

# LAMPIRAN

## Lampiran A. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 744-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 :** TERAPI RIMPANG PLETEKAN (*Ruellia tuberosa* L)  
TERHADAP PERBAIKAN KADAR MDA (*MALONDIALDEHYDE*) DAN INSULIN PADA SERUM  
SERTA AKTIVITAS SOD (*SUPEROXIDE DISMUTASE*)  
DAN ORGAN GAMBARAN HISTOLOGI PADA ORGAN  
PANKREAS TIKUS DIABETES HASIL INDUKSI  
*MULTIPLE LOW DOSE STREPTOZOTOCIN (MLD-STZ)*

**PENELITI :** M. ASADULLAH

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT :** UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN :** LAIK ETIK

Malang, 25 Maret 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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

# Lampiran B. Surat Determinasi Tanaman Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)



## PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR DINAS KESEHATAN UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396

KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 087 / 102.7 / 2017  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Pletekan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : ALFIN NUR LAILY KURNIAWATI / 135090201111028  
YULIA HARDIYANTI / 135090201111003  
EVA NUR LAILI OKTAVIANA / 135090201111007  
NURWICHDATUL LILLA RESTIYAN / 135090200111032  
M. ASADULLAH / 146090200011010  
Instansi : JURUSAN KIMIA, FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

### 1. Perihal determinasi tanaman pletekan/ ceplikan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)  
Sub Kelas : Asteridae  
Ordo : Scrophulariales  
Famili : Acanthaceae  
Genus : *Ruellia*  
Spesies : *Ruellia tuberosa* L.

Nama Daerah : Pletekan, ceplikan (Jawa ).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250b-266b-267b-273b-276b-278b-279b-282b-283b-284b-285b-1a-2a-3a-4a-3

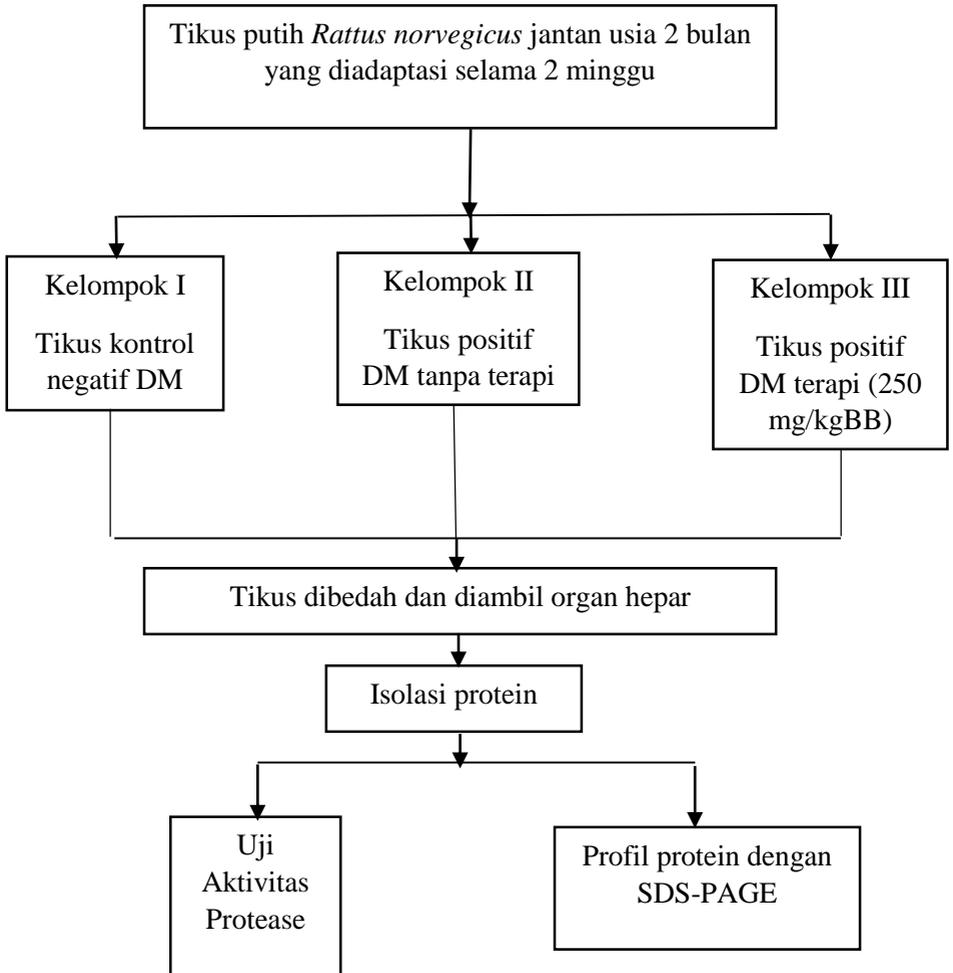
2. Morfologi : Habitus: Terna, semusim, tinggi 0.4-0.9m. Batang: Tegak, pangkal sedikit berbaring, bersegi, masif, hijau. Daun: Tunggal, bersilang berhadapan, bentuk solet, ujung membulat, pangkal runcing, tepi bergigi, panjang 6-18 cm, lebar 3-9cm, licin, pertulangan menyirip, hijau. Bunga: majemuk, bentuk payung, di ketiak daun, terdiri 1-15 bunga, kelopak 2-3cm, benang sari melekat pada tabung mahkota berjumlah 4, dasar mahkota membentuk tabung, ujung berlekuk 5, panjang 3.5-5cm, ungu. Buah: Kotak, lonjong, kering, berbiji banyak, panjang 2-3cm, membuka dengan dua katup, hijau. Biji: Bulat, kecil, coklat. Akar: Tunggang, membentuk umbi, coklat.
3. Nama Simplisia : *Ruelliae Radix* / Akar Ceplikan.
4. Kandungan Kimia : Daun dan akar mengandung saponin, disamping itu daunnya juga mengandung polifenol dan akarnya mengandung flavonoida.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
- Anonim. <http://www.plantamor.com/ceplikan>, diakses tanggal 28 Januari 2010.
  - Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/ceplikan>, diakses Tanggal 23 Januari 2007.
  - Anonim. 2009. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Obat Citeureup*. Badan POM, Direktorat Obat Asli Indonesia, Jakarta.
  - Syamsulhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
  - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 13 Maret 2017  
Kepala UPT Materis Medica Batu

Dr. Husin R.M. Drs. Apt., M.pKes.  
NIP.19611402199103 1 003

### Lampiran C. Skema Kerja Penelitian secara Umum



## Lampiran D. Preparasi Larutan dan Perhitungan

### D.1 Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,2 M

Dibuat larutan asam sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL dengan BM  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O = 210,14$  g/mol, maka:

$$\begin{aligned} \text{mol } C_6H_8O_7 \cdot H_2O &= [C_6H_8O_7 \cdot H_2O] \times V \text{ larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa } C_6H_8O_7 \cdot H_2O &= \text{mol } C_6H_8O_7 \cdot H_2O \times \text{BM } C_6H_8O_7 \cdot H_2O \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 210,14 \text{ g/mol} \\ &= 4,2 \text{ g} \end{aligned}$$

Sehingga, untuk membuat larutan asam sitrat 0,2 M 100 mL dibutuhkan 4,2 g padatan  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  yang kemudian dilarutkan dalam akuades. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan dengan akuades, lalu dikocok hingga homogen.

### D.2 Pembuatan Larutan Natrium Sitrat 0,2 M

Dibuat larutan natrium sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL dengan BM = 294,10 g/mol, maka:

$$\begin{aligned} \text{mol } Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O &= [Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O] \times V \text{ larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa } Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O &= \text{mol } Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O \times \text{BM} \\ & \quad Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 294,10 \text{ g/mol} \\ &= 5,88 \text{ g} \end{aligned}$$

Sehingga, untuk membuat larutan 100 mL natrium sitrat 0,2 M dibutuhkan 5,88 g padatan  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  yang kemudian dilarutkan dalam akuades. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan dengan akuades, lalu dikocok hingga homogen.

### D.3 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5

Pembuatan larutan buffer sitrat pH 4,5 dilakukan dengan mencampurkan larutan asam sitrat sebanyak 27,5 mL dengan larutan natrium sitrat sebanyak 22,5 mL. Setelah itu larutan diaduk dengan stirrer dan diatur pH larutan hingga pH menjadi 4,5.

#### D.4 Pembuatan Larutan Stok STZ

Pembuatan larutan Stok STZ dilakukan dengan menimbang padatan STZ sebanyak 100 mg yang kemudian dilarutkan dalam 3 mL larutan buffer sitrat pH 4,5. Setelah itu campuran larutan divorteks hingga homogen dan disimpan pada temperatur 4 °C.

#### D.5 Perhitungan Dosis Larutan STZ

Larutan STZ yang diinjeksikan pada hewan coba diambil dari larutan stok STZ yang ditambahkan larutan buffer sitrat pH 4,5. Dosis yang digunakan untuk injeksi hewan coba adalah 20 mg/kgBB. Volume larutan STZ yang dibutuhkan untuk injeksi dapat dihitung dengan persamaan di bawah ini:

$$\text{Volume campuran} = \frac{\frac{BB}{1000\text{ g}} \times 20\text{ mg}}{0,033} \times 1\ \mu\text{L}$$

$$\text{Volume STZ stok yang dibutuhkan} = \frac{\frac{BB}{1000\text{ g}} \times 20\text{ mg}}{0,067} 1\ \mu\text{L}$$

$$\text{Volume buffer sitrat} = V \text{ campuran} - V \text{ STZ stok}$$

#### D.6 Pembuatan Larutan NaCl fisiologis 0,9%

Pembuatan larutan NaCl fisiologis 0,9% dilakukan dengan menghitung massa NaCl yang dibutuhkan, dapat dihitung dengan perhitungan dibawah ini:

$$\text{Massa NaCl yang dibutuhkan} = \frac{0,9\text{ g}}{100\text{ mL}} \times 250\text{ mL} = 2,25\text{ g}$$

Jadi, 2,25 g NaCl dilarutkan dalam akuades secukupnya pada gelas kimia kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL dan ditandabatkan dengan akuades lalu dikocok hingga homogen.

#### D.7 Pembuatan Larutan Phospate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

Tahapan yang harus dilakukan adalah menimbang KCl sebanyak 0,2 gram, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 gram, NaCl 8 gram dan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O sebanyak 2,16 gram. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan 250 mL akuades steril menggunakan pengaduk magnetik stirer dalam gelas kimia 500 mL dan diatur pH nya hingga mencapai 7,4 dengan pH meter. Setelah itu dipindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tandabatas.

#### **D.8 Pembuatan Larutan TCA 4%**

Ditimbang TCA sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan dengan bufer fosfat pH 7 dalam gelas kimia 100 mL dan dituang dalam labu ukur 100 mL diencerkan sampai tanda batas.

#### **D.9 Pembuatan Larutan Kasein 500 ppm**

Ditimbang 0,250 gram kasein, kemudian dilarutkan dengan akuades dan di tambah beberapa tetes NaOH 1 N. Kemudian diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas.

#### **D.10 Pembuatan Larutan Stok tirosin 500 ppm**

Di timbang 0,250 gram tirosin, kemudian dilarutkan dengan 25 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas.

#### **D.11 Pembuatan Larutan Poliakrilamida (T-Akrid)**

Langkah awal yang harus dilakukan adalah ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,0801 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dengan 7 mL akuades steril dengan dihomogenkan menggunakan magnetik stirer. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

#### **D.12 Pembuatan Larutan Upper Gel Buffer (UGB) pH 6,8**

Larutan UGB dapat dibuat dengan mula-mula menimbang 0,75 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8. Selanjutnya, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

#### **D.13 Pembuatan Larutan Lower Gel Buffer (LGB) pH 8,8**

Tahapan yang harus dilakukan pertama kali adalah menimbang 1,32 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, lalu dilarutkan dengan 5 mL akuades steril dengan dihomogenkan dengan magnetik stirer serta diatur pHnya hingga 8,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

**Lampiran E. Hasil Uji Fitokimia Senyawa Bioaktif Ekstrak n-heksan Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)**

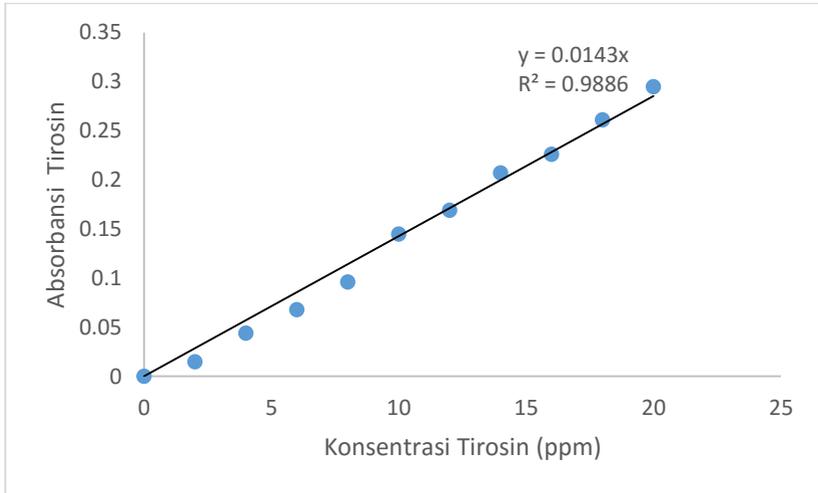


**Lampiran F. Pengukuran Kurva Baku Tirosin**

**Lampiran F.1 Tabel Absorbansi Tirosin**

<b>Tirosin [ppm]</b>	<b>Absorbansi rata-rata</b>
0	0
2	0.015
4	0.044
6	0.068
8	0.096
10	0.145
12	0.169
14	0.207
16	0.226
18	0.261
20	0.295

## Lampiran F.2 Kurva Baku Tirosin



## Lampiran G. Pengukuran Aktivitas Protease

### G.1 Tabel Pengukuran Absorbansi Sampel

	Tikus	Absorbansi			Rata-Rata Absorbansi
	<b>Kontrol Negatif</b>	1	0,118	0,117	0,118
2		0,096	0,094	0,094	0,095
3		0,122	0,122	0,122	0,122
4		0,121	0,123	0,122	0,122
5		0,130	0,130	0,129	0,130
6		0,147	0,147	0,148	0,147
<b>Kelompok Positif DM 1</b>	1	0,268	0,266	0,266	0,267
	2	0,289	0,287	0,288	0,288
	3	0,279	0,278	0,279	0,279
	4	0,299	0,298	0,299	0,299

	5	0,298	0,298	0,297	0,298
	6	0,288	0,289	0,289	0,289
<b>Kelompok Terapi 250 mg/kgBB</b>	1	0,181	0,183	0,182	0,182
	2	0,158	0,157	0,158	0,158
	3	0,157	0,157	0,158	0,157
	4	0,146	0,144	0,140	0,143
	5	0,109	0,109	0,110	0,109
	6	0,197	0,198	0,198	0,198

Lampiran G.2 Tabel Pengukuran Aktivitas Protease

	Tikus	[Tirosin]	Aktivitas Protease ( $\mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ )	Rata-rata Aktivitas Protease ( $\mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ )
<b>Kontrol Negatif</b>	1	8,228	0,038	0,039
	2	6,620	0,031	
	3	8,531	0,039	
	4	8,531	0,039	
	5	9,068	0,042	
	6	10,303	0,047	
<b>Kelompok Positif DM 1</b>	1	18,648	0,086	0,092
	2	20,140	0,093	
	3	19,487	0,090	
	4	20,886	0,096	
	5	20,816	0,096	
	6	20,186	0,093	
<b>Kelompok Terapi 250 mg/kgBB</b>	1	12,727	0,059	0,051
	2	11,026	0,051	
	3	11,002	0,051	
	4	10,023	0,046	
	5	7,646	0,035	
	6	13,823	0,064	

### Lampiran G.3 Perhitungan Konsentrasi Tirosin dalam Sampel

Didapatkan persamaan regresi linier dari kurva baku tirosin  $y=0,0143x$ . Dengan  $y$  adalah absorbansi sampel dan  $x$  adalah konsentrasi tirosin. Sehingga untuk mencari konsentrasi tirosin:

$$x = \frac{y}{0,0143}$$
$$x = \frac{0,118}{0,0143} = 8,228 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Maka nilai konsentrasi tirosin hasil hidrolisis protease pada sampel adalah 8,228  $\mu\text{g/mL}$ .

### Lampiran G.4 Perhitungan Aktivitas Protease

Unit aktivitas protease didefinisikan sebagai banyaknya jumlah tirosin hasil hidrolisis protein oleh protease dengan substrat kasein. Sehingga untuk mengukur aktivitas protease, digunakan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas Protease} = \frac{[\text{Tirosin}]}{BM \text{ Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Keterangan:

$v$  = volume total sampel (mL)

$p$  = jumlah enzim (mL)

$q$  = waktu inkubasi (menit)

$fp$  = faktor pengenceran

### Lampiran H. Hasil Uji Statistika

#### Tabel H.1 Uji Homogenitas

#### Kadar Glukosa

VAR00002

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.707	2	15	.215

\* $p > 0.05$  tidak berbeda

## Tabel H.2 Uji Normalitas Data

### Kadar Glukosa

VAR00001	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
VAR00002	1.00	.114	6	.200	.996	6	.998
	2.00	.202	6	.200*	.919	6	.496
	3.00	.317	6	.060	.881	6	.275

\* $p > 0,05$  tidak berbeda

## Tabel H.3 Uji Statistika ANOVA

### Kadar Glukosa

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	161593.444	2	80796.722	190.493	.000
Within Groups	6362.167	15	424.144		
Total	167955.611	17			

\* $p < 0,05$  terdapat perbedaan antar perlakuan

## Tabel H.4 Uji BNJ (Beda Nyata Jujur)

### Kadar Glukosa

Tukey HSD

(i) VAR00001	(j) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-216.5000	11.89039	.000	-247.3849	-185.6151
	3.00	-35.83333*	11.89039	.022	-66.7183	-4.9484
2.00	1.00	216.50000*	11.89039	.000	185.6151	247.3849
	3.00	180.66667*	11.89039	.000	149.7817	211.5516
3.00	1.00	35.83333*	11.89039	.022	4.9484	66.7183
	2.00	-180.66667*	11.89039	.000	-211.5516	-149.7817

### Tabel H.5 Pemberian Notasi pad Uji BNJ

#### Kadar Glukosa

Tukey HSD<sup>a</sup>

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	6	83.1667		
3.00	6		119.0000	
2.00	6			299.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

### Tabel H.6 Uji Homogenitas

#### Aktivitas Protease

\*

#### Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
VAR00002	Based on Mean	1.299	2	15	.302
	Based on Median	1.329	2	15	.294
	Based on Median and with adjusted df	1.329	2	10.035	.308
	Based on trimmed mean	1.365	2	15	.285

\* $p > 0,05$  tidak berbeda

### Tabel H.7 Uji Normalitas Data

#### Aktivitas Protease

#### Tests of Normality

VAR00001		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00002	1.00	.229	6	.200*	.945	6	.696
	2.00	.218	6	.200*	.922	6	.522
	3.00	.168	6	.200*	.968	6	.876

\* $p > 0,05$  tidak berbeda

## Tabel H.8 Uji Statistika ANOVA

### Aktivitas Protease

**ANOVA**

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.009	2	.005	97.055	.000
Within Groups	.001	15	.000		
Total	.010	17			

\* $p < 0,05$  terdapat perbedaan antar perlakuan

## Tabel H.9 Uji BNJ (Beda Nyata Jujur)

### Aktivitas Protease

**VAR00002**

Tukey HSD

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	6	.039350		
3.00	6		.050833	
2.00	6			.092200
Sig.		1.000	1.000	1.000