



LAMPIRAN



Lampiran 1. Keterangan Laik Etik

59



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 508-KEP-UB

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

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH PEMBERIAN VCO (VIRGIN COCONUT OIL)
FERMENTASI LACTOBACILLUS CASEI TERHADAP
KADAR MALONDIAL DEHID DAN GAMBARAN
HISTOLOGI DUODENUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINFEKSI *Salmonella sp.*

PENELITI : SETIYA DINI LARASATI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 24 Februari 2016
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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



Lampiran 2. Sertifikat *Salmonella enteritidis*

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: S.enterica sv Enteritidis ATCC13076 PK/5
Lot Number: 463534

Product Number: R4608200
Expiration Date: 2015-08-31
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Vitek 2C GN & Antisera Grouping

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed

Sherry Mason

Product Performance Technologist

Lampiran 3. Perhitungan Dosis VCO Fermentasi *Lactobacillus casei*

Dosis VCO fermentasi *L. casei* yang digunakan adalah 3,4 ml/kgBB, 6,7 ml/kgBB dan 10 ml/kgBB (Dosumu, 2010) dengan rata-rata berat badan tikus 150 gr = 0,15 kg, maka:

- Kelompok Perlakuan I, dosis VCO fermentasi *L. casei* 3,4 ml/kgBB

$$= (\text{Dosis} \times \text{BB tikus}) / 1 \text{ kg}$$

$$= (3,4 \text{ ml} \times 0,15 \text{ kg}) / 1 \text{ kg}$$

$$= 0,5 \text{ ml}$$

Jadi, volume pemberian yang diberikan pada setiap tikus per hari pada perlakuan I (Kelompok C) sebanyak 0,5 ml.

- Kelompok Perlakuan II, dosis VCO fermentasi *L. casei* 6,7 ml/kgBB

$$= (\text{Dosis} \times \text{BB tikus}) / 1 \text{ kg}$$

$$= (6,7 \text{ ml} \times 0,15 \text{ kg}) / 1 \text{ kg}$$

$$= 1 \text{ ml}$$

Jadi, volume pemberian yang diberikan pada setiap tikus per hari pada perlakuan II (Kelompok D) sebanyak 1 ml.

- Kelompok Perlakuan III, dosis VCO fermentasi *L. casei* 10 ml/kgBB

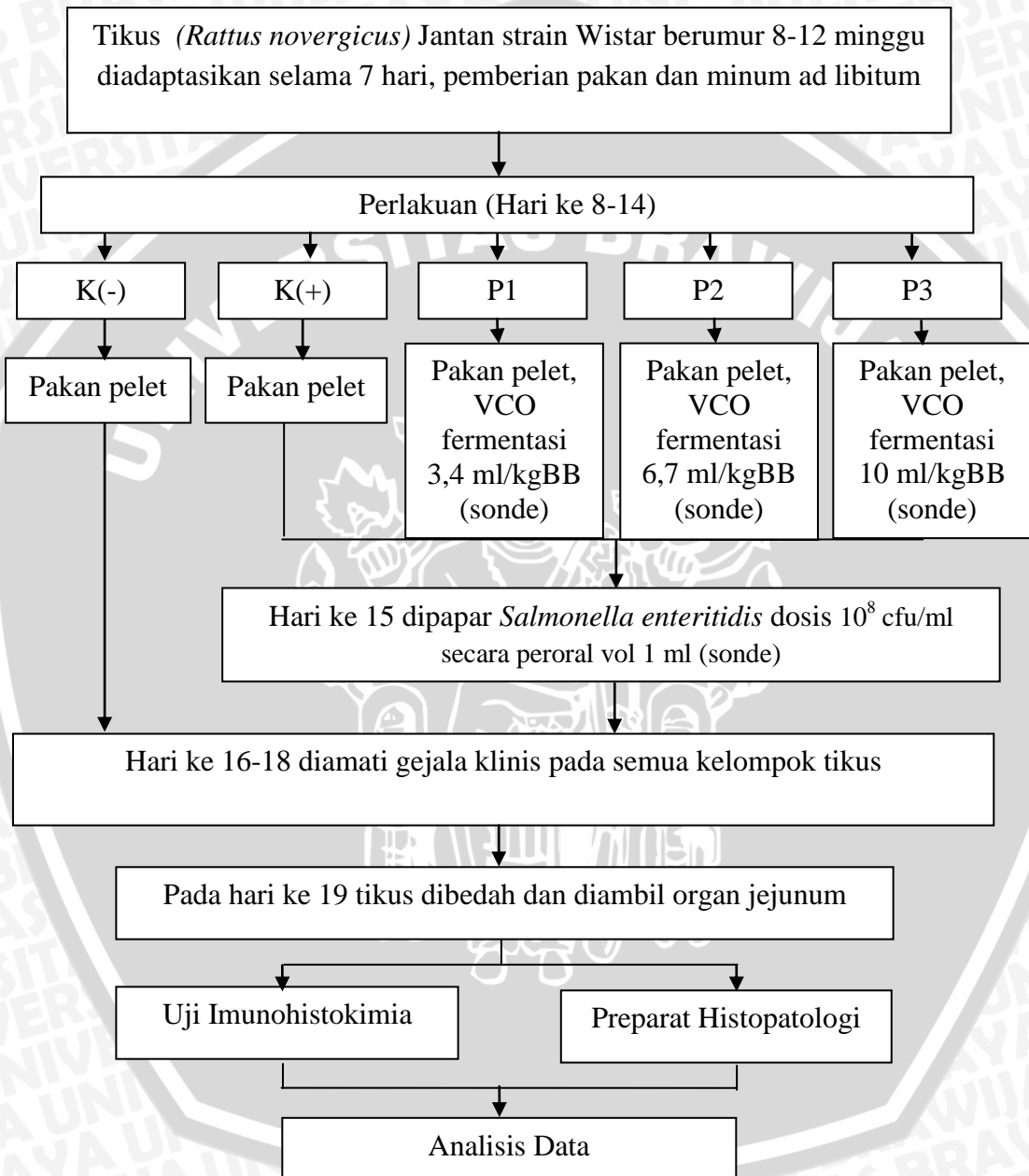
$$= (\text{Dosis} \times \text{BB tikus}) / 1 \text{ kg}$$

$$= (10 \text{ ml} \times 0,15 \text{ kg}) / 1 \text{ kg}$$

$$= 1,5 \text{ ml}$$

Jadi, volume pemberian yang diberikan pada setiap tikus per hari pada perlakuan III (Kelompok E) sebanyak 1,5 ml.

Lampiran 4. Diagram Tahapan Penelitian



Lampiran 5. Pembuatan Starter Bakteri *Lactobacillus casei*

5.1 Perhitungan susu skim 11%

Larutan susu skim 11% dibuat dengan cara menimbang 11 gr susu skim ditambah air destilasi sampai volume 100 ml.

5.2 Perhitungan volume *L.casei* 2%

$$2\% = \frac{X}{250} \times 100\%$$

$$500 = 100X$$

$$X = 5 \text{ ml}$$

Jadi, volume *L.casei* pada susu skim 11% yang ditambahkan pada santan adalah 2% dari 250 ml yaitu 5ml.

5.3 Pembuatan biakan bakteri *L.casei* pada susu skim

Bakteri *L.casei* pada media MRSA

- Dilakukan kondisi aseptis dengan menyalakan api pada bunsen.
- Dipanaskan terlebih dahulu ose yang akan digunakan pada bunsen hingga membara.
- Diambil biakan bakteri *L.casei* pada media MRSA *slant* menggunakan ose tersebut, cara pengambilan tidak langsung ke biakan bakteri, tetapi dididiamkan terlebih dahulu pada tepi agar hingga dingin, kemudian disentuh pada biakan bakteri.
- Diatur jarak antara bibir tabung dan api sekitar 5-10 cm.
- Dimasukkan biakan bakteri yang telah diambil dengan ose kedalam susu skim cair pada tabung elemeyer sambil diaduk.

- Dilakukan pengambilan biakan bakteri *L.casei* sebanyak 2 kali, dengan ose yang sama dan setiap pengambilan, ose dibarakan pada api bunsen terlebih dahulu.
- Ditunggu dengan kapas steril dan digoyang secara perlahan.
- Dimasukkan kedalam inkubator suhu 37°C selama 48 jam.
- Bakteri *L.casei* pada media susu skim siap digunakan.

Hasil



Lampiran 6. Pembuatan VCO Fermentasi *Lactobacillus casei*

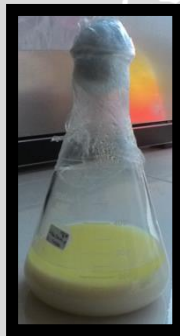
4 buah kelapa

- Dikupas kulit arinya dan diparut
- Direndam dalam air hangat bersuhu 50°C (1:2, berat/volume) selama 30 menit
- Disaring menggunakan saringan kain
- Didiamkan hasil saringan berupa santan selama 1 jam hingga terbentuk lapisan
- Dimasukkan santan lapisan atas (250 ml) pada gelas baker
- Ditambahkan *Lactobacillus casei* dari media susu skim dengan konsentrasi 10^8 cfu/ml sebanyak 2% dari volume santan, ditutup dengan aluminium foil.
- Didiamkan pada suhu 25°C selama 24 jam
- Diambil lapisan minyak VCO pada lapisan tengah

Minyak VCO



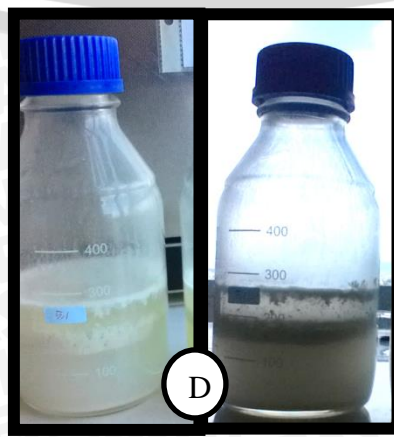
A



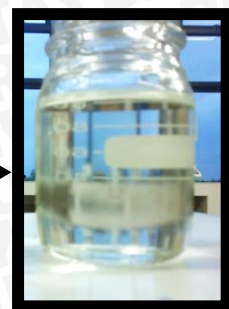
B



C



D



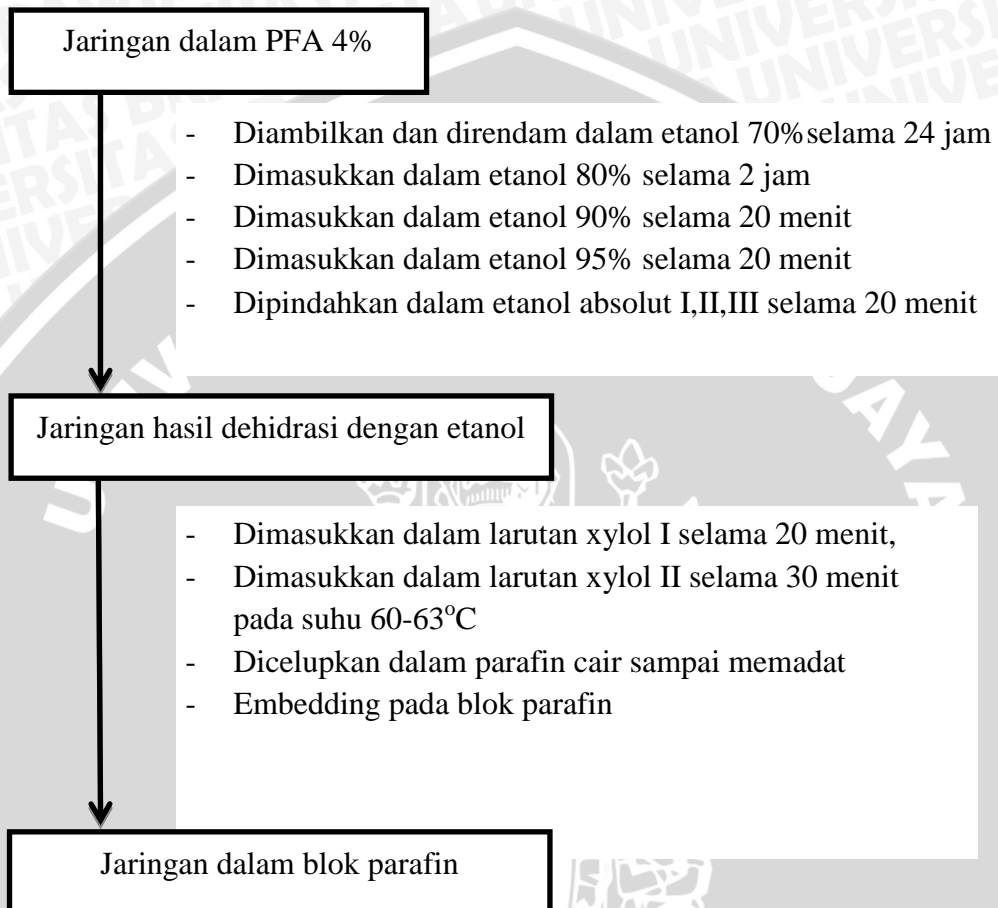
E

Keterangan:

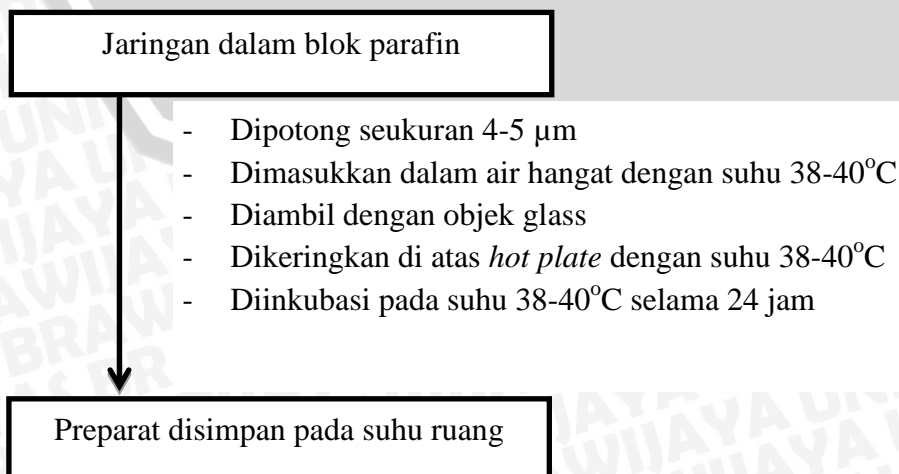
- A. Santan sebelum diamkan 1 jam
- B. Starter bakteri *L.casei* dalam susu skim
- C. Santan lapisan atas (250 ml)
- D. Setelah fermentasi 24 jam
- E. VCO fermentasi *L.casei*

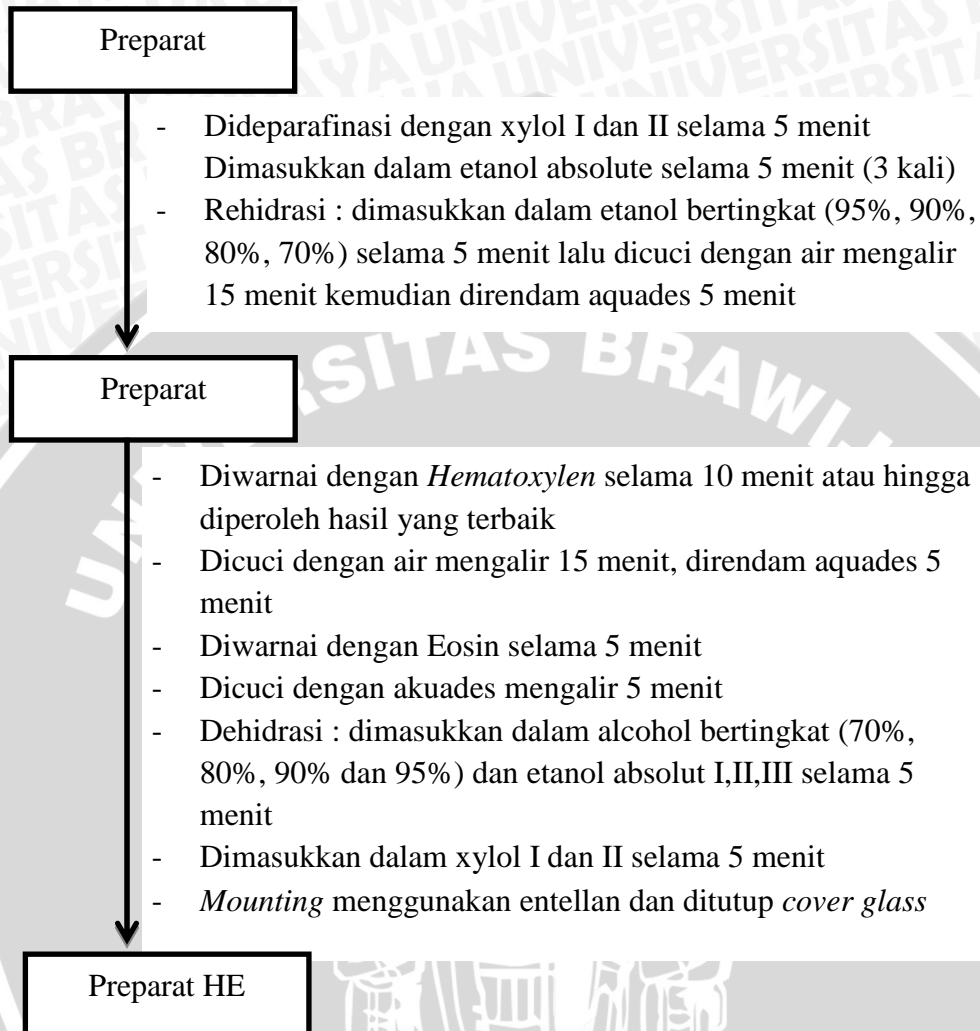
Lampiran 7. Pembuatan Gambaran Histopatologi Jaringan

Lampiran 7.1. Embedding Jaringan

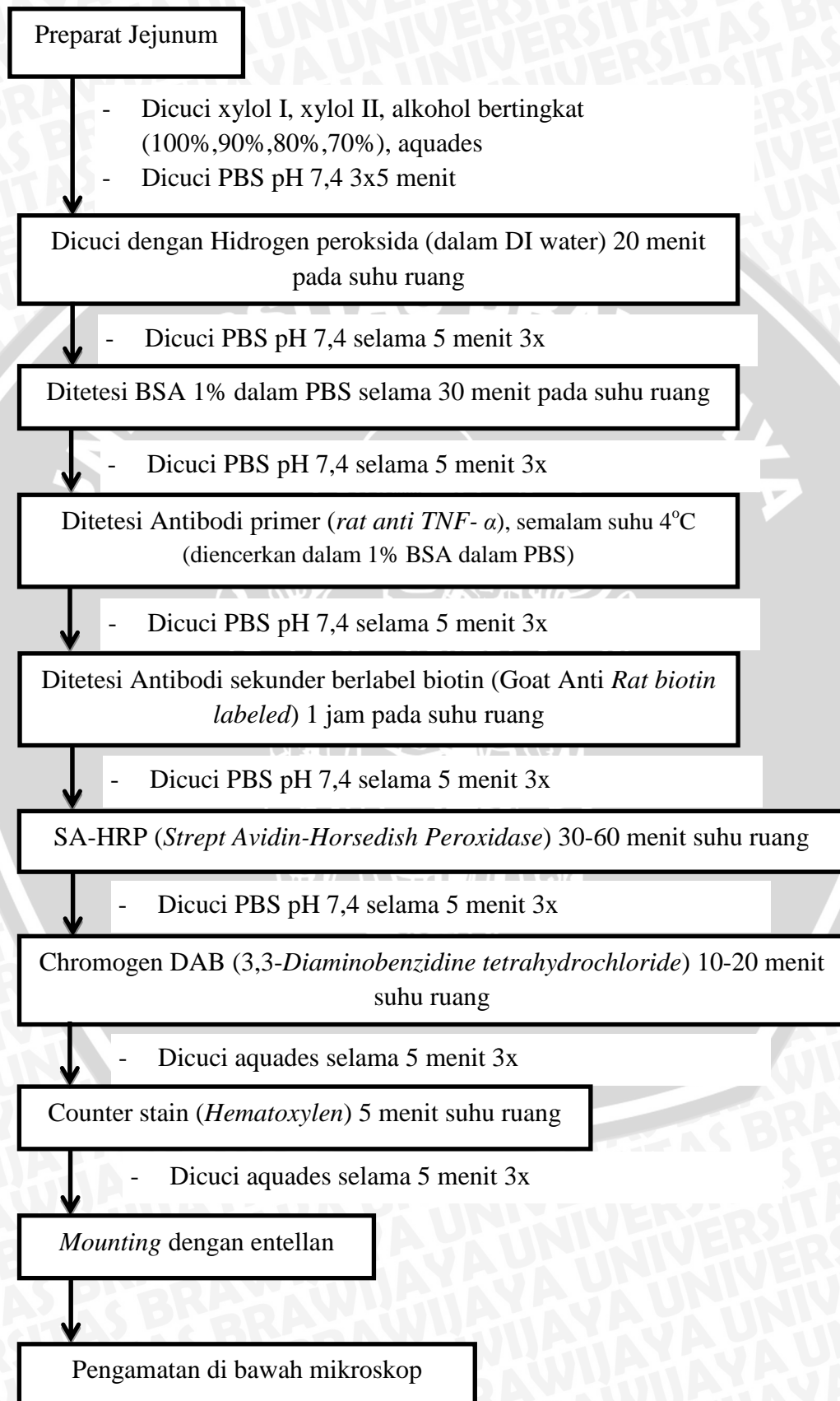


Lampiran 7.2 Pembuatan Preparat Jaringan

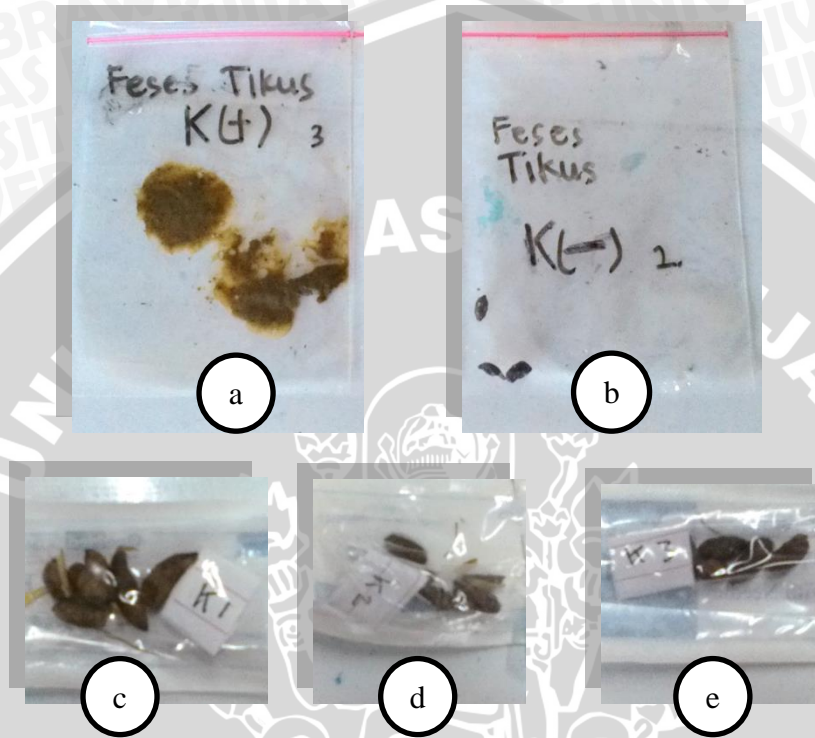


Lampiran 8. Pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE)

Lampiran 9. Metode Immunohistokimia Ekspresi TNF- α



Lampiran 10. Feses tikus semua kelompok setelah diinfeksi *S.enteritidis* sebanyak 1ml



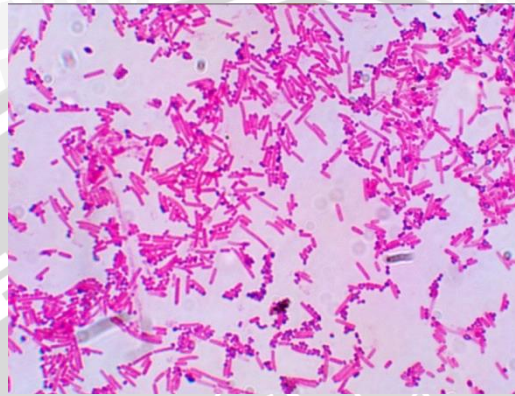
Keterangan gambar:

- A. feses kelompok B (kontrol positif), berupa diare profus tanpa disertai darah,
- B. feses kelompok A (kontrol negatif), berwarna gelap dan konsistensinya lebih padat,
- C. feses tikus kelompok C (perlakuan 1),
- D. feses tikus kelompok D (perlakuan 2),
- E. feses tikus kelompok E (perlakuan 3).

Feses tikus kelompok C, D, dan E tampak tidak berbeda dengan kelompok kontrol negatif.

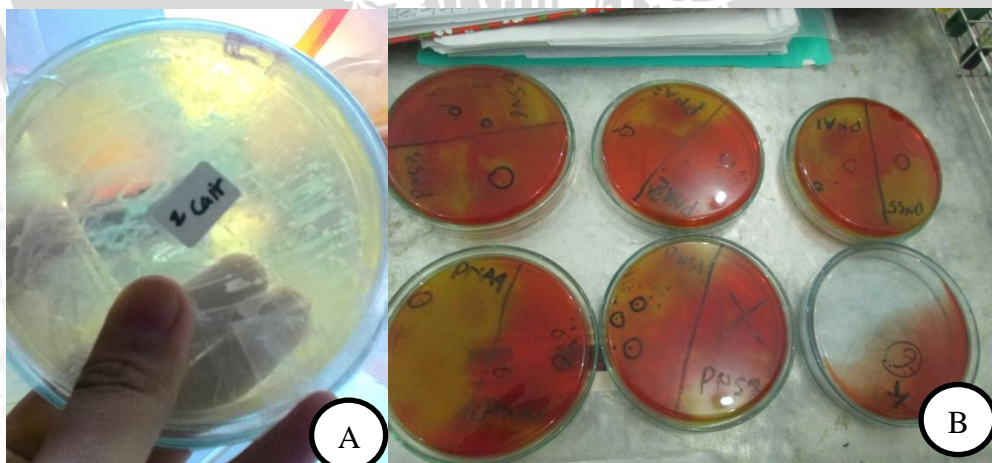
Lampiran 11. Uji konfirmasi feses tikus kontrol positif setelah diinfeksi *S. enteritidis*

11.1 Uji Pewarnaan gram



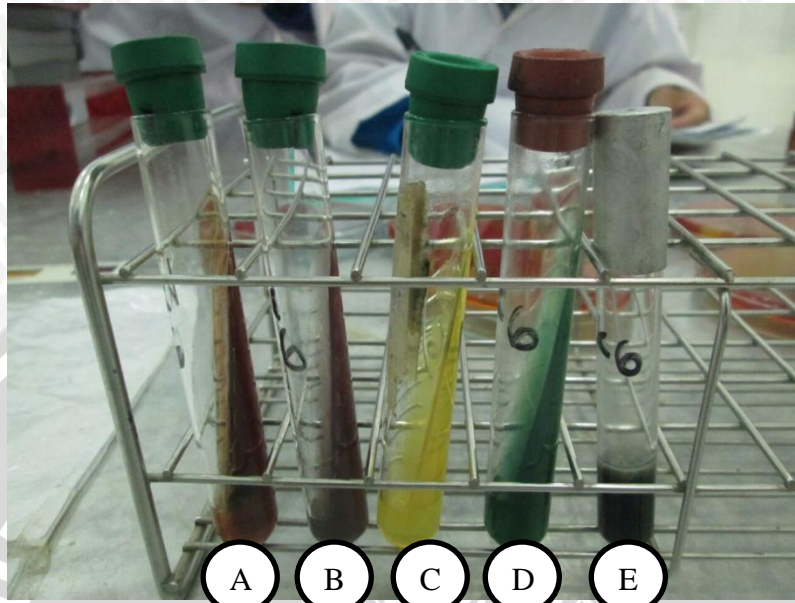
Keterangan gambar: Pewarnaan Gram perbesaran 1000x tampak koloni berwarna merah dan berbentuk bacillus, menunjukkan bahwa bakteri yang diidentifikasi adalah Gram negatif sesuai dengan ciri *S. enteritidis*.

11.2 Penanaman pada media *Nutrient Agar* (NA) dan media *Xylose lysine deoxycholate* (XLD)



Keterangan: **A)** media *Nutrient Agar* (NA) tampak koloni *S. enteritidis* berwarna bening dan smooth, **B)** media *Xylose lysine deoxycholate* (XLD) tampak koloni *S. enteritidis* berwarna hitam atau abu-abu.

11.3. Uji Biokimia



Keterangan: **A)** media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), **B)** media *Lysin Iron Agar* (LIA), **C)** media *Urease*, **D)** media *simon citrate agar* (SCA), **E)** media *sulfur indol motility* (SIM).

Hasil Uji Biokimia

No	Uji	Hasil
1	<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	+
2	<i>Lysin Iron Agar</i> (LIA)	+
3	Urease	-
4	<i>Simon Citrate Agar</i> (SCA)	+
5	<i>Sulfur Indol Motility</i> (SIM).	+

Lampiran 12. Perhitungan Ekspresi TNF- α

Tabel 12.1D ata Ekspresi TNF- α

Kelompok Perlakuan	Tikus				Rataan Ekspresi TNF- α
	1	2	3	4	
Kontrol Negatif	30,56	29,92	30	28,7	29,795
Kontrol Positif	50,04	49,24	49,22	49,88	49,595
Perlakuan 1	44,78	44,52	44,82	44,28	44,6
Perlakuan 2	38,34	38,5	37,94	37,6	38,095
Perlakuan 3	42,7	42,52	42,24	43,14	42,65

Lampiran 12.2 Presentase Peningkatan dan Penurunan Ekspresi TNF- α

Kelompok Kontrol

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Salmonelosis} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{49,595 - 29,795}{29,795} \times 100\% \\ &= 66,45\% \end{aligned}$$

Kelompok C (Perlakuan 1)

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Salmonelosis} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Salmonelosis}} \times 100\% \\ &= \frac{49,595 - 44,6}{49,595} \times 100\% \\ &= 10,07\% \end{aligned}$$



Kelompok D (Perlakuan 2)

$$\begin{aligned}\text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Salmonelosis} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Salmonelosis}} \times 100\% \\ &= \frac{49,595 - 38,095}{49,595} \times 100\% \\ &= 23,07\%\end{aligned}$$

Kelompok E (Perlakuan 3)

$$\begin{aligned}\text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Salmonelosis} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Salmonelosis}} \times 100\% \\ &= \frac{49,595 - 42,65}{49,595} \times 100\% \\ &= 14\%\end{aligned}$$



Lampiran 13. Data Dan Uji Statistik Ekspresi TNF- α

Tabel Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000
	Std. Deviation	6,55688702
	Absolute	,139
Most Extreme Differences	Positive	,139
	Negative	-,130
Kolmogorov-Smirnov Z		,624
Asymp. Sig. (2-tailed)		,832

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Hasil pengujian normalitas menggunakan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* dengan nilai *P value (sig)* sebesar 0,832. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar normal.

Tabel Deskriptif

Descriptives

Ekspresi TNF- α

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol Negatif	4		
Kontrol Positif	4	49,5950	,42658	,21329	48,9162	50,2738	49,22	50,04
Perlakuan 1	4	44,6000	,25140	,12570	44,2000	45,0000	44,28	44,82
Perlakuan 2	4	38,0950	,40542	,20271	37,4499	38,7401	37,60	38,50
Perlakuan 3	4	42,6500	,37754	,18877	42,0493	43,2507	42,24	43,14
Total	20	40,9470	6,87341	1,53694	37,7301	44,1639	28,70	50,04



Output Descriptives memuat hasil-hasil data statistik deskriptif seperti *mean*, standar deviasi, angka terendah dan tertinggi serta standar error. Pada bagian ini terlihat ringkasan statistic dari kelima sampel.

Tabel Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
TNF- α			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,150	4	15	,371

Tes ini bertujuan untuk menguji berlaku tidaknya asumsi untuk Anova, yaitu apakah kelima sampel mempunyai varian yang sama. Untuk mengetahui apakah asumsi bahwa kelima kelompok sampel yang ada mempunyai varian yang sama (homogen) dapat diterima. Untuk itu sebelumnya perlu dipersiapkan hipotesis tentang hal tersebut.

Adapun hipotesisnya adalah sebagai berikut :

H_0 = Kelima variansi populasi adalah sama

H_1 = Kelima variansi populasi adalah tidak sama

Dengan pengambilan Keputusan:

- a) Jika signifikan > 0.05 maka H_0 diterima
- b) Jika signifikan $< 0,05$ maka H_0 ditolak

Berdasarkan padahasil yang diperoleh pada *Test of Homogeneity of Variances*, dimana dihasilkan bahwa probabilitas atau signifikannya adalah 0,371 yang berarti lebih besardari 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis nol(H_0) diterima, yang berarti asumsi bahwa kelima varian populasi adalah sama (homogen) dapat diterima.

Uji Statistik ANOVA

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	894,134	4	223,534	958,521	,000
Within Groups	3,498	15	,233		
Total	897,632	19			

Setelah kelima varian terbukti sama, dilakukan uji Anova untuk menguji apakah kelima sampel mempunyai rata-rata yang sama. Output Anova adalah akhir dari perhitungan yang digunakan sebagai penentuan analisis terhadap hipotesis yang akan diterima atau ditolak. Hipotesis yang akan diuji adalah :

H_0 = Tidak ada perbedaan ekspresi TNF- α dengan pemberian VCO fermentasi *L.casei* yang berbeda. (Sama)

H_1 = Ada perbedaan kadar TNF- α dengan pemberian VCO fermentasi *L.casei* yang berbeda. (Tidak Sama)

Untuk menentukan H_0 atau H_1 yang diterima maka ketentuan yang harus diikuti adalah sebagai berikut :

- Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak
- Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ maka H_0 diterima
- Jika signifikan atau probabilitas $> 0,05$, maka H_0 diterima
- Jika signifikan atau probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak

Berdasarkan pada hasil yang diperoleh pada uji ANOVA, dimana dilihat bahwa $F_{hitung} = 958,521 > F_{tabel} = 3,06$, yang berarti H_0 ditolak dan menerima H_1 . Sedangkan untuk nilai probabilitas dapat dilihat bahwa nilai probabilitas adalah $0,000 < 0,05$ dengan taraf kepercayaan 95%. Dengan demikian hipotesis nol (H_0) ditolak. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan ekspresi TNF- α dengan pemberian VCO fermentasi *L.casei* yang berbeda. pemberian VCO fermentasi *L.casei* yang berbeda mempunyai pengaruh terhadap ekspresi TNF- α . Karena hasil yang ditunjukkan kurang dari 5% maka dilanjutkan dengan *Posthoc Test* dengan menggunakan uji Tukey.

Uji Lanjutan BNJ

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF_Alfa

Tukey HSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) ompok_Perlak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol	-19,80000*	,34147	,000	-20,8544	-18,7456
	Positif					
	Perlakuan 1	-14,80500*	,34147	,000	-15,8594	-13,7506
	Perlakuan 2	-8,30000*	,34147	,000	-9,3544	-7,2456
Kontrol Positif	Perlakuan 3	-12,85500*	,34147	,000	-13,9094	-11,8006
	Kontrol	19,80000*	,34147	,000	18,7456	20,8544
	Negatif					
	Perlakuan 1	4,99500*	,34147	,000	3,9406	6,0494
Perlakuan 1	Perlakuan 2	11,50000*	,34147	,000	10,4456	12,5544
	Perlakuan 3	6,94500*	,34147	,000	5,8906	7,9994
	Kontrol	14,80500*	,34147	,000	13,7506	15,8594
	Negatif					
Perlakuan 2	Kontrol	-4,99500*	,34147	,000	-6,0494	-3,9406
	Positif					
	Perlakuan 2	6,50500*	,34147	,000	5,4506	7,5594
	Perlakuan 3	1,95000*	,34147	,000	,8956	3,0044
Perlakuan 3	Kontrol	8,30000*	,34147	,000	7,2456	9,3544
	Negatif					
	Kontrol	-11,50000*	,34147	,000	-12,5544	-10,4456
	Positif					
Perlakuan 3	Perlakuan 1	-6,50500*	,34147	,000	-7,5594	-5,4506
	Perlakuan 3	-4,55500*	,34147	,000	-5,6094	-3,5006
	Kontrol	12,85500*	,34147	,000	11,8006	13,9094
	Negatif					
Perlakuan 3	Kontrol	-6,94500*	,34147	,000	-7,9994	-5,8906
	Positif					
	Perlakuan 1	-1,95000*	,34147	,000	-3,0044	-,8956
	Perlakuan 2	4,55500*	,34147	,000	3,5006	5,6094

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

Pemberian notasi pada uji BNJ

TNF_Alfa

Tukey HSD^a

Kelompok_Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Kontrol Negatif	4	29,7950				
Perlakuan 2	4		38,0950			
Perlakuan 3	4			42,6500		
Perlakuan 1	4				44,6000	
Kontrol Positif	4					49,5950
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

