

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik

**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA****KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:305-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 KAMBOJA
PUTIH (*Plumenia oeuminata L.*) TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI LAMBUNG TIKUS (*Rattus
norvegicus*) HASIL INDUKSI INDOMETASIN

PENELITI : VETRI HANDAYANI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 17 Maret 2015
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI
LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN

Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia, Telepon/Fax.: +62-341-575841, <http://biologi.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No : No. 0149/Takso.Identifikasi/03/2014

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

Nama : Eni Wulandari (NIM 115130100111052)
Navy Linggar H. A. (NIM 115130100111063)
Gilang Siwi P. (NIM 115130100111051)
Geta Darantika (NIM 115130101111059)
Vetri Handayani (NIM 115130113111005)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 225, diidentifikasi sebagai:

Familia : *Apocynaceae*
Genus : *Plumeria*
Species : *Plumeria acuminata* W. T. Ait.
Nama lokal : Kamboja

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 3 Oktober 2014

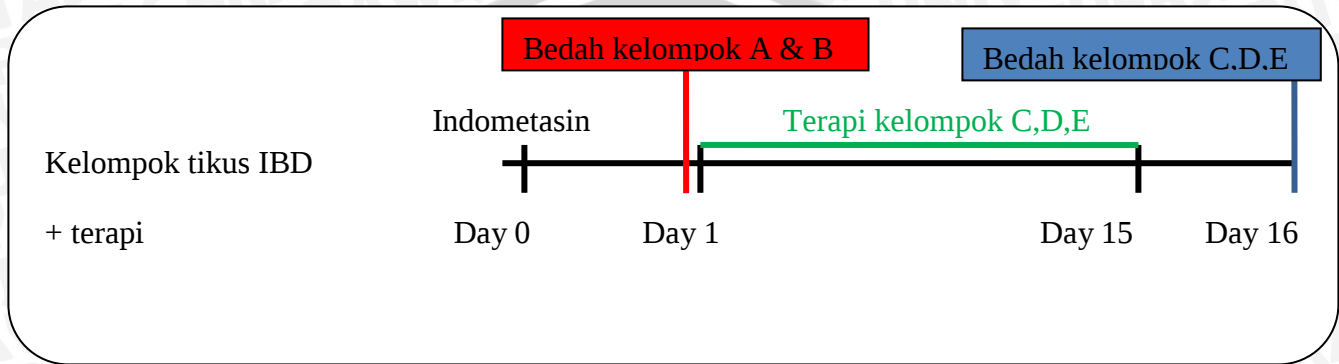
a.n. Kepala Laboratorium
Pelaksana Harian


LABORATORIUM
TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN
Dr. Jati Batoro, M.Si

NIP. 19570425.198601.1.001

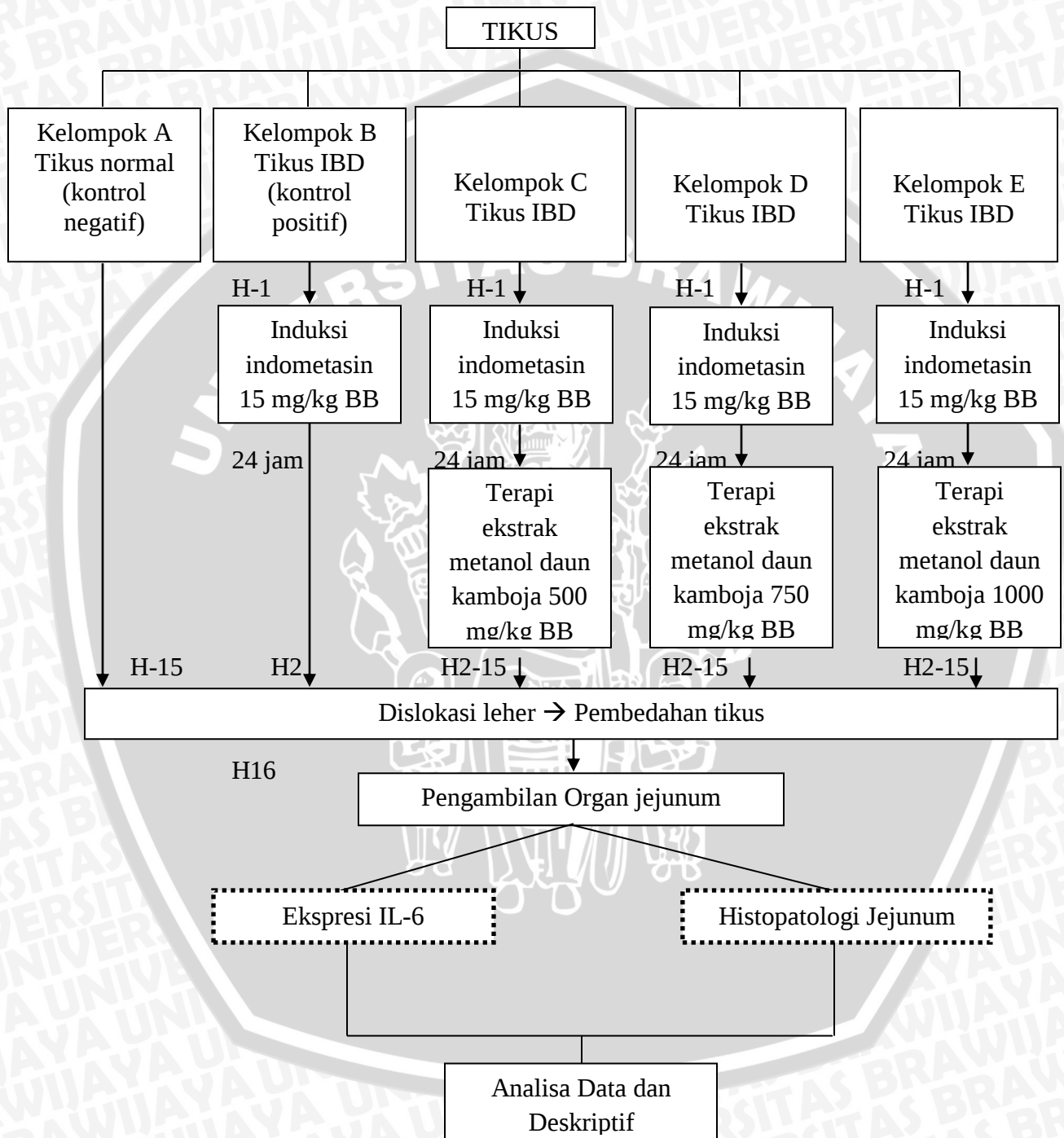
Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

A. Rancangan Perlakuan



Keterangan:

1. Induksi indometasin dilakukan secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB dengan pelarut minyak jagung.
2. Pada hari ke-1, 30 menit setelah 24 jam induksi indometasin tikus kelompok B dilakukan pembedahan untuk mengisolasi organ jejunum guna pengukuran ekspresi IL-6 dengan metode immunohistokimia dan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE).
3. Pada hari ke1- sampai hari ke-15 tikus kelompok C, D dan E diberikan terapi ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 500 mg, 750 mg dan 1000 mg.
4. Pada hari ke-16 dilakukan pembedahan tikus kelompok C, D dan E untuk mengisolasi organ jejunum, guna pengukuran ekspresi IL-6 dengan metode immunohistokimia dan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE).

B. Kerangka Operasional

Keterangan :



: Parameter yang diamati

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan yaitu 15 mg/kg BB (Aulani'am, 2012).

Rata- rata berat badan tikus adalah 200 gram, sehingga kebutuhan indometasin untuk per ekor tikus yaitu:

$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin per ekor tikus} &= 15 \text{ mg/kg BB} \times 0,20 \text{ kg} \\ &= 3 \text{ mg/ekor}\end{aligned}$$

Jadi, dosis indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin untuk 16 ekor tikus} &= 16 \times 3 \text{ mg/ekor} \\ &= 48 \text{ mg/16ekor}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengeceran dengan minyak jagung yaitu sebanyak} &= 48 \text{ mg} / 45 \text{ mg} \times 4 \text{ ml} \\ &= 4,2 \text{ ml/16 ekor}\end{aligned}$$

Jadi, indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus yaitu sebanyak 48 mg. selanjutnya diencerkan dengan minyak jagung dengan hasil akhir 4,2 ml untuk 16 ekor tikus. Induksi indometasin yang diperlukan untuk per ekor tikus yaitu 0,27 ml.

Lampiran 5. Penentuan dosis dan pembuatan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*)

Berdasarkan penelitian Gupta (2006) dosis eksperimental yang digunakan yaitu 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Hal ini dikarenakan dosis yang sering digunakan dalam penelitian menggunakan ekstrak daun kamboja putih antara 500 mg/kg BB sampai 2000 mg/kg BB.

Prosedur pembuatan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*)

Daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*)

- Ditimbang sebanyak 1000 gram.
- Dimasukkan ke dalam beker glass.
- Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:3.
- Direndam dan didiamkan pada suhu kamar minimal 2 x 24 jam, dengan sesekali diaduk.
- Disaring menggunakan kertas saring whatman no.40
- Dilakukan evaporasi untuk menghilangkan pelarut metanol dengan suhu 40-50 °C .
- Diuapkan pada suhu 40-50 °C untuk menghilangkan sisa metanol

Ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dalam bentuk pasta (semisolid)

Lampiran 6. Dosis Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

- **Kelompok Terapi 1 (500 mg/kg BB)**

Dosis untuk satu ekor tikus = $200/1000 \text{ kg} \times 500 \text{ mg}$

$$= 100 \text{ mg}$$

100 mg berat kering daun kamboja putih ini untuk satu ekor tikus

$$= 100 \times 4 \text{ (jumlah tikus satu kelompok)} \times 14 \text{ (hari)}$$

$$= 5600 \text{ mg}$$

$$= 5,6 \text{ gr}$$

5,6 gr ditambah dengan 56 ml aquades diberikan 1 ml untuk ekor tikus setiap hari

- **Kelompok Terapi 2 (750 mg/kg BB)**

Dosis untuk satu ekor tikus = $200/1000 \text{ kg} \times 750 \text{ mg}$

$$= 150 \text{ mg}$$

150 mg berat kering daun kamboja putih ini untuk satu ekor tikus

$$= 150 \times 4 \text{ (jumlah tikus satu kelompok)} \times 14 \text{ (hari)}$$

$$= 8400 \text{ mg}$$

$$= 8,4 \text{ gr}$$

8,4 gr ditambah dengan 56 ml aquades diberikan 1 ml untuk ekor tikus setiap hari

- **Kelompok Terapi 3 (1000 mg/kg BB)**

Dosis untuk satu ekor tikus = $200/1000 \text{ kg} \times 1000 \text{ mg}$
= 200 mg

200 mg berat kering daun kamboja putih ini untuk satu ekor tikus

= 200×4 (jumlah tikus satu kelompok) $\times 14$ (hari)

= 11200 mg

= 11,2 gr

11,2 gr ditambah dengan 56 ml aquades diberikan 1 ml untuk ekor tikus setiap hari



Lampiran 7. Pembedahan Hewan Coba

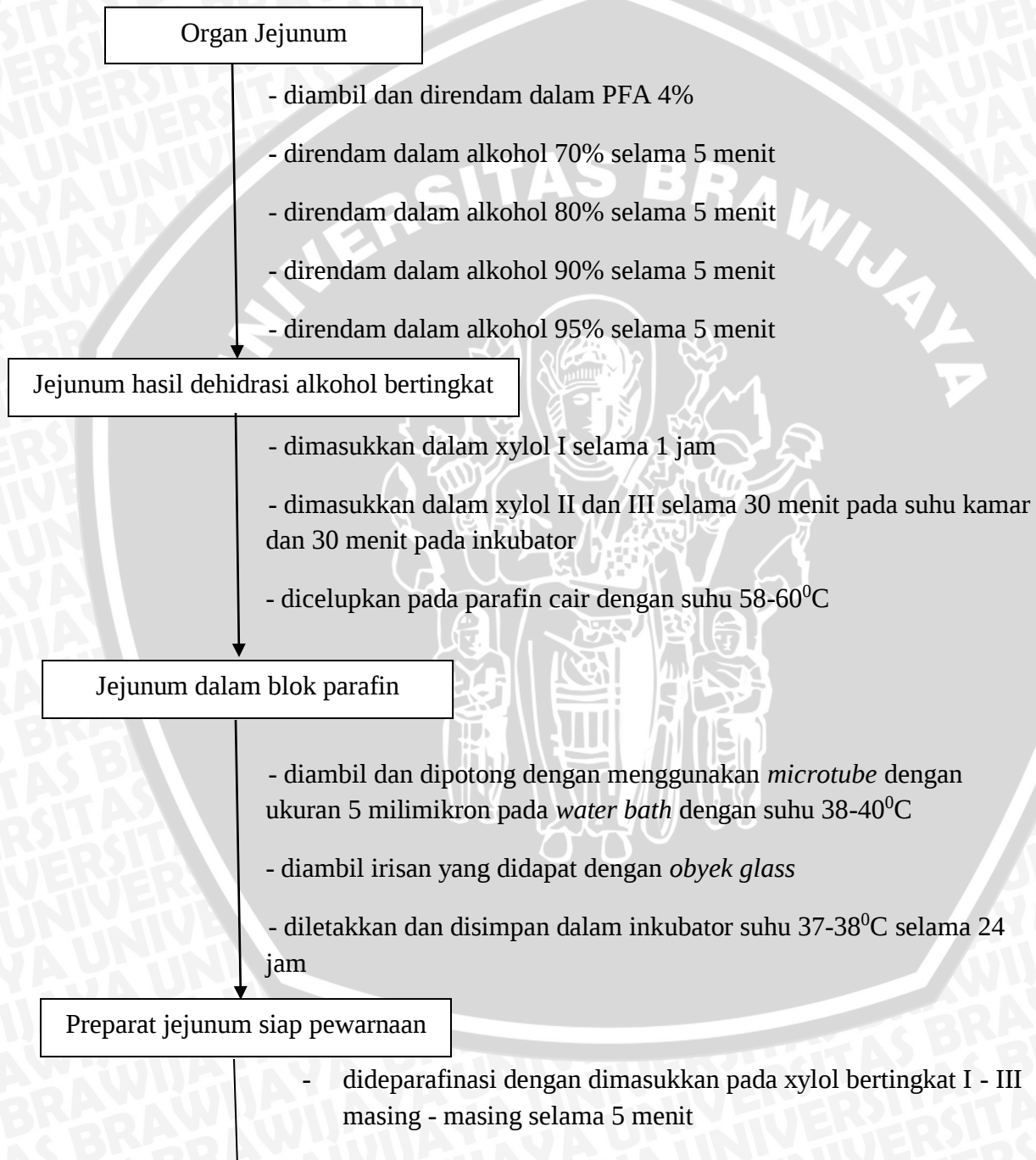
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu

- dieuthanasi dengan cara dislokasi leher
- diposisikan rebah dorsal
- difiksasi
- dibedah daerah thorax dengan melakukan insisi pada kulit dibawah os sternum
- dipotong os costae pada bagian lateral (dexter dan sinister) kemudian dikuakkan hingga terlihat organ dalam rongga *thorax*
- diambil organ dalam rongga thorax (jejunum)
- dipotong organ jejunum menjadi 2 bagian dan organ jejunum yang sudah dipotong disimpan dalam larutan PFA 4%

Organ Jejunum

Lampiran 8. Pembuatan Preparat dan Pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Organ Jejunum



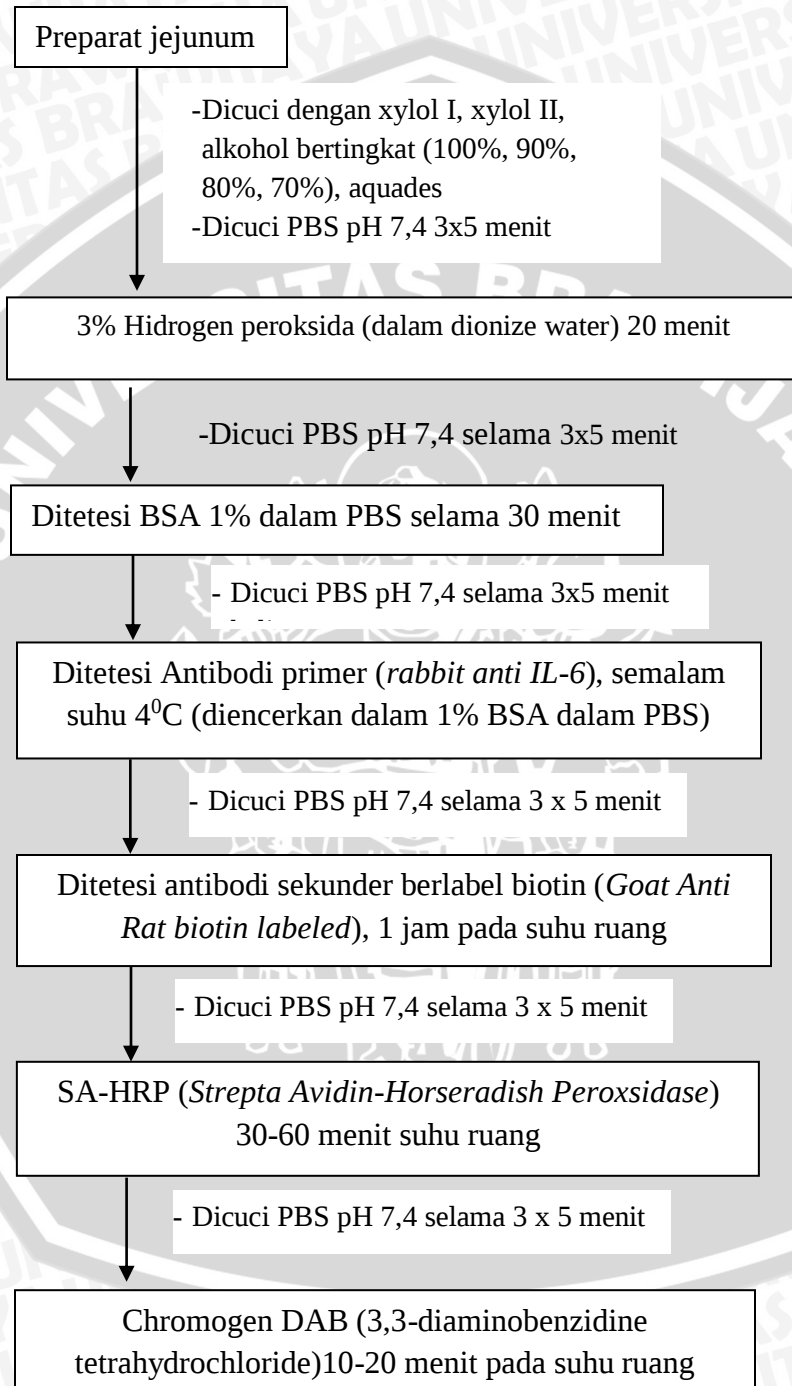
- direndam dalam alkohol 95% selama 5 menit
- direndam dalam alkohol 90% selama 5 menit
- direndam dalam alkohol 80% selama 5 menit
- direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit
- direndam dalam aquades selama 5 menit

Preparat Jejenum

- diwarnai dengan *hematoxyline* selama 10 menit
- dicuci dengan aquades selama 5 menit
- dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit
- dicuci dengan aquades selama 5 menit
- dimasukkan dalam alkohol 70% selama 5 menit
- dimasukkan dalam alkohol 80% selama 5 menit
- dimasukkan dalam alkohol 90% selama 5 menit
- dimasukkan dalam alkohol 95% selama 5 menit
- diclearing dalam xylol I – II masing – masing selama 3 menit dan dikering anginkan
- di *mounting* dengan menggunakan entellan dan ditutup dengan *cover glass*

Preparat jejenum pewarnaan HE

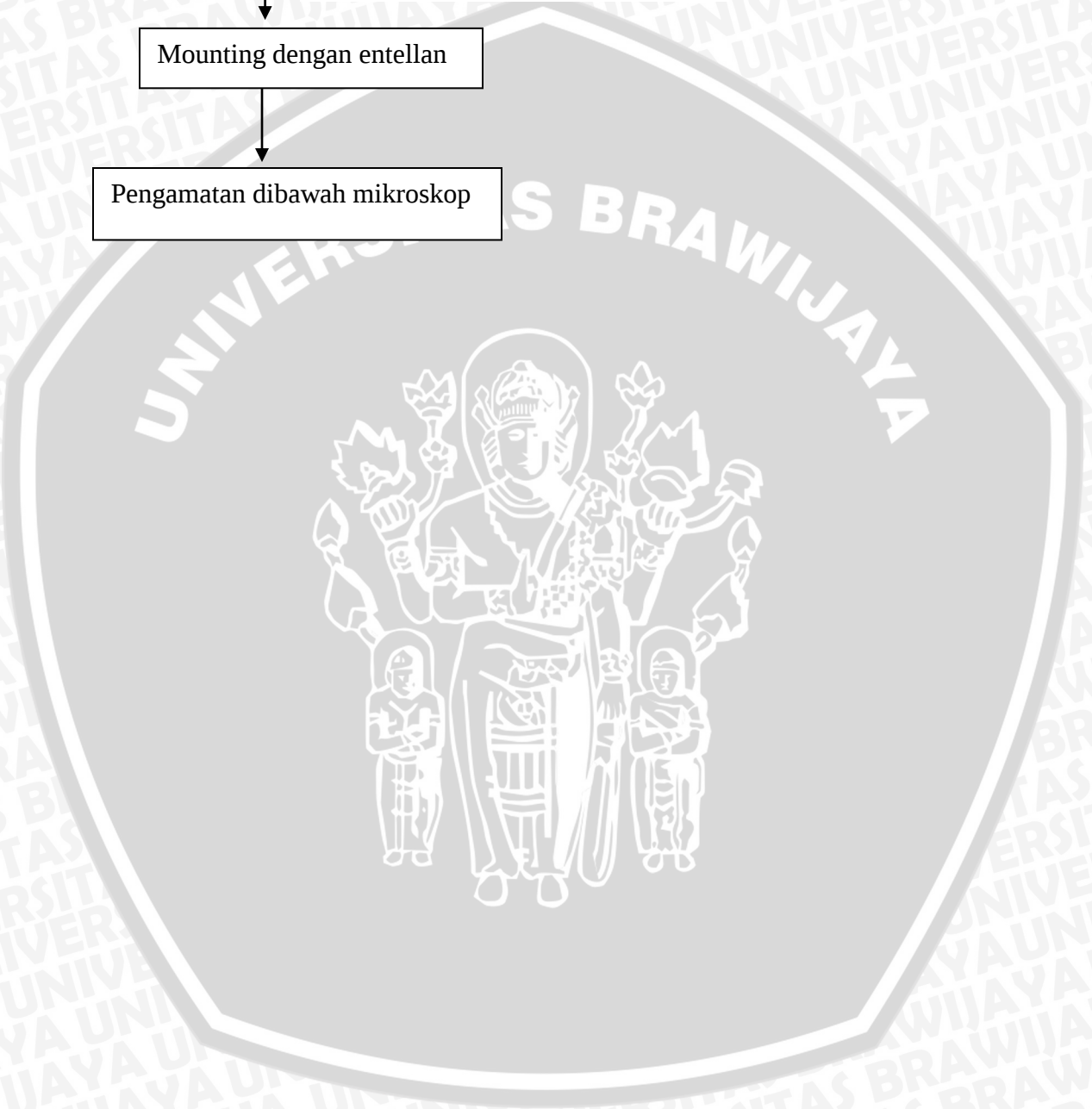
Lampiran 9. Metode Immunohistokimia Ekspresi IL-6



- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit

Mounting dengan entellan

Pengamatan dibawah mikroskop



Lampiran 10. Hasil Pengamatan Ekspresi IL-6

Tabel 10.1 Data *Interleukin-6* (IL-6)

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	U5	Rata-Rata
A (Kontrol negatif)	11,3	10,6	11,1	10,8	10,7	10,90
B (Kontrol positif)	97,8	98,1	98,3	97,8	98,0	98,00
C (Terapi 500 mg/kg BB)	61,1	61,5	60,9	61,4	61,6	61,30
D (Terapi 750 mg/kg BB)	38,8	39,1	39,6	38,7	39,2	39,08
E ((Terapi 1000 mg/kg BB)	15,3	14,8	15,1	14,9	15,0	15,02

Presentasi penurunan dan kenaikan dari ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin dan diterapi dengan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) adalah sebagai berikut :

Kelompok Positif

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Interleukin-6 (100\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Negatif}} \times 100\% \\
 &= \frac{98,00 - 10,90}{10,90} \times 100\% \\
 &= 799,08 \%
 \end{aligned}$$

Terapi I

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Interleukin-6 (100\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi I}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%
 \end{aligned}$$

$$= \frac{98,00 - 61,30}{98,00} \times 100\%$$

$$= 37,45 \%$$

Terapi II

Kadar *Interleukin-6* (100%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi II}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{98,00 - 39,08}{98,00} \times 100\%$$

$$= 60,12 \%$$

Terapi III

Kadar *Interleukin-6* (100%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi III}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{98,00 - 15,02}{98,00} \times 100\%$$

$$= 84,67 \%$$

Lampiran 11. Data dan Uji Statistika Ekspresi IL-6

a.

Uji Normalitas Data

Test of Normality

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum		Maximum
Kelompok perlakuan	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	5	10,900	,2915	,1304	10,538	11,262	10,6	11,3
Kontrol positif	5	98,000	,2121	,0949	97,737	98,263	97,8	98,3
Terapi 1	5	61,300	,2915	,1304	60,938	61,662	60,9	61,6
Terapi 2	5	39,080	,3564	,1594	38,638	39,522	38,7	39,6
Terapi 3	5	15,020	,1924	,0860	14,781	15,259	14,8	15,3
Total	25	44,860	32,8239	6,5648	31,311	58,409	10,6	98,3

b.

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ekspresiIL6

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,804	4	20	.537

c.

Uji One Way ANOVA

ANOVA

ekspresiIL6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25856,244	4	6464,061	85277,850	.000
Within Groups	1,516	20	.076		
Total	25857,760	24			

d.Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

ekspresiIL6

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
Kontrol negatif	Kontrol positif	-87.1000(*)	.1741	.000	-87.621	-86.579
	Terapi 1	-50.4000(*)	.1741	.000	-50.921	-49.879
	Terapi 2	-28.1800(*)	.1741	.000	-28.701	-27.659
	Terapi 3	-4.1200(*)	.1741	.000	-4.641	-3.599
Kontrol positif	Kontrol negatif	87.1000(*)	.1741	.000	86.579	87.621
	Terapi 1	36.7000(*)	.1741	.000	36.179	37.221
	Terapi 2	58.9200(*)	.1741	.000	58.399	59.441
	Terapi 3	82.9800(*)	.1741	.000	82.459	83.501
Terapi 1	Kontrol negatif	50.4000(*)	.1741	.000	49.879	50.921
	Kontrol positif	-36.7000(*)	.1741	.000	-37.221	-36.179
	Terapi 2	22.2200(*)	.1741	.000	21.699	22.741
	Terapi 3	46.2800(*)	.1741	.000	45.759	46.801
Terapi 2	Kontrol negatif	28.1800(*)	.1741	.000	27.659	28.701
	Kontrol positif	-58.9200(*)	.1741	.000	-59.441	-58.399
	Terapi 1	-22.2200(*)	.1741	.000	-22.741	-21.699
	Terapi 3	24.0600(*)	.1741	.000	23.539	24.581
terapi3	Kontrol negatif	4.1200(*)	.1741	.000	3.599	4.641
	Kontrol positif	-82.9800(*)	.1741	.000	-83.501	-82.459
	Terapi 1	-46.2800(*)	.1741	.000	-46.801	-45.759
	Terapi 2	-24.0600(*)	.1741	.000	-24.581	-23.539

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

d.Homogeneous Subsets

ekspresiIL6

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = .05				
		2	3	4	5	1
Kontrol negatif	5	10.900				
Terapi 3	5		15.020			
Terapi 2	5			39.080		
Terapi 1	5				61.300	
Kontrol positif	5					98.000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.