

Lampiran 1 : *Ethical Clearance*

55



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 352-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** : POTENSI MADU SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR  
TERHADAP AKTIFITAS PROTEASE DAN  
HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS ( *Rattus norvegicus*)  
INDUKSI CCL<sub>4</sub>

**PENELITI** : BRASILIA SEPTYA AYU

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

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 18 Mei 2015

Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



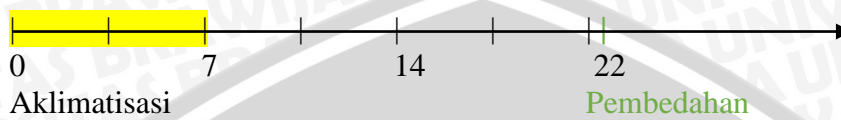
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001



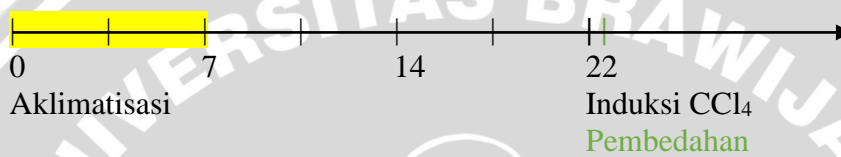
**Lampiran 2 : Rancangan Perlakuan**

**Perlakuan/hari :**

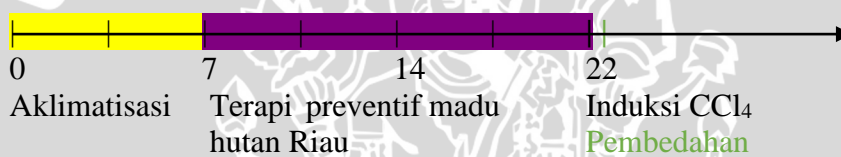
Kelompok kontrol negatif



Kelompok kontrol positif



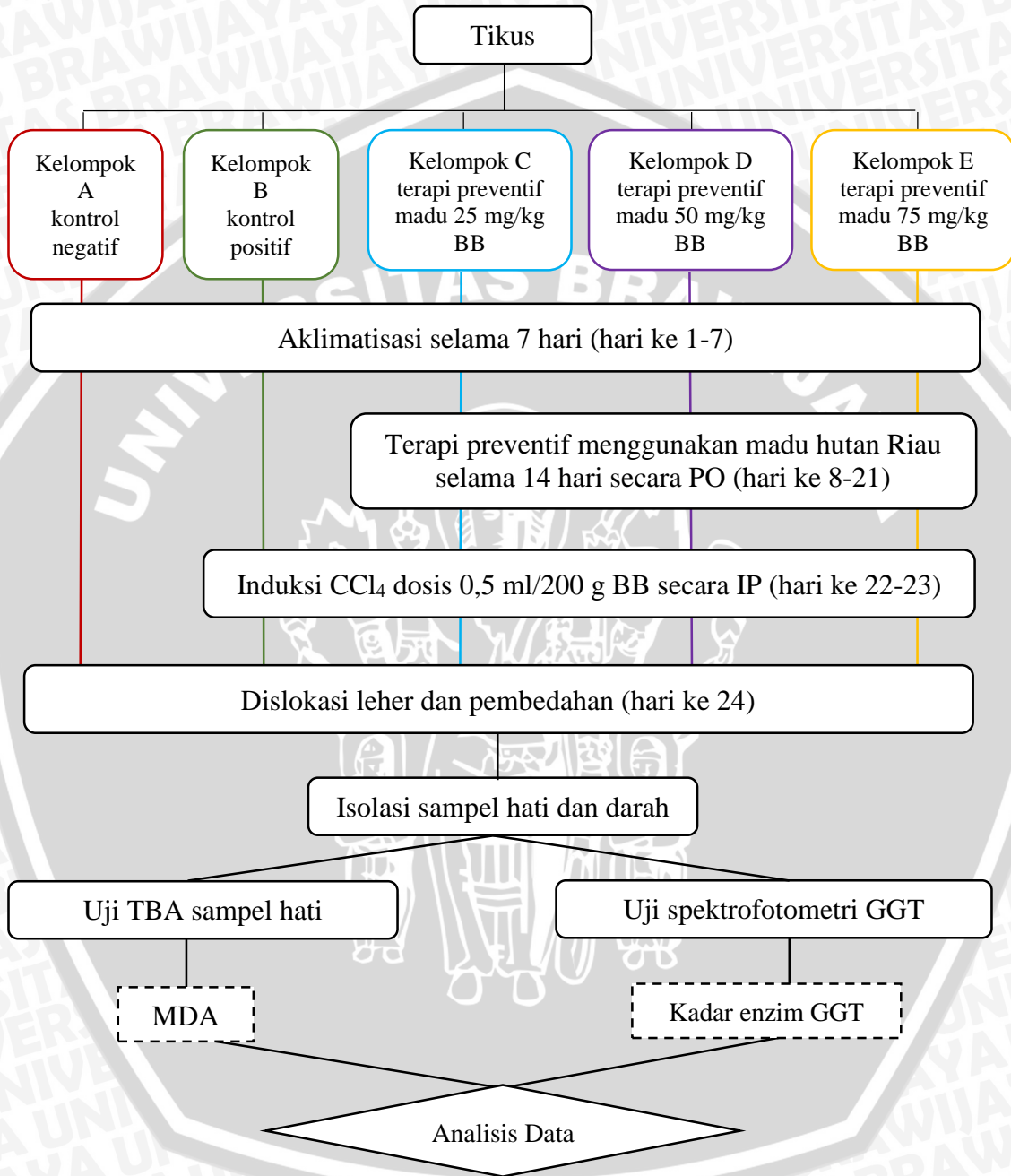
Kelompok tikus yang diberi terapi preventif madu hutan Riau + induksi CCl<sub>4</sub>



Keterangan :

1. Terapi preventif madu hutan Riau dilakukan sekali sehari secara peroral menggunakan sonde. Dosis yang digunakan yakni 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB masing-masing kelompok perlakuan.
2. Terapi preventif madu hutan Riau berlangsung selama 14 hari.
3. Induksi CCl<sub>4</sub> dilakukan secara intraperitoneal dosis 0,5 ml/200 g BB sekali sehari selama dua hari. Pembedahan dilakukan 24 jam setelah induksi.

Lampiran 3 : Skema Penelitian



#### Lampiran 4 : Perhitungan Dosis

##### Kelompok C (Dosis 25 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 25 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 ml = 1410 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 ml larutan madu = 141 mg madu

Dihitung : (a)  $\frac{200}{1000} \text{ kg} \times 25 \text{ mg/kg}$   
= 5 mg / ekor

(b)  $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$

$$V_1 \cdot 141 = 1 \cdot 5$$

$$V_1 = 0,035 \text{ ml} = 35 \mu\text{l} / \text{ekor}$$

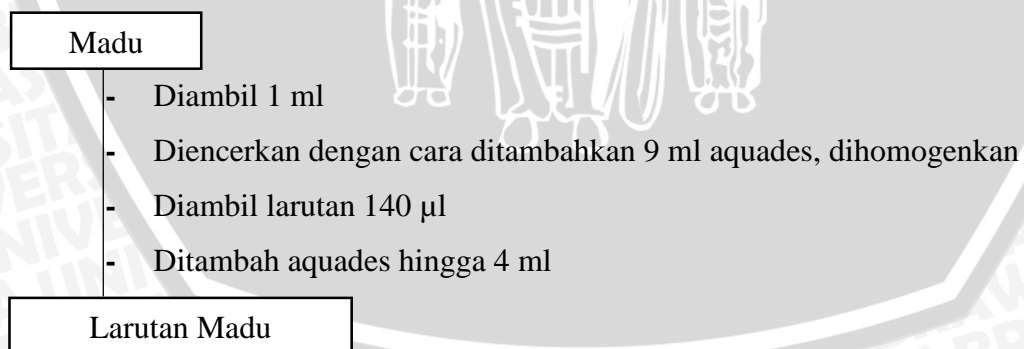
(c) Volume pemberian 1 ml

$$4 \text{ ekor} \times 35 \mu\text{l} = 140 \mu\text{l} \rightarrow 140 \mu\text{l} \sim 4 \text{ ml}$$

Dosis terapi = 25 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 35  $\mu\text{l}$ /ekor tikus.

Volume pemberian 1 ml / ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



**Kelompok D (Dosis 50 mg/kg BB)**

Perhitungan untuk dosis 50 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 ml = 1410 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 ml larutan madu = 141 mg madu

Dihitung : (a)  $\frac{200}{1000} \text{ kg} \times 50 \text{ mg/kg}$

$$= 10 \text{ mg / ekor}$$

(b)  $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$

$$V_1 \cdot 141 = 1 \cdot 10$$

$$V_1 = 0,070 \text{ ml} = 70 \mu\text{l / ekor}$$

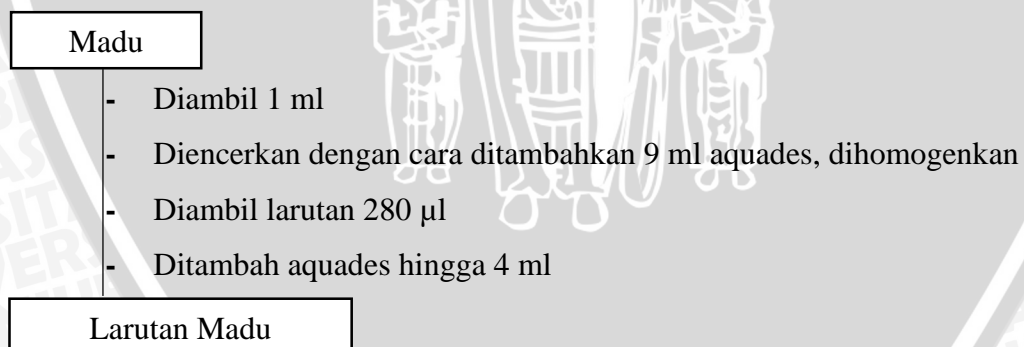
(c) Volume pemberian 1 ml

$$4 \text{ ekor} \times 70 \mu\text{l} = 280 \mu\text{l} \rightarrow 280 \mu\text{l} \sim 4 \text{ ml}$$

Dosis terapi = 50 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 70  $\mu\text{l}$  / ekor.

Volume pemberian 1 ml / ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



**Kelompok E (Dosis 75 mg/kg BB)**

Perhitungan untuk dosis 75 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 ml = 1410 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 ml larutan madu = 141 mg madu

Dihitung : (a)  $\frac{200}{1000} \text{ kg} \times 75 \text{ mg/kg}$ 

= 15 mg / ekor

(b)  $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$

$V_1 \cdot 141 = 1 \cdot 15$

$V_1 = 0,105 \text{ ml} = 105 \mu\text{l} / \text{ekor}$

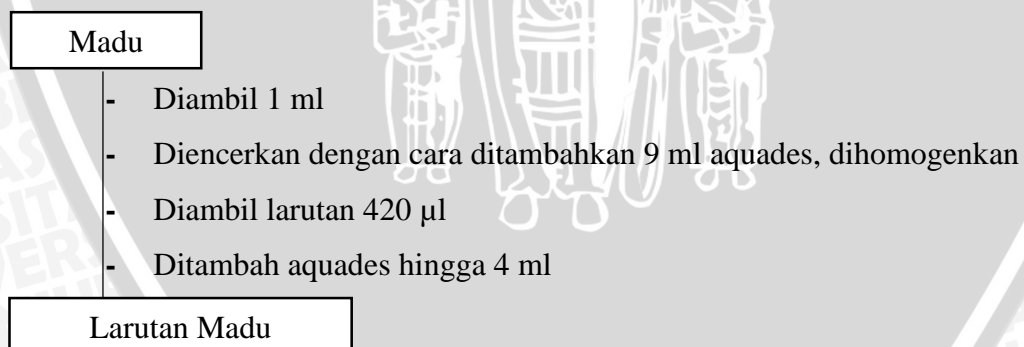
(c) Volume pemberian 1 ml

$4 \text{ ekor} \times 105 \mu\text{l} = 420 \mu\text{l} \rightarrow 420 \mu\text{l} \sim 4 \text{ ml}$

Dosis terapi = 75 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 105  $\mu\text{l}$  / ekor.

Volume pemberian 1 ml / ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



**Lampiran 5 : Prosedur Pengukuran Kadar MDA (Capeyron *et al.*, 2002)****Pembuatan Larutan Standar MDA**

100  $\mu$ l Stock Kit MDA konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8  $\mu$ g/ml

- Dimasukkan dalam tabung reaksi kecil
- Ditambah 550  $\mu$ l aquades
- Ditambahkan 100  $\mu$ l TCA 10 %
- Dihomogenkan
- Ditambahkan 250  $\mu$ l HCl
- Dihomogenkan
- Ditambah 100  $\mu$ l Na-Thio 1 %
- Dihomogenkan
- Disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

- Diinkubasi pada *waterbath* 100°C selama 30 menit
- Diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer ( $\lambda = 533$  nm)

Absorbansi larutan standar dan kurva standar MDA

### Pembuatan Homogenat

Hati

- Ditimbang 1 gram
- Dipotong kecil-kecil dan digerus dalam mortar dingin
- Ditambahkan 1 ml NaCl 0,9 %
- Disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit
- Diambil supernatannya

Supernatan

### Pengukuran Kadar MDA Homogenat

Supernatan

- Diambil 100  $\mu$ l sampel supernatan
- Ditambah 550  $\mu$ l aquades
- Ditambahkan 1 ml NaCl 0,9 %
- Ditambah 100  $\mu$ l asam trikloroasetat atau TCA 10 %
- Dihomogenkan dengan vorteks
- Ditambah 250  $\mu$ l HCl 1 M
- Ditambah 100  $\mu$ l Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan vorteks
- Dipanaskan dalam water bath dengan suhu 100°C selama 20 menit
- Diangkat dan didinginkan pada suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada  $\alpha = 533$  nm

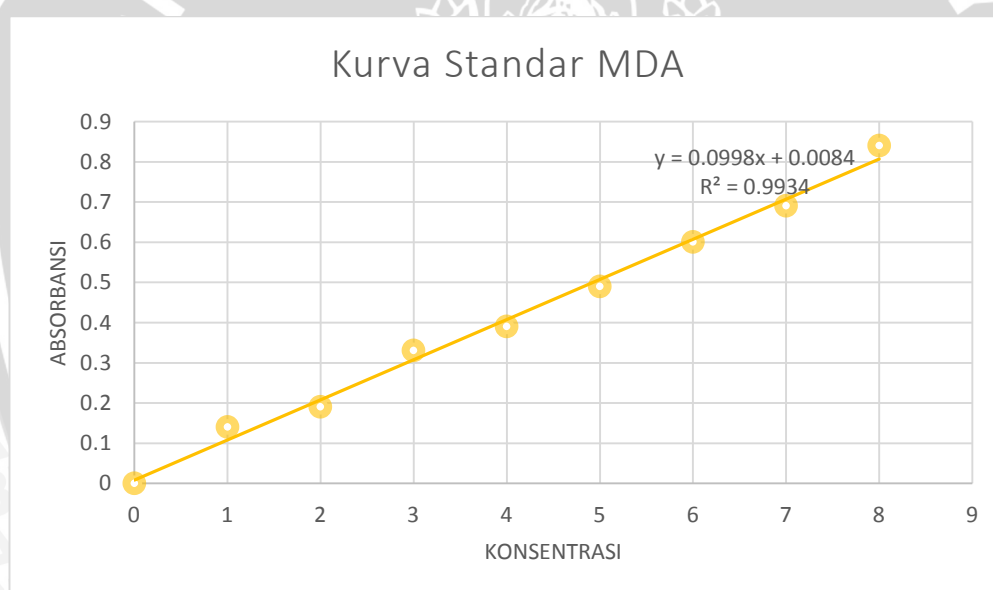
Hasil



### Lampiran 6 : Kurva Standar MDA dan Perhitungan Kadar MDA

**Tabel L6.1** Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Standar MDA dengan Panjang Gelombang 533 nm

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi
0	0
1	0,140
2	0,190
3	0,330
4	0,390
5	0,490
6	0,600
7	0,691
8	0,841



**Gambar L6.1** Kurva standar MDA dengan panjang gelombang 533 nm

**Tabel L6.2** Data Absorbansi MDA

Perlakuan	Absorbansi MDA			
	1	2	3	4
<b>Kontrol -</b>	0.052	0.054	0.059	0.058
<b>Kontrol +</b>	0.09	0.096	0.098	0.094
<b>Preventif 25 mg/kg BB</b>	0.072	0.079	0.071	0.077
<b>Preventif 50 mg/kg BB</b>	0.07	0.067	0.064	0.062
<b>Preventif 75 mg/kg BB</b>	0.062	0.06	0.059	0.063

### Perhitungan Kadar MDA

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA (Gambar L6.1)  $y = 0,098x + 0,0136$ .

Contoh perhitungan kadar MDA adalah :

$$y = 0,098x + 0,0136$$

$$0,052 = 0,098x + 0,0136$$

$$x = \frac{(0,052 - 0,0136)}{0,098}$$

$$x = 0,392 \mu\text{g/ml}$$

**Tabel L6.3** Perhitungan Kadar MDA

Perlakuan	Kadar MDA ( $\mu\text{g/ml}$ )				Rata-Rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	
<b>Kontrol -</b>	0.392	0.412	0.463	0.453	0.430 $\pm$ 0.003
<b>Kontrol +</b>	0.780	0.841	0.861	0.820	0.826 $\pm$ 0.004
<b>Preventif 25 mg/kg BB</b>	0.596	0.667	0.586	0.647	0.624 $\pm$ 0.005
<b>Preventif 50 mg/kg BB</b>	0.576	0.545	0.514	0.494	0.532 $\pm$ 0.004
<b>Preventif 75 mg/kg BB</b>	0.494	0.473	0.463	0.504	0.484 $\pm$ 0.001

## Lampiran 7 : Prosedur Pengukuran Kadar GGT Menggunakan Spektrofotometri (Jong, 2003)

### Pembuatan serum

Darah

- Dimasukkan ke dalam *vacutainer* label merah
- Dilakukan sentrifus 2500 rpm selama 15 menit
- Diambil supernatan (serum)

Serum

### Pengukuran Kadar GGT

Serum

- Diambil 20  $\mu$ l
- Ditambah 1000  $\mu$ l reagen GGT
- Dihomogenkan dan didiamkan di suhu ruang selama 1 menit
- Dibaca pada panjang gelombang 405 nm
- Dicatat perubahan absorbansinya setiap 1 menit hingga nilai menjadi konstan

Hasil

**Lampiran 8 : Kadar GGT Serum****Tabel L7.1 Hasil Uji Kadar GGT Serum**

Perlakuan	Kadar GGT (U/L)				Rata-Rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	
<b>Kontrol -</b>	0.64	0.57	0.71	0.61	0.632 $\pm$ 0.01
<b>Kontrol +</b>	1.98	1.91	1.93	1.69	1.877 $\pm$ 0.04
<b>Preventif 25 mg/kg BB</b>	0.95	0.86	0.8	0.79	0.85 $\pm$ 0.01
<b>Preventif 50 mg/kg BB</b>	0.81	0.73	0.84	0.77	0.787 $\pm$ 0.006
<b>Preventif 75 mg/kg BB</b>	0.69	0.76	0.77	0.65	0.717 $\pm$ 0.009



**Lampiran 9 : Hasil Uji Statistika Kadar MDA Hati**

**Tabel L9.1** Uji Normalitas Data

Dependent variable MDA		Unstandardized Residual
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.14289595
Most Extreme Differences	Absolute	.153
	Positive	.153
	Negative	-.099
Kolmogorov-Smirnov Z		.683
Asymp. Sig. (2-tailed)		.740*

\*P > 0.05 = data berdistribusi normal

**Tabel L9.2** Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.079	4	15	.402*

\*P > 0.05 = data dari tiap kelompok memiliki varian yang sama

**Tabel L9.3** Uji ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.385	4	.096	87.327	.000*
Within Groups	.017	15	.001		
Total	.402	19			

\*P < 0.05 = terdapat perbedaan antar perlakuan

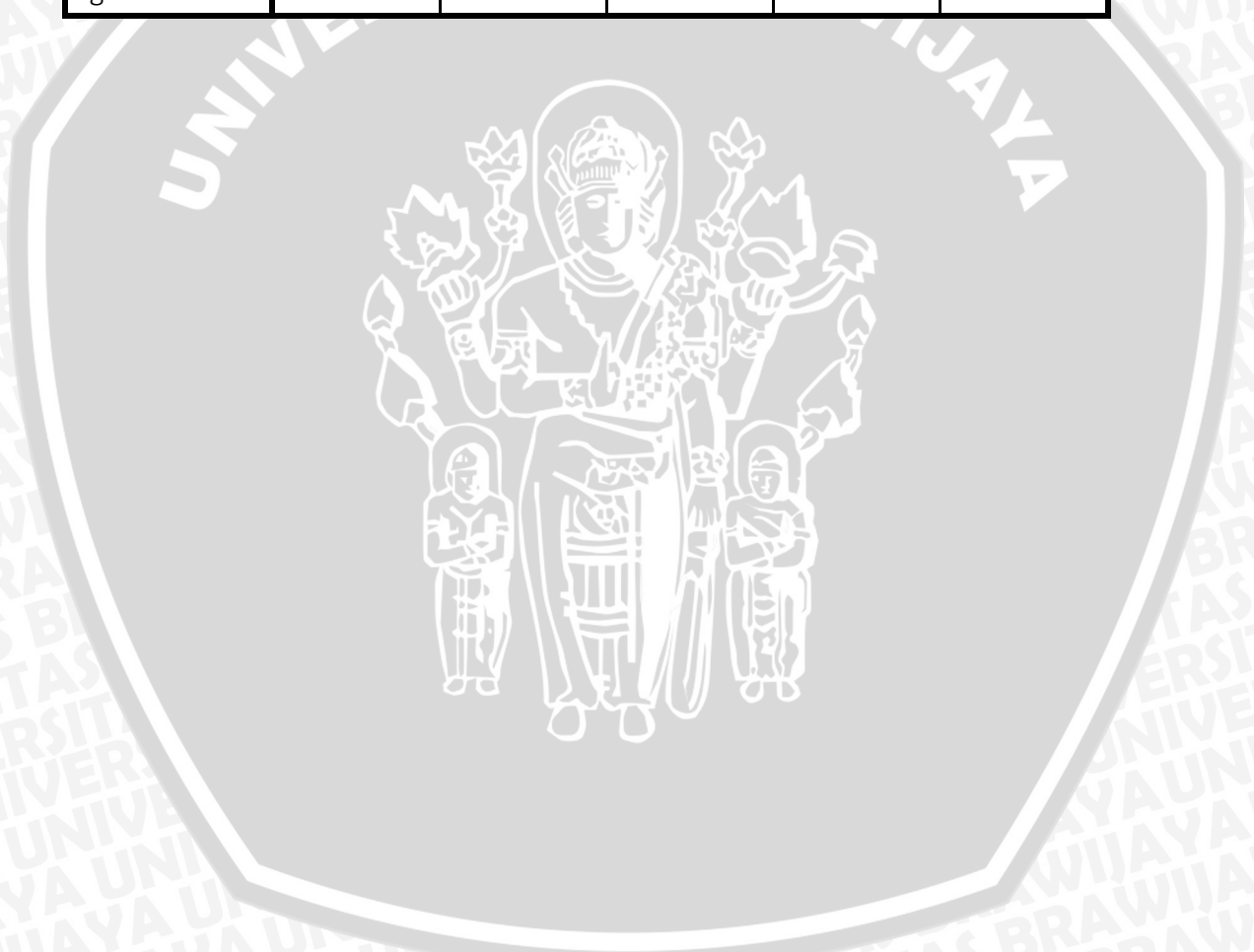
**Tabel L9.4 Uji Lanjutan ( Tukey / BNJ )**

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol -	Kontrol +	-.395500*	.023487	.000	-.46802	-.32298
	Preventif 25	-.194000*	.023487	.000	-.26652	-.12148
	Preventif 50	-.102250*	.023487	.004	-.17477	-.02973
	Preventif 75	-.053250	.023487	.209	-.12577	.01927
Kontrol +	Kontrol -	.395500*	.023487	.000	.32298	.46802
	Preventif 25	.201500*	.023487	.000	.12898	.27402
	Preventif 50	.293250*	.023487	.000	.22073	.36577
	Preventif 75	.342250*	.023487	.000	.26973	.41477
Preventif 25	Kontrol -	.194000*	.023487	.000	.12148	.26652
	Kontrol +	-.201500*	.023487	.000	-.27402	-.12898
	Preventif 50	.091750*	.023487	.010	.01923	.16427
	Preventif 75	.140750*	.023487	.000	.06823	.21327
Preventif 50	Kontrol -	.102250*	.023487	.004	.02973	.17477
	Kontrol +	-.293250*	.023487	.000	-.36577	-.22073
	Preventif 25	-.091750*	.023487	.010	-.16427	-.01923
	Preventif 75	.049000	.023487	.276	-.02352	.12152
Preventif 75	Kontrol -	.053250	.023487	.209	-.01927	.12577
	Kontrol +	-.342250*	.023487	.000	-.41477	-.26973
	Preventif 25	-.140750*	.023487	.000	-.21327	-.06823
	Preventif 50	-.049000	.023487	.276	-.12152	.02352

\* ada perbedaan signifikan antar rata-rata perlakuan

**Tabel L9.5** Pemberian Notasi pada Uji Tukey

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
Kontrol -	4	.43000			
Preventif 75	4	.48325	.48325		
Preventif 50	4		.53225		
Preventif 25	4			.62400	
Kontrol +	4				.82550
Sig.		.209	.276	1.000	1.000



**Lampiran 10 : Hasil Uji Statistika Kadar GGT Serum**

**Tabel L10.1 Uji Normalitas Data**

Dependent variable GGT		Unstandardized Residual
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.45594667
Most Extreme Differences	Absolute	.317
	Positive	.317
	Negative	-.144
Kolmogorov-Smirnov Z		1.416
Asymp. Sig. (2-tailed)		.306*

\*P > 0.05 = data berdistribusi normal

**Tabel L10.2 Uji Homogenitas**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.275	4	15	.323*

\*P > 0.05 = data dari tiap kelompok memiliki varian yang sama

**Tabel L10.3 Uji ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.196	4	1.049	169.356	.000*
Within Groups	.093	15	.006		
Total	4.288	19			

\*P < 0.05 = terdapat perbedaan antar perlakuan



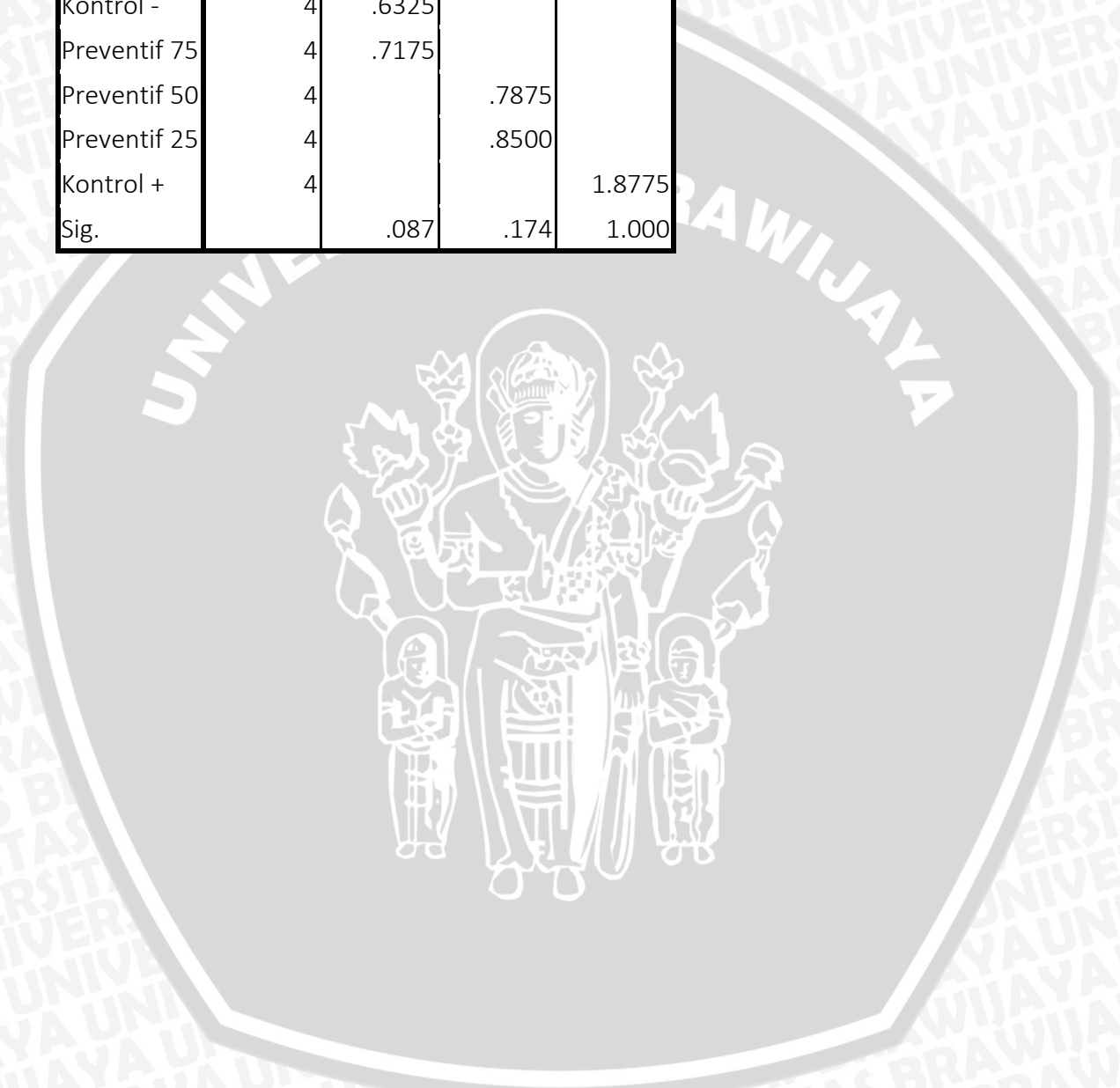
**Tabel L10.4** Uji Lanjutan (Tukey / BNJ )

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol -	Kontrol +	-1.2450*	.05565	.000	-1.4168	-1.0732
	Preventif 25	-.2175*	.05565	.000	-.3893	-.0457
	Preventif 50	-.1550*	.05565	.000	-.3268	.0168
	Preventif 75	-.08500	.05565	.562	-.2568	.0868
Kontrol +	Kontrol -	1.2450*	.05565	.000	1.0732	1.4168
	Preventif 25	1.0275*	.05565	.000	.8557	1.1993
	Preventif 50	1.0900*	.05565	.000	.9182	1.2618
	Preventif 75	1.1600*	.05565	.000	.9882	1.3318
Preventif 25	Kontrol -	.2175*	.05565	.000	.0457	.3893
	Kontrol +	-1.0275*	.05565	.000	-1.1993	-.8557
	Preventif 50	.06250	.05565	.792	-.1093	.2343
	Preventif 75	.1325*	.05565	.000	-.0393	.3043
Preventif 50	Kontrol -	.1550*	.05565	.000	-.0168	.3268
	Kontrol +	-1.0900*	.05565	.000	-1.2618	-.9182
	Preventif 25	-.06250	.05565	.792	-.2343	.1093
	Preventif 75	.07000*	.05565	.000	-.1018	.2418
Preventif 75	Kontrol -	.08500	.05565	.562	-.0868	.2568
	Kontrol +	-1.1600*	.05565	.000	-1.3318	-.9882
	Preventif 25	-.1325*	.05565	.000	-.3043	.0393
	Preventif 50	-.07000*	.05565	.000	-.2418	.1018

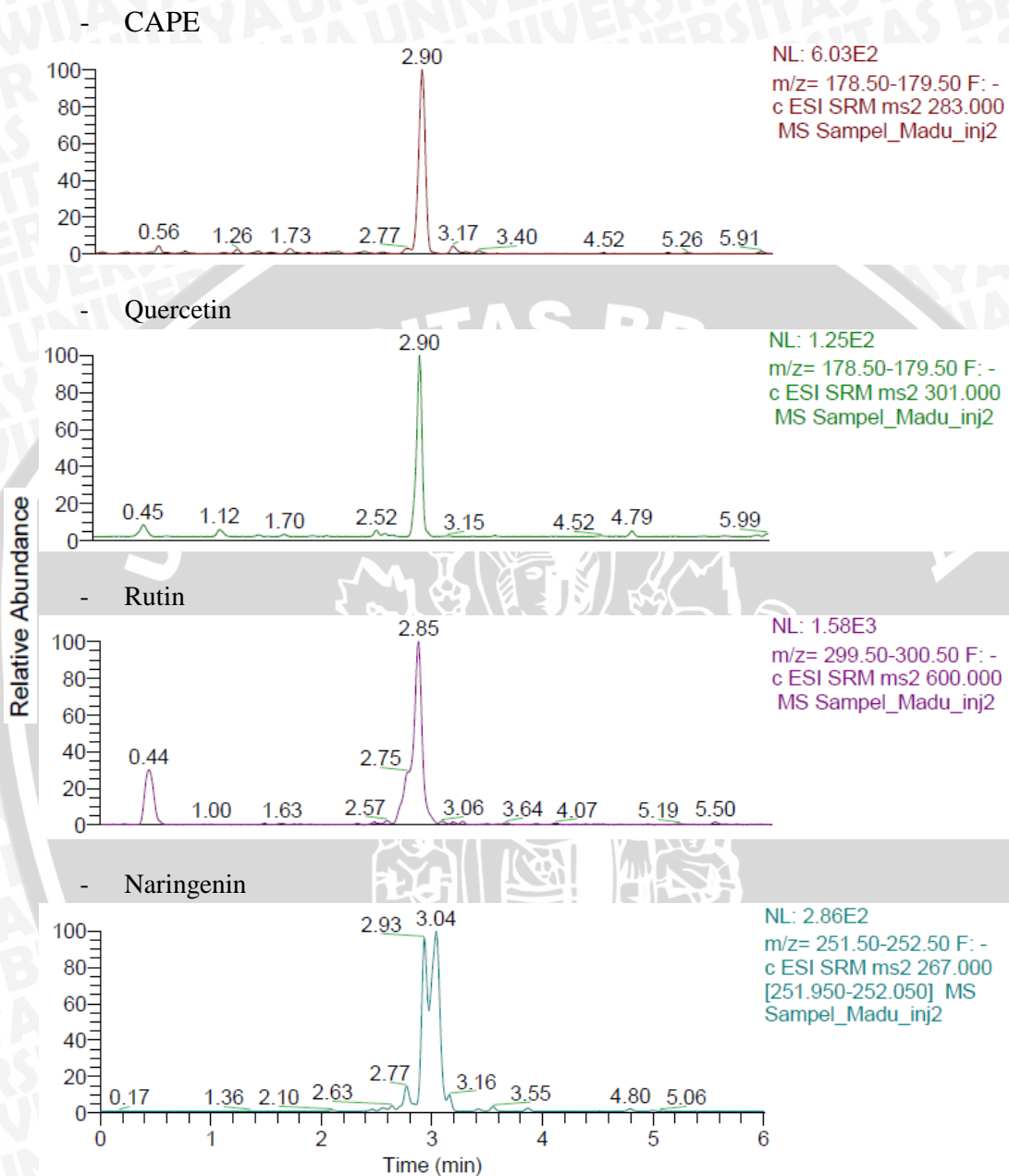
\* ada perbedaan signifikan antar rata-rata perlakuan

**Tabel L10.5** Pemberian Notasi pada Uji Tukey

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
Kontrol -	4	.6325		
Preventif 75	4	.7175		
Preventif 50	4		.7875	
Preventif 25	4		.8500	
Kontrol +	4			1.8775
Sig.		.087	.174	1.000



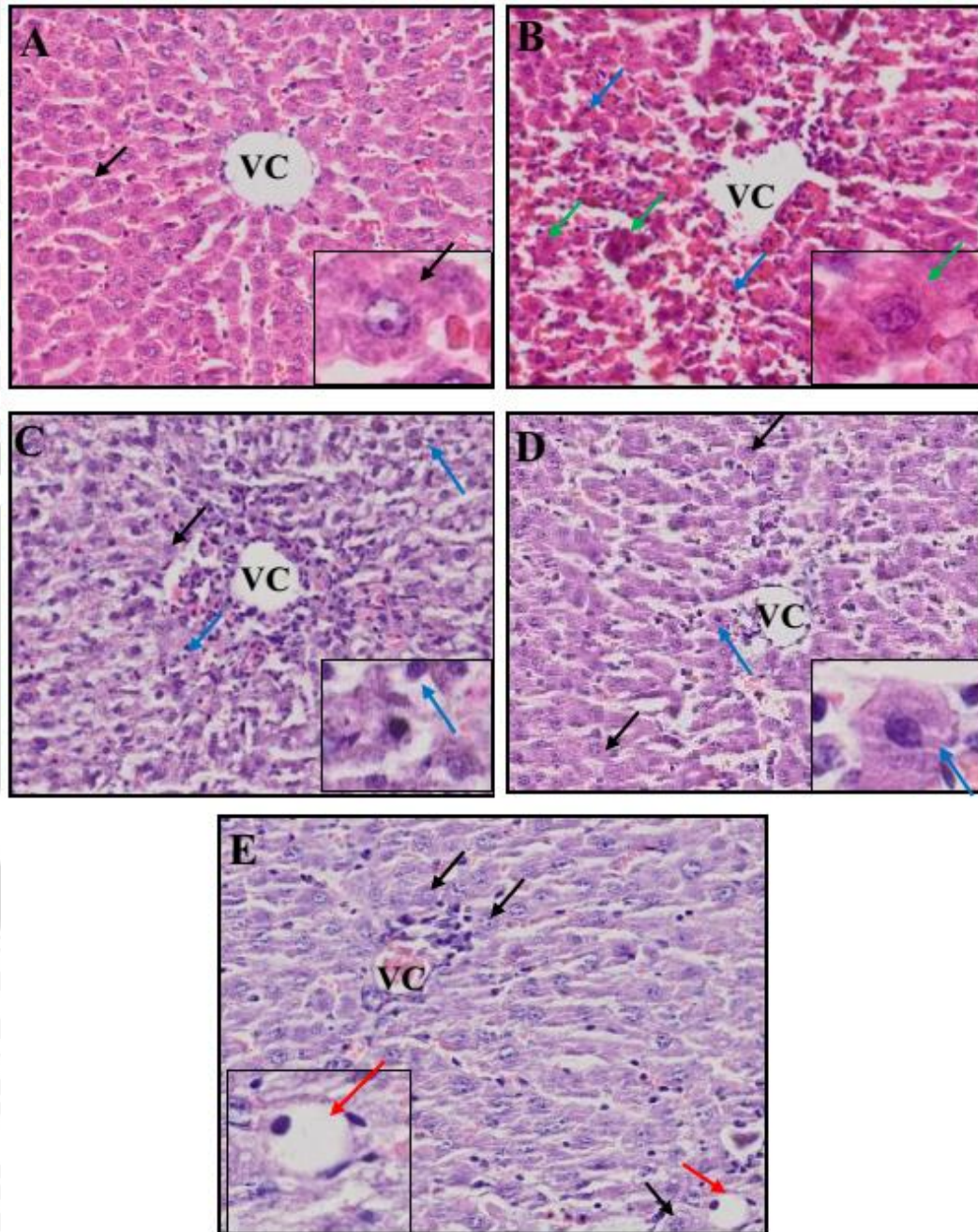
### Lampiran 11 : Hasil Uji LCMS Madu Hutan Riau Secara Kualitatif



Uji ini untuk mengetahui kandungan flavonoid di dalam madu hutan Riau. Beberapa turunan flavonoid yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah :

- CAPE : 179 g/mol
- Quercetin : 179 g/mol
- Rutin : 300 g/mol
- Naringenin : 252 g/mol

Lampiran 12 : Histopatologi Organ Hati Tikus



**Gambar 1** : Gambaran histopatologi hati tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE, perbesaran 400x.

Keterangan : Kelompok Kontrol Negatif (A), Kontrol Positif (B), Preventif 25 mg/kg BB (C), Preventif 50 mg/kg BB (D), dan Preventif 75 mg/kg BB (E). Tanda panah hitam menunjukkan sel hepatosit normal, tanda panah hijau menunjukkan inti karioreksis, tanda panah biru menunjukkan inti piknotik, tanda panah merah menunjukkan steatosis.

Gambar 1A menunjukkan histologi hati tikus dalam keadaan normal. Pada gambaran mikroskopis tersebut terlihat hepatosit normal berbentuk kuboid dan memiliki inti yang berada di tengah. Sinusoid terlihat normal dengan bentuk iregular dan ukurannya lebih besar daripada kapiler darah. Gambaran histopatologi kelompok kontrol positif (Gambar 1B) menunjukkan adanya perubahan pada inti sel berupa nekrosis karioreksis dan nekrosis piknotik karena induksi CCl<sub>4</sub>. Terjadinya nekrosis sel hati ini, dapat diketahui dengan adanya perubahan pada sitoplasma dan inti sel, saat membran plasma sel rusak, berbagai enzim akan dilepas ke dalam darah dan dapat dijadikan penanda kuantitatif terhadap luas dan tipe kerusakan hepatosit.

Berdasarkan Ayu (2015) gambar 1C merupakan gambaran histopatologi hati tikus kelompok preventif dosis 25 mg/kg BB, menunjukkan bahwa masih terlihat hepatosit yang normal meskipun tidak berbeda jauh terhadap kelompok kontrol positif yang ditunjukkan pada gambar 1B, nekrosis piknotik pada sel juga banyak terlihat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (Gambar 1A). Pada gambar 1D merupakan gambaran histopatologi hati kelompok tikus preventif 50 mg/kg BB masih belum efektif dalam mencegah kerusakan sel jika dilihat dari kondisi sel yang masih banyak ditemukan inti yang mengalami nekrosis piknotik. Namun, menunjukkan adanya penghambatan kerusakan hati yang ditunjukkan dengan ditemukan sel hati normal dan jumlah sel yang mengalami nekrosis piknotik lebih sedikit dibandingkan dengan gambaran histopatologi kelompok preventif madu dosis 25 mg/kg BB. Gambar 1E mulai terlihat memberikan hambatan kerusakan sel jika dibandingkan dengan histopatologi kelompok kontrol positif, pada gambar ditemukan banyak hepatosit yang normal di antara sel yang mengalami perlemakan. Pada gambar ditemukan adanya vakuolisasi, tetapi bagian lobus hati yang mengalami steatosis terlihat berupa vakuola kecil dan tidak berada di setiap bagian lobus pada hati serta dan tidak terlihat adanya nekrosis piknotik ataupun nekrosis karioreksis. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok preventif madu dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam penelitian ini yang dapat menghambat kerusakan hati dan hampir mendekati gambaran histologi kelompok tikus kontrol negatif.