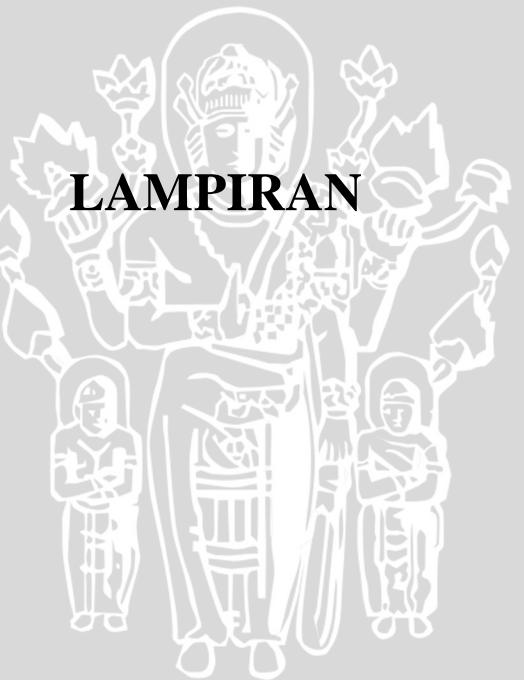


UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



Lampiran 1. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM JURUSAN BIOLOGI LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN TUMBUHAN Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia, Telepon/Fax.: +62-341-575841, http://biologi.ub.ac.id
SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI	
No : No. 0149/Takso.Identifikasi/03/2014	
Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:	
Nama	: Eni Wulandari (NIM 115130100111052) Navy Linggar H. A. (NIM 115130100111063) Gilang Siwi P. (NIM 115130100111051) Geta Darantika (NIM 115130101111059) Vetri Handayani (NIM 115130113111005)
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 225, diidentifikasi sebagai:	
Familia	: Apocynaceae
Genus	: Plumeria
Species	: Plumeria acuminata W. T. Ait.
Nama lokal	: Kamboja
Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.	
Malang, 3 Oktober 2014	
a.n. Kepala Laboratorium Pelaksana Harian	
 LABORATORIUM TAKSONOMI KUTUBUHAN Dr. Jati Batoro, M.Si. NIP. 19570425.198601.1.001	



Lampiran 2. Serifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ETHICAL CLEARENCE”**

No:305-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAWAH:**

PENELITIAN BERJUDUL	: PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN KAMBOJA PUTIH (<i>Plumenia oeuminata L.</i>) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LAMBUNG TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) HASIL INDUKSI INDOMETASIN
PENELITI	: VETRI HANDAYANI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

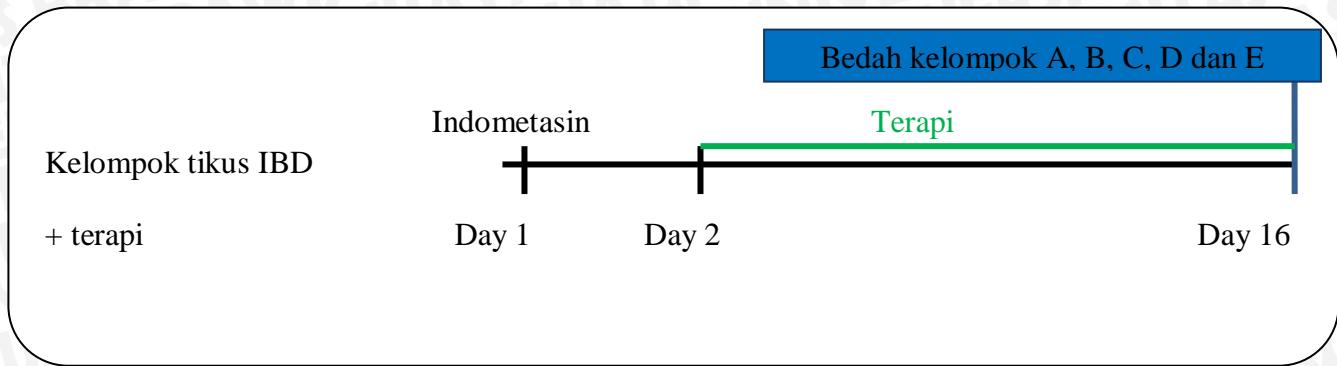
Malang, 17 Maret 2015

Ketua Komisi Etik Penelitian

Universitas Brawijaya

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



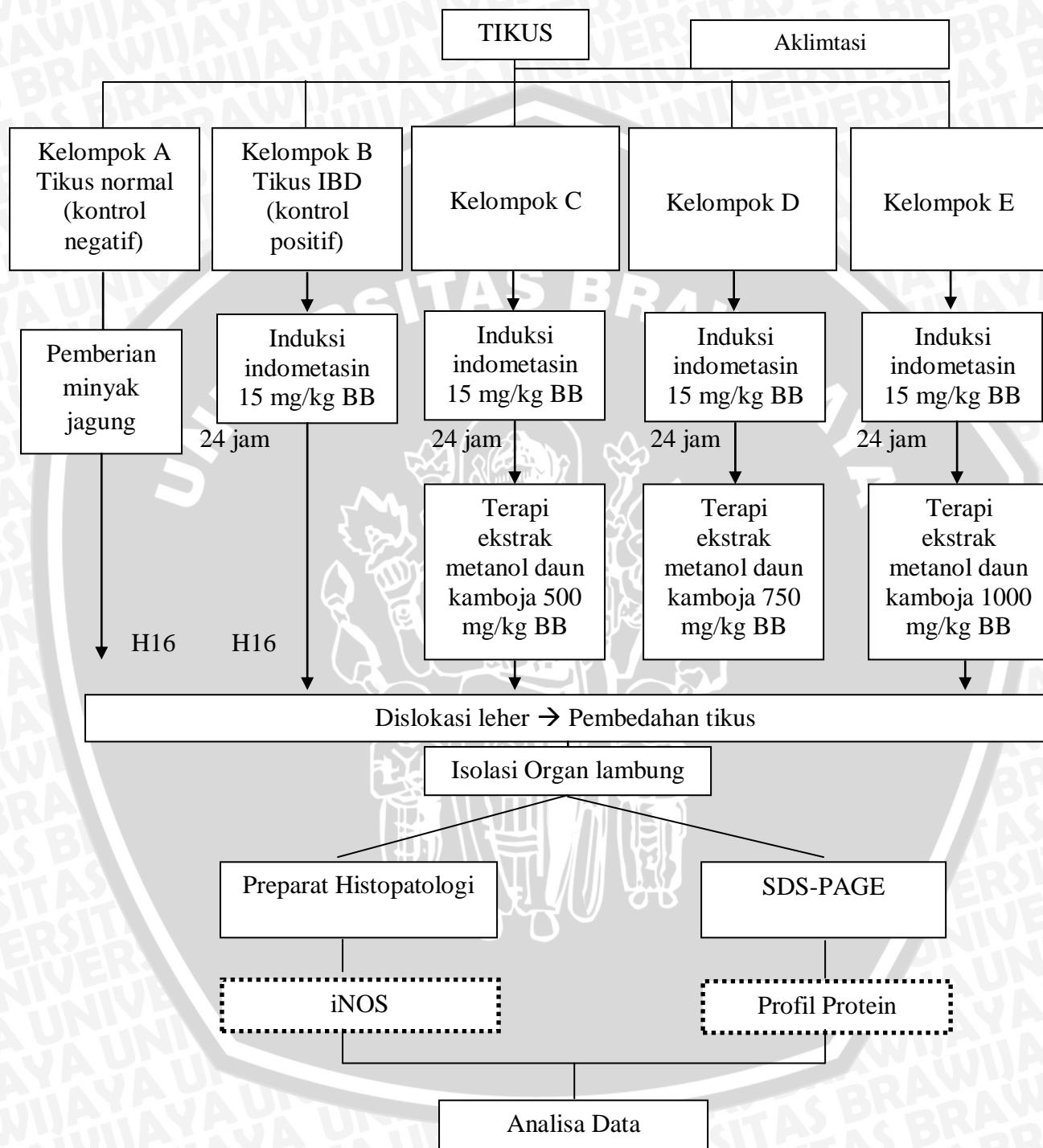
Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian**A. Rancangan Perlakuan**

Keterangan:

1. Induksi indometasin dilakukan secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB dengan pelarut minyak jagung.
2. Pada hari ke-2 sampai hari ke-15 tikus kelompok C, D dan E diberikan terapi ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata L.*) dengan dosis 500 mg, 750 mg dan 1000 mg.
3. Pada hari ke-16 dilakukan pembedahan tikus kelompok C, D dan E untuk mengisolasi organ untuk pembuatan preparat histologi untuk uji iNOS serta untuk uji profil protein menggunakan metode SDS-PAGE.



B. Kerangka Operasional



Keterangan :

: Parameter yang diamati

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan yaitu 15 mg/kg BB (Aulani'am, 2012). Rata- rata berat badan tikus adalah 200 gram. Kebutuhan indometasin untuk per ekor tikus yaitu:

$$\begin{aligned} \text{Dosis indometasin per ekor tikus} &= 15 \text{ mg/kg BB} \times 0,20 \text{ kg} \\ &= 3 \text{ mg/kg BB.} \end{aligned}$$

Jadi, dosis indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned} \text{Dosis indometasin untuk 16 ekor tikus} &= 16 \times 3 \text{ mg/kg BB} \\ &= 48 \text{ mg/kg BB.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pengeceran dengan minyak jagung yaitu sebanyak} &= 48 \text{ mg} / 45 \text{ mg} \times 4 \text{ ml} \\ &= 4,3 \text{ ml} = 4300 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi, indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus yaitu sebanyak 48 mg. selanjutnya diencerkan dengan minyak jagung dengan hasil akhir 4,3 ml untuk 16 ekor tikus. Induksi indometasin yang diperlukan untuk per ekor tikus yaitu 0,27 ml.



Lampiran 5. Penentuan dosis dan pembuatan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*)

Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Gupta (2006) yaitu sebesar 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Hal ini dikarenakan dosis yang sering digunakan dalam penelitian menggunakan ekstrak metanol daun kamboja putih antara 500 mg/kg BB sampai 2000 mg/kg BB.

Prosedur pembuatan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*)

Daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*)

- Ditimbang sebanyak 1000 gram.
- Dimasukkan kedalam beker glass.
- Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:3.
- Direndam dan didiamkan pada suhu kamar selama 3 hari, dengan sesekali diaduk.
- Disaring menggunakan kertas saring whatman no 40.
- Dilakukan evaporasi untuk menghilangkan pelarut.
- Diwaterbath pada suhu 40-50 °C untuk menghilangkan sisa metanol.

Ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*)



Perhitungan Dosis Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata L.*)

Kelompok C (Dosis Terapi 500 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 500 mg/kg BB

Diketahui : - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung: } = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 500 \text{ mg/kg}$$

$$= 100 \text{ mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.}$$

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi 500 mg/Kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 100 mg.
- Jumlah kelompok terapi 500 mg/Kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :

Berat kering daun kamboja putih = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 100 \text{ mg/ ekor/ hari} \times 4$$

$$= 400 \text{ mg} \times 14$$

$$= 5600 \text{ mg}$$

= 5,6 gram

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 5,6 gram ditambahkan dengan 56 ml aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 ml/ ekor/ hari.

Kelompok D (Dosis Terapi 750 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 750 mg/kg BB

Diketahui : - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung: } = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 750 \text{ mg/kg}$$

= 150 mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi 750 mg/Kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 150 mg.

- Jumlah kelompok terapi 750 mg/Kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :

Berat kering daun putri malu = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

= 150 mg/ ekor/ hari x 4



$$= 600 \text{ mg} / 4 \text{ ekor tikus} \times 14$$

$$= 8400 \text{ mg}$$

$$= 8,4 \text{ gram}$$

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 8,4 gram ditambahkan dengan 56 ml aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 ml/ ekor/ hari.

Kelompok E (Dosis Terapi 1000 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 1000 mg/kg BB

Diketahui : - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung: } = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 1000 \text{ mg/kg}$$

$$= 200 \text{ mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.}$$

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi 1000 mg/Kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 200 mg.

- Jumlah kelompok terapi 1000 mg/Kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :



Berat kering daun putri malu = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 200 \text{ mg/ ekor/ hari} \times 4$$

$$= 800 \text{ mg} \times 14$$

$$= 11200 \text{ mg}$$

$$= 11,2 \text{ gram}$$

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 5,6 gram ditambahkan dengan 56 ml aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 ml/ ekor/ hari.



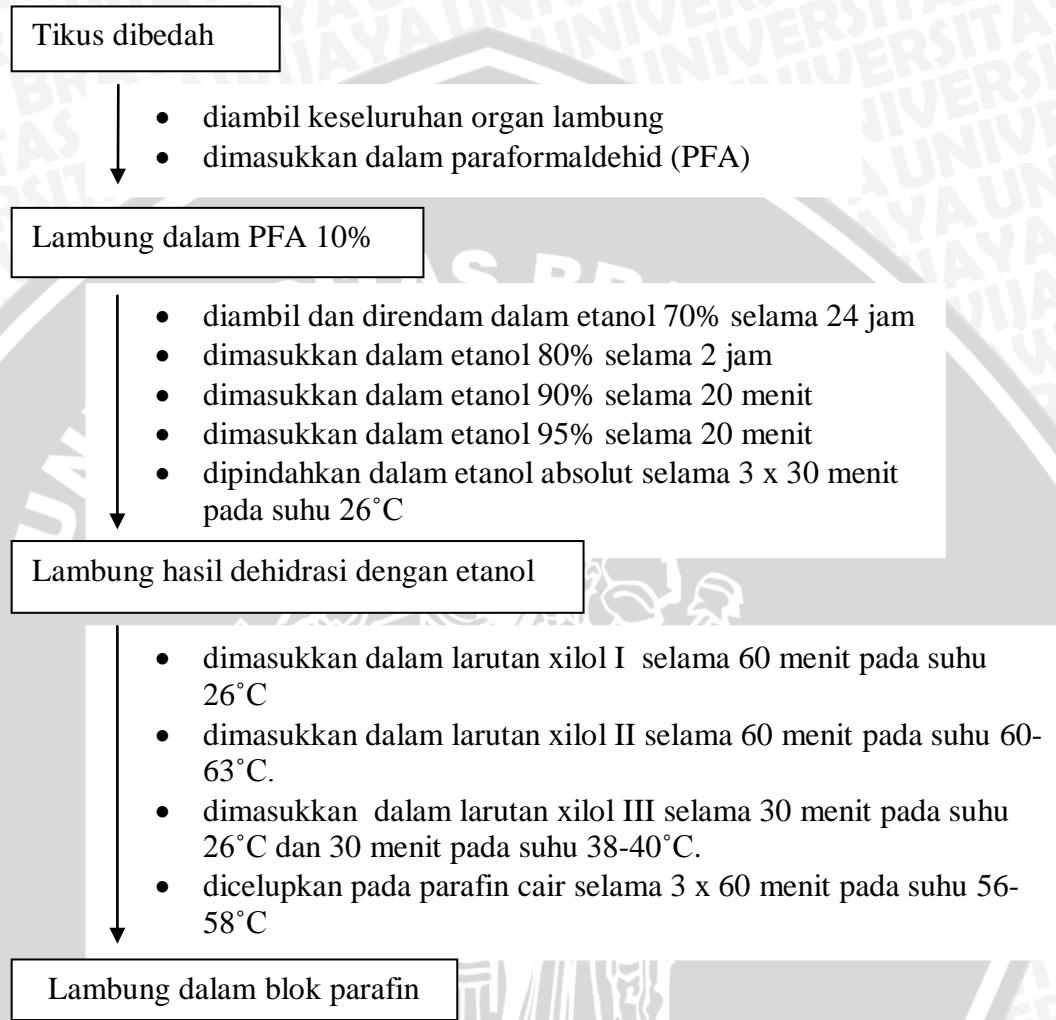
Lampiran 6. Komposisi Larutan

Tabel L6.1. Komposisi Larutan

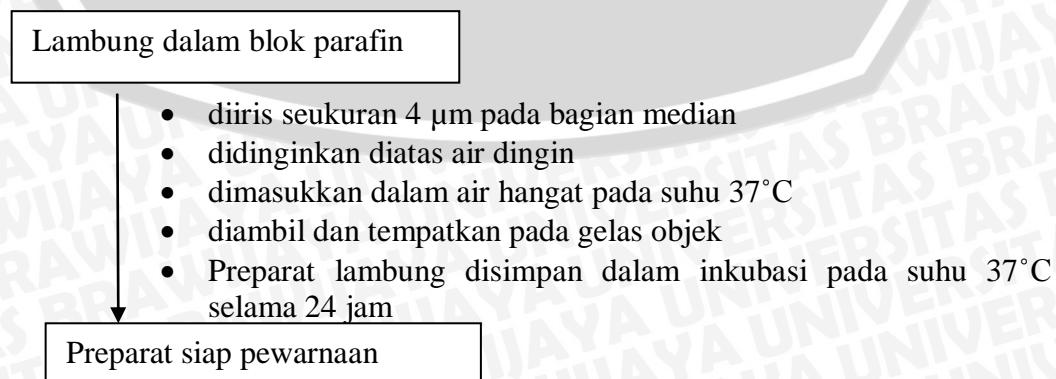
No.	Larutan	Bahan- bahan
1.	100 ml NaCl fisiologis 0,9 %	4,5 gram garam NaCl Akuades
2.	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram KH ₂ PO ₄ 8 gram NaCl 2,16 gram Na ₂ HPo ₄ . H ₂ O 0,2 gram KCl 0,2 gram KH ₂ PO ₄ 8 gram NaCl 2,16 gram Na ₂ HPo ₄ . H ₂ O
3.	TCA 10%	TCA 10 g Akuades 100 ml
4.	Na-Thio 1%	Asam thiobarbiturat 0,868 g NaOH 0,241 Akuades 100 ml
5.	HCl 1 N	HCL 37 % 7,780 ml Akuades 100 ml
6.	Buffer formalin 10%	100 ml formaldehida 40 % 4 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 6,5 g Na ₂ HPO ₄ 900 ml Akuades

Lampiran 7. Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung

7.1 Embedding Lambung



7.2 Pembuatan Preparat Organ Lambung



Lampiran 8. Pembuatan Preparat dengan Teknik Imunohistokimia iNOS

Preparat

- dideparafinasi dengan *xylol* sebanyak 2 kali selama 5 menit
- dimasukkan kedalam ethanol absolut sebanyak 3 kali dan ethanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 5 menit.
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- diaplikasikan dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit.

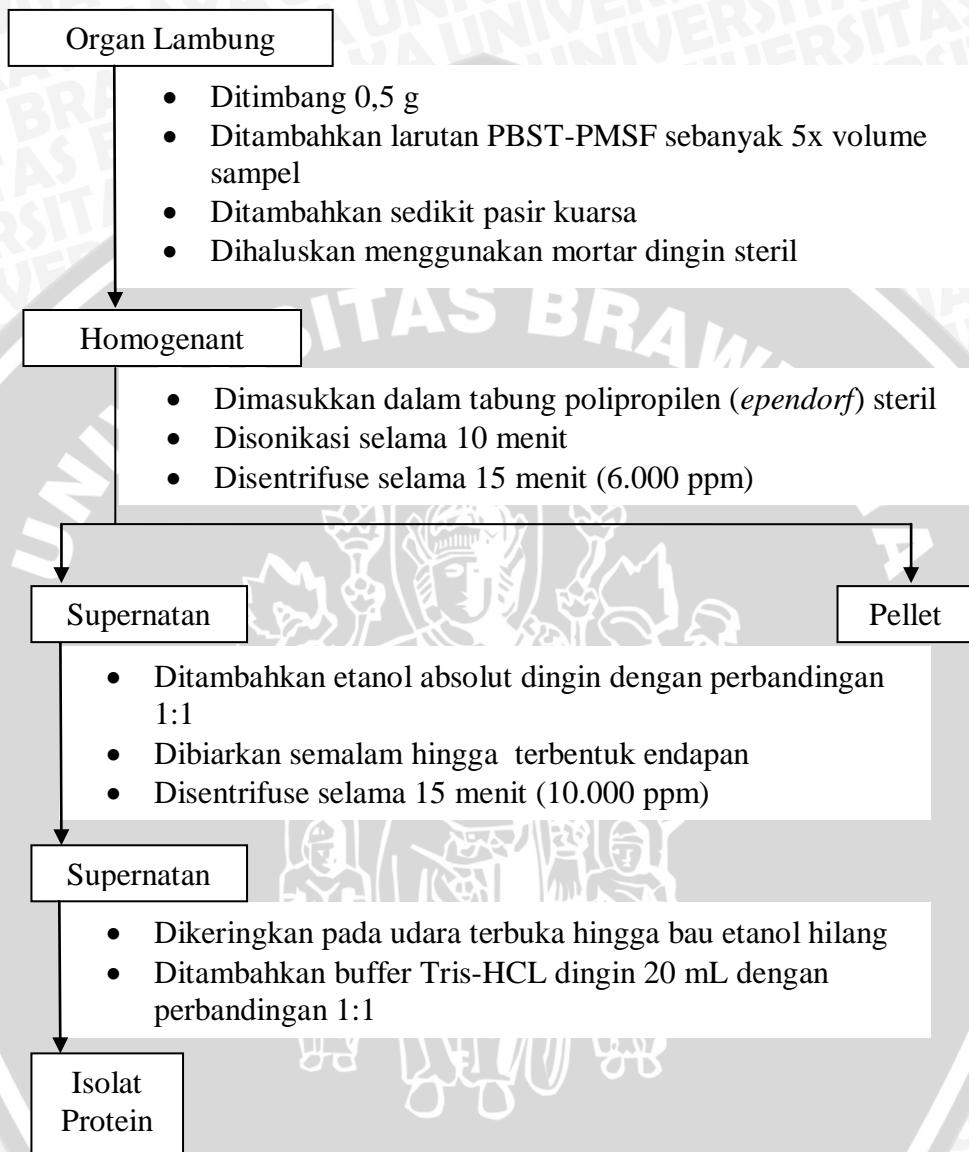
Preparat

- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- dibloking dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit di suhu ruang,
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.
- diinkubasi dengan antibodi primer (*Anti Rat iNOS*) selama satu hari dengan suhu 4°C
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- ditetesi dengan antibodi sekunder (*Goat anti rat Ig G biotin labeled*) dan diinkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang.
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali
- ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-Horseradish peroxidase*)
- diinkubasi selama 30-60 menit dalam suhu ruang.
- dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali,
- ditetesi dengan cromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetratera hydrochloride*) selama 10-20 menit dalam suhu ruang.
- dicuci dengan aquades selama 5 menit sebanyak 3 kali,
- dilakukan *counterstaining* dengan *Mayer Hematoxlyn* selama 5 menit pada suhu ruang.
- dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan aquades
- dikeringkan dan dilakukan *mounting* menggunakan *entellan*
- ditutup dengan cover glass.
- diamati dengan menggunakan mikroskop

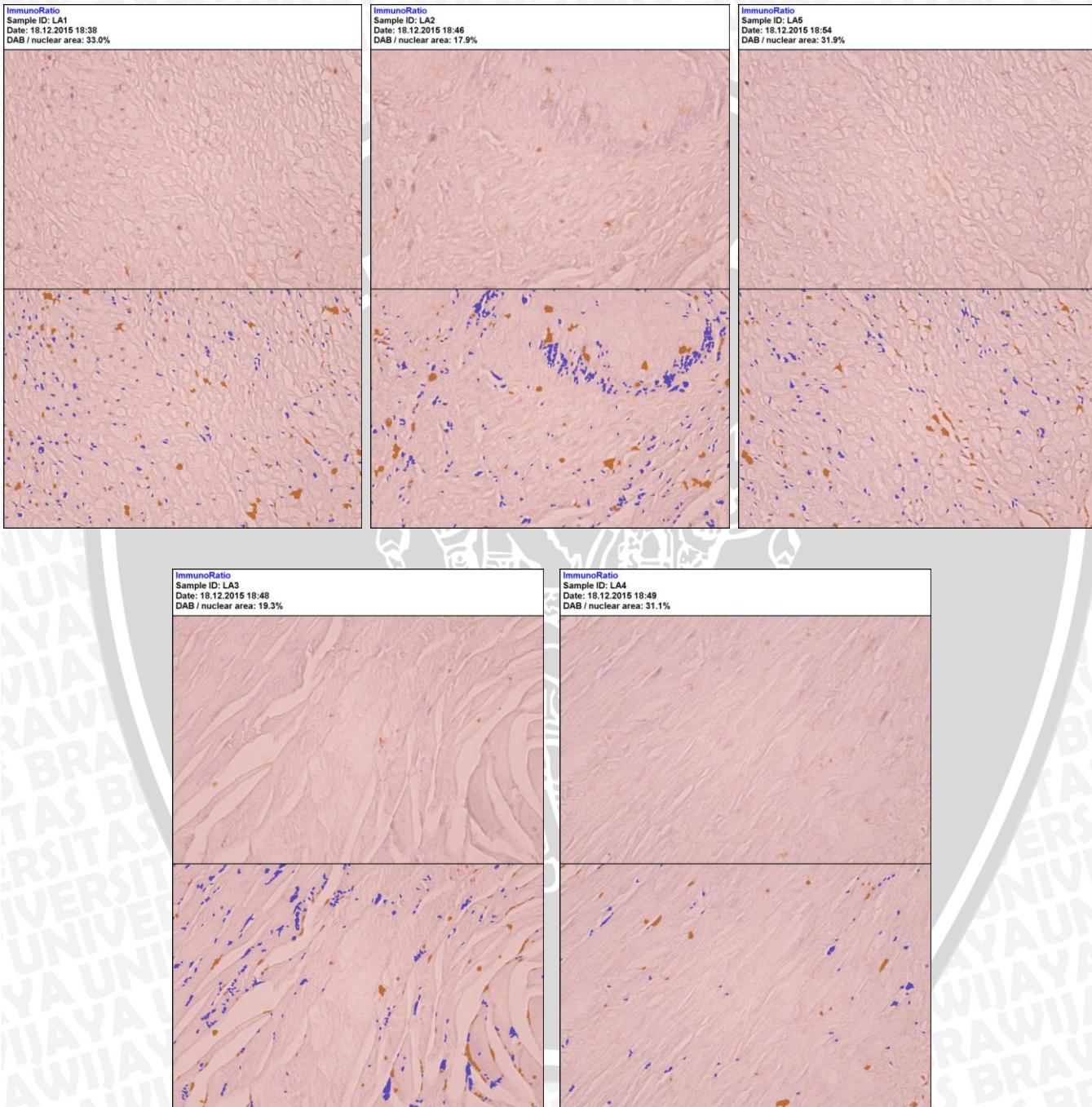
Preparat Hasil Imunohistokimia

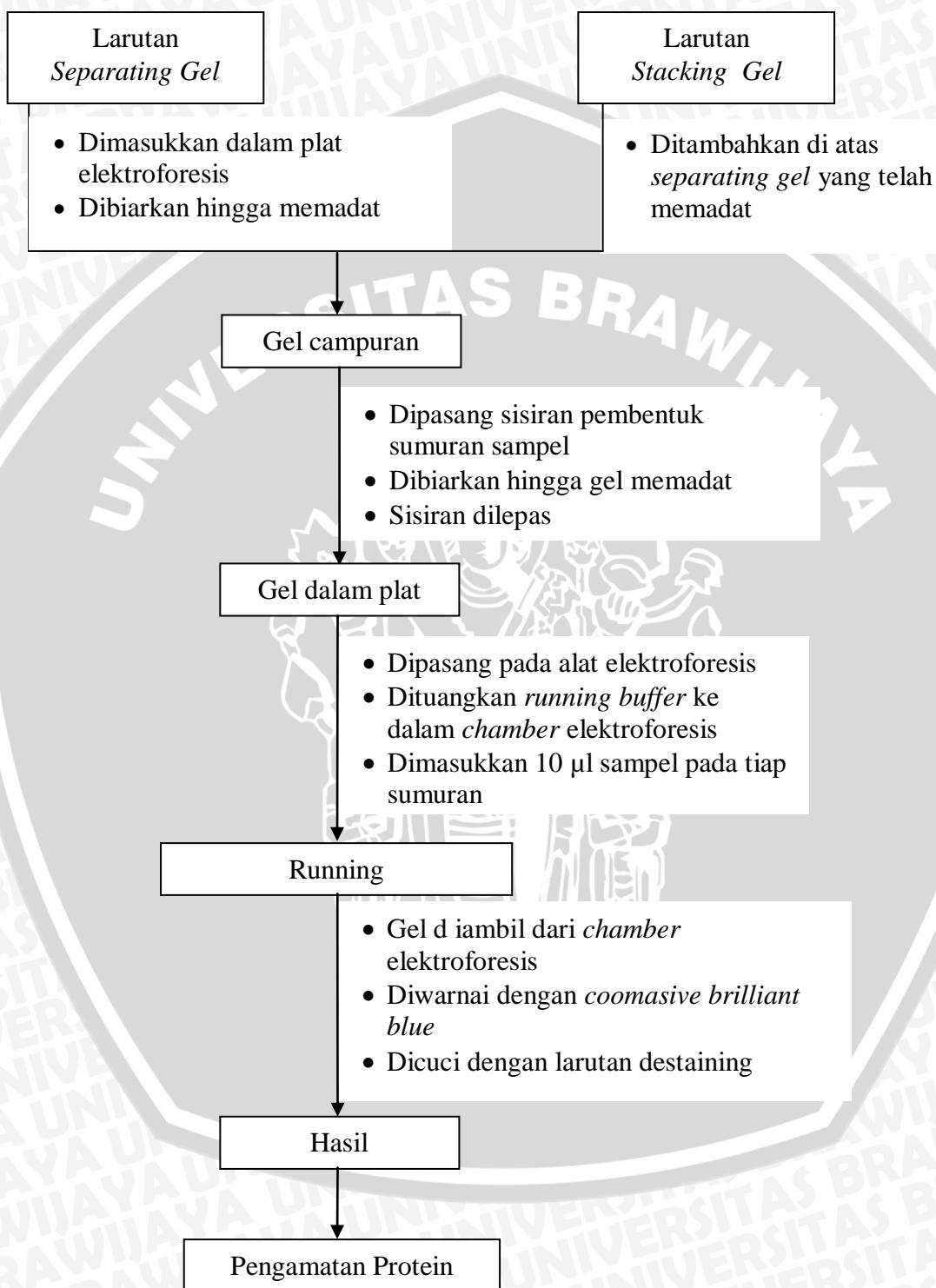


Lampiran 9. Isolasi Protein



Lampiran 10. Hasil pencitraan eksptesi INOS menggunakan *software* *Imunoratio*



Lampiran 11. Penentuan Profil Protein

Lampiran 12. Perhitungan Ekspresi iNOS

Kelompok Perlakuan	Tikus					Rataan Ekspresi iNOS
	1	2	3	4	5	
Kontrol	0,18	0,15	0,2	0,21	0,18	0,184
IBD	0,58	0,51	0,62	0,66	0,56	0,586
Terapi 500	0,48	0,4	0,49	0,5	0,46	0,466
Terapi 750	0,4	0,37	0,39	0,41	0,37	0,388
Terapi 1000	0,22	0,19	0,21	0,28	0,23	0,226

Tabel L12.1. Data Ekspresi iNOS

Lampiran 13. Presentasi Peningkatan dan Penurunan Ekspresi iNOS

Kelompok Kontrol

$$\text{Peningkatan ekspresi iNOS (\%)} = \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,586 - 0,184}{2,535} \times 100\%$$

$$= 15,85\%$$

Kelompok Terapi 500 mg/kgBB

$$\text{Penurunan ekspresi iNOS (\%)} = \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,586 - 0,466}{0,586} \times 100\%$$

$$= 20,47\%$$

Kelompok Terapi 750 mg/kgBB

$$\text{Penurunan ekspresi iNOS (\%)} = \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,586 - 0,388}{0,586} \times 100\%$$



$$\begin{aligned} &= \frac{0,586}{0,226} \times 100\% \\ &= 33,78\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 1000 mg/kgBB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi iNOS (\%)} &= \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\% \\ &= \frac{0,586 - 0,226}{0,586} \times 100\% \\ &= 61,43\% \end{aligned}$$

Lampiran 14. Hasil Uji Statistik Ekspresi iNOS

Tabel 14.1 Uji Normalitas Dosis

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
N		25
Normal Parameters ^a	Mean	.3700
	Std. Deviation	.15612
Most Extreme Differences	Absolute	.175
	Positive	.175
	Negative	-.100
Kolmogorov-Smirnov Z		.875
Asymp. Sig. (2-tailed)		.428

a. Test distribution is Normal

Tabel 14.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
inos			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.510	4	20	.237



Tabel 14.3 Uji Statistik ANOVA

ANOVA					
inos					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.558	4	.139	101.908	.000
Within Groups	.027	20	.001		
Total	.585	24			

Tabel 14.4 Peemberian Notasi Pada Uji BNJ

inos					
Tukey HSD					
Perlaku an	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	5	.1840			
5	5	.2260			
4	5		.3880		
3	5			.4660	
2	5				.5860
Sig.		.403	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel 14.5 Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)**Multiple Comparisons**

inos

Tukey HSD

(I) Perlaku an	(J) Perlaku an	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.40200*	.02339	.000	-.4720	-.3320
	3	-.28200*	.02339	.000	-.3520	-.2120
	4	-.20400*	.02339	.000	-.2740	-.1340
	5	-.04200	.02339	.403	-.1120	.0280
2	1	.40200*	.02339	.000	.3320	.4720
	3	.12000*	.02339	.000	.0500	.1900
	4	.19800*	.02339	.000	.1280	.2680
	5	.36000*	.02339	.000	.2900	.4300
3	1	.28200*	.02339	.000	.2120	.3520
	2	-.12000*	.02339	.000	-.1900	-.0500
	4	.07800*	.02339	.024	.0080	.1480
	5	.24000*	.02339	.000	.1700	.3100
4	1	.20400*	.02339	.000	.1340	.2740
	2	-.19800*	.02339	.000	-.2680	-.1280
	3	-.07800*	.02339	.024	-.1480	-.0080
	5	.16200*	.02339	.000	.0920	.2320
5	1	.04200	.02339	.403	-.0280	.1120
	2	-.36000*	.02339	.000	-.4300	-.2900
	3	-.24000*	.02339	.000	-.3100	-.1700
	4	-.16200*	.02339	.000	-.2320	-.0920

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



Lampiram 15. Perhitungan Profil Protein

Tabel L15.1 Perhitungan Harga R_f dan Berat Molekul (BM) Protein Marker

BM	log BM (y)	a	b	$R_f(x)$
250	2.39794	0.6	6.1	0.098361
130	2.113943	1.3	6.1	0.213115
100	2	2	6.1	0.327869
70	1.845098	2.7	6.1	0.442623
55	1.740363	3.5	6.1	0.57377
35	1.544068	5.1	6.1	0.836066
25	1.39794	5.8	6.1	0.95082
15	1.176091	6	6.1	0.983607

Keterangan

a : Jarak batas gel hingga pita (cm)

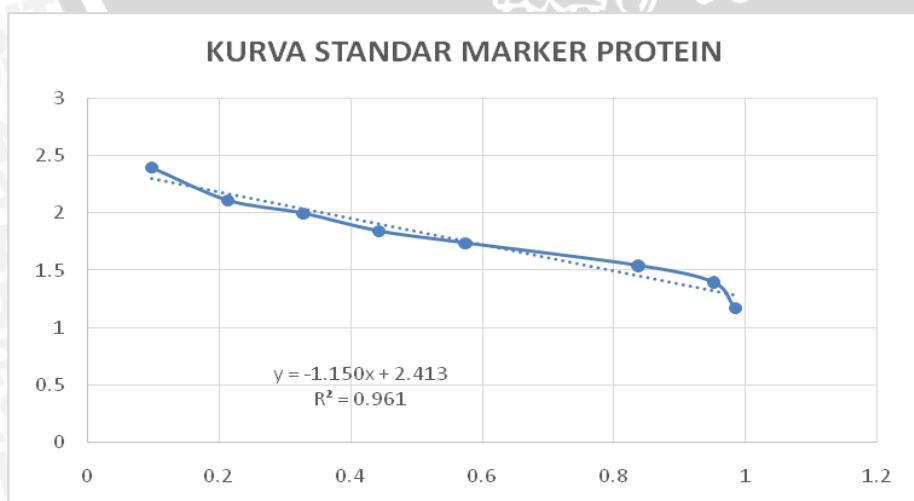
b : Jarak batas gel hingga batas bawah gel (cm)

R_f : *Retardation factor*

BM : Berat molekul

Log BM : Logaritma berat molekul

Lampiram 16. Grafik Berat Molekul (BM) Protein Marker



Lampiram 17. Perhitungan Harga R_f dan Berat Molekul (BM) Protein Sampel

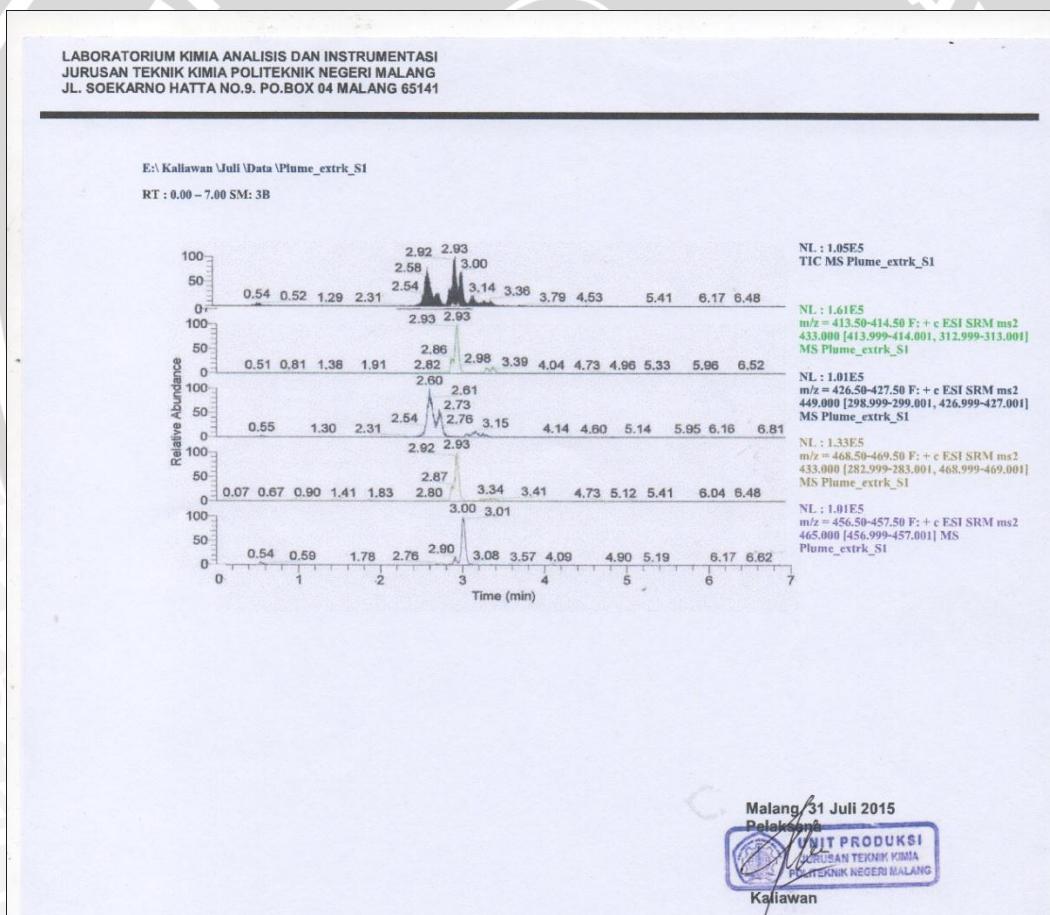
Tabel L17.1 Harga R_f dan Berat Molekul (BM) Protein Marker

Sampel	a	b	R_f	y	BM (kDa)
Kontrol	1.1	6.1	0.180328	2.212097	162.965893
	-	-	-	-	-
	2.3	6.1	0.377049	1.98573	96.7674971
	3.4	6.1	0.557377	1.778226	60.0103596
	3.7	6.1	0.606557	1.721634	52.6786245
	3.9	6.1	0.639344	1.683907	48.2954878
	4.1	6.1	0.672131	1.646179	44.2770511
	5.1	6.1	0.836066	1.457539	28.6773716
	5.7	6.1	0.934426	1.344356	22.0981409
IBD	1	6.1	0.163934	2.230961	170.200431
	2	6.1	0.327869	2.042321	110.235458
	2.3	6.1	0.377049	1.98573	96.7674971
	3.4	6.1	0.557377	1.778226	60.0103596
	3.7	6.1	0.606557	1.721634	52.6786245
	3.9	6.1	0.639344	1.683907	48.2954878
	4.1	6.1	0.672131	1.646179	44.2770511
	5.1	6.1	0.836066	1.457539	28.6773716
	5.7	6.1	0.934426	1.344356	22.0981409
Terapi 500 mg/kg BB	1	6.1	0.163934	2.230961	170.200431
	2	6.1	0.327869	2.042321	110.235458
	2.3	6.1	0.377049	1.98573	96.7674971
	3.4	6.1	0.557377	1.778226	60.0103596
	3.7	6.1	0.606557	1.721634	52.6786245
	3.9	6.1	0.639344	1.683907	48.2954878
	4.1	6.1	0.672131	1.646179	44.2770511
	5.1	6.1	0.836066	1.457539	28.6773716
	5.6	6.1	0.918033	1.36322	23.0791427
Terapi 750 mg/kg BB	1	6.1	0.163934	2.230961	170.200431
	2	6.1	0.327869	2.042321	110.235458
	2.3	6.1	0.377049	1.98573	96.7674971
	3.4	6.1	0.557377	1.778226	60.0103596
	3.7	6.1	0.606557	1.721634	52.6786245
	3.9	6.1	0.639344	1.683907	48.2954878
	4.1	6.1	0.672131	1.646179	44.2770511
	5.1	6.1	0.836066	1.457539	28.6773716
	5.6	6.1	0.918033	1.36322	23.0791427



Terapi 1000 mg/kg BB	0.9	6.1	0.147541	2.249825	177.756131
	-	-	-	-	-
	2.3	6.1	0.377049	1.98573	96.7674971
	3.4	6.1	0.557377	1.778226	60.0103596
	3.7	6.1	0.606557	1.721634	52.6786245
	3.9	6.1	0.639344	1.683907	48.2954878
	4.1	6.1	0.672131	1.646179	44.2770511
	5.1	6.1	0.836066	1.457539	28.6773716
	5.6	6.1	0.918033	1.36322	23.0791427

Lampiran 18. Hasil Uji LCMS



Pada Uji LCMS telah diketahui bahwa ekstrak metanol daun kmboja putih yang digunakan sebagai terapi terdapat kandungan lupeol asetat didalamnya,

yang mana lupeol asetat merupakan turunan dari Terpenoid. Beberapa turunan Terpenoid yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah :

- 1) Stigmast-7-enol : Molar mass 414 g/mol
- 2) Ursolic acid: Molar mass 456 g/mol
- 3) lupeol acetat : Molar mass 468 g/mol
- 4) lupeol carboxylic acid : Molar mass 426 g/mol