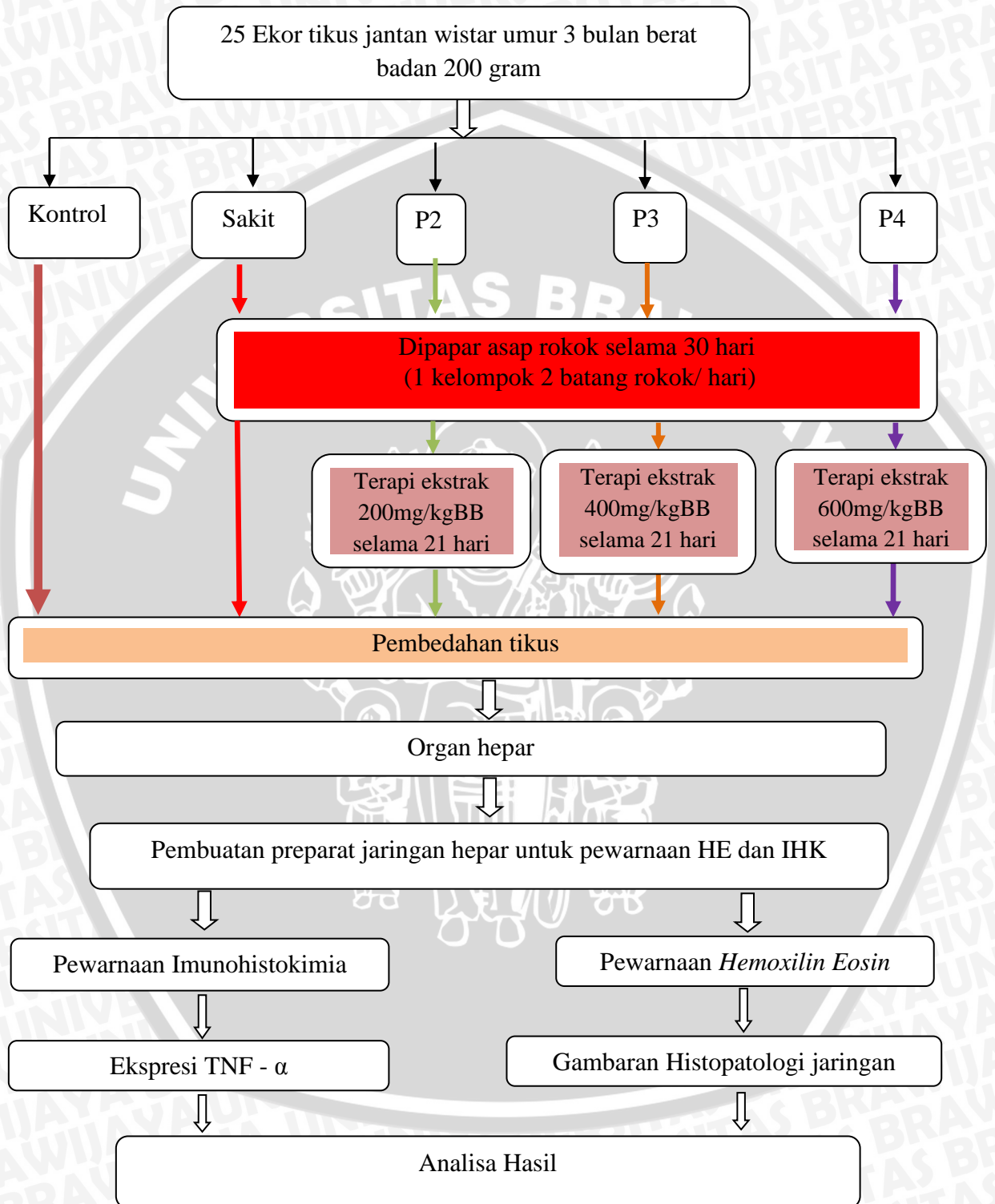


Lampiran 1. Skema Penelitian



Lampiran 2. Kode etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 188-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT
BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana Linn*)
TERHADAP EKSPRESI TNF ALPHA DAN
GAMBARAN HISTOLOGI DARI JARINGAN HEPAR
TIKUS (*Rattus norvegicus*) HASIL PAPARAN ASAP
ROKOK

PENELITI : YUSRINA SUHARTININGSIH

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

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

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



Lampiran 3. Perhitungan Dosis

Dosis ekstrak :

Hasil maserasi 95 g simplisia dihasilkan 27,6 mL ekstrak etanol kulit buah manggis

$$\text{Konsentrasi per mL} = \frac{95 \text{ g}}{27,6 \text{ mL}} = 3,442 \text{ g/mL}$$

$$1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

$$3,442 \text{ g/mL} = 0,003442 \text{ mg}/\mu\text{L} \text{ (kandungan dalam 1 mL)}$$

Rata – rata berat badan tikus adalah 200 g

Jadi :

$$\text{Dosis 200} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ mg} = 40 \text{ mg} = 0,04 \text{ gram}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 400 \text{ mg} = 80 \text{ mg} = 0,08 \text{ gram}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 600 \text{ mg} = 120 \text{ mg} = 0,12 \text{ gram}$$

Konsentrasi CEMP (*Crude Extract from Mangosteen Peel*) adalah 3,44 g/mL dan CEMP yang harus diambil :

$$[\text{CEMP}] = 3,44 \text{ g/ mL} = 3,44 \text{ g}/1000 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 200} = \frac{0,04 \text{ g}}{3,44 \text{ g}} \times 1000 \mu\text{L} = 11,63 \mu\text{L} = 0,01163 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{0,08 \text{ g}}{3,44 \text{ g}} \times 1000 \mu\text{L} = 23,26 \mu\text{L} = 0,02326 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{0,12 \text{ g}}{3,44 \text{ g}} \times 1000 \mu\text{L} = 34,88 \mu\text{L} = 0,03488 \text{ mL}$$

Pemberian dilakukan secara per oral (sonde) dalam 3 minggu, satu hari 1 mL/ekor
Pembuatan ekstrak untuk sonde dilakukan 3 hari sekali :

$$\text{Dosis 200} = 11,63 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 174,45 \mu\text{L} = 0,17445 \text{ mL (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 400} = 23,26 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 348,9 \mu\text{L} = 0,3489 \text{ mL (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 600} = 34,88 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 523,2 \mu\text{L} = 0,523 \text{ mL (ekstrak)}$$

Pengenceran dilakukan dengan penambahan akuades :

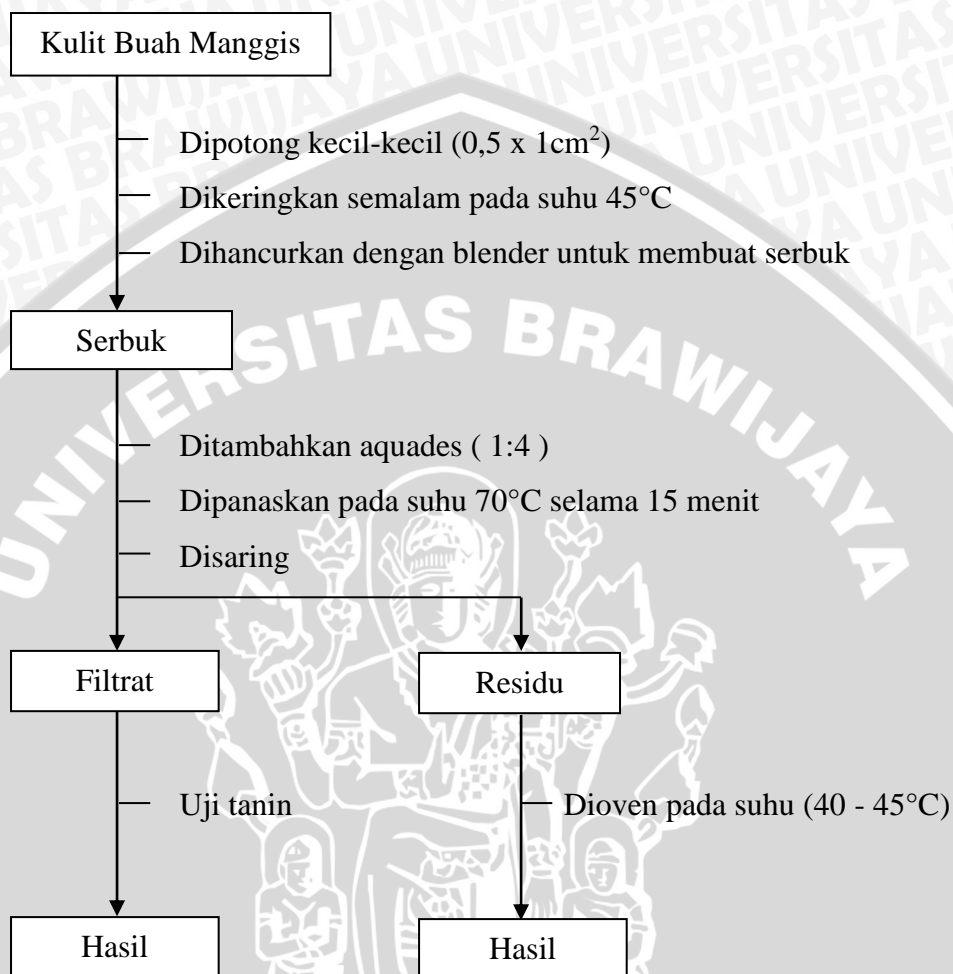
$$\text{Dosis 200} = 15.000 \mu\text{L} - 174 \mu\text{L} = 14.826 \mu\text{L} = 14,826 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 400} = 15.000 \mu\text{L} - 349 \mu\text{L} = 14.651 \mu\text{L} = 14,651 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 600} = 15.000 \mu\text{L} - 523 \mu\text{L} = 14.477 \mu\text{L} = 14,477 \text{ mL}$$



Lampiran 4. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis



Lampiran 5. Maserasi dengan Etanol 50%

Perhitungan pembuatan etanol 50 %

Prosentase etanol absolut 96%

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 96 = 1000 \text{ mL} \times 50$$

$$96 V_1 = 50.000 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{50.000 \text{ mL}}{96}$$

$$V_1 = 520,83 \text{ mL} \quad \rightarrow \quad \text{etanol 96\%}$$

Keterangan :

 $V_1 \rightarrow$ Volume larutan sebelum pengenceran (mL) $M_1 \rightarrow$ Konsentrasi sebelum pengenceran $V_2 \rightarrow$ Volume larutan setelah pengenceran (mL) $M_2 \rightarrow$ Konsentrasi setelah pengenceran

520 mL etanol 96 %

- dimasukkan ke dalam labu ukur
- ditambah aquades sampai tanda batas

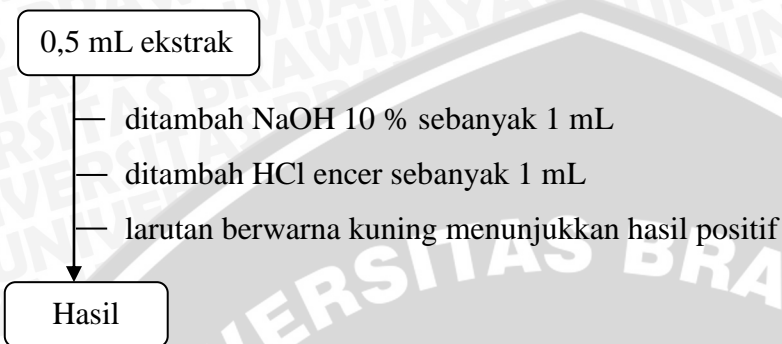
Etanol 50 %

- dihomogenkan dengan 95 g simplisia dalam beker glass 500 mL
- ditutup dengan aluminium voil selama 1 minggu

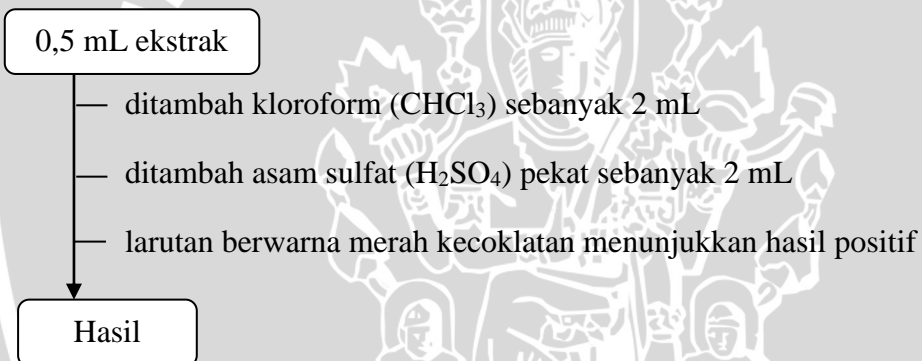
Hasil

Lampiran 6. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

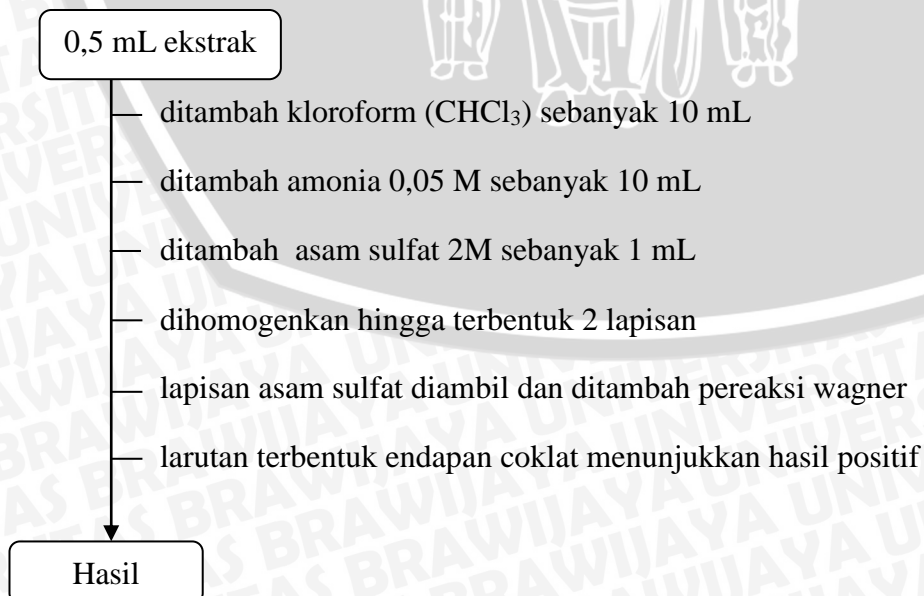
Lampiran 6.1 Uji Flavanoid



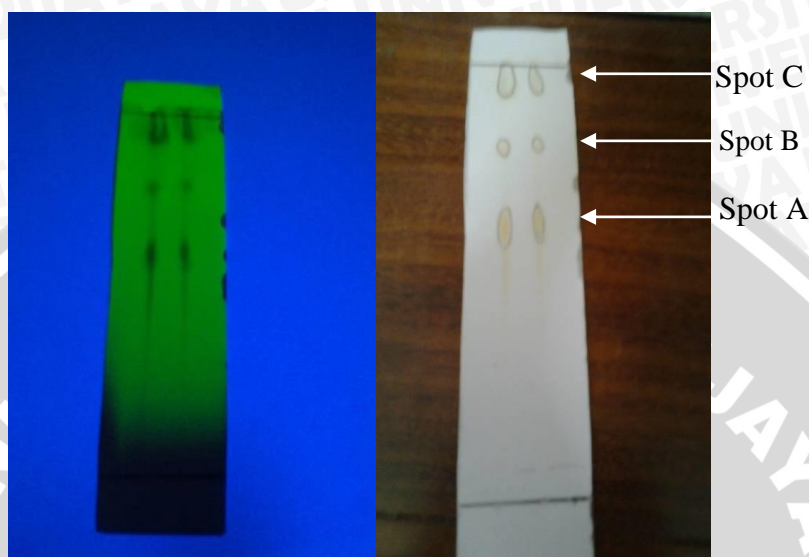
Lampiran 6.2 Uji Terpenoid



Lampiran 6.3 Uji Alkaloid



Lampiran 7. Hasil KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan IR pada ekstrak etanol kulit buah manggis

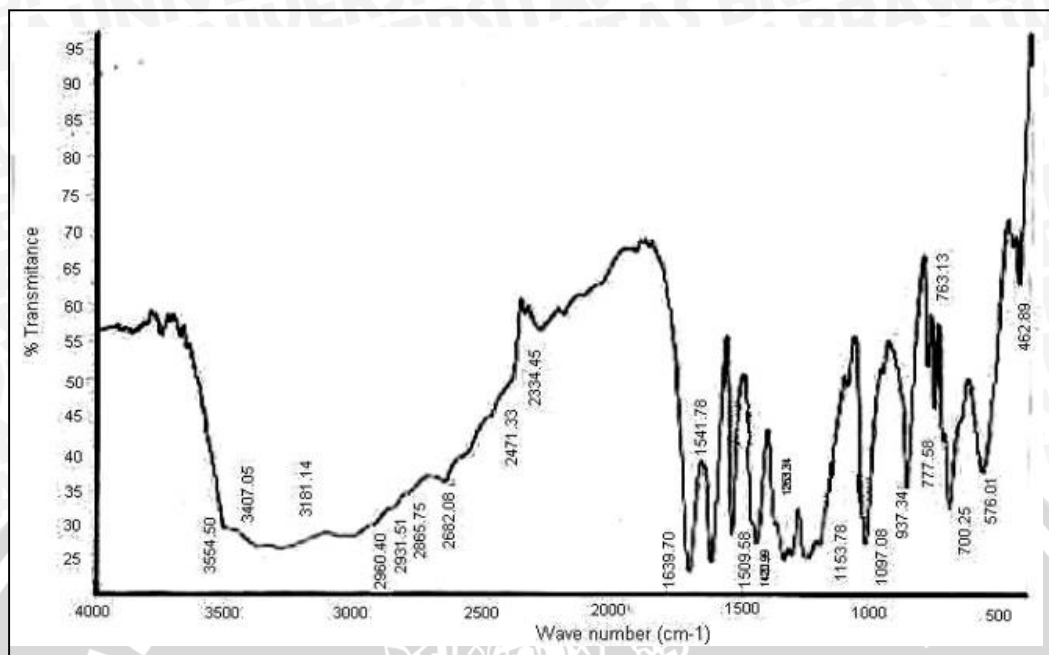


Gambar 7.1 Hasil KLT

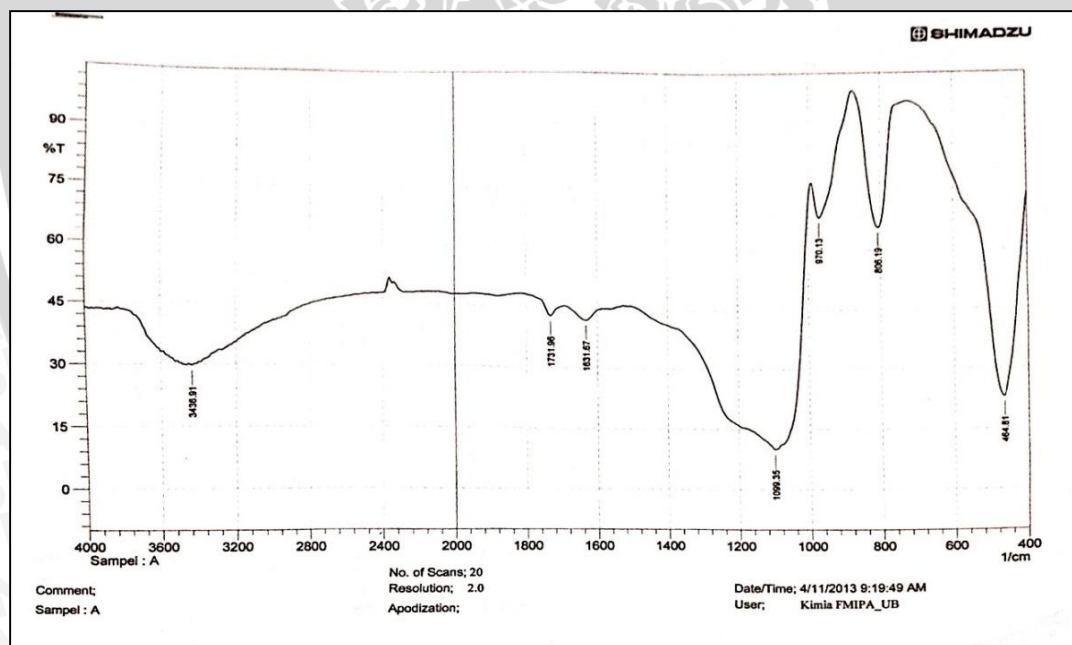
Table 7.1 Nilai Rf setiap titik ekstrak kulit manggis dengan metode KLT

Spot	Jarak spot dari pergerakan awal		Nilai Rf
	Spot	Eluen	
A	4,5	8	0,56
B	6,2	8	0,77
C	7,6	8	0,95

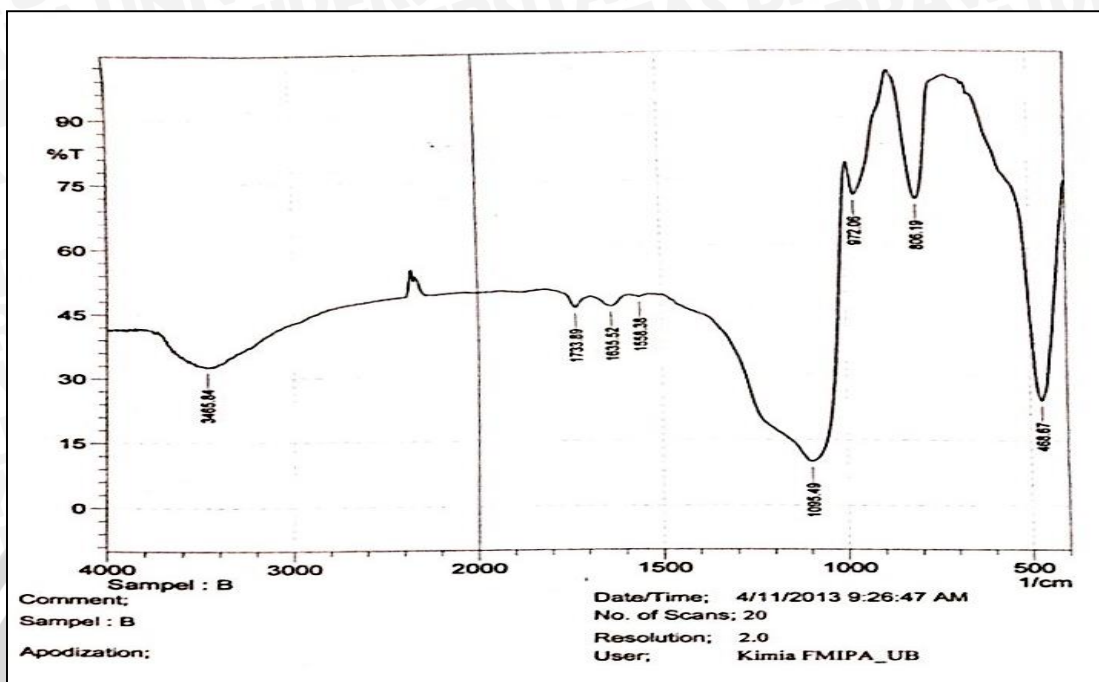
Untuk mengkonfirmasi gugus-gugus fungsi dari senyawa yang terkandung digunakan spektrum standar asam galat sebagai standar karena asam galat memiliki kerangka dasar sama dengan senyawa polifenol. Standar asam galat mempunyai range spektrum dengan absorbansi berkisar antara 426,89 cm^{-1} sampai 3.554,50 cm^{-1} . Asam galat biasanya mengandung gugus-gugus fungsi seperti O-H, C-H, C=C, dan C-O.



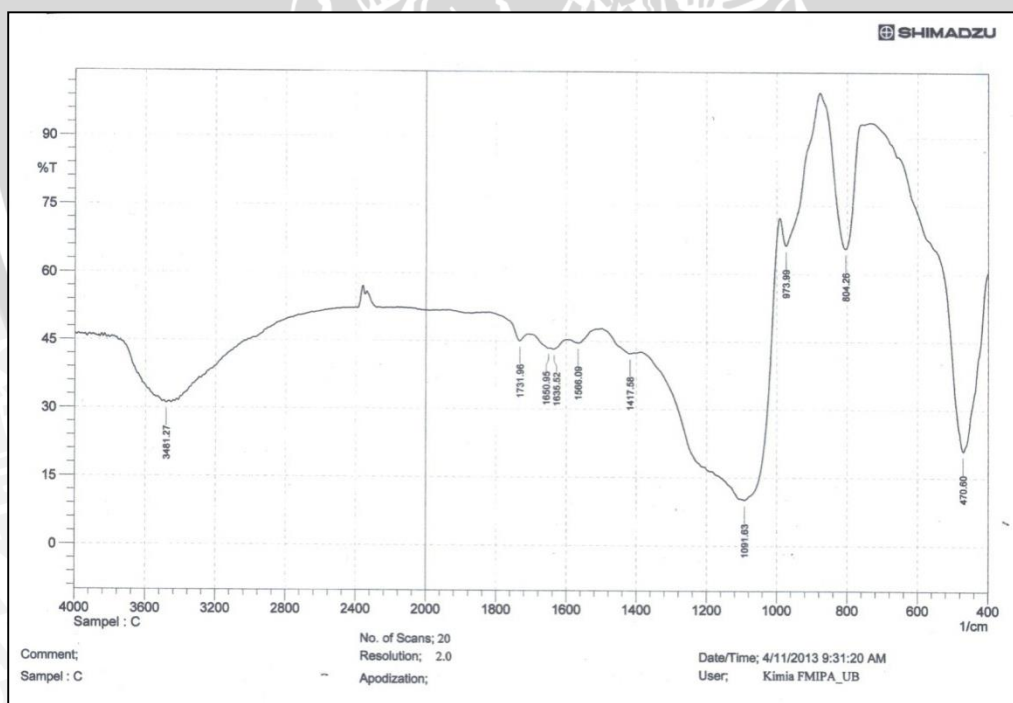
Gambar 7.2 Spektrum IR standar asam galat



Gambar 7.3 spektrum IR noda A hasil KLT ekstrak kulit buah manggis



Gambar 7.4 Spektrum IR noda B hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis



Gambar 7.4 Spektrum IR noda C hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis

Tabel 7.2 Interpretasi infrared absorption (IR) sample dan standar.

No.	Wavelength (cm ⁻¹)					Interpretasi
	Spot A	Spot B	Spot C	Standar asam galat	Referensi	
1.	3.436,91	3.495,86	3.481,27	3.407,05 3.554,50	3200-3650	O-H (alcohol, phenol)
2.	-	-	-	2.960,40 2.931,51 2.865,75	2.850-3.000	C-H aliphatic
3.	1.731,96	1.733,89	1.731,96	-	1.705-1.750	C=O aldehyde, ketone, carboxylic acid and ester
4.	1.631,67	-	1.650,95	1.639,70	1.600-1.680	C=C alkena
5.	-	1.635,52	1.636,52	1.509,58	1.475-1.600	C=C aromatic
6.	-	1.558,38	1.566,09	1.420,99	1.370-1.465	C-H aliphatic
7.	1.099,35	1.095,49	1.417,58 1.091,63	1.153,78 1.097,08	1.000-1.300 1020-1150	C-O (alcohol, eter, e3ster, and carboxylic acid) C-N amina
8.	806,19	806,19	804,26	777,58 763,13	690-900	C-H aromatic

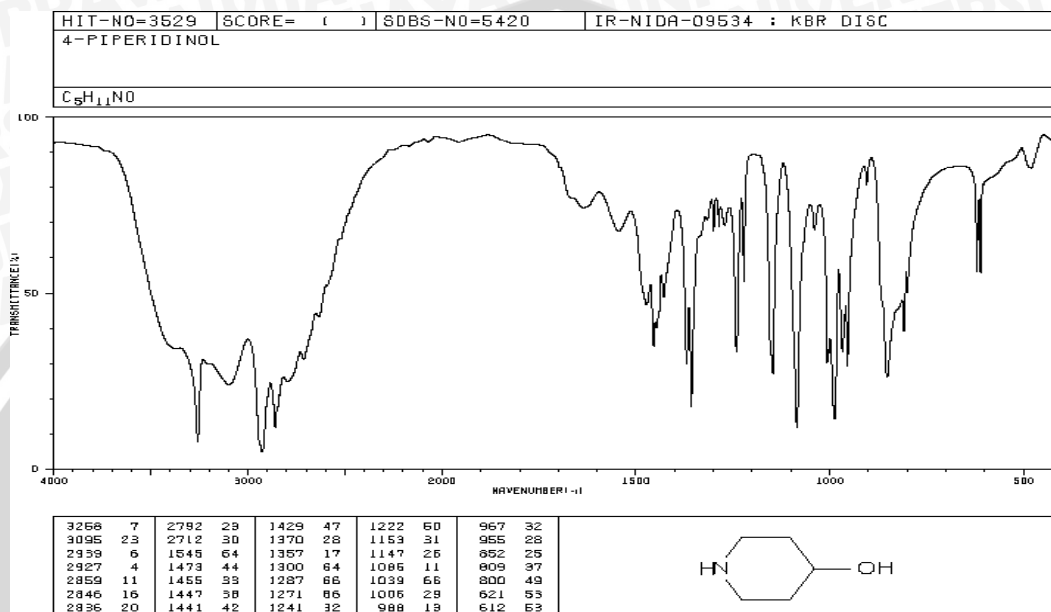
IR spektra dari spot A menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.436,91\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.731,96\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O (*aldehyde, ketone, carboxylic acid* dan *ester*). Absorpsi pada $1.631,67\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C alkena, $1.099,35\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-O (*alcohol, eter, ester, dan carboxylic acid*), C-N (amina), dan pada $806,19\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatik. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat A mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-O , C=C alkena dan C-H aromatik.

IR spektra dari spot B menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.495,86\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.733,89\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O (*aldehyde, ketone, carboxylic acid* dan *ester*). Absorpsi pada $1.635,52\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C aromatik, $1.558,38\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H alifatik, $1.095,49\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-O (*alcohol, eter, ester, dan carboxylic acid*), C-N amina, dan pada $806,19\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatik. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat B mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-O , C=C aromatik, C-H alifatik, dan C-H aromatik.

IR spektra dari spot C menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.481,27\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.731,96\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O (*aldehyde, ketone, carboxylic acid* dan *ester*). Absorpsi pada $1.650,95\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C alkena, $1.635,52\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C aromatik, $1.566,09\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H alifatik. Serapan pada $1.417,58$ dan $1.091,63$ menunjukkan adanya C-O (*alcohol, eter, ester, and carboxylic acid*), C-N amina dan pada $804,26\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatik. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat C mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-H alifatik, C-O , C=C alkena, C=C aromatik dan C-H aromatik.

Untuk mengkonfirmasi adanya golongan senyawa alkaloid, digunakan spektrum standar dari 4-piperidiniol karena senyawa ini merupakan senyawa golongan alkaloid sehingga dapat digunakan sebagai standar untuk senyawa alkaloid. Alkaloid dapat mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Pada

Gambar 7.5 terlihat serapan pada bilangan gelombang antara 612-3268 cm^{-1} . Gugus fungsi yang dimiliki alkaloid pada umumnya yaitu C-H alifatik dan C-N alkil amina.



Gambar 7.5 Spektrum IR dari 4-piperidiniol standar

Berdasarkan hasil spektrum IR pada ketiga noda dibandingkan dengan spektrum standar 4-piperidiniol merupakan senyawa golongan alkaloid. Didapatkan C-H alifatik pada bilangan gelombang 1.558,38 dan 1.566,09, sedangkan C-N alkil amina pada bilangan gelombang 1.099,35; 1.095,49 dan 1.091,63.

Spektrum IR yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak dari kulit manggis mengandung komponen antara lain gugus -OH, C=C aromatik, C=C alkena, C-H aromatik, C-H alifatik, dan gugus C-O yang juga dikandung oleh kelompok senyawa phenolik/polifenol (flavonoid) dan C-N amina (alkaloid). Berdasarkan spektrum IR noda B merupakan senyawa yang memiliki kemiripan gugus fungsi dengan standar asam galat yaitu senyawa polifenol dengan intensitas noda B lebih besar dari noda A yang memiliki gugus fungsi O-H, C=C alkena, C=C aromatik, C-H alifatik, C-O dan C-H aromatik.

Lampiran 8. Pembedahan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia

- Didislokasi bagian leher
- Diletakkan pada papan bedah posisi terlentang (perut diatas)
- Dilakukan pembedahan pada daerah inguinal membentuk huruf V menggunakan gunting bedah
- Di ambil hepar tikus
- Dicuci dengan NaCl - Fis 0,9%
- $\frac{1}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan PFA 4%
- $\frac{3}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan PBS – azida pH 7,4

Organ Hepar

L.8.1 Pembuatan Preparat Organ Hepar**8.1.1 Embedding Hepar**

Hepar dalam PFA 4%

- diambil dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dimasukkan pada etanol 80% selama 2 jam
- Dimasukkan pada etanol 90% selama 20 menit
- Dimasukkan pada etanol 95% selama 20 menit
- Dipindahkan dalam etanol absolut selama 3 x 20 menit

Hepar hasil dehidrasi

- Dimasukkan dalam larutan xylol 1 dan 2 masing – masing 20 menit pada suhu ruang
- Organ hepar dipindah pada xylol 3 pada suhu 60 – 63 °C selama 20 menit
- Dicelupkan pada parafin cair yang telah dituang dalam wadah 3 x 30 menit pada suhu 56-58 °C, kemudian parafin akan memadat
- Didinginkan pada suhu 4°C

Hepar dalam blok parafin

8.1.2 Pembuatan preparat organ

Hepar dalam blok parafin

- diiris seukuran 4 μm
- didinginkan diatas air dingin
- dimasukkan dalam air hangat pada suhu 38 – 40 °C
- diambil dan tempatkan pada objek gelas
- dikeringkan di atas hot plate dengan suhu 38 – 40 °C selama 24 jam

Preparat siap pewarnaan

8.1.3 Pewarnaan Hematosilin-Eosin

Preparat

- dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- direndam dalam akuades steril selama 5 menit

Preparat

- diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit atau sampai diperoleh hasil terbaik
- dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit
- dicuci air dengan akuades selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanoi 90% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- dimasukkan kedalam etanol absolut 3 x 2 menit
- dimasukkan dalam larutan xilol 3 x 3 menit
- dikering anginkan dan ditutup dengan *cover glass*
- *dimounting* dengan menggunakan entellan
- ditutup dengan *cover glass*

Preparat

8. 1. 4 Imunohistokimia

Preparat Hematoksilin Eosin

- Dicuci PBS pH 7,4 selama 1 x 5 menit
- Ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH7,4 selama 5 menit tiga kali
- Diblok dengan 5% FBS (Fetal Bovine Serum) yang mengandung 0,25 % teilon x- 100 selama 1 jam
- Preparat dicuci dengan PBS pH7,4 selama 5 menit 3 kali
- Preparat diinkubasi dengan antibodi primer anti TNF – α selama semalam pada suhu 4 °C
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH7,4 selama 5 menit 3 kali
- Ditetesi dengan SA – HRP (STREP Avidin – horse radin peroxidase) diinkubasi selama 40 menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxylen selama 10 menit
- Preparat dicuci dengan air mengalir
- Dibilas dengan aquades dan dikeringkan
- Di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*

Pengamatan

Sumber (Junquiera, 2007).

Lampiran 9. Pembuatan Larutan PBS – Azida

Menggunakan larutan PBS yang telah dibuat sebelumnya 200mL. Larutan PBS pH7,4 dalam gelas kimia 250ml. Selanjutnya ditambahkan 8 tetes larutan azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu larutan dihomogenkan dengan magnet stirrer (Junquiera, 2007).

Lampiran 9.1 Pembuatan Larutan NaCl – fis 0,9%

$$\text{Pembuatan larutan NaCl – fis 0,9\%} = \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \times 500 \text{ ml} = 4,5 \text{ gram}$$

Tahap pertama yaitu penimbangan larutan NaCl sebanyak 4,5 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades steril. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan ditanda bataskan dengan aquades (Junquiera, 2007).

Lampiran 9.2 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$\begin{aligned} V1. M1 &= V2 . M2 \\ V1.37\% &= 100 \text{ ml} \times 4\% \\ V1 &= 10,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Larutan pertama yaitu membuat larutan NaCl – fisiologis 0,9% sebagai pelarut. Larutan PFA 4% dibuat dengan mengambil 10,8 ml formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dan ditanda bataskan dengan NaCl fisiologis sampai tanda batas (Junquiera, 2007).

Lampiran 9.3 Pembuatan larutan etanol bertingkat

Larutan etanol bertingkat dibuat dari larutan etanol absolut 99% yang kemudian diencerkan menjadi 95%, 90%, 80%,70% dalam labu ukur takar 100 mL dengan menggunakan aquades steril. Perhitungan pembuatan larutan etanol 95% dibuat dari atanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah

$$\begin{aligned} V1. M1 &= V2 . M2 \\ V1.99\% &= 100 \text{ mL} \times 95\% \\ V1 &= 95,96 \text{ mL} \end{aligned}$$

Perhitungan larutan etanol 90% dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah

$$\begin{aligned} V1. M1 &= V2 . M2 \\ V1.99\% &= 100 \text{ mL} \times 90\% \\ V1 &= 90,90 \text{ mL} \end{aligned}$$

Perhitungan larutan etanol 80% dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah

$$V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$V1 \cdot 99\% = 100 \text{ mL} \times 80\%$$

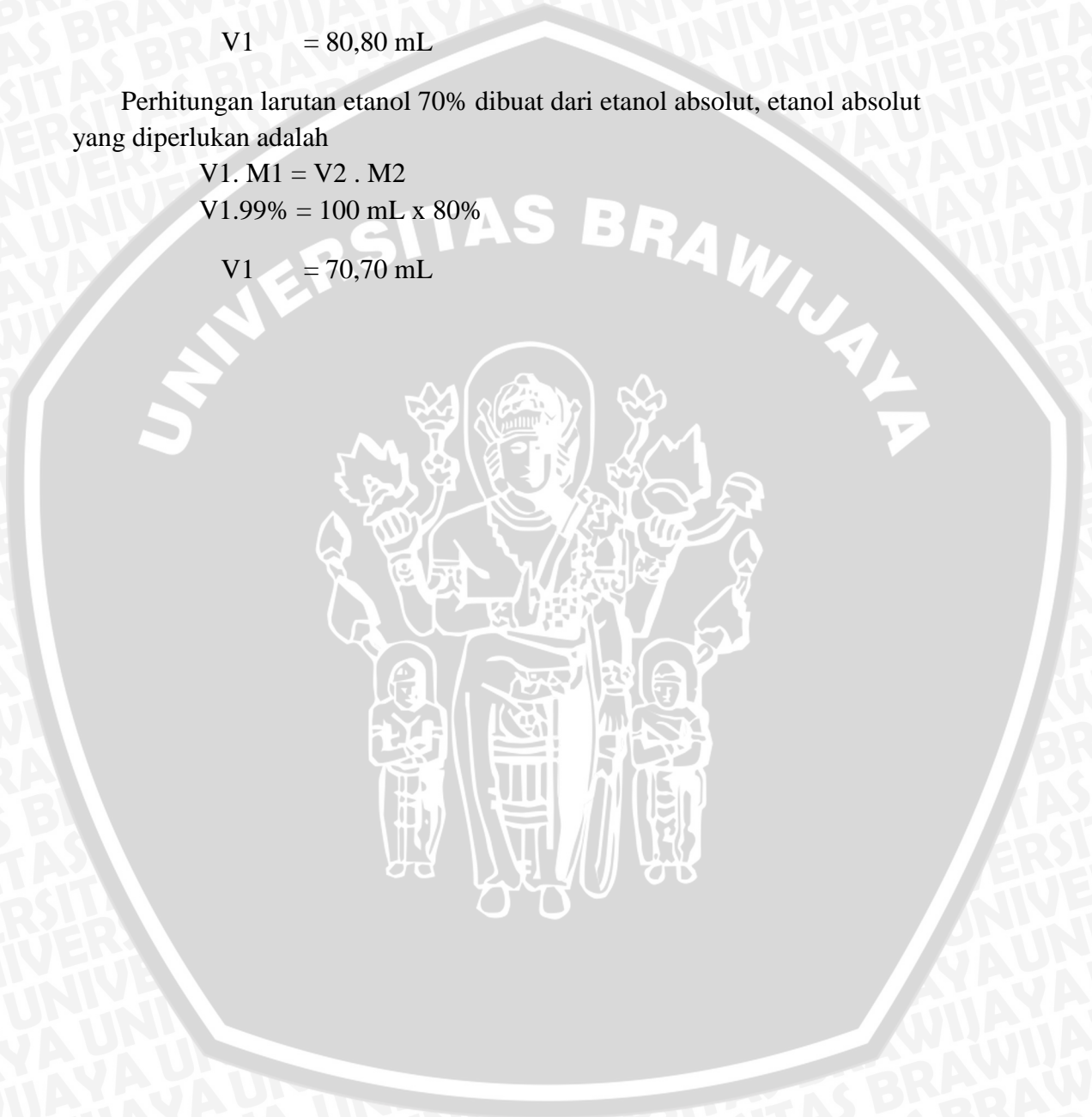
$$V1 = 80,80 \text{ mL}$$

Perhitungan larutan etanol 70% dibuat dari etanol absolut, etanol absolut yang diperlukan adalah

$$V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$V1 \cdot 99\% = 100 \text{ mL} \times 70\%$$

$$V1 = 70,70 \text{ mL}$$



Lampiran 10. Hasil Uji Statistika Ekspresi TNF – α Hepar

Tabel 10.1 Uji Normalitas Ekspresi TNF – α

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
perlakuan	.155	20	.200*	.896	20	.035
tnf	.123	20	.200*	.956	20	.459

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tabel 10.2 Uji Homogenitas TNF – α

Test of Homogeneity of Variances			
Tnf			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.899	4	15	.163

Tabel 10.3 Uji One Way ANOVA

ANOVA					
Eksresi TNF – α	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.241	4	6.310	18.682	.000
Within Groups	5.067	15	.338		
Total	30.308	19			

Tabel 10.4 Uji Tukey Eksresi TNF – α

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol negatif	4	.32000			
terapi 3	4	1.10250	1.10250		
terapi 2	4		2.09250	2.09250	
terapi 1	4			2.83500	2.83500
Paparan asap rokok	4				3.41000
Sig.		.357	.166	.405	.637

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Multiple Comparisons

TNF- α

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-3.090000*	.410960	.000	-4.35901	-1.82099
	terapi 1	-2.515000*	.410960	.000	-3.78401	-1.24599
	terapi 2	-1.772500*	.410960	.005	-3.04151	-.50349
	terapi 3	-.782500	.410960	.357	-2.05151	.48651
kontrol positif	kontrol negatif	3.090000*	.410960	.000	1.82099	4.35901
	terapi 1	.575000	.410960	.637	-.69401	1.84401
	terapi 2	1.317500*	.410960	.040	.04849	2.58651
	terapi 3	2.307500*	.410960	.000	1.03849	3.57651
terapi 1	kontrol negatif	2.515000*	.410960	.000	1.24599	3.78401
	kontrol positif	-.575000	.410960	.637	-1.84401	.69401
	terapi 2	.742500	.410960	.405	-.52651	2.01151
	terapi 3	1.732500*	.410960	.006	.46349	3.00151
terapi 2	kontrol negatif	1.772500*	.410960	.005	.50349	3.04151
	kontrol positif	-1.317500*	.410960	.040	-2.58651	-.04849
	terapi 1	-.742500	.410960	.405	-2.01151	.52651
	terapi 3	.990000	.410960	.166	-.27901	2.25901
terapi 3	kontrol negatif	.782500	.410960	.357	-.48651	2.05151
	kontrol positif	-2.307500*	.410960	.000	-3.57651	-1.03849
	terapi 1	-1.732500*	.410960	.006	-3.00151	-.46349
	terapi 2	-.990000	.410960	.166	-2.25901	.27901

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

