

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 208-KEP-UB

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

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU  
(*Mimosa pudica*) BERDASARKAN PADA  
PENGUKURAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)  
SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI EPITEL  
BRONKIOLUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA

PENELITI : RIZY AHMADA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 3 Maret 2014  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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

## Lampiran 2. Hasil Uji Taksonomi

50



LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN  
PERKEMBANGAN TUMBUHAN  
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
JALAN VETERAN, MALANG 65145  
Telepon/faks: 0341-575841

### KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0102/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Rizy Ahmada (NIM. 105130101111075)  
Anita Wanda S (NIM. 105130101111063)  
Nisa Mufidah (NIM. 105130101111062)  
Adekhantari Y (NIM. 105130101111064)  
Yehuda Laksana A (NIM. 105130101111011)  
Hadlrotus Okvianty M P (NIM. 105130107111013)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 561, diidentifikasi sebagai:

**Familia** : Fabaceae  
**Genus** : *Mimosa*  
**Species** : *Mimosa pudica* L.

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

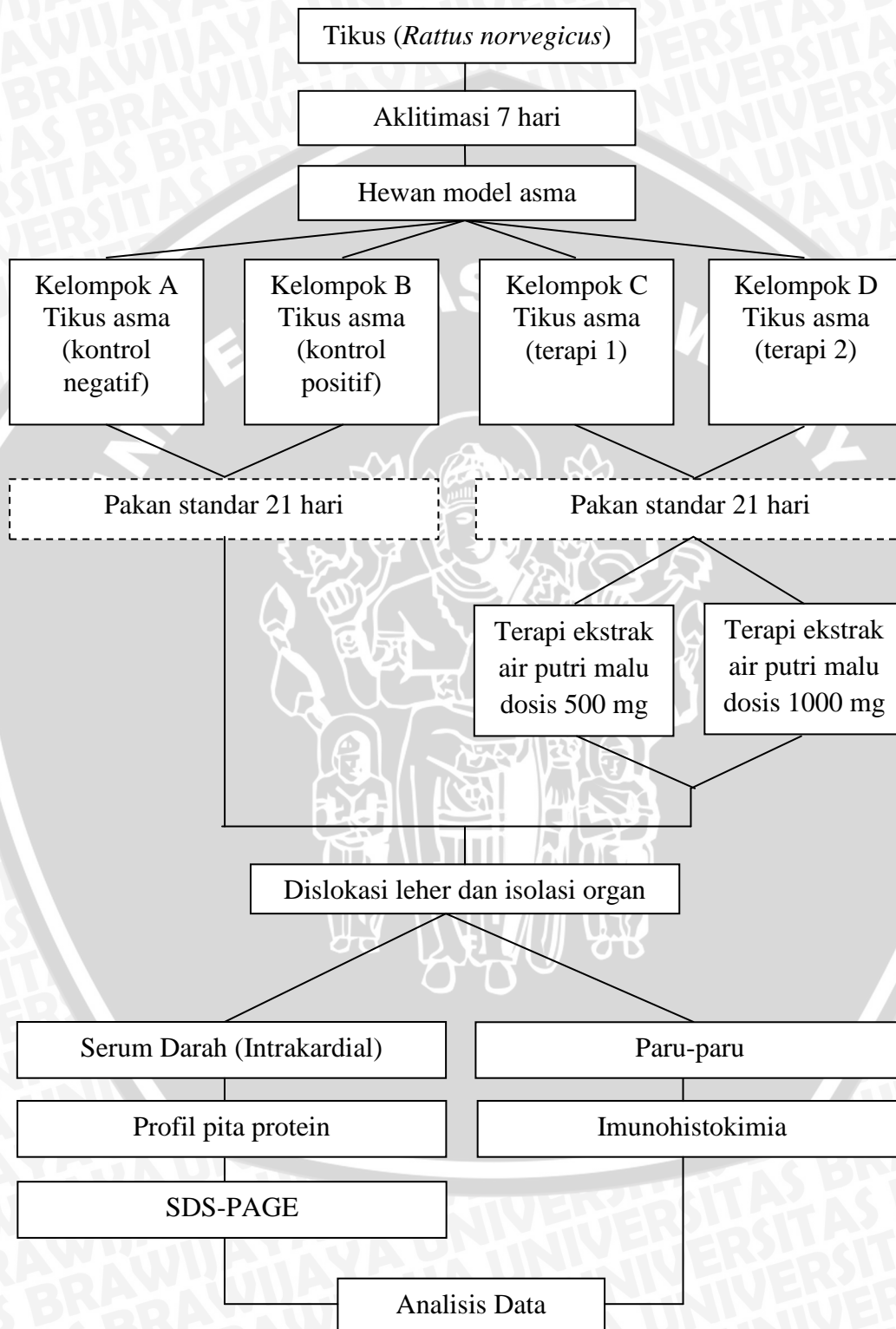
Malang, 26 Agustus 2013

Kepala Laboratorium  
Taksonomi, Struktur dan  
Perkembangan Tumbuhan,

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.  
LABORATORIUM TAKSONOMI TU63009-198802 2 001

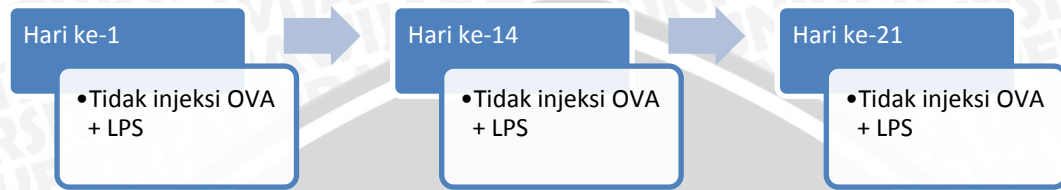


**Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian**

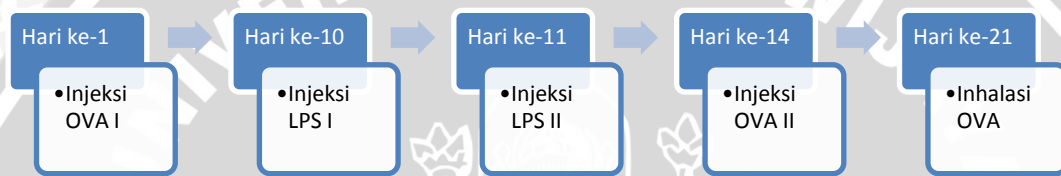


**Lampiran 4. Rancangan Perlakuan**

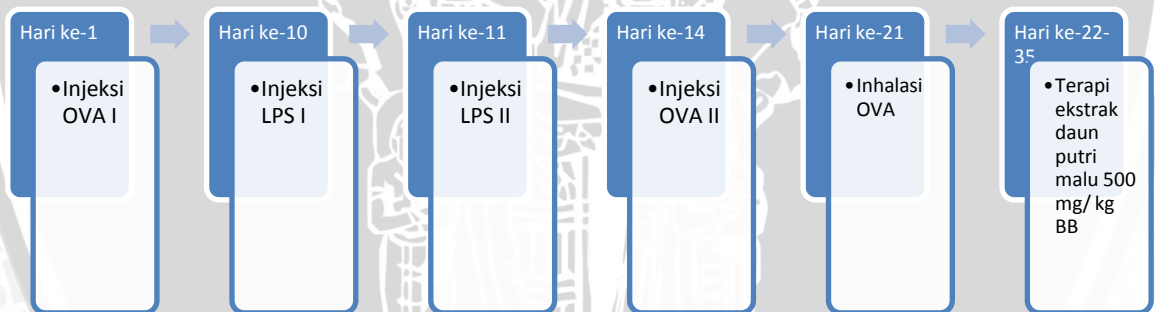
**Kelompok Tikus Negatif (Normal)**



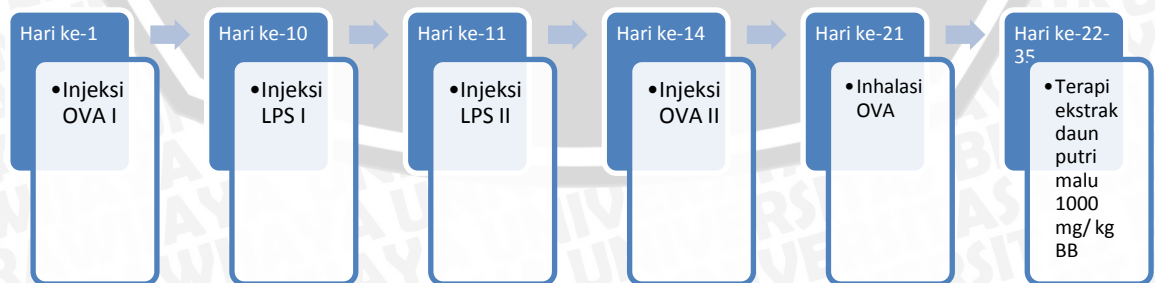
**Kelompok Tikus Positif (Infeksi Asma)**



**Kelompok Tikus Terapi 1 (Ekstrak Air Daun Putri Malu Dosis 500 mg/kg BB)**



**Kelompok Tikus Terapi 2 (Ekstrak Air Daun Putri Malu Dosis 1000 mg/kg BB)**



Keterangan:

1. Injeksi OVA I dan OVA II dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 1  $\mu\text{g/ml}$  dengan adjuvant AIOH<sub>3</sub> dalam larutan PBS
2. Inhalasi OVA dilakukan dengan cara nebulasi OVA dalam larutan NaCl fisiologis dengan dosis 1 mg/ml selama 20 menit
3. Pemberian LPS I dan LPS II berurutan pada hari ke-10 dan ke-11 dengan dosis 1  $\mu\text{g/ml}$  pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus
4. Pada hari ke-21, 30 menit setelah diberikan OVA secara inhalasi tikus dibunuh untuk digunakan dalam analisis profil pita protein dengan SDS-PAGE dan pembuatan preparat imunohistokimia
5. Pada hari ke-22 sampai dengan ke-35 untuk kelompok tikus terapi I dan II dilakukan terapi menggunakan sonde lambung dengan ekstrak air daun putri malu dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB.
6. Pada hari ke-36 untuk kelompok tikus terapi I dan II dibunuh kemudian diisolasi organ paru-paru dan serum darahnya untuk digunakan dalam pembuatan preparat imunohistokimia dan analisis profil pita protein dengan SDS-PAGE

**Lampiran 5.** Komposisi Larutan

No.	Larutan	Bahan-bahan
1.	100 mL NaCl fisiologis 0,9%	4,5 gram garam NaCl Akuades
2.	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 gram NaCl 2,16 gram Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
3.	Larutan OVA injeksi	10 µg ovalbumin 1,5 mg AlOH <sub>3</sub> dilarutkan dalam 200 µl PBS
4.	Larutan LPS injeksi	100 µg LPS dilarutkan di dalam 1 ml PBS steril. Jadi, di dalam 1 µl terdapat 0,1 µg LPS

**Lampiran 6.** Dosis Terapi Ekstrak Air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.) (Vikram, *et al.*, 2012)

### 3.1 Kelompok Tikus Terapi I (Dosis terapi = 500 mg/kg BB)

Dosis toksik = 2000 mg/kg BB

Dosis terapi (eksperimental) = 500 mg/kg BB

Berat rata-rata tikus = 200 g

Dosis terapi ekstrak air Putri Malu untuk 1 ekor tikus =

$$200 \text{ g} \times \frac{500 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 100 \text{ mg/ekor}$$

1 kelompok terdiri dari 5 ekor tikus

$$100 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} = 500 \text{ mg/kelompok}$$

500 mg/kelompok dilarutkan dalam 100 ml aquades

$$\text{Perhitungan} = 500 \text{ mg}/100 \text{ ml} \text{ (5 ekor tikus)}$$

$$= 500 \text{ mg}/10 \text{ ml}$$

$$= 100 \text{ mg}/2 \text{ ml} \text{ (1 ekor tikus)} \rightarrow \text{konsentrasi}$$

Volume pemberian = 2 ml (kapasitas maksimal lambung 1 ekor tikus = ±5 ml)

Diagram Pembuatan Ekstrak Air Daun Putri Malu:

Daun Putri Malu

- Ditimbang sebanyak 0,5 gram (500 mg)
- Dimasukkan dalam labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak air daun putri malu

### 3.2 Kelompok Tikus Terapi II (Dosis terapi = 1000 mg/kg BB)

Dosis toksik = 2000 mg/kg BB

Dosis terapi (eksperimental) = 1000 mg/kg BB

Berat rata-rata tikus = 200 g

Dosis terapi ekstrak air Putri Malu untuk 1 ekor tikus =

$$200 \text{ g} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 200 \text{ mg/ekor}$$

1 kelompok terdiri dari 5 ekor tikus

$$200 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} = 1000 \text{ mg/kelompok}$$

1000 mg/kelompok dilarutkan dalam 100 ml aquades

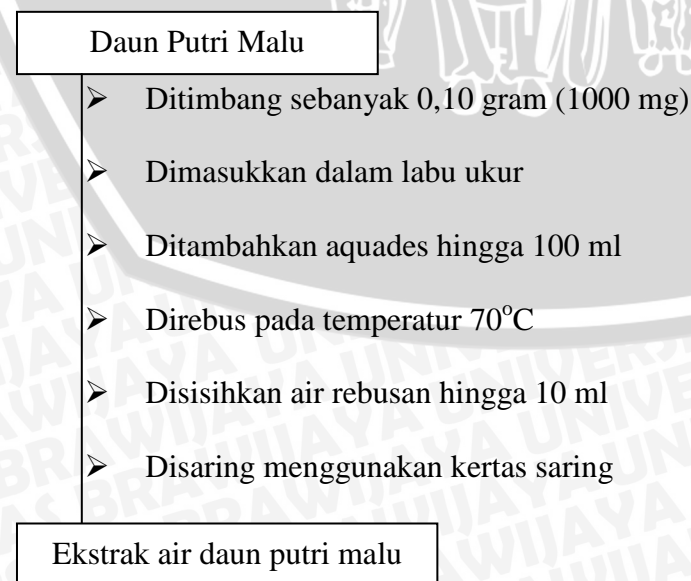
Perhitungan = 1000 mg/100 ml (5 ekor tikus)

$$= 1000 \text{ mg}/10 \text{ ml}$$

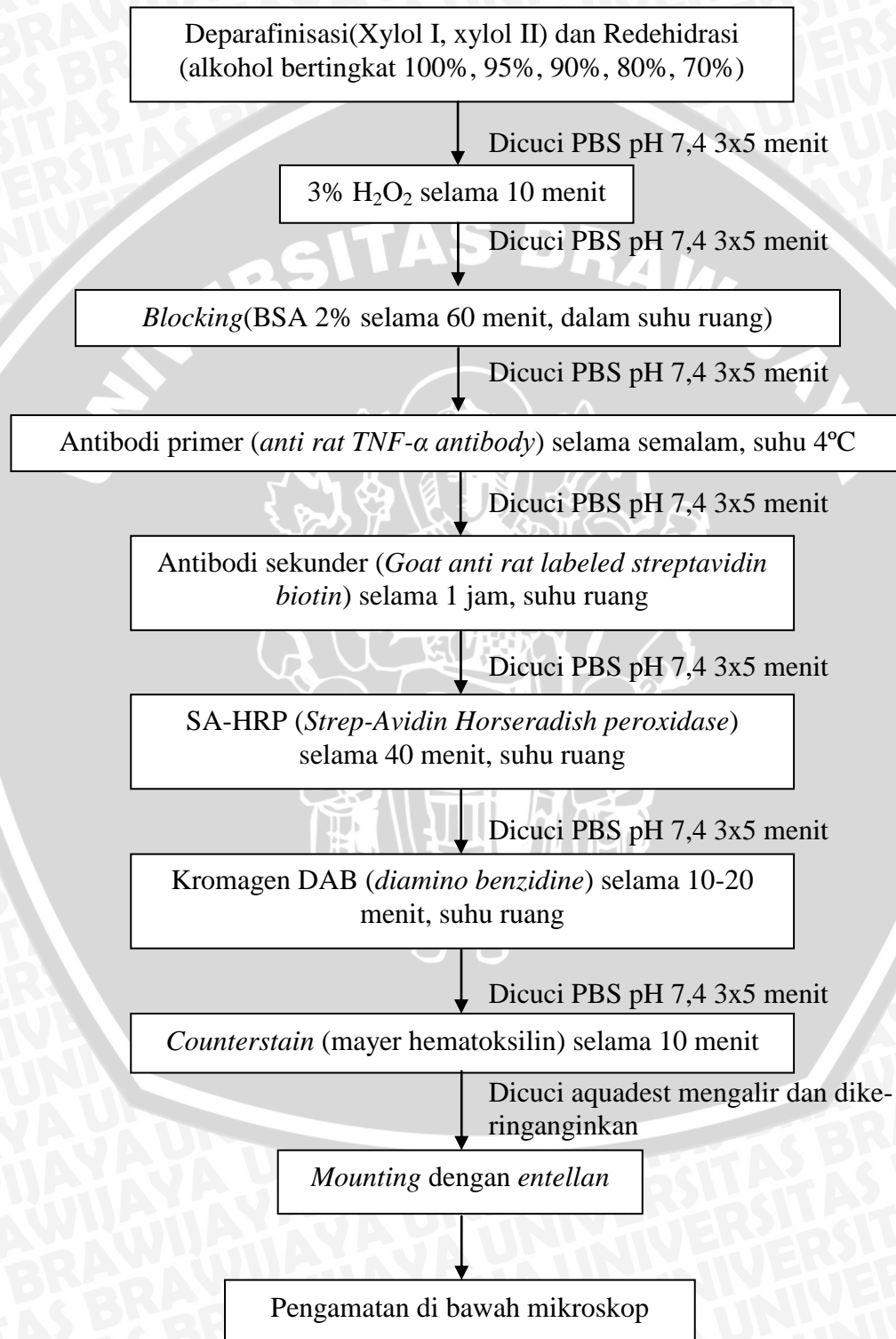
$$= 200 \text{ mg}/2 \text{ ml} \text{ (1 ekor tikus)} \rightarrow \text{konsentrasi}$$

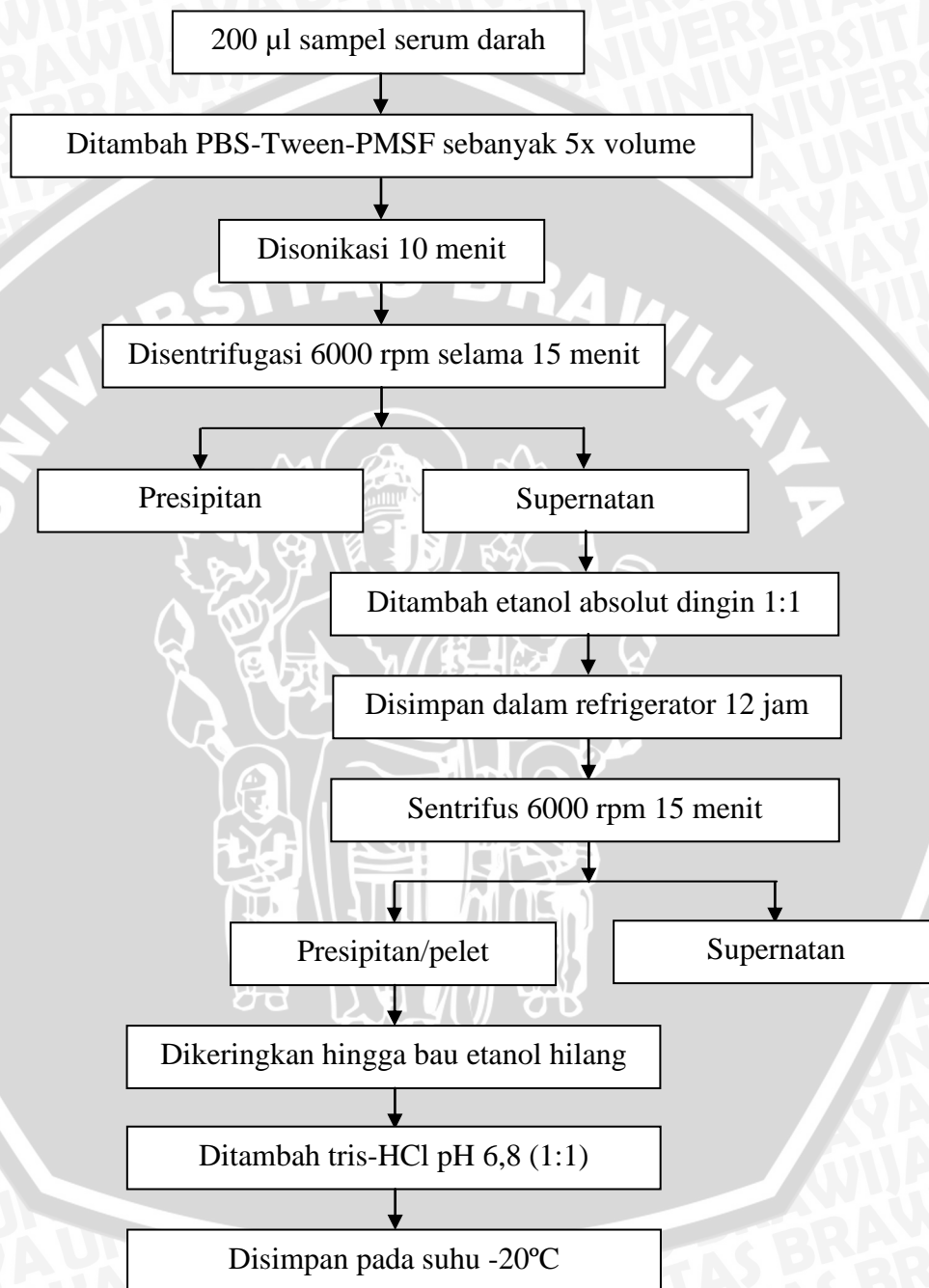
Volume pemberian = 2 ml (kapasitas maksimal lambung 1 ekor tikus =  $\pm 5$  ml)

Diagram Pembuatan Ekstrak Air Daun Putri Malu:



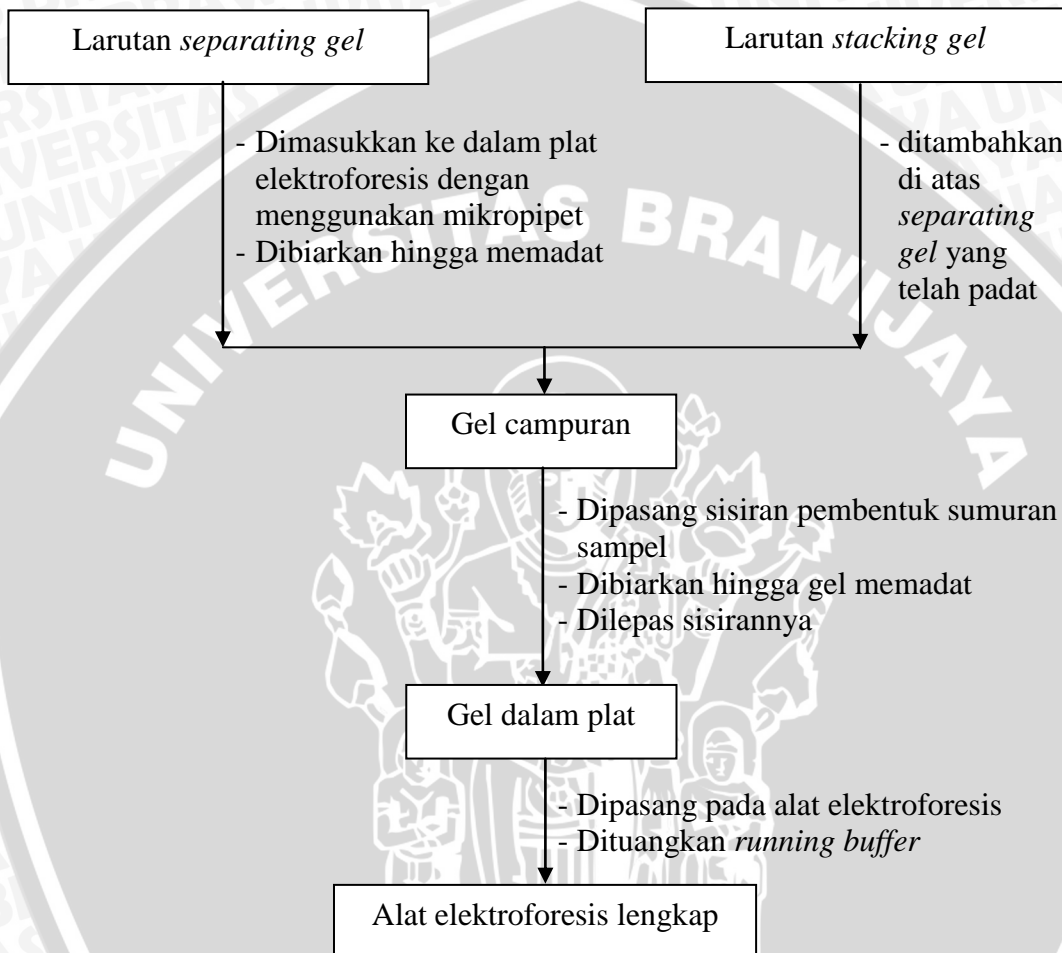


**Lampiran 7. Metode Imunohistokimia**

**Lampiran 8. Isolasi Protein Serum**

**Lampiran 9. Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE**

**9.1 Persiapan Gel**



## 9.2 Pemasukan Sampel dan Proses *Running*

2,5  $\mu$ l sampel + 17,5  $\mu$ l Tris-HCl

- Dimasukkan ke dalam tabung mikro
- Ditambah dengan 20  $\mu$ l RSB (perbandingan volume 1:1)
- Dipanaskan pada suhu 100°C selama 7 menit pada waterbath
- Didinginkan pada suhu ruang
- Disuntikkan ke dalam 10 sumuran @30  $\mu$ l
- Dilakukan *running* dengan arus 28 mA, 128 V hingga warna biru berada  $\pm$ 0,5 cm dari batas bawah plat gel (45 menit)

Gel hasil *running*

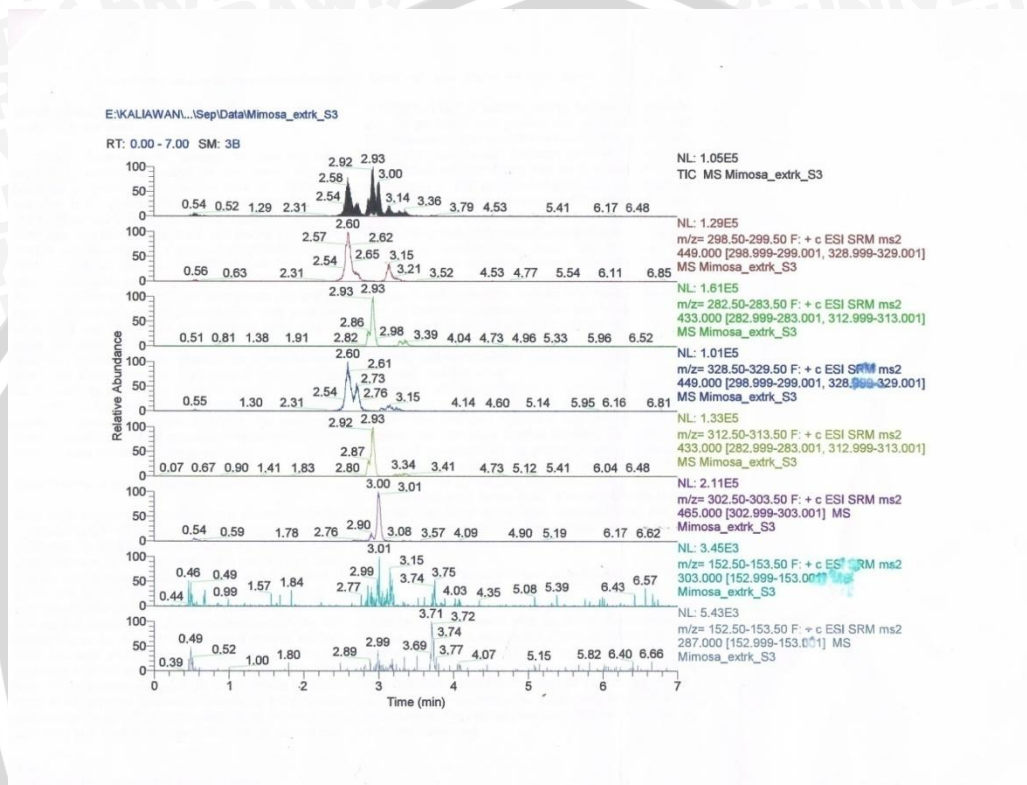
- Direndam dalam larutan *staining* sambil dikocok menggunakan *shaker* selama 20 menit
- Direndam dalam larutan *destaining* sambil dikocok menggunakan *shaker* hingga pita pada gel tampak jelas

Pita-pita pada gel hasil elektroforesis

- Ditentukan harga  $R_f$  dan massa molekul relatifnya masing-masing

Data

Lampiran 10. Hasil Uji LCMS



Keterangan Gambar:

1. Isoorientin : Molar mass 299 g/mol
2. Isovitexin : Molar mass 283 g/mol
3. Orientin : Molar mass 329 g/mol
4. Vitexin : Molar mass 313 g/mol
5. Isoquercetin : Molar mass 303 g/mol
6. Quercetin : Molar mass 153 g/mol
7. Kaempferol : Molar mass 153 g/mol



## Lampiran 11. Hasil dan Analisis Ekspresi TNF- $\alpha$

### 11.1 Data Ekspresi TNF- $\alpha$

Kelompok Perlakuan	Persentase Area					Rata-rata
	1	2	3	4	5	
A. Negatif (sehat)	0,523	0,325	0,458	0,435	0,548	0,4578
B. Positif (asma)	3,133	2,869	3,235	2,827	2,178	2,8484
C. Terapi 500 mg/kg BB	1,459	1,564	1,381	2,020	1,121	1,5089
D. Terapi 1000 mg/kg BB	1,172	1,531	0,824	0,176	0,270	0,7946

### 11.2 Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$

$$\text{Persentase peningkatan (\%)} = \frac{\text{rataaan perlakuan} - \text{rataaan negatif}}{\text{rataaan negatif}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase penurunan (\%)} = \frac{\text{rataaan positif} - \text{rataaan perlakuan}}{\text{rataaan positif}} \times 100\%$$

$$A : \text{Persentase peningkatan (\%)} = \frac{0,458 - 0,458}{0,458} \times 100\% = 0\%$$

$$B : \text{Persentase peningkatan (\%)} = \frac{2,848 - 0,458}{0,458} \times 100\% = 521,8\%$$

$$C : \text{Persentase penurunan (\%)} = \frac{2,848 - 1,509}{2,848} \times 100\% = 47,1\%$$

$$D : \text{Persentase penurunan (\%)} = \frac{2,848 - 0,795}{2,848} \times 100\% = 72,1\%$$

### 11.3 Analisis Data

#### 9.3.1 Uji Normalitas Data

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perlakuan	,169	20	,139	,863	20	,009
KadarIHK	,152	20	,200*	,904	20	,050*

\*P>0,05 (data tidak berbeda)

#### 11.3.2 Uji Homogenitas

##### Test of Homogeneity of Variances

KadarIHK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,698	3	16	,081



### 11.3.3 Uji Statistik ANOVA

#### ANOVA

KadarIHK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16,822	3	5,607	36,040	,000
Within Groups	2,489	16	,156		
Total	19,311	19			

### 11.3.4 Uji Lanjutan BNJ (Benar Nyata Jujur)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: KadarIHK

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Sakit	-2,39076580*	,24946528	,000	-3,1044909	-1,6770407
	Terapi 500 mg/kg BB	-1,05103616*	,24946528	,003	-1,7647613	-,3373111
	Terapi 1000 mg/kg BB	-,33685660	,24946528	,546	-1,0505817	,3768685
Sakit	Kontrol	2,39076580*	,24946528	,000	1,6770407	3,1044909
	Terapi 500 mg/kg BB	1,33972964*	,24946528	,000	,6260045	2,0534547
	Terapi 1000 mg/kg BB	2,05390920*	,24946528	,000	1,3401841	2,7676343
Terapi 500 mg/kg BB	Kontrol	1,05103616*	,24946528	,003	,3373111	1,7647613
	Sakit	-1,33972964*	,24946528	,000	-2,0534547	-,6260045
	Terapi 1000 mg/kg BB	,71417956*	,24946528	,050	,0004545	1,4279047
Terapi 1000 mg/kg BB	Kontrol	,33685660	,24946528	,546	-,3768685	1,0505817



Sakit	-2,05390920*	,24946528	,000	-2,7676343	-1,3401841
Terapi 500 mg/kg BB	-,71417956*	,24946528	,050	-1,4279047	-,0004545

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

### 11.3.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ (Benar Nyata Jujur)

#### KadarIHK

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	5	,4578700		
Terapi 1000 mg/kg BB	5	,7947266		
Terapi 500 mg/kg BB	5		1,5089062	
Sakit	5			2,8486358
Sig.		,546	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**Lampiran 12. Perhitungan Berat Molekul (BM) Hasil SDS-PAGE**

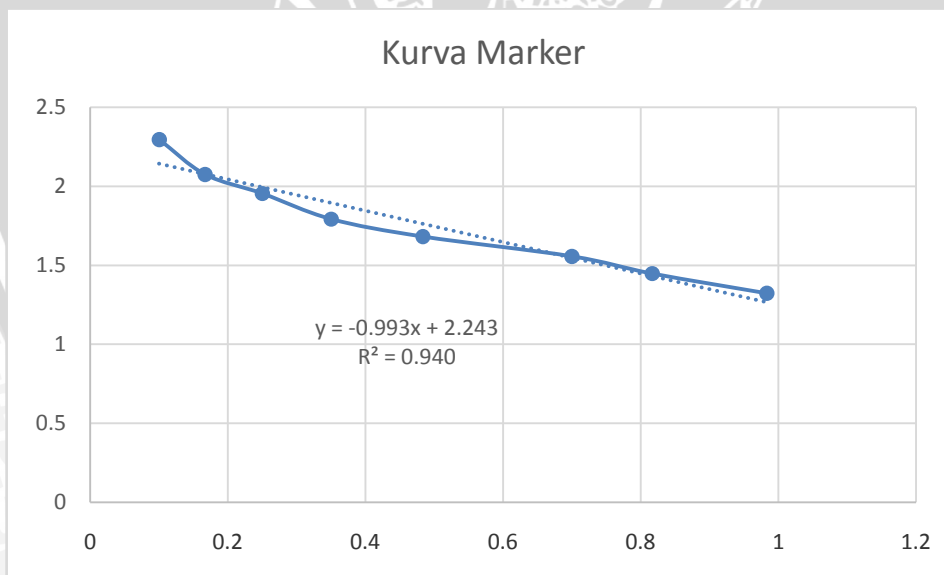
**12.1 Tabel Nilai  $R_f$  dan Berat Molekul (BM) *Protein Marker***

a	b	$R_f$ (a/b) (x)	BM (kDa)	Log BM (y)
0,6	6	0,1	198	2,296665
1	6	0,166667	119	2,075547
1,5	6	0,25	90	1,954243
2,1	6	0,35	62	1,792392
2,9	6	0,483333	48	1,681241
4,2	6	0,7	36	1,556303
4,9	6	0,816667	28	1,447158
5,9	6	0,983333	21	1,322219

**Keterangan:**

- a = jarak batas atas *gel* hingga pita (cm)
- b = jarak batas atas *gel* hingga batas bawah *gel* (cm)
- $R_f$  = *Retardation Factor*
- BM = berat molekul *marker*
- Log BM = logaritma berat molekul *marker*

**12.2 Grafik Berat Molekul (BM) *Protein Marker***



### 12.3 Tabel Nilai $R_f$ dan Berat Molekul (BM) Sampel Protein Serum

Sampel	a	b	$R_f$ (a/b)	Log BM	BM (anti log)
Negatif	2,1	6	0,35	1,89545	78,60497
	2,7	6	0,45	1,79615	62,53887
	3,5	6	0,583333	1,66375	46,10521
	4,8	6	0,8	1,4486	28,09312
Asma	2,1	6	0,35	1,89545	78,60497
	2,7	6	0,45	1,79615	62,53887
	3,3	6	0,55	1,69685	49,75652
	3,5	6	0,583333	1,66375	46,10521
	4,7	6	0,783333	1,46515	29,18435
	4,8	6	0,8	1,4486	28,09312
Terapi 500 mg/kg BB	2,1	6	0,35	1,89545	78,60497
	2,7	6	0,45	1,79615	62,53887
	3,3	6	0,55	1,69685	49,75652
	3,5	6	0,583333	1,66375	46,10521
	4,7	6	0,783333	1,46515	29,18435
	4,8	6	0,8	1,4486	28,09312
Terapi 1000 mg/kg BB	2,1	6	0,35	1,89545	78,60497
	2,7	6	0,45	1,79615	62,53887
	3,5	6	0,583333	1,66375	46,10521
	4,8	6	0,8	1,4486	28,09312