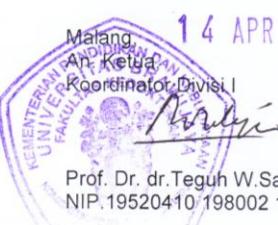


LAMPIRAN**Lampiran 1. Lembar Keterangan Kelaiakan Etik**

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF BRAWIJAYA KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE Jalan Veteran Malang – 65145 Telp./ Fax. (62) 341 - 553930
KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")	
No. 264 / EC / KEPK – PKM / 04 / 2015	
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN	
JUDUL	: NEUROLASTICA (<i>Neuroprotective Effect of Cebtella asiatica</i>) Potensi Phytosome Terhadap Ekspresi Krox-20, Distribusi Fosfolipid, Ekspresi Neuregulin-1 (NRG-1) dan Tingkat Kognitif pada Tikus Model Traumatic Brain Injury (TBI)
PENELITI	: Alif Fariz Jazmi Putri Fitri Alifiantya Sitti Ayu Hemas Nurarifah Erlin Aditia Purmitasari Lilin Andreas Vitania
UNIT / LEMBAGA	: PKM – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang
TEMPAT PENELITIAN	: Laboratorium Biomedik, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Patologi Anatomi, Laboratorium Fitokimia dan Fitoterapi FKUB
DINYATAKAN LAIK ETIK.	
 Malang 14 APR 2015 An. Ketua Koordinator Divisi I Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpPark NIP. 19520410/198002 1 001	
Catatan : Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).	



FORMULIR ETIK PENELITIAN KESEHATAN

1.	<p>Peneliti :</p> <p>Alif Fariz Jazmi 125070107111051 Putri Fitri Alfiantya 115070107111061 Sitti Ayu Hemas Nurarifah 125070100111093 Erlin Aditia Purmitasari 125070507111015 Lilin Andreas Vitania 135070501111002</p> <p>Dibawah bimbingan komisi pembimbing Wibi Riawan, S.Si.</p>
2.	Judul Penelitian : <i>NEUROLASTICA (Neuroprotective Effect of Centella asiatica) Potensi Phytosome terhadap Ekspresi Krox-20, Distribusi Fosfolipid, Ekspresi Neuregulin-1 (NRG-1) dan Tingkat Kognitif pada Tikus Model Traumatic Brain Injury (TBI)</i>
3.	Subyek : Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) jantan usia 4-5 bulan dengan berat badan 200-300 gram.
4.	Perkiraan waktu Penelitian: 3 bulan
5.	<p>Ringkasan usulan penelitian yang mencakup objektif/tujuan penelitian, manfaat/relevansi dari hasil penelitian dan alasan/motivasi untuk melakukan penelitian.</p> <p>a. Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk membuktikan potensi <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) sebagai neuroprotektor yang ditandai dengan peningkatan ekspresi <i>Krox-20</i>, perbaikan membran sel saraf, dan peningkatan fungsi kognitif. Sementara, tujuan khususnya adalah untuk mengatahui pengaruh pemberian <i>phytosome</i> ekstrak pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap peningkatan aktivasi <i>Krox-20</i> pada model tikus TBI, perbaikan membran sel saraf pada model tikus TBI, peningkatan ekspresi NRG-1 pada model tikus TBI, dan perbaikan fungsi kognitif pada model tikus TBI.</p> <p>b. Manfaat dari penelitian ini adalah dapat dijadikan sebagai dasar teori pengembangan penelitian dan menambah wawasan ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai potensi <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan sebagai modulator <i>Krox-20</i> dalam proses perbaikan sel saraf dan peningkatan fungsi kognitif. Sekaligus juga dapat dijadikan sebagai dasar untuk memberikan informasi kepada kalangan perindustrian obat tentang kegunaan teknologi <i>phytosome</i> guna meningkatkan efek terapeutik dari sediaan obat.</p>

	c. Motivasi untuk melakukan penelitian ini adalah mengembangkan <i>phytosome</i> di Indonesia dan pengaruhnya terhadap efek neuroprotektor.
6.	<p>Masalah etik (nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin dihadapi)</p> <p><i>Prinsip 3R (Reduction, Refinement, Replacement)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pada penelitian <i>trauma brain injury</i>, hewan coba yang biasa digunakan adalah tikus wistar jantan. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan tikus sebagai hewan coba. • Setelah dilakukan perhitungan jumlah sampel, maka dibutuhkan sampel hewan coba erupa tikus minimal sebanyak 30 yang dibagi menjadi 5 kelompok penelitian (masing-masing sebanyak 6 ekor tikus), sehingga pada penelitian ini digunakan sampel sebanyak 30 tikus. • Tikus diperlakukan sebaik mungkin sesuai standar yang telah ditentukan pada penelitian ini dengan memperhatikan tingkat kesejahteraan hewan dengan menerapkan prinsip 5 F. Setelah pembedahan dan pengambilan spesimen, dicukur dan dibersihkan dengan povidone iodine 10%. Silinder besi seberat 10 gram (diameter 4mm) dijatuhkan dari ketinggian 25 cm menggunakan tabung silinder besi sepanjang 25 cm dan diamter 5 mm untuk mengarahkan beban ke atas kulit kepala yang telah dicukur bulunya sebanyak 1 kali. Tabung dijaga agar tetap membentuk sudut 90° dengan jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara. • Perlakuan pada hewan coba <ul style="list-style-type: none"> - Hewan percobaan tikus jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 6 ekor untuk masing-masing kelompok - Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi tiga ekos tikus) - Tikus diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan. - Selama masa aklimatisasi, tikus sudah dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok K_p, K_n, P₁, P₂, P₃. Selama satu minggu masa aklimatisasi dan selama penelitian, tikus telah diberikan standar diet normal di Laboratorium Fisiologi. Pada saat penelitian berlangsung, minuman diberikan secara <i>ad libitum</i>. Sekam diganti setiap 2 hari sekali. - Perlakuan dilakukan secara bersamaan selama 14 hari (2 minggu). - Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus (asupan makanan tikus). - Dua jam setelah induksi, dilakukan perlakuan sebagai berikut: K_p : tikus diinduksi TBI tanpa diberikan <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan maupun <i>citicoline</i> K_n : tikus sehat tanpa diberikan perlakuan apapun P₁ : tikus diinduksi TBI dan diberikan <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan dosis



	<p>180 mg/kgBB P_2 : tikus diinduksi TBI dan diberikan <i>citicoline</i> dosis 250 mg/kgBB P_3 : tikus diinduksi TBI dan diberikan <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan beserta <i>citicoline</i></p> <p>Sebelum hewan coba diinjeksi, dilakukan pembersihan daerah yang akan diinjeksi menggunakan kapas yang telah ditetesi oleh alkohol 70%. Injeksi diulang setiap hari secara intraperitoneum selama dua minggu.</p> <p>- Pada akhir penelitian, semua tikus di-eutanasia untuk diambil jaringan otaknya dan darahnya sebagai bahan pengukuran aktivasi <i>Krox-20</i>, distribusi fosfolipid, dan ekspresi <i>Neuregulin-1</i> (NRG-1).</p> <p>Prinsip 5F (<i>Freedom from hunger and thirsty, freedom from discomfort, freedom from pain, injury and disease, freedom from fear and distress, freedom to express natural behaviour</i>)</p> <ul style="list-style-type: none">• Rasa lapar dan haus pada hewan coba. Untuk mengatasinya maka pemberian pakan sebanyak 30 gram setiap harinya dan minum <i>ad libitum</i>.• Rasa tidak nyaman pada hewan coba karena ditempatkan di dalam kandang. Untuk mengatasinya maka pembersihan kandang dan pemunggantian sekam dilakukan setiap dua hari sekali.• Rasa sakit, luka dan penyakit pada hewan coba. Kemungkinan hewan coba akan merasa sakit karena diinduksi TBI, maka induksi dilakukan oleh orang yang berpengalaman dan sebelum induksi TBI hewan coba dianastesi terlebih dahulu dengan pemberian anestesi berupa obat anestesi phenobarbital intraperitoneum (30mg/kgBB). Selain itu, digunakan <i>syringe</i> yang baru dan sudah disterilisasi untuk mencegah kemungkinan infeksi. Sedangkan, untuk menghilangkan rasa sakit pada saat dibedah maka hewan coba dieuthanasia menggunakan eter dengan spesimen yang diambil adalah jaringan otak. Sebelum dibedah kondisi tikus dipastikan tidak lagi bernapas dan bergerak. Semua prosedur dilakukan se-higienis mungkin untuk meminimalisasi terjadinya infeksi atau penyakit lain, termasuk pada saat pembuatan <i>phytosome</i> dimana pada akhir pembuatan dilakukan sterilisasi untuk meminimalisasi kontaminasi pada <i>phytosome</i> sebelum diinjeksikan pada hewan coba.• Rasa takut dan stress pada hewan coba. Untuk mengatasinya, sebelumnya dilakukan aklimatisasi pada hewan coba selama 7 hari.• Kebebasan hewan coba mengekspresikan tingkah laku alamiah. Untuk mengatasinya maka disediakan luasan kandang yang cukup dan kualitas kandang yang baik.
7.	Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk pemulih penelitian ini pada manusia Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia.
8.	Prosedur penelitian yang dilakukan : 1. Ekstraksi Pegagan

- Setiap 2 kg serbuk simplisia tanaman ditambahkan 10L etanol 70% dan dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam kemudian dilakukan proses remerasensi. Filtrat disaring, diuapkan dengan *rotary evaporator* (suhu 30°C) dan dikeringkan dengan *vacuum drying* (George *et al.*, 2009; Pramono dan Ajiastuti, 2004).
2. Pembuatan *Phytosome*
Melalui metode sonikasi dengan mencampur lecithin, etanol 70%, ekstrak Pegagan, PEG dan natrium cholat, lalu distirer 3 jam dengan magnetig stirer 2000 rpm. Pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dihidrasi dengan aqua bebas CO₂ (Acharya, 2011).
3. Induksi *Traumatic Brain Injury (TBI)*
Tikus dianastesi dengan xyla (5mg/kgBB) dan ketamin (50mg/kgBB) IM. Bulu kepala dicukur, dibersihkan dengan alkohol 70% dan dibuka. Silinder besi ujung runcing seberat 450 gram (diameter 4mm) dijatuhkan dari ketinggian 1 meter menggunakan tabung silinder besi untuk mengarahkan beban ke atas kepala tikus sebanyak 1 kali. Tabung dijaga tetap membentuk sudut 90° dengan jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara. Sepuluh menit setelah induksi, 1 kelompok perlakuan diberi *phytosome* ekstrak Pegagan, 1 kelompok perlakuan diberi *CDP-Choline*, dan 1 kelompok diberi gabungan keduanya melalui injeksi IP.
4. Pemeriksaan Aktivasi *Krox-20*, Distribusi Fosfolipid, dan Eksresi *Neuregulin-1* (NRG-1)
Sampel yang sudah diblok dengan parafin di deparafinasi lalu disimpan selama 24 jam dan dilakukan pengecatan IHK. Sampel dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 2x5 menit, tetesi larutan H₂O₂ selama 30 menit, cuci dengan PBS sebanyak 3x5 menit, lakukan *blocking protein* dengan serum 1% selama 20 menit, cuci dengan PBS 3x5 menit, inkubasi dengan masing-masing antibodi primer dalam serum 1:500 selama 2 jam pada suhu ruang, cuci dengan PBS 3x5 menit, inkubasi dengan masing-masing antibodi sekunder 1:500 selama 1 jam pada suhu ruang, cuci dengan PBS 3x5 menit, tetesi polimer selama 40 menit, cuci dengan PBS 2x5 menit, cuci dengan aquadest sebanyak satu kali, tetesi dengan *diamono benzidine* (DAB) dan dibiarkan selama 20 menit, cuci dengan aquadest, tetesi dengan *mayer hematoxilen* selama 5 menit, tambahkan aquadest, diamkan selama 10 menit, cuci dengan aquadest mengalir, keringkan selama 3 jam, tetesi dengan entelan, dan terakhir tutup dengan coverslip (Fatmawati *et al.*, 2010). Slide hasil pengecatan diperiksa menggunakan program *Scan Dot Slide OlyVIA*. Kemudian dilakukan pemeriksaan aktivasi *Krox-20*, distribusi fosfolipid, dan eksresi NRG-1, dengan pembesaran 40x obyektif dengan 20 lapang pandang pada tiap slide.
5. Penilaian Fungsi Kognitif
Tikus dilepaskan di salah satu sisi dari kolam buatan (diameter 1m kedalaman 0,5m) dengan suhu air 22-24°C yang terdapat pelampung gabus berdiameter 10 cm di sisi yang berlawanan dengan posisi tikus. Penilaian



	<p>berupa analisis kuantitatif terhadap waktu yang ditempuh tikus berenang mencapai pelampung gabus. (Manuscript, 2008).</p> <p>6. Prosedur Pengumpulan dan Analisia Data</p> <p>Hasil penghitungan aktivasi <i>Krox-20</i>, distribusi fosfolipid, dan ekspresi NRG-1 dianalisa menggunakan program <i>IBM SPSS Statistics 20</i> dengan tingkat signifikansi 0,05 dan taraf kepercayaan 95%. Langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji One-way ANOVA, Post hoc test,dan Uji korelasi Pearson (Dahlan, 2004).</p>
9	<p>Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung, segera atau kemudian dan cara-cara untuk mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rasa tidak nyaman pada hewan coba karena ditempatkan di dalam kandang : dilakukan pembersihan kandang dan pengantian sekam setiap hari (kebersihan kandang, makanan, dll). • Rasa sakit pada hewan coba karena diinduksi TBI dan diinjeksi <i>phytosome</i> : penyuntikan dilakukan oleh oorang yang berpengalaman, penggunaan <i>syringe</i> yang baru dan sudah distreilisasi untuk mencegah kemungkinan infeksi. • Rasa sakit pada hewan coba saat pembedahan : dilakukan prosedur eutanasia menggunakan eter terlebih dahulu sebelum dilakukan prosedur pembedahan. Pembedahan dilakukan oleh tenaga ahli yang sudah berpengalaman.
10.	<p>Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dan tindakan yang hendak diterapkan.</p> <p>Pengalaman terdahulu sudah pernah melakukan induksi TBI, pembedahan dan pengambilan jaringan otak.</p>
11.	<p>Bila penelitian ini menggunakan orang sakit dan dapat memberi manfaat untuk subyek yang bersangkutan, uraikan manfaat itu ?</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan orang sakit.</p>
12.	<p>Bagaimana memilih pasien/sukarelawan sehat</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan pasien/sukarelawan.</p>
13.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, jelaskan hubungan antara peneliti dengan subyek yang diteliti</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia.</p>
14.	<p>Bila penelitian ini menggunakan orang sehat, jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan manusia.</p>
15.	<p>Jelaskan cara pencatatan selama penelitian, efek samping dan komplikasi bila ada</p> <p>Pencatatan selama penelitian dilakukan setiap harinya pada logbook penelitian.</p>
16.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, jelaskan bagaimana cara memberitahu dan mengajak subyek (lampirkan contoh surat persetujuan subyek)</p> <p>Bila pemberitahuan dan kesediaan subyek bersifat lisan atau bila karena sesuatu hal subyek tidak dapat atau tidak perlu dimintakan persetujuan, berilah alasan</p>



	yang kuat untuk itu Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia.
17.	Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, apakah subyek mendapat ganti rugi bila ada efek samping? Berapa banyak? Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia.
18.	Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, apakah subyek diasuransikan? Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia.

Peneliti

1. Alif Fariz Jazmi	125070107111051	
2. Putri Fitri Alfiantya	115070107111061	
3. Sitti Ayu Hemas Nurarifah	125070100111093	
4. Erlin Aditia Purmitasari	125070507111015	
5. Lilin Andreas Vitania	135070501111002	

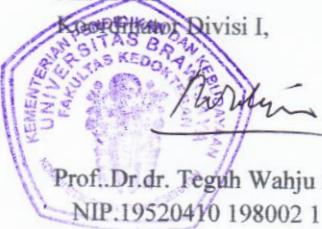
Pembimbing :

1. Wibi Riawan, S.Si.	0031017703	
-----------------------	------------	---------------------------------------------------------------------------------------

14 APR 2015

Telah diperiksa dan disetujui pada tanggal

An. Ketua



Prof..Dr.dr. Teguh Wahju Sardjono DTM& H, MSc, SpParK
NIP.19520410 198002 1 001



Lampiran 2. Surat Determinasi Tanaman Pegagan**UPT MATERIA MEDICA**Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074/034/101.8/2015
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Pegagan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ALIF FARIS JAZMI
NIM : 125070107111051
Fakultas : KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Umbellales
Suku : Umbelliferae
Marga : Centella
Jenis : *Centella asiatica* (Linn). Urban.
Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* Linn, = *Pasequinus* Rumph.
Nama Daerah : Pegagan, gagan-gagan, rendeng, kerok batok (Jawa), daun kaki kuda (Indonesia), pegaga (Ujung Pandang), antanan gede, antanan rambat (Sunda), dau tungke (Bugis), kos tekosan (Madura), kori-kori (Halmahera).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b- 249b-250b-266b-267a-268a-269a-2b-3.

2. Morfologi : Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10-80 cm. Akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1-7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5-50 mm. Buah kecil bergantung yang bentuknya lonjong/pipih panjang 2-2.5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit.

3. Nama Simplicia : *Centellae Herba/ Herba Pegagan*.

4. Kandungan : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasianic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, dan zat samak. Senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra. Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergepnoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi.

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 1977. *Materia Medica Indonesia "Jilid I"*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. 2007. *Serial Tanaman Obat "PEGAGAN"*. Badan POM Republik Indonesia.
- Anonim. <http://www.iptek.net.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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

Batu, 19 Januari 2015

Kepala UPT MATERIA MEDICA Batu



Drs. Husin RM, Apt, MKes.

Lampiran 3. Prosedur Pembuatan Aqua Bebas CO₂

Prosedur pembuatan aqua bebas CO₂ adalah sebagai berikut.

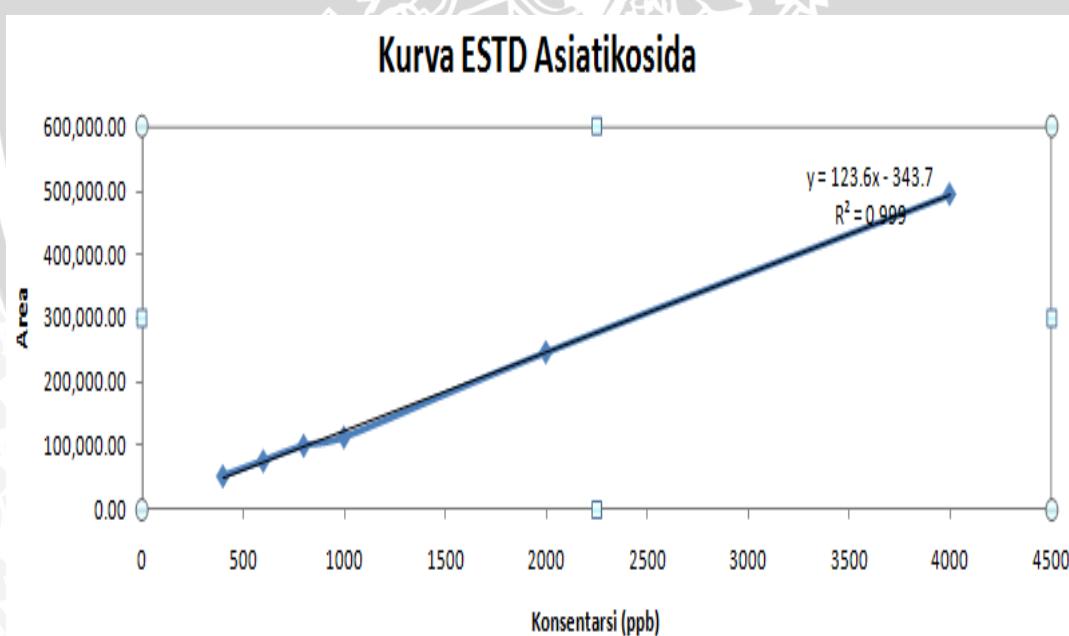
1. Diukur aqua bidestilata yang dibutuhkan
2. Dimasukkan ke dalam botol kaca atau erlenmeyer
3. Kemudian ditutup dengan aluminium foil yang dilubangi dengan jarum
4. Kemudian dilakukan sonikasi dengan *bath sonicator*
5. Diperoleh aqua bebas CO₂



Lampiran 4. Penetapan Kadar Asiatikosida Ekstrak Etanol 70% Pegagan dengan Menggunakan Metode LC-MS/MS

a. Uji Linearitas

Konsentrasi (ppb)	Luas area [Y]
400	52624.01
600	76612.08
800	100611.63
1000	113744.37
2000	247232.80
4000	495510.96



Dalam pembuatan kurva baku digunakan lima konsentrasi, yaitu 200 ppb, 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb, dan 2000 ppb, sehingga didapatkan persamaan kurva baku, $y = 123,68x - 343,75$ dengan $R^2 = 0,9992$. Kurva baku

digunakan untuk menentukan kadar yang terukur pada sampel, sehingga selanjutnya dapat dilakukan perhitungan kadar terhitung yang telah dikalikan dengan faktor pengenceran, dimana untuk penelitian ini menggunakan faktor pengenceran 200 μl dalam 1 ml pelarut.

b. Uji LOD dan LOQ

Konsentrasi (ppb)	Luas area [Y]	Luas area berdasarkan persamaan regresi [Y1]	[Y-Y1]	$[Y-Y1]^2$	Akar total $[Y-Y1]^2$
400	52624.01	49128.25	3495.6	12220338	10823.825
600	76612.08	73864.25	2747.83	7550569.7	
800	100611.63	98600.25	2011.38	4045649.5	
1000	113744.37	123336.25	-9591.88	92004162	
2000	247232.80	247016.25	216.55	46893.902	
4000	495510.96	494376.25	1134.71	1287566.8	

Parameter	Nilai
Simpangan baku residual ($S_{y/x}$)	2705.956
Limit deteksi	65.6361 ppb
Limit kuantitas	218.7869 ppb

c. Uji Selektifitas

Nama	Replikasi	Luas Area	Retention Time (RT)
Sampel 1 (ekstrak tanpa larutan baku)	1	575065	3.38
	2	576990	3.38
	3	576289	3.38

	Rata-rata	576114.67	
Sampel 2 (sampel ekstrak + larutan baku 0.5 ppm)	1	589066	3.38
	2	588878	3.37
	3	589576	3.38
	Rata-rata	589173.33	
Sampel 3 (sampel ekstrak + larutan baku 0.75 ppm)	1	594898	3.38
	2	593714	3.38
	3	594991	3.38
	Rata-rata	594534.33	
Sampel 4 (sampel ekstrak + larutan baku 1.0 ppm)	1	600796	3.37
	2	599802	3.37
	3	602476	3.37
	Rata-rata	601024.67	
	Rata-rata	601024.67	

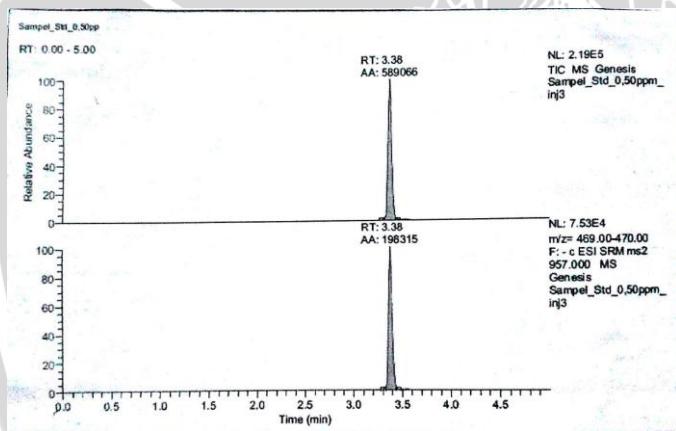
d. Uji Akurasi

Nama	Replikasi	Luas Area	Konsentrasi terhitung (ppb)	% recovery
Sampel 1 (ekstrak tanpa larutan baku)	1	575065	23261.997	
	2	576990	23339.616	
	3	576289	23311.479	
	Rata-rata	576114.67	23304.431	
Sampel 2 (sampel ekstrak + larutan baku 0.5 ppm)	1	589066	23828.014	104.716
	2	588878	23820.414	103.196
	3	589576	23848.632	108.840
	Rata-rata	589173.33	23832.353	105.584
Sampel 3	1	594898	24063.784	101.247

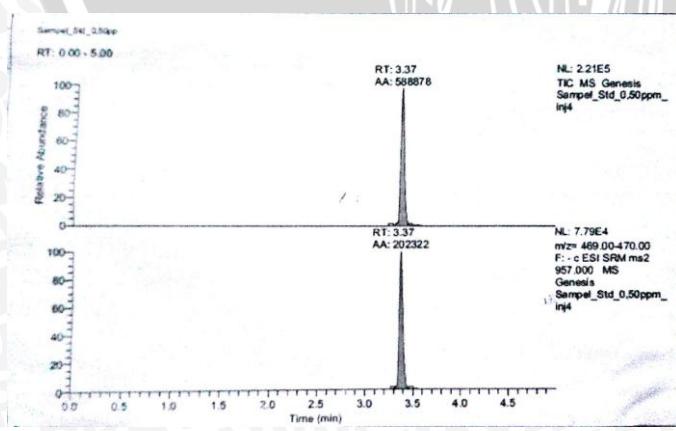
(sampel ekstrak + larutan baku 0.75 ppm)	2	593714	24015.918	94.867
	3	594991	24067.543	101.748
	Rata-rata	594534.33	24049.083	99.287
Sampel 4 (sampel ekstrak + larutan baku 1.0 ppm)	1	600796	24302.221	99.779
	2	599802	24262.037	95.761
	3	602476	24370.139	106.571
	Rata-rata	601024.67	24311.466	100.703

e. Kromatogram Hasil LC-MS/MS

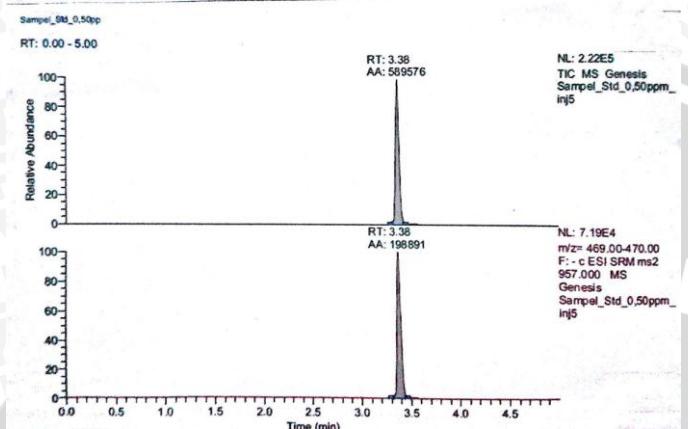
1)



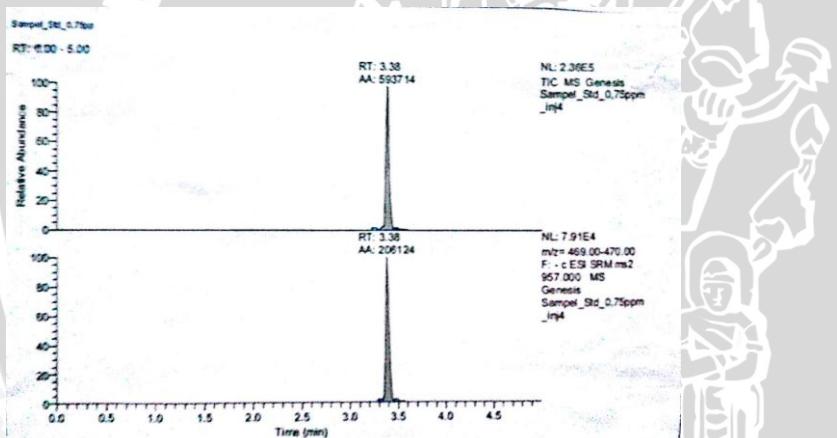
2)



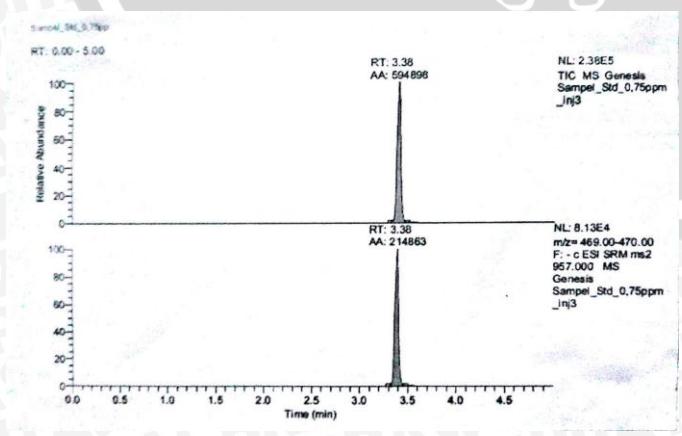
3)



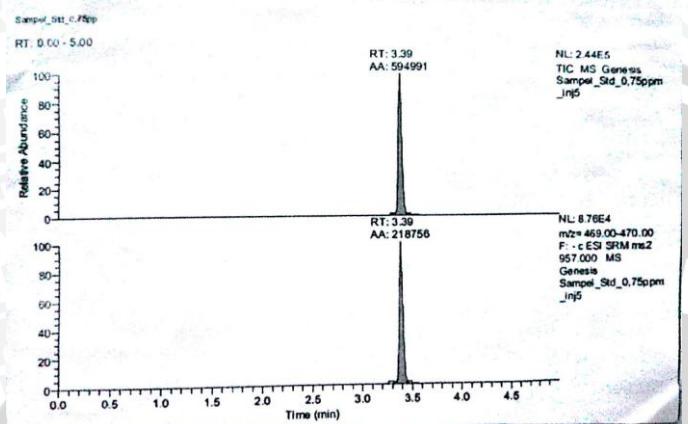
4)



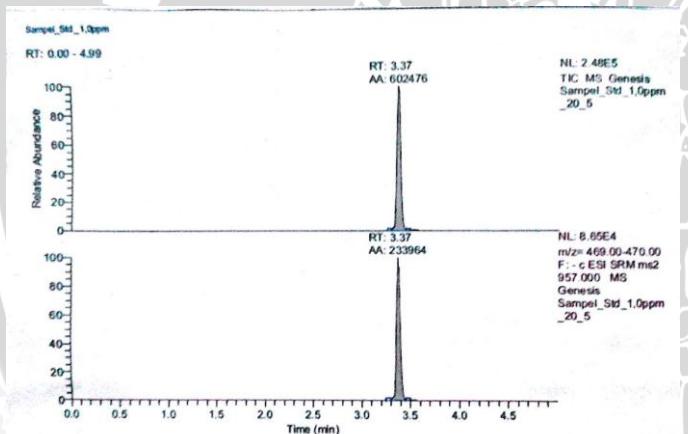
5)



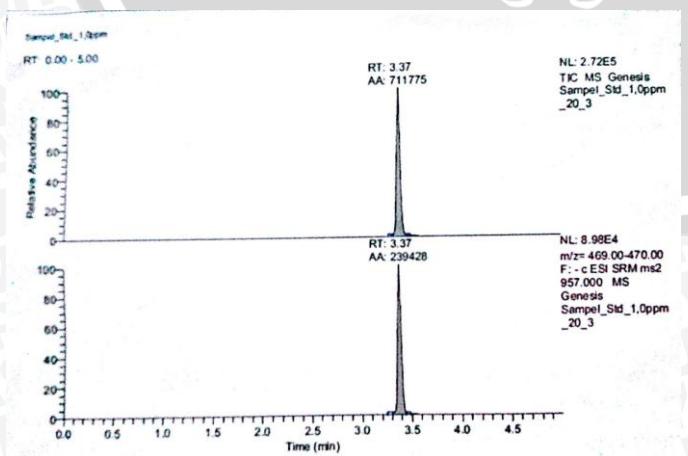
6)



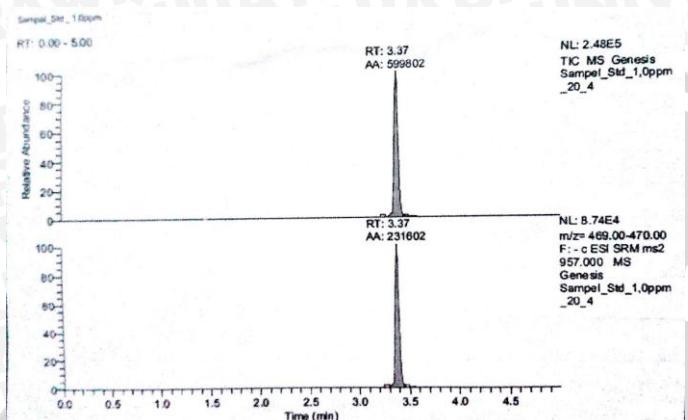
7)



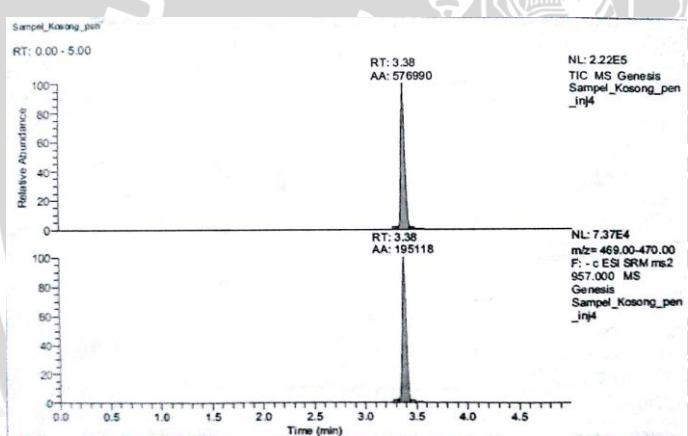
8)



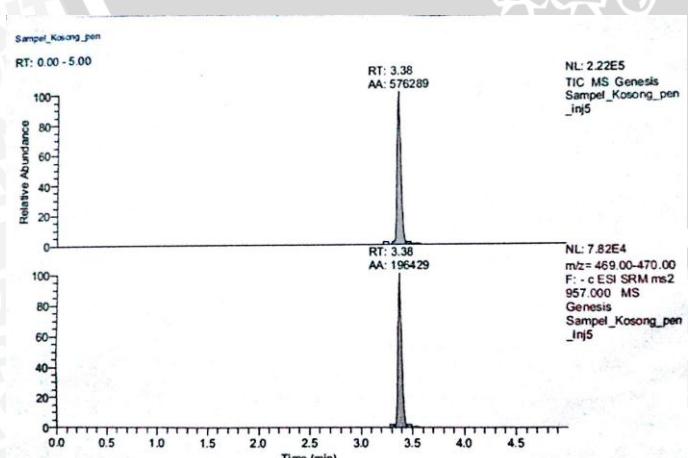
9)



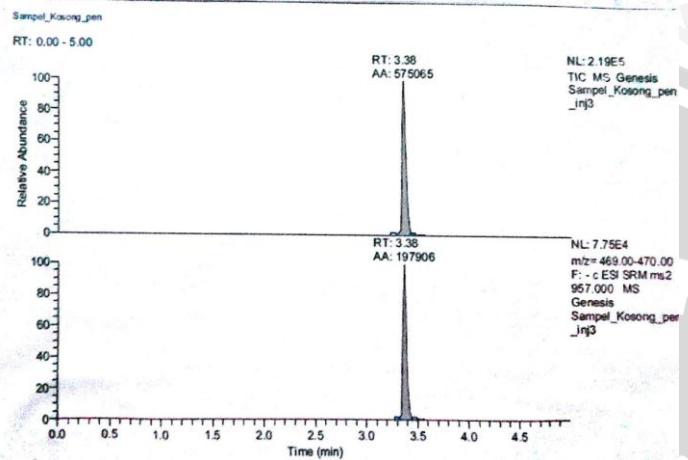
10)



11)



12)

**PREPARASI SAMPEL**

200 mikroliter sampel dilarutkan dalam 1 ml Metanol, kemudian difilter dengan menggunakan 0,2 mikron.

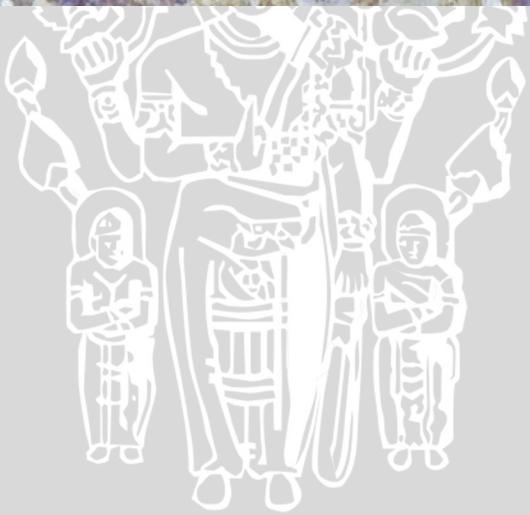
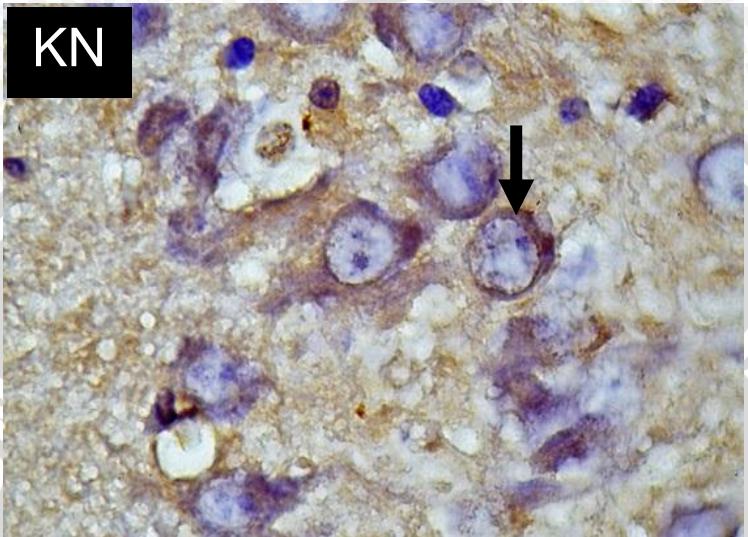
KONDISI OPERASI

AUTOSAMPLER MERK = THERMO SCIENTIFIC, TYPE = ACCEL A, SET SUHU = 10°C, VOLUME INJECTION 2 MIKROLITER

UHPLC DENGAN GRADIENT MERK = THERMO SCIENTIFIC , TYPE = ACCEL A TYPE 1250, MOBILE PHASE (A = AIR 0,1 Formic Acid, B = ACETONITRILE 0,1 Formic Acid), FLOW = 250 MIKROLITER/MENIT, KOLOM = HYPERSIL GOLD (50 X 2,1 X 1,9μM)

Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	P2
0.00	80.0	20.0	0.0	0.0	250.0	
0.20	80.0	20.0	0.0	0.0	250.0	
2.00	10.0	90.0	0.0	0.0	250.0	
4.00	10.0	90.0	0.0	0.0	250.0	
4.20	80.0	20.0	0.0	0.0	250.0	
5.00	80.0	20.0	0.0	0.0	250.0	
100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	250.0	

Lampiran 5. Gambaran Histopatologi pada Jaringan Otak untuk kondisi normal (Kontrol Negatif)



Lampiran 6. Hasil Uji Statistik SPSS**GGraph****Notes**

Output Created		22-JUL-2015 10:52:38
Comments		
	Data	/Users/djrestu/Documents/data faris.sav
	Active Dataset	DataSet0
Input	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	

17



Syntax

```
GGGRAPH  
  
/GRAPHDATASET  
NAME="graphdataset"  
VARIABLES=KELOMPOK  
MEANSE(PHOSPHOLIPID,  
1)[name="MEAN_PHOSPHOLI  
PID"  
LOW="MEAN_PHOSPHOLIPI  
D_LOW"  
HIGH="MEAN_PHOSPHOLIPI  
D_HIGH"]  
MISSING=LISTWISE  
REPORTMISSING=NO  
  
/GRAPHSPEC  
SOURCE=INLINE.  
  
BEGIN GPL  
  
SOURCE:  
s=userSource(id("graphdatase  
t"))  
  
DATA:  
KELOMPOK=col(source(s),  
name("KELOMPOK"),  
unit.category())  
  
DATA:  
MEAN_PHOSPHOLIPID=col(s  
ource(s),  
name("MEAN_PHOSPHOLI  
D"))  
  
DATA: LOW=col(source(s),  
name("MEAN_PHOSPHOLIPI  
D_LOW"))  
  
DATA: HIGH=col(source(s),  
name("MEAN_PHOSPHOLIPI  
D_HIGH"))  
  
GUIDE: axis(dim(1),  
label("KELOMPOK"))  
  
GUIDE: axis(dim(2),  
label("Mean  
PHOSPHOLIPID"))
```



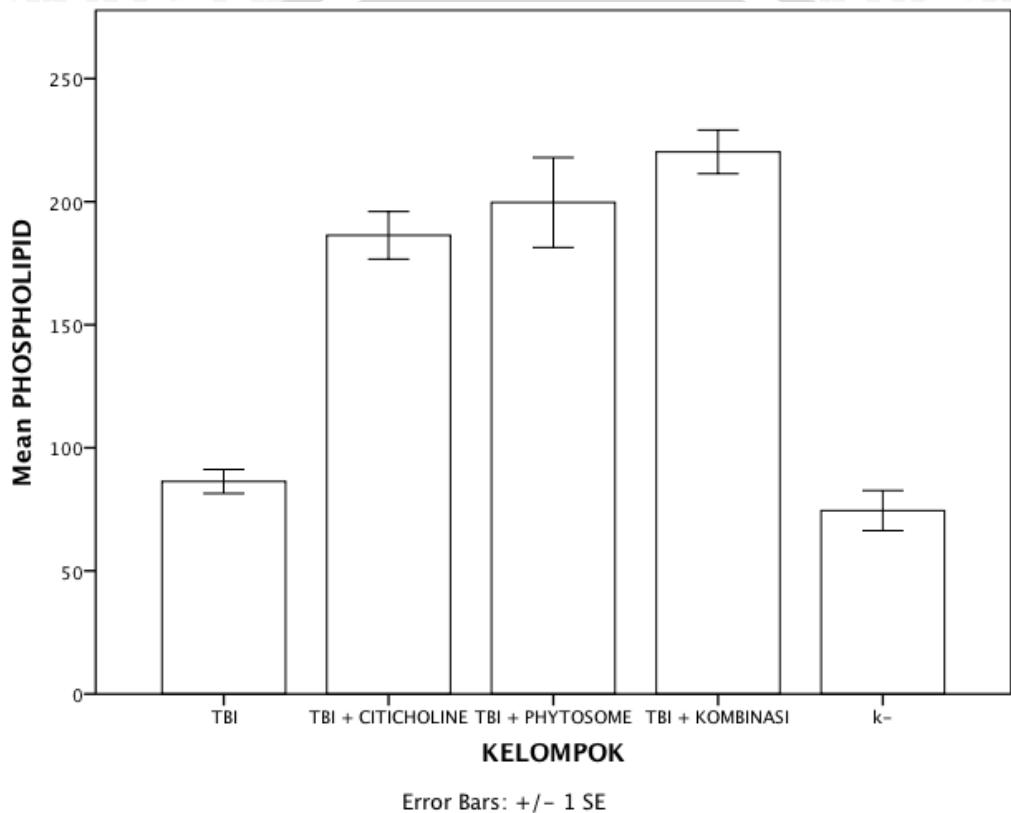


Processor Time	00:00:00.23
Resources	Elapsed Time

Elapsed Time

00:00:01.00

[DataSet0] /Users/djrestu/Documents/data faris.sav



ONEWAY KROX20 NRG PHOSPHOLIPID BY KELOMPOK

/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY

/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

	Output Created	22-JUL-2015 10:54:11
	Comments	
Input	Data	/Users/djrestu/Documents/data faris.sav
	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File	17
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
Cases Used		Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.



Syntax	ONEWAY KROX20 NRG PHOSPHOLIPID BY KELOMPOK /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).
Resources	Process or Time 00:00:00.05 Elapsed Time 00:00:00.00

[DataSet0] /Users/djrestu/Documents/data faris.sav

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minim um	Maximu m
					Lower Bound	Upper Bound		
KROX20	TBI	3	72.67	11.590	6.692	43.87	101.46	65 86
	TBI + CITICHOLINE	3	83.33	5.508	3.180	69.65	97.01	78 89
	TBI + PHYTOSOME	3	166.67	3.512	2.028	157.94	175.39	163 170
	TBI + KOMBINASI	4	135.50	19.774	9.887	104.04	166.96	118 163



NRG	k-	4	67.25	19.259	9.630	36.60	97.90	45	89
	Total	17	104.65	41.842	10.148	83.13	126.16	45	170
	TBI	3	72.33	6.110	3.528	57.16	87.51	67	79
	TBI + CITICHOLINE	3	104.67	24.987	14.426	42.60	166.74	83	132
	TBI + PHYTOSOME	3	186.00	24.434	14.107	125.30	246.70	158	203
	TBI + KOMBINASI	4	179.00	2.160	1.080	175.56	182.44	176	181
	k-	4	72.25	17.858	8.929	43.83	100.67	58	98
	Total	17	123.18	54.170	13.138	95.32	151.03	58	203
	TBI	3	86.33	8.386	4.842	65.50	107.17	81	96
	TBI + CITICHOLINE	3	186.33	16.773	9.684	144.67	228.00	167	197
PHOSPHOLIPID	TBI + PHYTOSOME	3	199.67	31.644	18.270	121.06	278.27	165	227
	TBI + KOMBINASI	4	220.25	17.689	8.845	192.10	248.40	203	236
	k-	4	74.50	16.361	8.180	48.47	100.53	55	89
	Total	17	152.71	66.326	16.086	118.60	186.81	55	236

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
KROX20	2.208	4	12	.130
NRG	3.502	4	12	.041
PHOSPHOLIPID	2.291	4	12	.120

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
KROX20	Between Groups	25372.132	4	6343.033	28.835	.000
	Within Groups	2639.750	12	219.979		
	Total	28011.882	16			
NRG	Between Groups	43462.387	4	10865.597	37.381	.000
	Within Groups	3488.083	12	290.674		
	Total	46950.471	16			
PHOSPHOLIPID	Between Groups	65937.779	4	16484.445	44.475	.000
	Within Groups	4447.750	12	370.646		
	Total	70385.529	16			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons****Tukey HSD**

Dependent Variable	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
KROX20	TBI	TBI + CITICHOLINE	-10.667	12.110	.899	-49.27	27.93
		TBI + PHYTOSOME	-94.000*	12.110	.000	-132.60	-55.40
		TBI + KOMBINASI	-62.833*	11.328	.001	-98.94	-26.73
	TBI + CITICHL OLINE	k-	5.417	11.328	.988	-30.69	41.52
		TBI	10.667	12.110	.899	-27.93	49.27
		TBI + PHYTOSOME	-83.333*	12.110	.000	-121.93	-44.73
	TBI + PHYTO SOME	TBI + KOMBINASI	-52.167*	11.328	.004	-88.27	-16.06
		k-	16.083	11.328	.628	-20.02	52.19
		TBI	94.000*	12.110	.000	55.40	132.60
	TBI + CITICHL OLINE	TBI + CITICHOLINE	83.333*	12.110	.000	44.73	121.93

NRG	TBI	TBI + KOMBINASI	31.167	11.328	.104	-4.94	67.27
		k-	99.417*	11.328	.000	63.31	135.52
		TBI	62.833*	11.328	.001	26.73	98.94
		TBI + CITICHOLIN E	52.167*	11.328	.004	16.06	88.27
		TBI + PHYTOSOME	-31.167	11.328	.104	-67.27	4.94
		k-	68.250*	10.488	.000	34.82	101.68
		TBI	-5.417	11.328	.988	-41.52	30.69
		TBI + CITICHOLIN E	-16.083	11.328	.628	-52.19	20.02
		k- TBI + PHYTOSOME	-99.417*	11.328	.000	-135.52	-63.31
		TBI + KOMBINASI	-68.250*	10.488	.000	-101.68	-34.82
		TBI + CITICHOLIN E	-32.333	13.921	.203	-76.70	12.04
		TBI + PHYTOSOME	113.667*	13.921	.000	-158.04	-69.30
		TBI + KOMBINASI	106.667*	13.022	.000	-148.17	-65.16
		k-	.083	13.022	1.000	-41.42	41.59

	TBI	32.333	13.921	.203	-12.04	76.70
TBI + CITICHEOLINE	TBI + PHYTOSOME	-81.333*	13.921	.001	-125.70	-36.96
	TBI + KOMBINASI	-74.333*	13.022	.001	-115.84	-32.83
	k-	32.417	13.022	.157	-9.09	73.92
	TBI	113.667*	13.921	.000	69.30	158.04
TBI + PHYTOSOME	TBI + CITICHEOLINE	81.333*	13.921	.001	36.96	125.70
	TBI + KOMBINASI	7.000	13.022	.981	-34.51	48.51
	k-	113.750*	13.022	.000	72.24	155.26
	TBI	106.667*	13.022	.000	65.16	148.17
TBI + KOMBINASI	TBI + CITICHEOLINE	74.333*	13.022	.001	32.83	115.84
	TBI + PHYTOSOME	-7.000	13.022	.981	-48.51	34.51
	k-	106.750*	12.056	.000	68.32	145.18
	TBI	-.083	13.022	1.000	-41.59	41.42
k-	TBI + CITICHEOLINE	-32.417	13.022	.157	-73.92	9.09

	TBI + PHYTOSOME	113.750 *	13.022	.000	-155.26	-72.24
	TBI + KOMBINASI	106.750 *	12.056	.000	-145.18	-68.32
	TBI + CITICHLIN E	100.000 *	15.719	.000	-150.10	-49.90
TBI	TBI + PHYTOSOME	113.333 *	15.719	.000	-163.44	-63.23
	TBI + KOMBINASI	133.917 *	14.704	.000	-180.78	-87.05
	k-	11.833	14.704	.924	-35.03	58.70
PHOSPHOL IPID	TBI	100.000 *	15.719	.000	49.90	150.10
	TBI + PHYTOSOME	-13.333	15.719	.910	-63.44	36.77
	TBI + CITICHLIN E	-33.917	14.704	.208	-80.78	12.95
	k-	111.833 *	14.704	.000	64.97	158.70
	TBI	113.333 *	15.719	.000	63.23	163.44
	TBI + CITICHLIN E	13.333	15.719	.910	-36.77	63.44
	TBI + PHYTOSOME					



	TBI + KOMBINASI	-20.583	14.704	.639	-67.45	26.28
	k-	125.167 *	14.704	.000	78.30	172.03
	TBI	133.917 *	14.704	.000	87.05	180.78
	TBI + CITICHOLIN	33.917	14.704	.208	-12.95	80.78
TBI + E KOMBINASI	TBI + PHYTOSOME	20.583	14.704	.639	-26.28	67.45
	k-	145.750 *	13.613	.000	102.36	189.14
	TBI	-11.833	14.704	.924	-58.70	35.03
	TBI + CITICHOLIN E	111.833 *	14.704	.000	-158.70	-64.97
k-	TBI + PHYTOSOME E	125.167 *	14.704	.000	-172.03	-78.30
	TBI + KOMBINASI	145.750 *	13.613	.000	-189.14	-102.36

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

Homogeneous Subsets**PHOSPHOLIPID**

Tukey HSD

KELOMPOK	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
k-	4	74.50	
TBI	3	86.33	
TBI + CITICHLINE	3		186.33
TBI + PHYTOSOME	3		199.67
TBI + KOMBINASI	4		220.25
Sig.		.928	.218

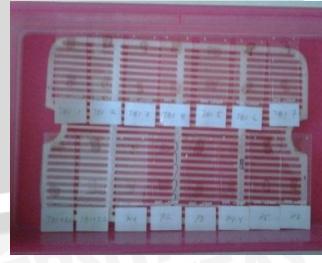
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.333.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



Lampiran 7. Dokumentasi Kegiatan

<p>Laboratorium Farmasi</p> 	<p>Keperluan Ekstraksi</p> 	<p>Homogenasi dengan <i>magnetic stirrer</i></p> 
<p>Pengeringan pelarut menggunakan rotavapor</p> 	<p>Ekstraksi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)</p> 	<p>Pengeringan pelarut dengan <i>rotary evaporator</i></p> 
<p>Pencampuran ekstrak dengan fosfatidilkolin</p> 	<p>Pembuatan phytosome-ekstrak pegagan : Hidrasi dengan aquabidest</p> 	<p>Filtrasi phytosome-ekstrak pegagan</p> 

Perawatan tikus	Aklimatisasi	Pemberian minum tikus
		
Induksi <i>Traumatic Brain Injury</i>	Pasca Induksi TBI	Penjahitan kulit kepala tikus yang pasca induksi
		
Keadaan tikus pasca induksi TBI	Pembedahan tikus untuk pengambilan otak	Pengecatan IHK
		

Lampiran 9. Dokumentasi PIMNAS



Lampiran 10. Poster PIMNAS

NEUROLASTICA

PKM-P

**PERSAMAAN PENGETAHUAN NASIONAL
PIMNAS 28
UNIVERSITAS HALU OLEO 2015**

Neuroprotective Effect of Centella asiatica :

Potensi Phytosome-Ekstrak Pegagan sebagai Neuroprotektor terhadap Distribusi Fosfolipid, Aktivasi Krox-20, Ekspresi Neuregulin-1 (NRG-1), dan Tingkat Kognitif pada Tikus Model Traumatic Brain Injury (TBI)

Dosen Pembimbing : Wibi Riawan, S.Si

Peneliti : Alif Fariz Jazmi, Putri Fitri Aflantya, Sitti Ayu Hemas Nurarifah, Erlin Aditia Purmitasari, Lilln Andreas Vitania.

LATAR BELAKANG

Terapi Citicoline pada pasien TBI memberikan hasil yang kurang memuaskan. Di sisi lain, Phytosome-Ekstrak Pegagan memiliki efek neuroprotektor melalui aktivitas gen Krox-20 sehingga berpotensi menjadi terapi pilihan untuk pasien TBI

TUJUAN

Membandingkan efek neuroprotektor antara Phytosome-Ekstrak Pegagan dengan Citicoline yang ditandai melalui peningkatan distribusi fosfolipid, aktivasi Krox-20 ekspresi NRG-1, dan perbaikan fungsi kognitif pada tikus model TBI

METODE

HASIL

Jumlah Fosfolipid (sel)

Kelompok	Jumlah Fosfolipid (sel)
KP	~95
KN	~90
P1	~205
P2	~185
P3	~215

Jumlah Krox-20 (sel)

Kelompok	Jumlah Krox-20 (sel)
KP	~85
KN	~80
P1	~175
P2	~95
P3	~145

Jumlah Neuregulin-1 (sel)

Kelompok	Jumlah Neuregulin-1 (sel)
KP	~80
KN	~85
P1	~185
P2	~105
P3	~175

Grafik Perbandingan Waktu Tempuh dalam Uji Morris Water Maze

Keterangan:

- KN : Kontrol Negatif
- KP : Kontrol Positif (TBI)
- P1 : TBI + Injeksi Phytosome-Ekstrak Pegagan 90mg/KgBB
- P2 : TBI + Injeksi Citicoline 250mg/KgBB
- P3 : TBI + Injeksi Phytosome-Ekstrak Pegagan 90mg/KgBB dan Citicoline 250mg/KgBB

KESIMPULAN

Pemberian kombinasi Phytosome-Ekstrak Pegagan dan Citicoline mampu meningkatkan distribusi fosfolipid yang lebih tinggi dan menghasilkan waktu tempuh tersingkat dalam uji kognitif jika dibandingkan dengan pemberian Phytosome-Ekstrak Pegagan atau Citicoline saja.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui efek samping, uji stabilitas dan uji toksisitas dari Phytosome-Ekstrak Pegagan.

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia
Email : neulastica@gmail.com
Telp : 0341-551611 / 085648098551

Terimakasih kepada :