

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 201-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 EKSTRAK BIJI ANGGUR (*Vitis vinifera*) TERHADAP VIABILITAS *Spermatozoa* DAN EKSPRESI TNF- α PADA HEWAN MODEL TIKUS YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK

PENELITI : ULFA SEPTIANA WULANDARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

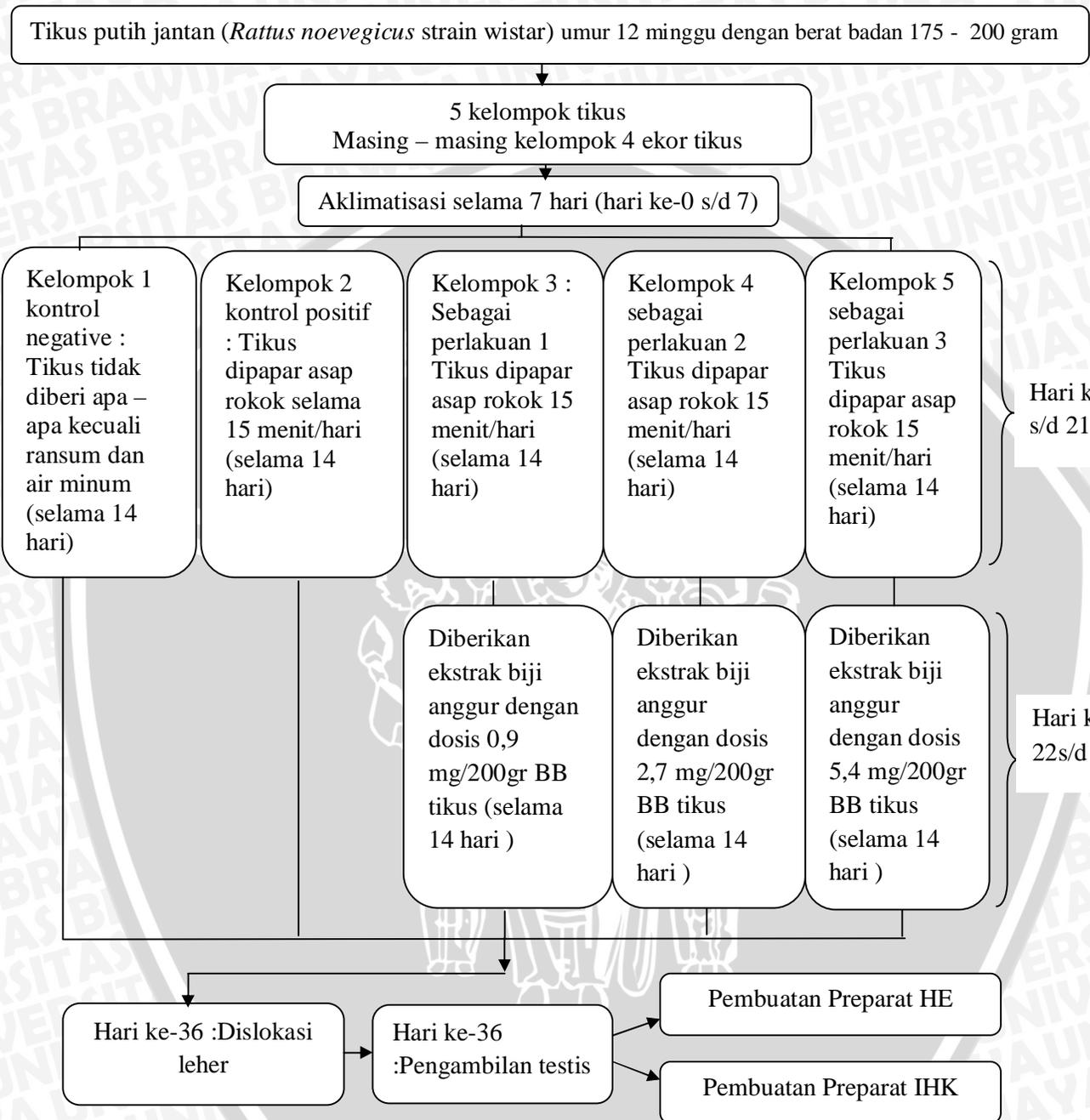
Malang, 3 Januari 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.

NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Kerangka Operasional



Lampiran 3. Perhitungan dosis

Tabel 4.2 Konversi dosis hewan ke manusia

	Mencit 20 gram	Tikus 200 gram	Marmot 44 gram	Kelinci 1,5 gram	Anjing 12 Kg	Manusia 70 Kg
Mencit 20 Gram	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9
Tikus 200 gram	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	56,0
Marmot 44 gram	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,5
Kelinci 1,5 gram	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	1,031	0,07	0,32	1,0

(Laurance dan Bacharach, 1964)

Perhitungan dosis : Berat serbuk x Faktor konversi (Fauzi, 2009)

Dosis I

$$= 0,05 \text{ gram} \times 0,018$$

$$= 0,0009 \text{ gram}$$

$$= 0,9 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}/\text{Hari} \times 4 \text{ ekor tikus tiap kelompok}$$

= 3,6 mg + 100 ml air, (kemudian dipanaskan dengan suhu 80°C selama 4-5 jam sampai volume menyusut 12 ml, diendapkan pada suhu kamar sampai 5 hari, dipisahkan dari endapan dan diperoleh larutan sebanyak 8 ml) = 8 ml

dosis I/ 4 ekor tikus.

Dosis II

$$= 0,15 \text{ gram} \times 0,018 \text{ (faktor konversi)}$$

$$= 0,0027 \text{ gram}$$

$$= 2,7 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}/\text{Hari} \times 4 \text{ ekor tikus tiap kelompok}$$

= 10,8 mg + 100 ml air, (kemudian dipanaskan dengan suhu 80°C selama 4-5 jam sampai volume menyusut 12 ml, diendapkan pada suhu kamar sampai

5 hari, dipisahkan dari endapan dan diperoleh larutan sebanyak 8 ml) = 8 ml

dosis I/ 4 ekor tikus.

= 2 ml (dengan kandungan 2,7 mg) dan diberikan per sonde per ekor tikus.

Dosis III (Untuk kelompok perlakuan ketiga akan diberikan dosis maksimal)

= 0,3 gram x 0,018(faktor konversi)

= 0,0054 gram

= 5,4 mg/200 gram BB tikus/Hari x 4 ekor tikus tiap kelompok

= 21,6 mg + 100 ml air, (kemudian dipanaskan dengan suhu 80°C selama 4-

5 jam sampai volume menyusut 12 ml diendapkan pada suhu kamar sampai

5 hari, dipisahkan dari endapan dan diperoleh larutan sebanyak 8 ml) = 8 ml

dosis I/ 4 ekor tikus.

= 2 ml (dengan kandungan 5,4 mg) dan diberikan per sonde.



Lampiran 4. Pembuatan larutan

1. Pembuatan larutan phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4

KCL 0,1 gram, KH_2PO_4 0,1 gram, NaCl 4 gram dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 ml aquades steril dan dihomogenkan menggunakan magnetik stirrer dalam gelas kimia 500 ml pH larutan diatur hingga mencapai 7,4 dengan larutan NaOH 1M. Kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan aquades steril hingga tanda batas.

2. Pembuatan PBS-Azida

Diambil 200 ml larutan PBS dengan pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. Kemudian ditambahkan 8 tetes larutan azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirrer.

3. Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

$$\text{Rumus NaCl-fis } 0,9\% = (0,9/100) \times 500 \text{ mL} = 4,5 \text{ g}$$

Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram yang sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades steril hingga tanda batas.

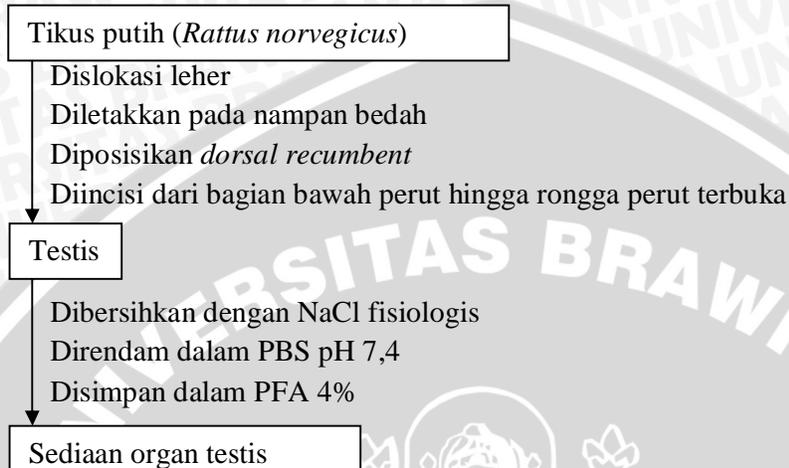
4. Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ V_1 \times 37\% &= 400 \text{ ml} \times 4\% \\ V_1 &= 10,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl-fis 0,9 sebagai pelarutnya, dimana NaCl ditimbang sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200 ml aquades dan distirrer. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai tanda batas.

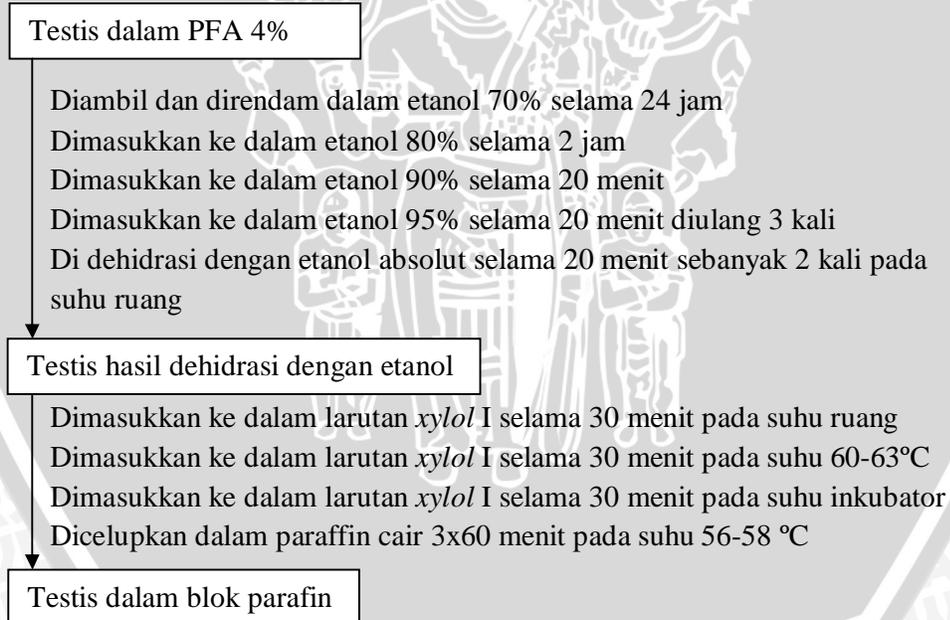
Lampiran 5. Diagram Alir Penelitian

1. Pengambilan organ pada hewan coba

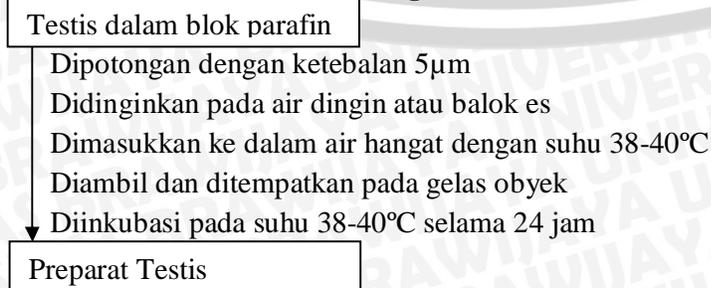


2. Sediaan preparat untuk pemeriksaan histologis

2.1 Embedding Testis



2.2 Pembuatan Preparat Organ



3. Pewarnaan dengan *Hematoxylin-Eosin*

Preparat Testis

Deparafinasi dengan *xylol* selama 5 menit (3 kali)
Dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 5 menit (3 kali)
Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) selama 5 menit
Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
direndam dalam aquades

Preparat Testis

Diwarnai dengan *Hematoxylin* selama 10 menit atau hingga diperoleh hasil yang terbaik
Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
Dibilas dengan aquades selama 5 menit
Diwarnai dengan *Eosin* selama 5 menit
Direndam dengan aquades selama 5 menit
Dimasukkan ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 5 detik
Dimasukkan kedalam etanol absolute selama 2 menit (3 kali)
Dimasukkan dengan *xylol* selama 3 menit (3 kali)
Dikeringkan
Dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup dengan cover glass

Preparat Testis HE

4. Metode Imunohistokimia (IL-1 β)

Preparat Testis

Dideparafinasi dengan *xylol* I, *xylol* II selama 5 menit
Direndam dalam etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) dan aquades (1kali 5 menit)
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit
Direndam dengan 3% Hidrogen Peroksida (dalam dionize water) 20 menit
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit
Direndam dalam FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5% dalam PBS, 30 menit
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit
Direaksikan dengan (1:100) Antibodi Primer (Anti IL-1 β) selama 24 jam dengan suhu 4°C (diencerkan dalam 1% BSA dalam PBS)
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit

Direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*) selama 1 jam dengan suhu ruang
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit
Kemudian ditambahkan SA-HRP (*Strepta avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 40 menit
Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit
Ditambahkan Substrat *DAB* (3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) dan diinkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS selama 3 kali 5 menit
Counterstaining dilakukan dengan *Hematoxylen* selama 5 menit pada suhu ruang
Dicuci aquades selama 3 kali menit
Mounting dengan entellan

Preparat Testis Imunohistokimia



Lampiran 6 Sertifikat taksonomi *Vitis vinifera*

LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0130/Takso.Identifikasi/03/2014

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

Nama : Ulfa Septiana Wulandari
Ditya Sulanda B
Valola Putri Perdana
Habyb Palyoga
Sakti Mustikkka Wati
Istiana Hidayati
Munip Setyowati
Tino Zainul

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 87, diidentifikasi sebagai:

Familia : Vitaceae
Genus : *Vitis*
Species : *Vitis vinifera* L.
Nama lokal : Anggur hijau

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 11 Maret 2014

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,



Dr. Serafinah Idrisyani, M.Si.
LABORATORIUM TAKSONOMI TUMBUHAN
198802 2 001