

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 185-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 EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS
(*Garcinia mangostana* L) TERHADAP EKSPRESI cAMP
RESPONSIVE ELEMENT MODULATOR (CREM) DAN
MARFOLOGI SPERMATOZOA PASCA PAPARAN ASAP
ROKOK PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

PENELITI : FRISKI ROSANDI AFRIZAL

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : PENDIDIKAN KEDOKTERAN HEWAN /
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

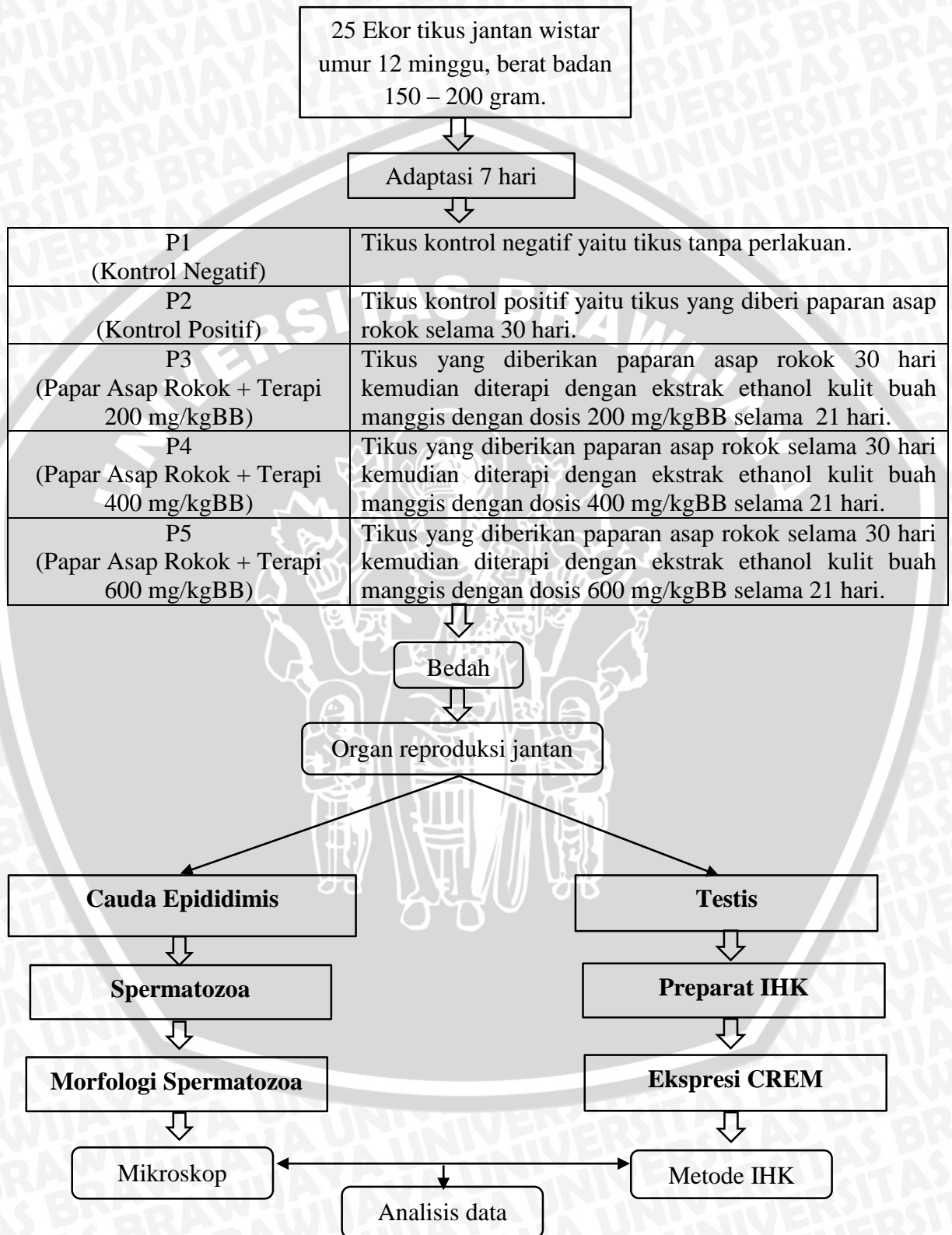
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

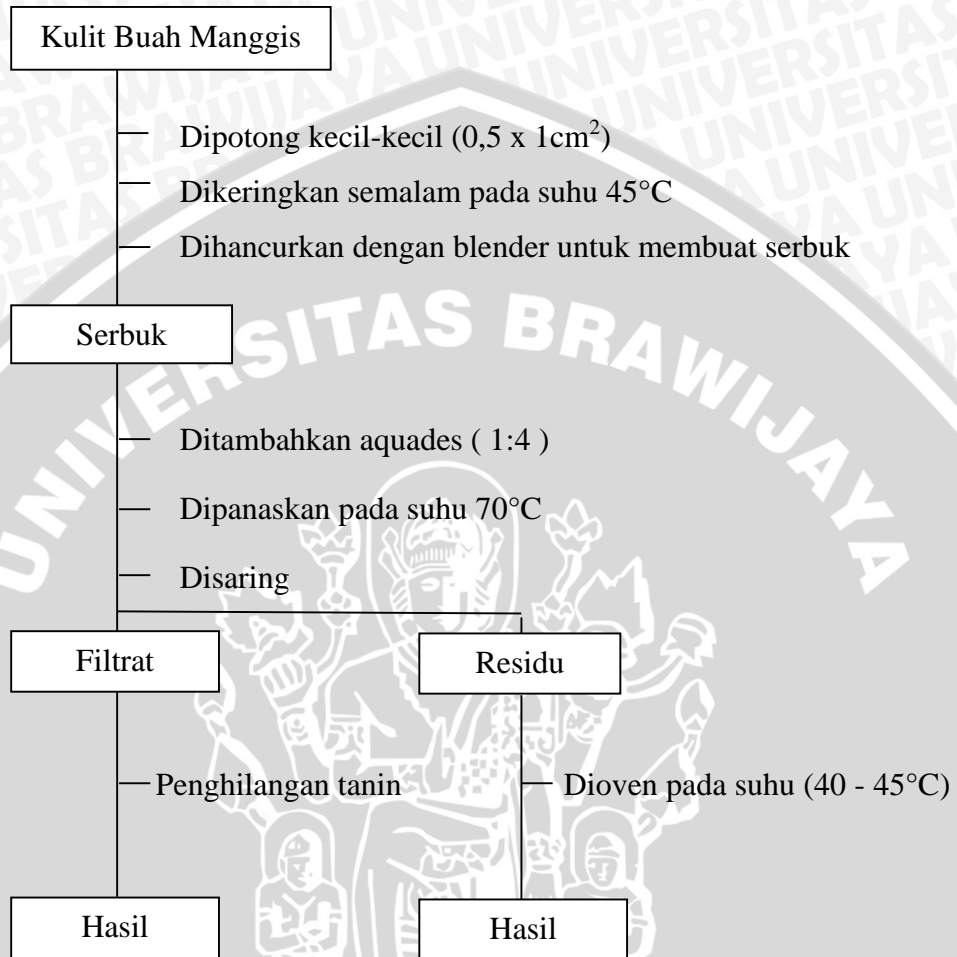


Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis



Lampiran 4. Maserasi dengan Ethanol 50%

Perhitungan pembuatan ethanol

Prosentase ethanol absolute 96%

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 96 = 1000\text{ml} \times 50$$

$$96 V_1 = 50.000\text{ml}$$

$$V_1 = \frac{50.000\text{ml}}{96}$$

$$V_1 = 520,83\text{ml} \quad V \quad \text{etanol 96\%}$$

Keterangan :

V_1 → Volume larutan sebelum pengenceran (mL)

M_1 → Konsentrasi sebelum pengenceran

V_2 → Volume larutan setelah pengenceran (mL)

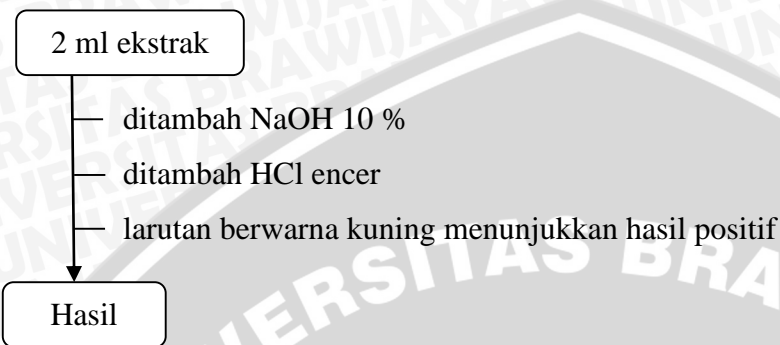
M_2 → Konsentrasi setelah pengenceran

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

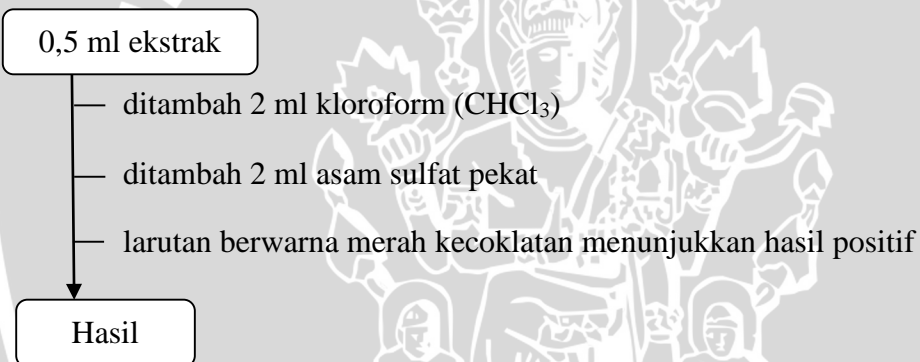


Lampiran 5. Uji Fitokimia Ekstrak Ethanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

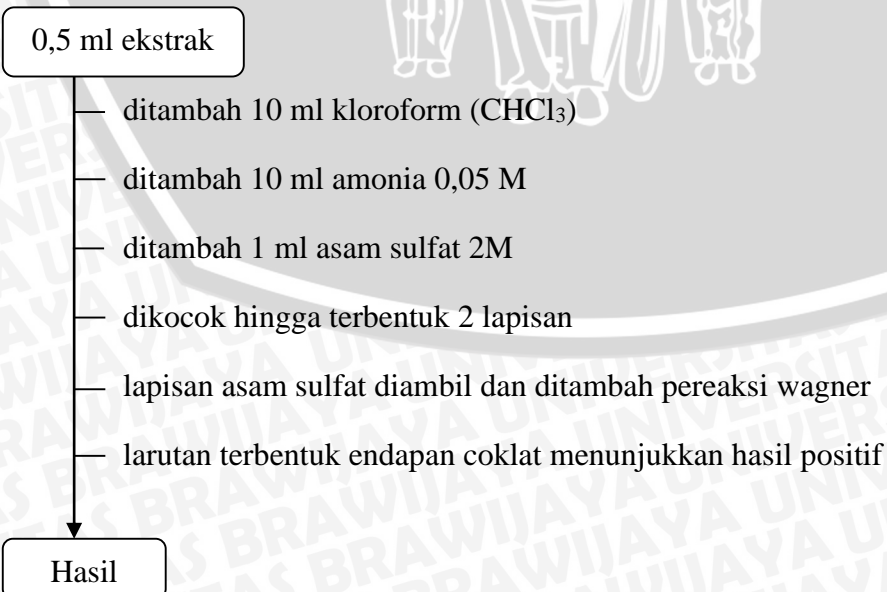
5.1 Flavanoid



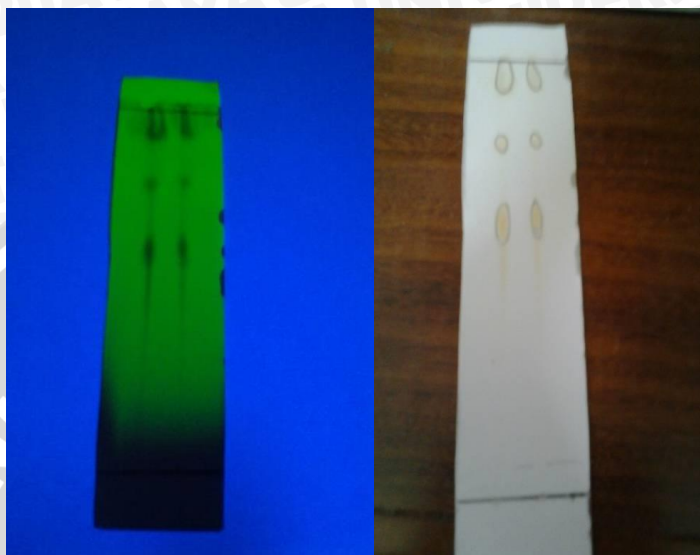
5.2 Terpenoid



5.3 Alkaloid



Lampiran 6 Hasil KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan IR pada Ekstrak Ethanol Kulit Buah Manggis

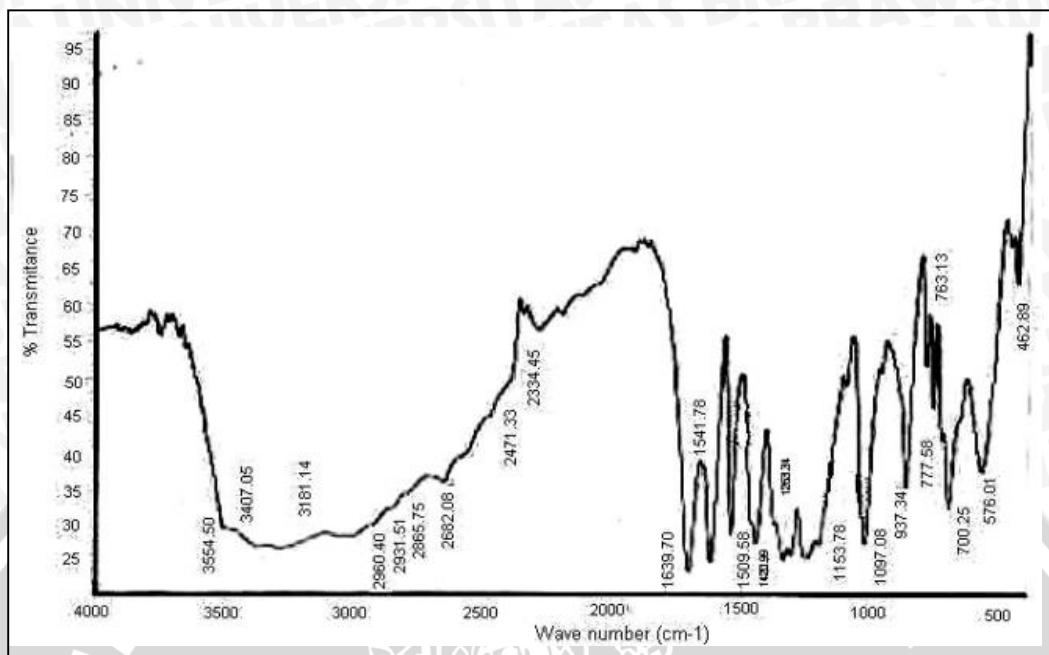


Gambar 6.1 Hasil KLT

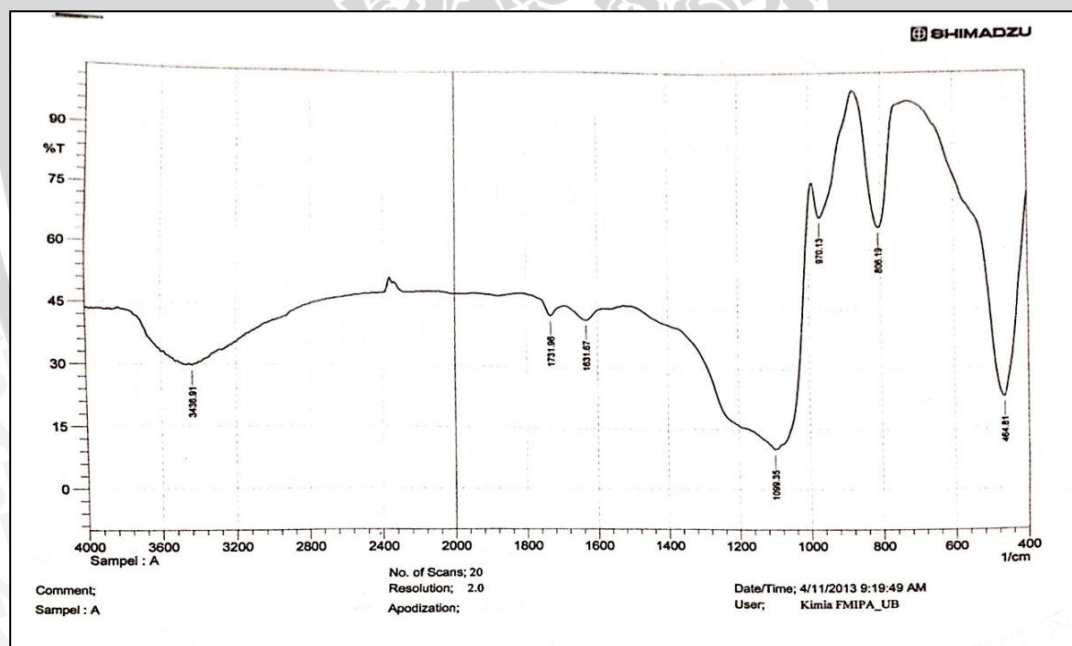
Table 6.1 Nilai Rf setiap titik ekstrak kulit manggis dengan metode KLT

Spot	Distance of spot from the initial movement		Rf Value
	Spot	Eluen	
A	4,5	8	0,56
B	6,2	8	0,77
C	7,6	8	0,95

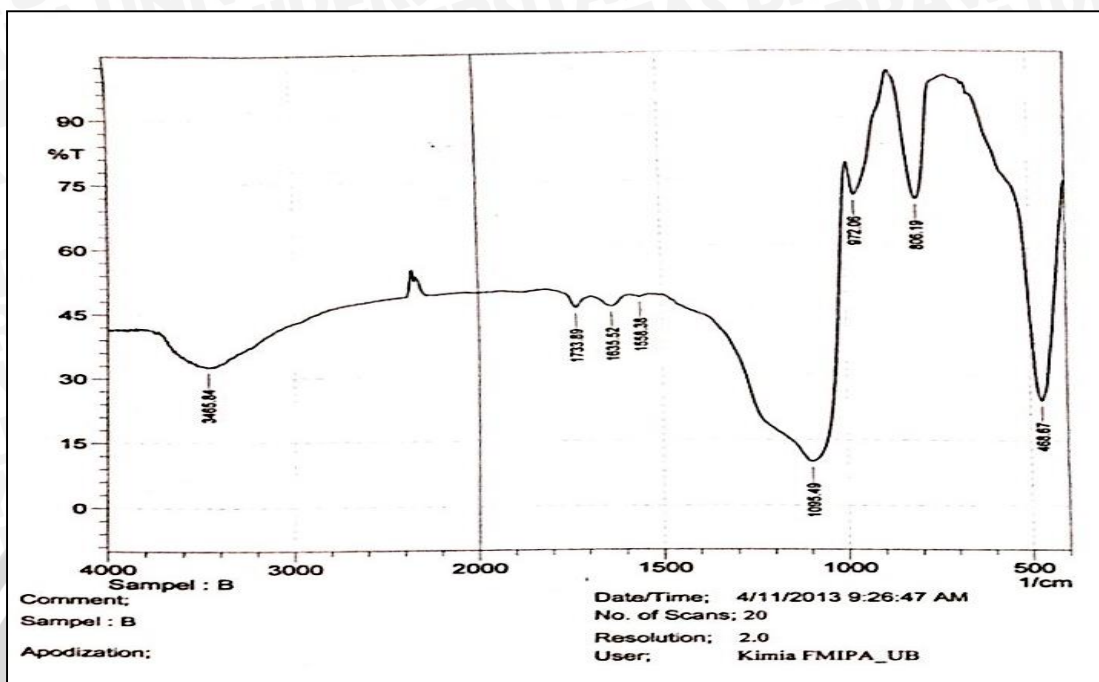
Konfirmasi gugus-gugus fungsi dari senyawa yang terkandung dalam ekstrak ethanol kulit buah manggis digunakan spektrum standar asam galat sebagai standar karena asam galat memiliki kerangka dasar sama dengan senyawa polifenol. Standar asam galat mempunyai range spektrum dengan absorbansi berkisar antara 426,89 cm^{-1} sampai 3.554,50 cm^{-1} . Asam galat biasanya mengandung gugus-gugus fungsi seperti O-H, C-H, C=C, dan C-O.



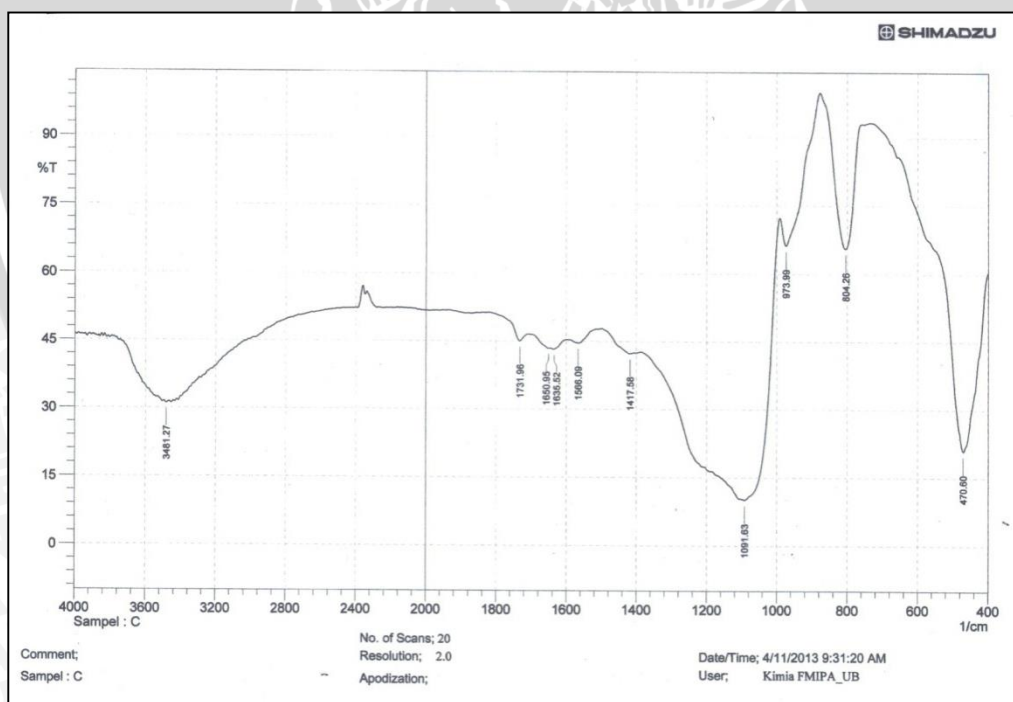
Gambar 6.2 Spektrum IR standar asam galat



Gambar 6.3 Spektrum IR noda A hasil KLT ekstrak kulit buah manggis



Gambar 6.4 Spektrum IR noda B hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis

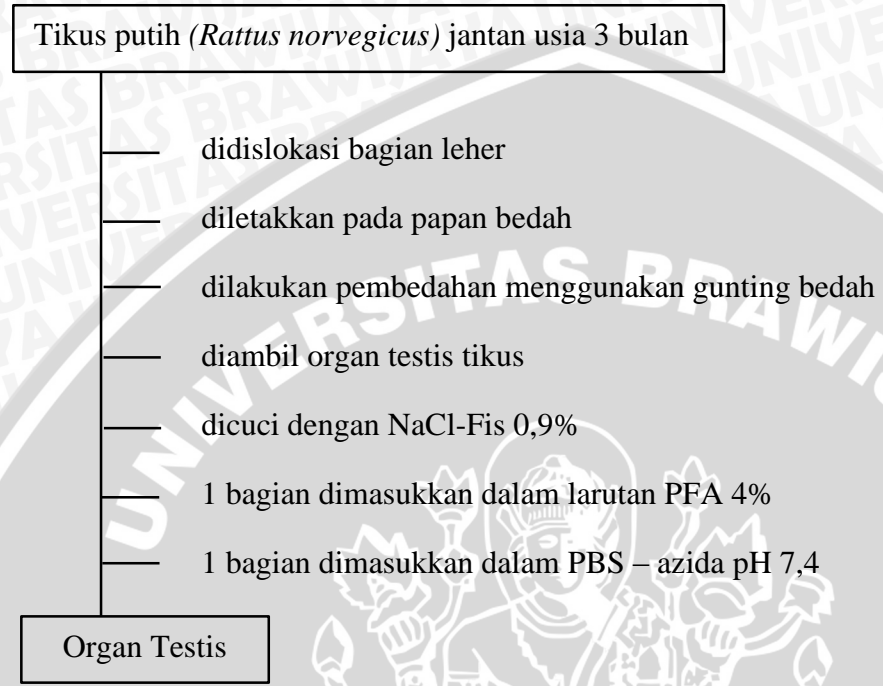


Gambar 6.4 Spektrum IR noda C hasil KLT ekstrak ethanol kulit buah manggis

repository.ub.ac.id

Lampiran 7. Diagram Kerja Penelitian

7.1 Pembedahan Hewan Coba



Lampiran 7.2 Pengambilan Spermatozoa Untuk Morfologi

Cauda Epididimis

di keluarkan spermatozoa

di tempatkan spermatozoa pada obyek glass yang telah di tetesi dengan NaCl fis

di tutup dengan cover glass

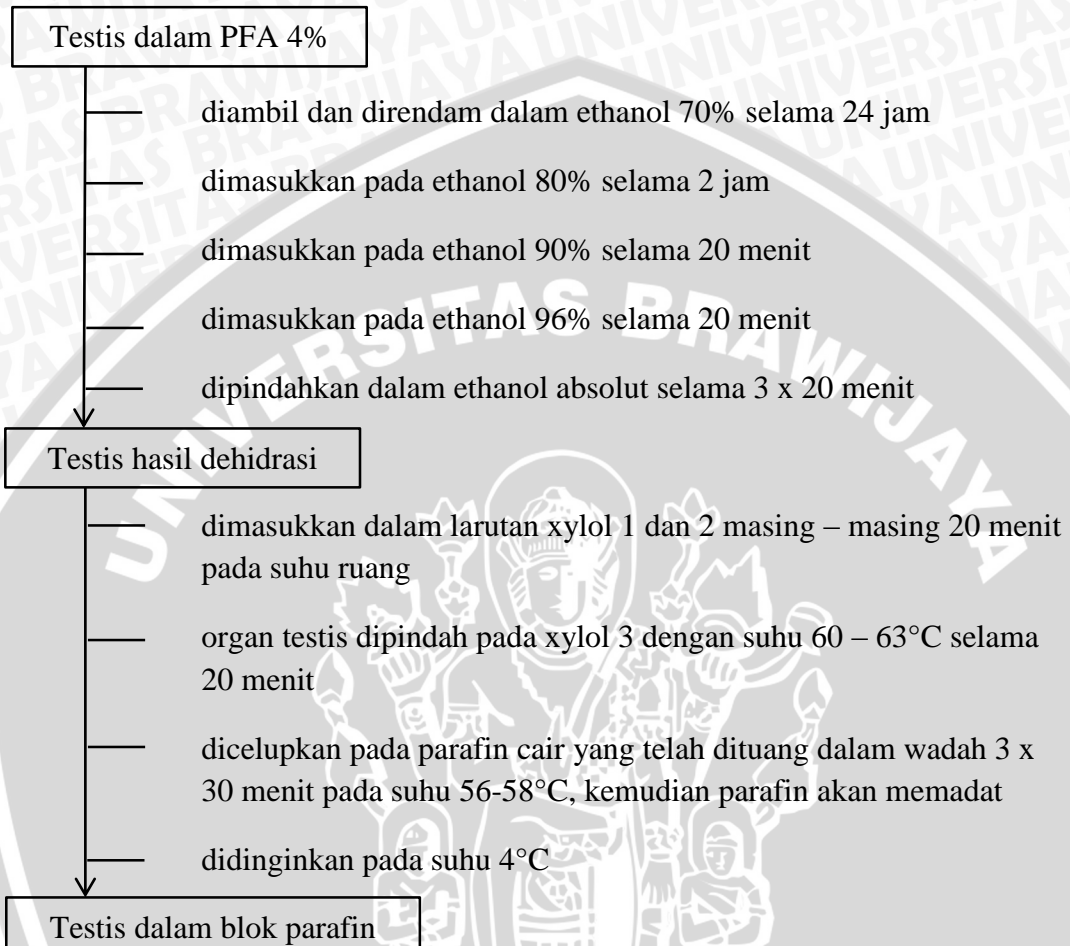
di amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang

Hasil

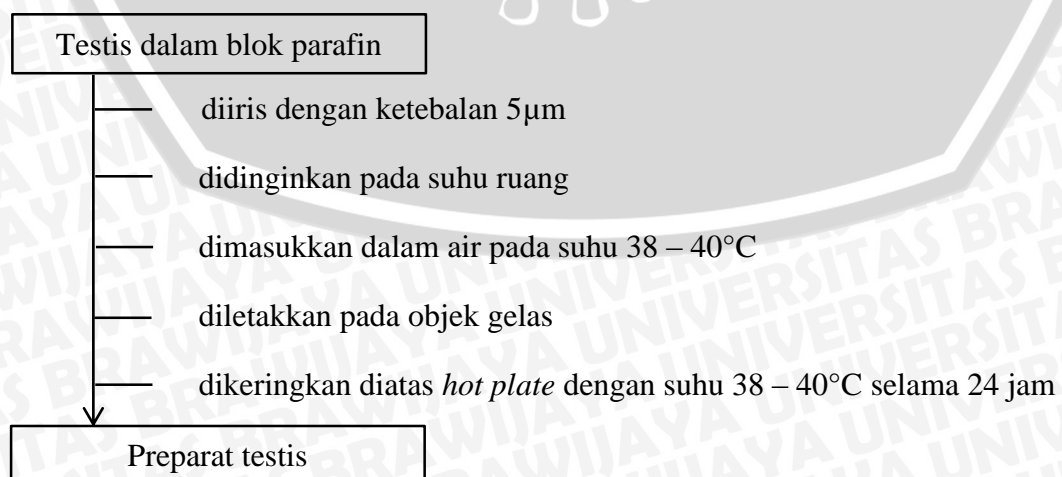


Lampiran 7.3 Pembuatan Preparat Organ Testis

7.3.1 Embedding Testis



7.3.2 Pembuatan Preparat Testis



Lampiran 7.4 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Preparat Testis

- dicelupkan dalam Xylol I, Xylol II, Alkohol bertingkat (96%, 90%, 80%, 70%) dan aquades (sebanyak 1x5 menit)
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan 3 % hydrogen peroksida (dalam dionize) 20 menit
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan BSA (Bovine Serum Albumin) 1% dalam PBS selama 30 menit
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan antibodi primer dengan perbandingan (1 : 100), dibiarkan semalam suhu 40 °C (diencerkan dalam 1% BSA dalam PBS)
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan antibodi skunder berlabel biotin (Goat Anti Rat biotin *labeled*) (2497,5 ; 2,5), didiamkan selama 1 jam dalam suhu ruang
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan SA-HRP (Strepta avidin-Horse Radish Peroxidase) selama 30-60 menit dalam suhu ruang
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- diteteskan chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) dibiarkan selama 10-20 menit dalam suhu ruang
- dicuci dengan aquades selama 3x5 menit
- ditetesi counter stam (Hematoxylen-Eosin) , ditunggu 5 menit dalam suhu ruang
- *mounting* dengan entellan
- pengamatan dibawah mikroskop

Hasil



Lampiran 8. Perhitungan Pembuatan Larutan

8.1 Pembuatan Larutan Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dalam gelas kimia 500 mL. pH larutan diatur 7,4 dengan larutan NaOH 1M menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditanda bataskan dengan akuades steril.

8.2 Pembuatan PBS – Azida

Menggunakan larutan PBS yang telah dibuat sebelumnya, larutan PBS dengan pH 7,4 sebanyak 500mL ditempatkan dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan 16 tetes azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu larutan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*.

8.3 Pembuatan Larutan NaCl – Fis 0,9%

$$\text{Pembuatan larutan NaCl – Fis \%} = \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 500 \text{ mL} = 4,5 \text{ gram,}$$

tahap pertama adalah menimbang 4,5 gram NaCl kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 500mL dan ditandabatkan dengan akuades.

8.4 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 40 \% = 1000 \text{ mL} \cdot 4\%$$

$$V_1 = 100 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl – Fis 0,9% sebagai pelarut. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 100mL PFA murni 40% dimasukkan dalam labu ukur 1000 mL dan dilarutkan dengan NaCl-Fis sampai tanda batas.

8.5 Pembuatan Larutan Ethanol Bertingkat

Larutan ethanol bertingkat dibuat dari larutan ethanol absolut 96% yang kemudian diencerkan menjadi 96%, 90%, 80%, 70% dalam labu takar 100 mL dengan menggunakan akuades steril.

Perhitungan pembuatan larutan ethanol 96%, dibuat dari ethanol absolut, ethanol absolut yang diperlukan adalah :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 96\% = 250 \text{ mL} \cdot 96\%$$

$$V_1 = 250 \text{ mL}$$

Perhitungan pembuatan larutan ethanol 90%, dibuat dari ethanol absolut, ethanol absolut yang diperlukan adalah :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100\% = 250 \text{ mL} \cdot 90\%$$

$$V_1 = 225 \text{ mL}$$

Perhitungan pembuatan larutan ethanol 80%, dibuat dari ethanol absolut, ethanol absolut yang diperlukan adalah :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100\% = 250 \text{ mL} \cdot 80\%$$

$$V_1 = 200 \text{ mL}$$

Perhitungan pembuatan larutan ethanol 70%, dibuat dari ethanol absolut, ethanol absolut yang diperlukan adalah :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100\% = 250 \text{ mL} \cdot 70\%$$

$$V_1 = 175 \text{ mL}$$

Lampiran 9. Perhitungan Dosis

Dosis ekstrak :

Dengan bahan 95 gram dimaserasi dan destilasi menghasilkan 27,6 mL

$$\text{Konsentrasi per mL} = \frac{95 \text{ gr}}{27,6 \text{ mL}} = 3,442 \text{ gr / mL}$$

$$1 \text{ mL} = 1000\mu\text{L} = 0,003442 \text{ mg}/\mu\text{L} \text{ (kandungan dalam 1 mL)}$$

Rata – rata berat badan tikus adalah 200 gram

Jadi :

$$\text{Dosis 200} = \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 200 \text{ gr} = 40 \text{ mg} = 0,04 \text{ gr}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{400 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 200 \text{ gr} = 80 \text{ mg} = 0,08 \text{ gr}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{600 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 200 \text{ gr} = 120 \text{ mg} = 0,12 \text{ gr}$$

Konsentrasi CEMP (*Crude Extract from Mangosteen Peel*) adalah 3,44 gr/mL dan CEMP yang harus diambil :

$$[\text{CEMP}] = 3,44 \text{ gr/ mL} = 3,44 \text{ gr}/1000 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 200} = \frac{0,04 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 11,63 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{0,08 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 23,26 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{0,12 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 34,88 \mu\text{L}$$

Pemberian dilakukan secara per oral (sonde) dalam 3 minggu, satu hari 1 ml/ekor

Pembuatan ekstrak untuk sonde dilakukan 3 hari sekali :

$$\text{Dosis 200} = 11,63 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 174,45 \mu\text{L} \text{ (ekstrak)}$$

Dosis 400 = $23,26 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 348,9 \mu\text{L}$ (ekstrak)

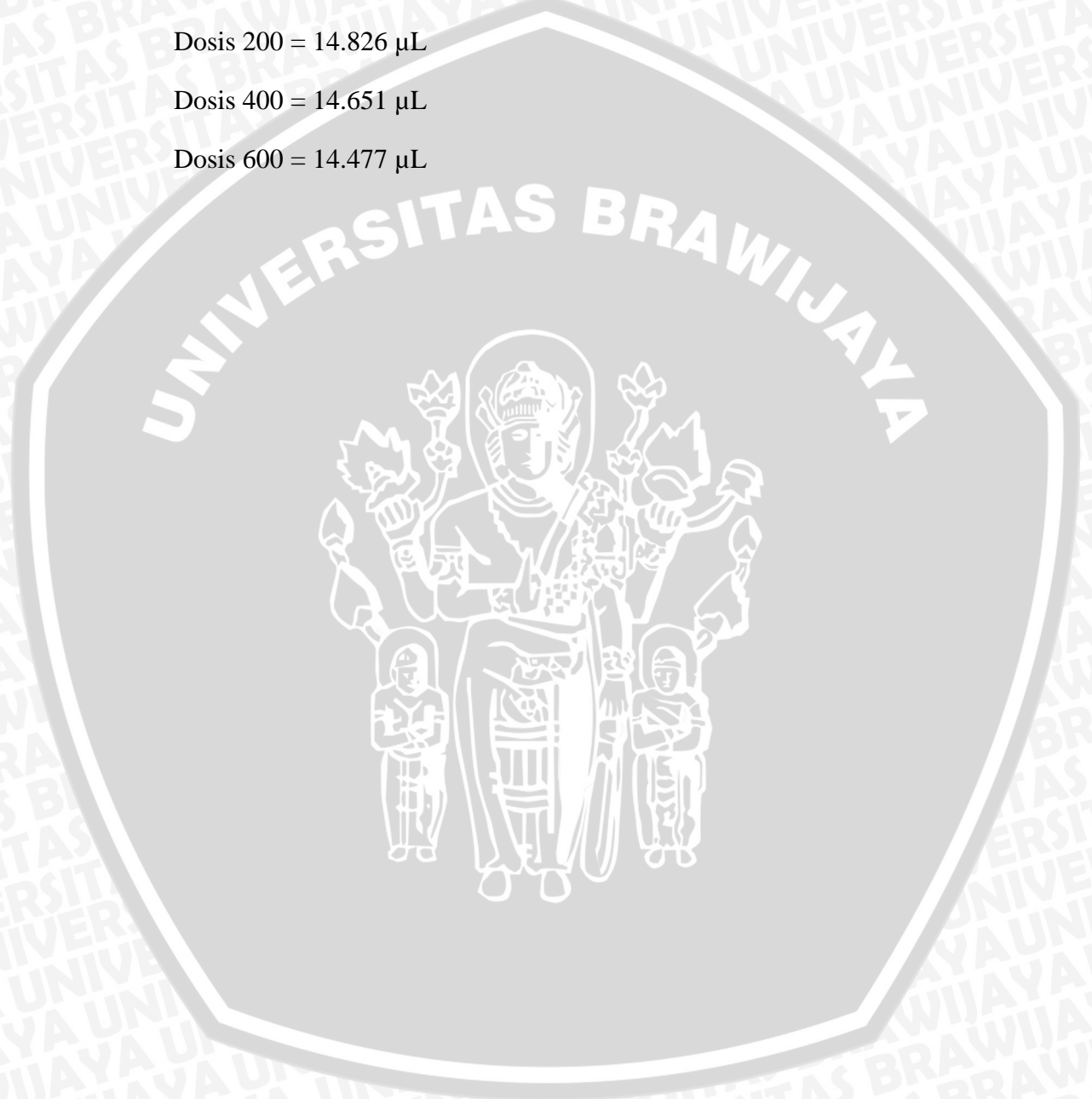
Dosis 600 = $34,88 \mu\text{L} \times 15 \text{ tikus} = 523,2 \mu\text{L}$ (ekstrak)

Pengenceran dilakukan dengan penambahan akuades :

Dosis 200 = $14.826 \mu\text{L}$

Dosis 400 = $14.651 \mu\text{L}$

Dosis 600 = $14.477 \mu\text{L}$



Lampiran 10. Uji Normalitas Data CREM

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KELOMPOK
N		25
Normal Parameters ^a	Mean	2.0000
	Std. Deviation	1.44338
Most Extreme Differences	Absolute	.156
	Positive	.156
	Negative	-.156
Kolmogorov-Smirnov Z		.779
Asymp. Sig. (2-tailed)		.579

a. Test distribution is Normal.



Lampiran 11. Uji Homogenitas CREM

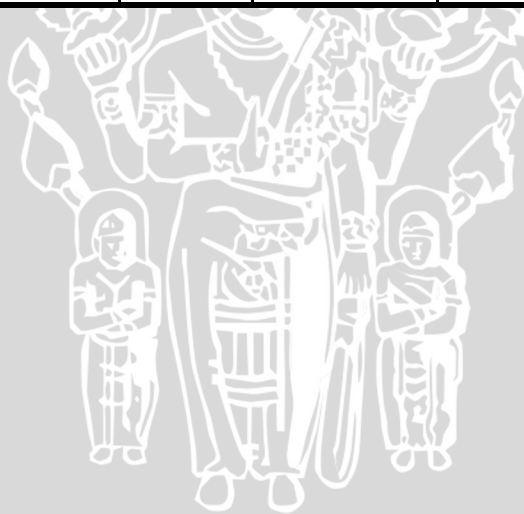
Test of Homogeneity of Variances

IHK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.608	4	20	.662

ANOVA

IHK	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	437.910	4	109.477	176.372	.000
Within Groups	12.414	20	.621		
Total	450.324	24			



Lampiran 12. Uji Tukey CREM

IHK

Tukey HSD

KELOM POK	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	5	4.9700		
P3	5	6.2300		
P4	5		11.4500	
P5	5			14.3860
P1	5			15.2720
Sig.		.124	1.000	.413

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 13. Uji Normalitas Abnormalitas Spermatozoa

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MORFOLOGI
N		25
Normal Parameters ^a	Mean	15.332
	Std. Deviation	5.6151
Most Extreme Differences	Absolute	.158
	Positive	.158
	Negative	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.791
Asymp. Sig. (2-tailed)		.560
a. Test distribution is Normal.		



Lampiran 14. Uji Homogenitas Abnormalitas Spermatozoa

Test of Homogeneity of Variances

MORFOLOGI

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.161	4	20	.955

ANOVA

MORFOLOGI	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	732.178	4	183.045	149.327	.000
Within Groups	24.516	20	1.226		
Total	756.694	24			

Lampiran 15. Uji Tukey Abnormalitas Spermatozoa

MORFOLOGI

Tukey HSD

KELOM POK	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P1	5	8.380		
P5	5	10.180		
P4	5		15.600	
P3	5			20.400
P2	5			22.100
Sig.		.114	1.000	.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

