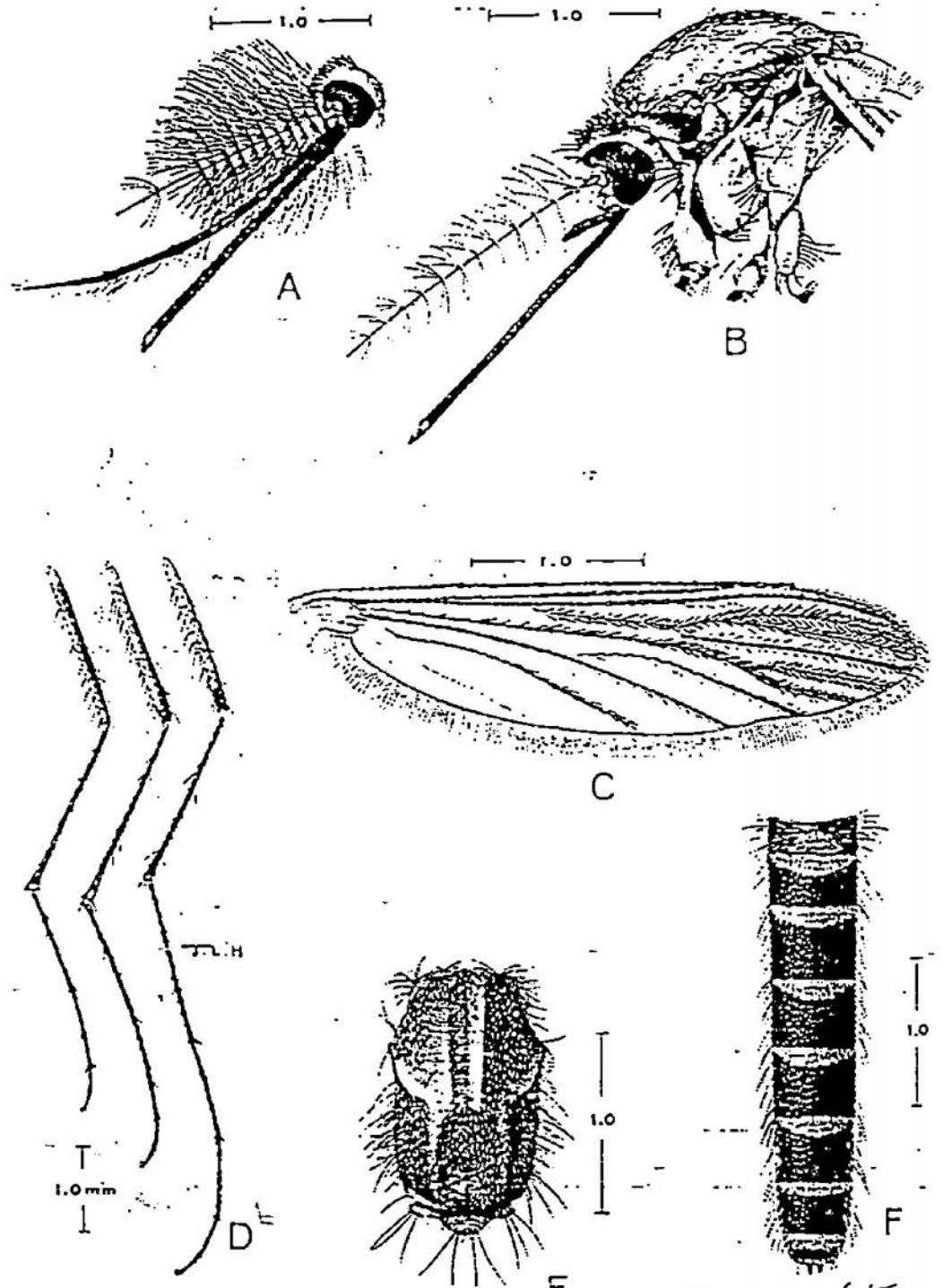
Culex quinquefasciatus

Gambar Identifikasi Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dewasa



- A. Kepala *Cx. quinquefasciatus* jantan
- B. Kepala dan thorax *Cx. quinquefasciatus* betina
- C. Sayap *Cx. quinquefasciatus* betina
- D. Kaki *Cx. quinquefasciatus* betina
- E. Scutum dan Scutellum *Cx. quinquefasciatus* betina
- F. Abdomen *Cx. quinquefasciatus* betina

Gambar Identifikasi Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dewasa



- A. Kepala *Cx. quinquefasciatus* jantan
- B. Kepala dan thorax *Cx. quinquefasciatus* betina
- C. Sayap *Cx. quinquefasciatus* betina
- D. Kaki *Cx. quinquefasciatus* betina
- E. Scutum dan Scutellum *Cx. quinquefasciatus* betina
- F. Abdomen *Cx. quinquefasciatus* betina

**DAFTAR PELAKSANAAN PENGASAPAN DENGAN INSEKTISIDA
MALATHION DI LOKASI PENELITIAN**

A. Lokasi I (RW 17. Perumahan Condong Catur, Depok, Sleman), semua pengasapan massal/sebelum masa penularan

1. Tahun 1987	: 2 kali
2. Tahun 1988	: 2 kali
3. Tahun 1989	: 2 kali
4. Tahun 1990	: 2 kali
5. Tahun 1991	: 24 / 9 s/d 1 / 10 - 1991 : 2 kali
6. Tahun 1991	: 21 / 10 s/d 10 / 10-1992 : 2 kali
7. Tahun 1992	: 1/11 s/d 20 /11 - 1992 : 2 kali
8. Tahun 1993	: 8 /5 s/d 15 / 5 - 1993 : 2 kali
9. Tahun 1993	: 3 /11 s/d 12/12 - 1993 : 2 kali
10. Tahun 1994	: 24/5 s/d 31/5 - 1994 : 2 kali
11. Tahun 1994	: 29/6 s/d 5/7 - 1994 : 2 kali
12. Tahun 1994	: 3 /12 s/d 12/12 - 1994 : 2 kali
13. Tahun 1994	: 13/12 s/d 21/ 12- 1994 : 2 kali
14. Tahun 1995	: 27/2 s/d 9/3 - 1995 : 2 kali
15. Tahun 1995	: 24 / 4 s/d 17/5 - 1995 : 2 kali
16. Tahun 1995	: 28 /11 s/d 11/12 -1995 : 2 kali
17. Tahun 1995	: 7/12 s/d 20/12 - 1995 : 2 kali
18. Tahun 1996	: 16/4 s/d 25/4 - 1996 : 2 kali

Total Pengasapan = 36 kali

B. Lokasi II (Jl.Lodan Perumahan Minomartani, Ngaglik, Sleman)

- a. Nopember tahun 1995 : 2 kali
- b. Nopember tahun 1996 : 2 kali
- c. Nopember tahun 1997 : 2 kali
- d. Nopember tahun 1998 : 2 kali
- e. Nopember tahun 1999 : 2 kali

2. Pengasapan fokus

Agustus tahun 1998 : 1 kali

Total pengasapan di Jl. Lodan, Perumahan Minomartani, Ngaglik, Sleman adalah 11 kali.

C. Lokasi III (RW.60 Perumahan Gebang Permai, Ngemplak, Sleman)

1. Pengasapan masal / sebelum masa penularan.

(1) Tahun 1995 : 2 kali

(2) Tahun 1996 : 1 kali

(3) Tahun 1997 : 1 kali

2. Pengasapan fokus.

Tahun 1998 : 1 kali

Total Pengasapan di RW 60, Perumahan Gebang Permai, Ngemplak, Sleman adalah 5 kali

D. Lokasi IV (dusun Sebrang Wetan, Wukirsari, Cangkringan)

-Belum pernah sama sekali

Lampiran 11

Gambaran Kondisi di Tempat Pengambilan Sampel

1. Lokasi pengambilan sampel I.(RW 17 Perumahan Condong Catur Depok Sleman)
Parit dengan air tergenang di depan rumah, pinggir jalan, dari perumahan kurang lebih 200 m.
2. Lokasi pengambilan sampel II (Jl. Lodan Perumahan Minomartani Ngaglik Sleman)
Parit dengan air tergenang di dekat rumah di tengah perumahan di pinggir jalan kampung jauh dari persawahan.
3. Lokasi pengambilan sampel III (RW 60 Perumahan Gebang, Ngemplak, Sleman)
Comberan di kebun belakang rumah, \pm 50 m dari jalan raya, \pm 100 m dari persawahan.
4. Lokasi pengambilan sampel IV (Dusun Sebrang Wetan, Wukirsari, Cangkringan, Sleman)

Lampiran 11

Gambaran Kondisi di Tempat Pengambilan Sampel

1. Lokasi pengambilan sampel I.(RW 17 Perumahan Condong Catur Depok Sleman)
Parit dengan air tergenang di depan rumah, pinggir jalan, dari perumahan kurang lebih 200 m.
2. Lokasi pengambilan sampel II (Jl. Lodan Perumahan Minomartani Ngaglik Sleman)
Parit dengan air tergenang di dekat rumah di tengah perumahan di pinggir jalan kampung jauh dari persawahan.
3. Lokasi pengambilan sampel III (RW 60 Perumahan Gebang, Ngemplak, Sleman)
Comberan di kebun belakang rumah, \pm 50 m dari jalan raya, \pm 100 m dari persawahan.
4. Lokasi pengambilan sampel IV (Dusun Sebrang Wetan, Wukirsari, Cangkringan, Sleman)

Gambaran di lapangan sampel di tempat pengambilan jauh dari perumahan 1

Lampiran 12

Daftar Insektisida dan Fungisida Pertanian yang sering digunakan di Kabupaten Sleman

A. Insektisida untuk mengendalikan hama padi

Nama dagang	Bahan aktif	Golongan
1. Darmabas 500 EC	BMPC(fenubucarb)	Karbamat
2. Baycarb 500 EC	BMPC(fenubucarb)	Karbamat
3. Bassa 50 EC	BMPC(fenubucarb)	Karbamat
4. Kiltop 500 EC	BMPC(fenubucarb)	Karbamat

B. Insektisida untuk mengendalikan hama hortikultura(terutama di Cangkringan)

1. Comfidor 200 SL	imidaklopid 200g/l	Triazol
2. Curacron 500 EC	profenefos 500 g/l	Organofosfat
3. Decis 2,5 EC	deltametrin 25 g/l	Piretroid
4. Matador 6 ULV	lamda sihalotrin 6 g/l	Piretroid
5. Thiodan 35 EC	endosulfan 350 g/l	Organochlorin
6. Diazenon	diazenon	Organofosfat

C. Fungisida untuk mengendalikan hama hortikultura(terutama di Cangkringan)

