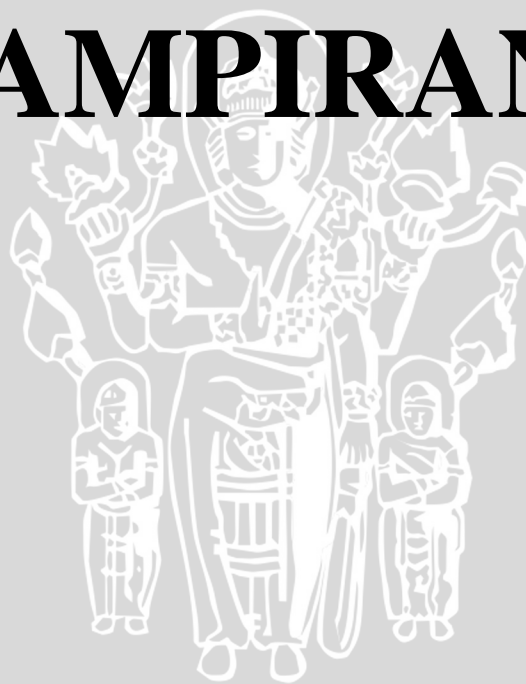


# UNIVERSITAS BRAWIJAYA

# LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:492-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** : MY-IBD ( MILK YOGURT FOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASE): PEMANFAATAN SUSU AFKIR SEBAGAI PRODUK INOVATIF UNTUK PENANGANAN IBD PADA PET ANIMAL

**PENELITI** : NUR HAMNI  
**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 7 Maret 2016  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

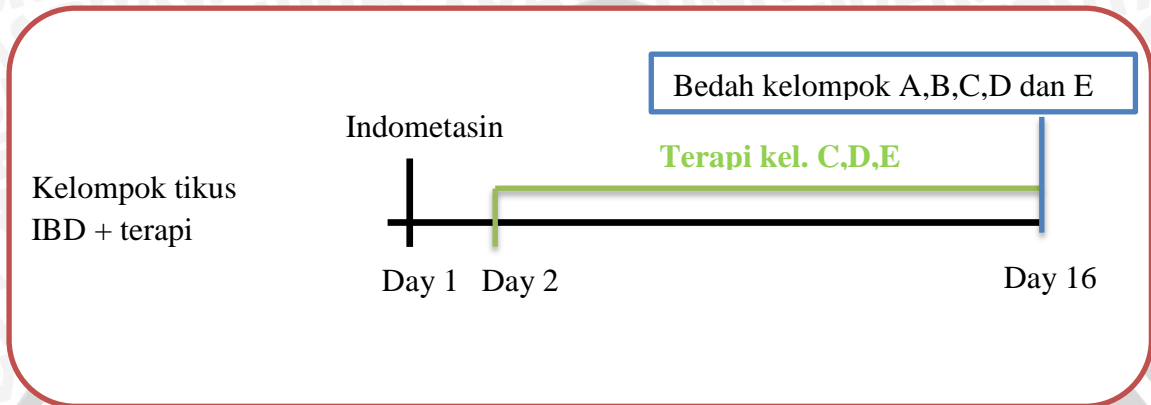


Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001



## Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

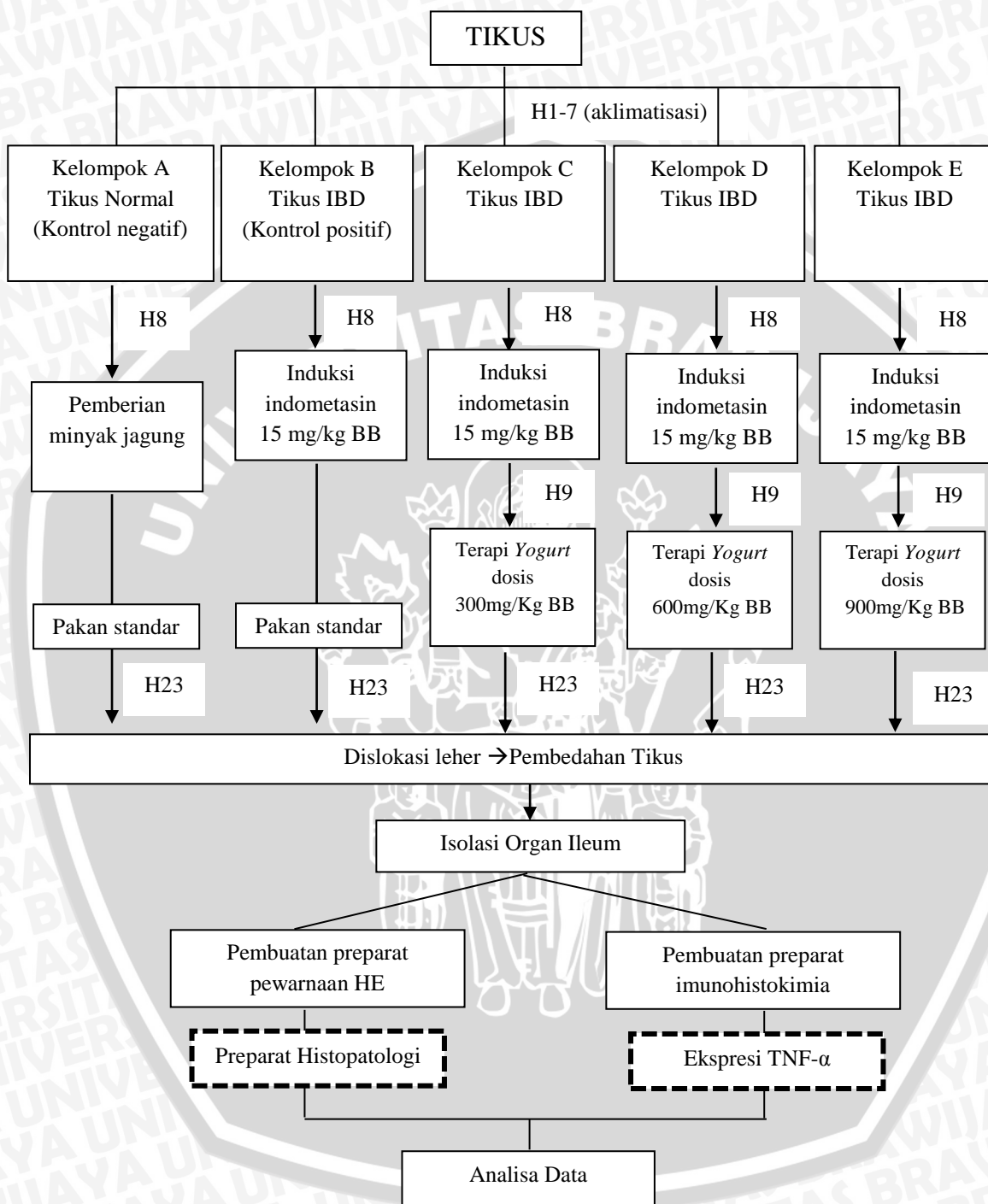
### A. Rancangan Perlakuan



#### Keterangan:

1. Induksi indometasin dilakukan secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB dengan dilarutkan minyak jagung pada hari ke-1
2. Hari ke-2 sampai hari ke-15 tikus kelompok C, D, dan E diberikan terapi yogurt susu sapi dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB
3. Hari ke-16 dilakukan pembedahan tikus kelompok A,B,C,D, dan E untuk mengisolasi organ ileum tikus untuk penentuan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode pewarnaan imunohistokimia dan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE

**B. Kerangka Operasional**



Keterangan :

     : Parameter yang diamati



### Lampiran 3. 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 :

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

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

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

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

$$\begin{aligned}\text{Kebutuhan minyak jagung per ekor tikus} &= \frac{3 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ ml} = 0,27 \text{ ml/tikus.}\end{aligned}$$

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 4. Yogurt Susu Sapi

### 4.1 Pembuatan Yogurt Susu Sapi

#### Pembuatan *Mother Culture*

Susu sapi 50 ml

- Dimasukkan kedalam tabung *Erlenmeyer* lalu ditutup *aluminium foil* dan dimasukkan ke panci yang berisi air
- Dipanaskan pada suhu 72°C selama  $\pm 5$  menit
- Diangkat dan tabung *Erlenmeyer* dimasukkan kedalam panci yang berisi air dingin  $\pm 3$  menit hingga suhu menjadi 45 °C
- Diinokulasikan starter *yogurtmet* 0,25 gram untuk 50 ml susu
- Starter dicampurkan kedalam susu
- Botol penyimpanan digoyang ringan jangan sampai berbuih
- Diinkubasi pada suhu 45°C selama  $\pm 4$  jam
- Didiamkan 4-5 menit dalam suhu ruang (27°C)
- Diukur pH dengan pH meter dan pH indikator

*Mother culture*

### Pembuatan *Yogurt* Susu Sapi

#### Susu sapi

- Susu sapi dituang kedalam 4 botol penyimpanan masing-masing 500 ml
- Botol ditutup *aluminium foil* dan dimasukkan ke dalam panci yang berisi air
- Dipanaskan sampai suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 5$  menit
- Dimasukan botol penyimpanan kedalam panci yang berisi air dingin sampai susu mencapai suhu  $45^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3$  menit)
- Dilakukan inokulasi starter dari *mother culture* yang sudah dibuat sebelumnya sebanyak 2 % dari volume susu yaitu 10 ml starter untuk 500 ml susu.
- Botol penyimpanan digoyang ringan jangan sampai berbuih
- Diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam
- Diletakan pada suhu ruang  $27^{\circ}\text{C}$  selama 4-5 menit
- Dilakukan pengujian pH dengan pH meter dan pH indikator

#### *Yogurt* susu sapi

## Pembuatan *Freeze dried Yogurt*

### Yogurt Susu Sapi

- Dimasukan *yogurt* ke dalam 32 botol kaca, per botol diisi 62,5 ml *yogurt*.
- Botol kaca disimpan di dalam freezer sampai *yogurt* didalamnya beku.
- Botol kaca dipasangkan pada alat *freeze dryer* dan dilakukan proses penyubliman sampai menimbulkan uap
- Uap akan ditangkap mesin spiral pada mesin *freeze dry* sehingga air terhisap semua sampai *yogurt* menjadi serbuk selama 24 jam dan 30 jam.
- *Freeze dried yogurt* disimpan di dalam refrigerator dengan suhu sekitar 4°C sampai dibutuhkan kembali.

### Yogurt *Freeze Dried*





## 4.2 Perhitungan Dosis *Yogurt* Susu Sapi

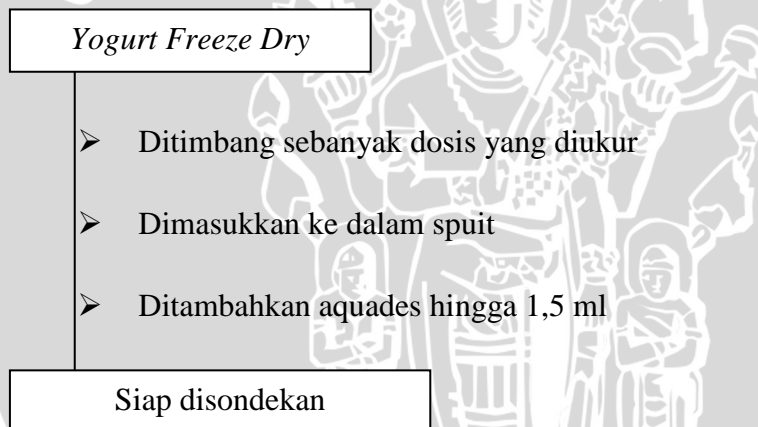
### Kelompok C ( Dosis terapi = 300 mg/kg BB )

Dengan pemisalan rata-rata BB tikus 200 g dengan pemberian *yogurt* dosis 300 mg/kg BB

$$\begin{aligned}\text{Jumlah } \textit{yogurt} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{Berat badan} \\ &= 300 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \\ &= 60 \text{ mg/ekor}\end{aligned}$$

Volume *yogurt* yang diberikan untuk tikus dengan dosis 300 mg/kg adalah 60 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagram :



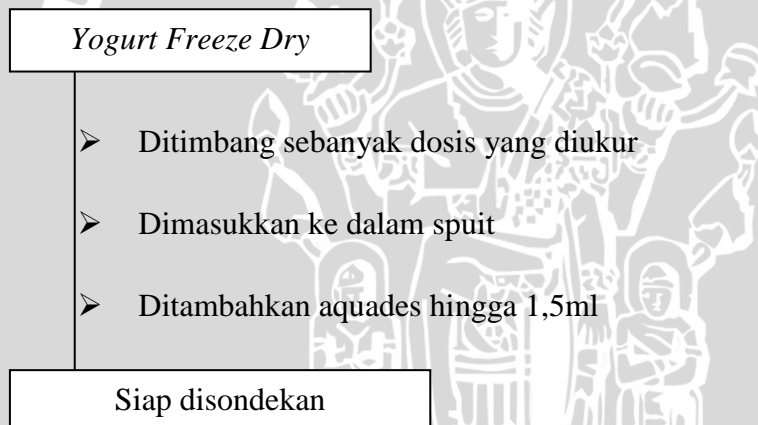
**Kelompok D ( Dosis terapi = 600 mg/kg BB )**

Dengan pemisalan rata-rata BB tikus 200 g dengan pemberian *yogurt* dosis 600 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{jumlah yogurt} &= \text{Dosis pemberian} \times \text{Berat badan} \\ &= 600 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \\ &= 120 \text{ mg/ekor} \end{aligned}$$

Volume *yogurt* yang diberikan untuk tikus dengan dosis 600 mg/kg adalah 120 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagram :



**Kelompok E ( Dosis terapi = 900 mg/kg BB )**

Dengan pemisalan rata-rata BB tikus 200 g dengan pemberian *yogurt* dosis 900 mg/kg BB

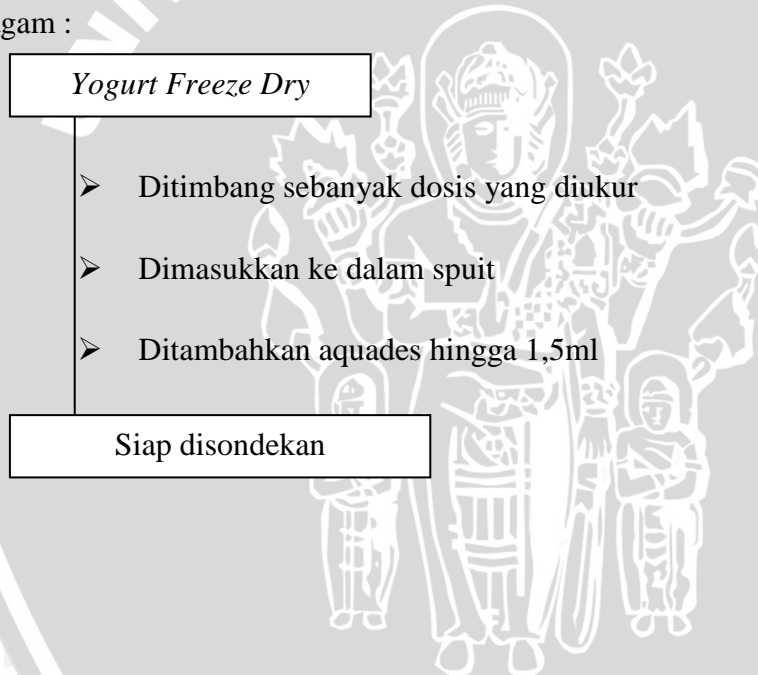
Jumlah *yogurt* = Dosis pemberian x Berat badan

$$= 900 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g}$$

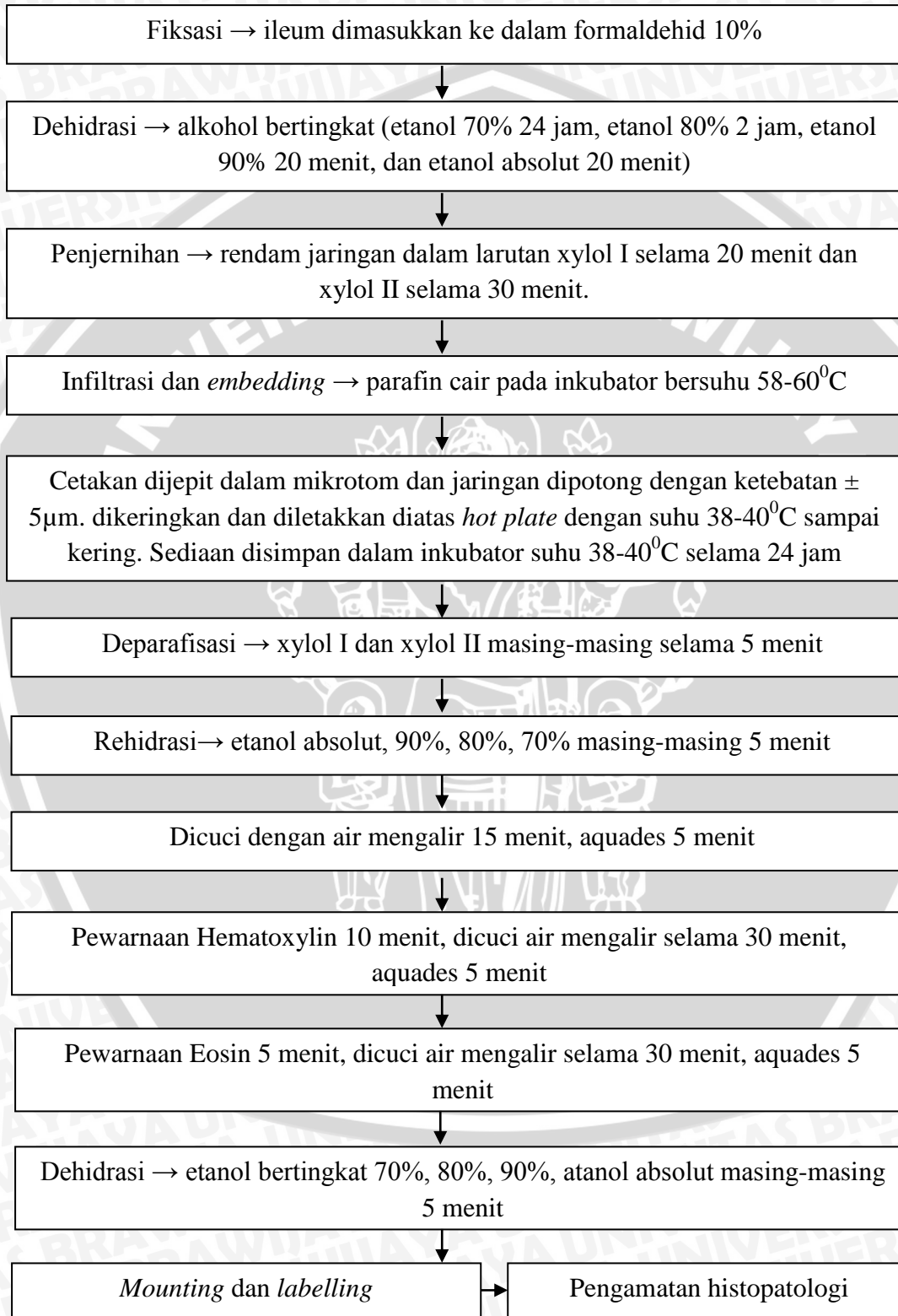
$$= 180 \text{ mg/ekor}$$

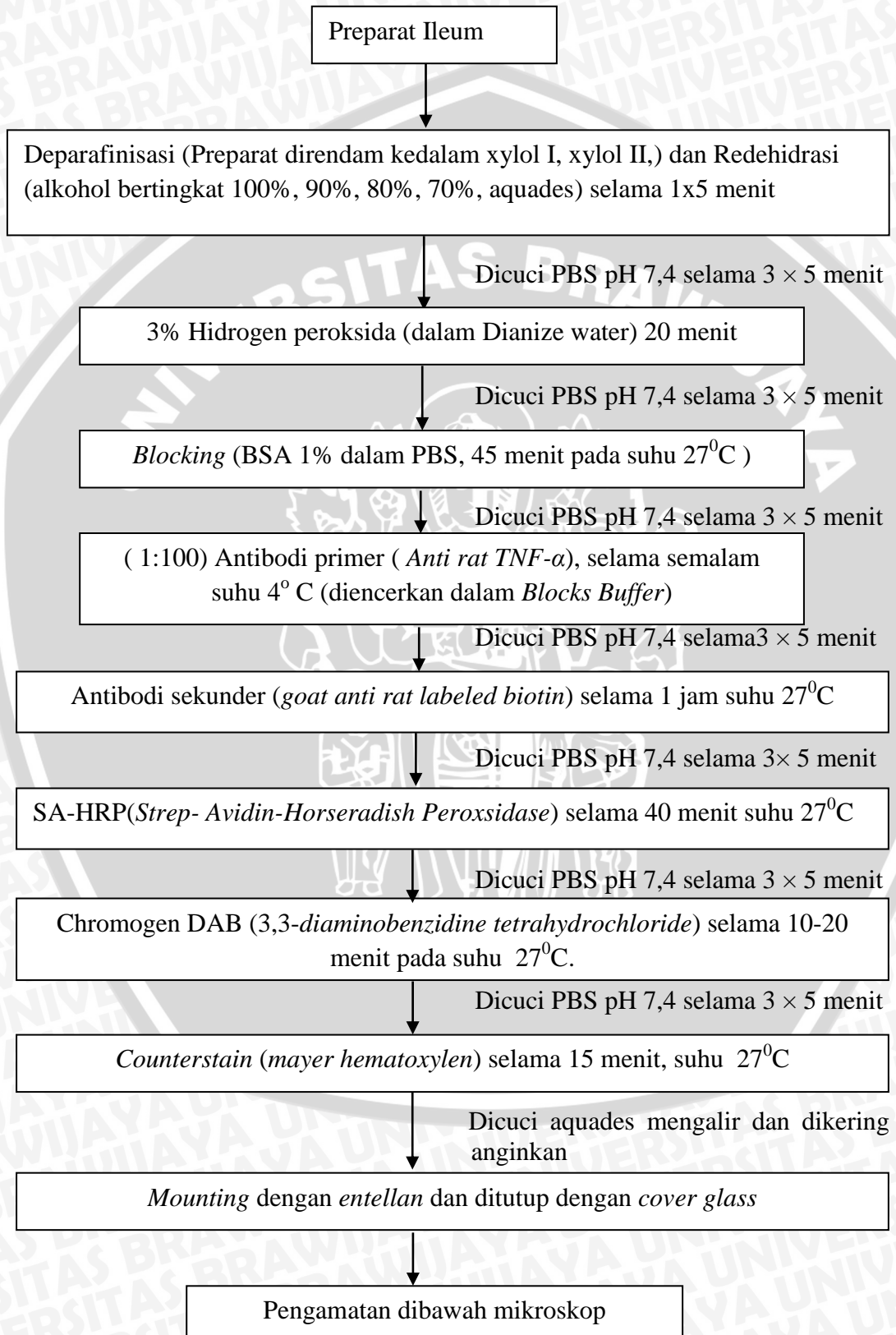
Volume *yogurt* yang diberikan untuk tikus dengan dosis 900 mg/kg adalah 180 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagram :



**Lampiran 5.** Pembuatan Preparat Histopatologi Ileum Dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) (Jusuf, 2009).



**Lampiran 6.** Metode Imunohistokimia (TNF-  $\alpha$ ) (Ramos, 2005)

Lampiran 7. Hasil Perhitungan Ekspresi TNF- $\alpha$ 

Lapang Pandang	Jumlah Ekspresi TNF- $\alpha$ Tikus Normal (Kontrol Negatif)							
	U1		U2		U3		U4	
	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa
1	1	2	4	1	1	2	2	0
2	2	4	0	3	0	1	1	4
3	1	5	3	3	1	1	3	1
4	1	3	1	2	4	0	5	1
5	2	4	4	2	2	1	2	1
6	2	3	2	1	2	1	0	3
7	4	0	3	1	0	1	3	3
8	1	1	3	1	1	1	3	1
9	1	1	3	2	2	1	2	0
10	3	1	2	1	2	4	2	0
Jumlah	18	24	25	17	15	13	23	14
Rata-rata	1,8	2,4	2,5	1,7	1,5	1,3	2,3	1,4
<b>Jumlah Ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>4,2</b>		<b>4,2</b>		<b>2,8</b>		<b>3,7</b>	

Lapang Pandang	Jumlah Ekspresi TNF- $\alpha$ Tikus IBD (Kontrol Positif)							
	U1		U2		U3		U4	
	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa
1	20	12	29	13	12	11	12	20
2	17	7	18	13	16	15	9	11
3	21	9	26	10	9	9	19	9
4	17	6	27	9	22	9	16	16
5	10	11	20	9	16	17	14	9
6	11	16	22	11	9	20	16	12
7	16	14	14	10	9	22	22	16
8	8	14	21	8	11	19	12	12
9	11	10	18	6	16	12	14	16
10	15	11	16	8	19	9	11	16
Jumlah	146	110	211	97	139	143	145	137
Rata-rata	14,6	11	21,1	9,7	13,9	14,3	14,5	13,7
<b>Jumlah Ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>25,6</b>		<b>30,8</b>		<b>28,2</b>		<b>28,2</b>	

Lapang Pandang	Jumlah Ekspresi TNF- $\alpha$ (Terapi Dosis 300 mg/kg BB)							
	U1		U2		U3		U4	
	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa
1	18	6	12	10	6	17	8	12
2	14	12	16	7	11	9	9	11
3	16	15	9	8	9	11	9	9
4	12	14	12	6	12	9	16	8
5	18	12	14	5	12	17	12	12
6	18	8	11	6	6	14	16	9
7	17	8	16	5	9	11	14	16
8	12	10	16	6	11	9	12	12
9	14	8	10	5	16	12	6	9
10	12	12	8	9	14	9	9	15
Jumlah	151	105	124	67	106	118	111	113
Rata-rata	15,1	10,5	12,4	6,7	10,6	11,8	11,1	11,3
<b>Jumlah ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>25,6</b>		<b>19,1</b>		<b>22,4</b>		<b>22,4</b>	

Lapang Pandang	Jumlah Ekspresi TNF- $\alpha$ (Terapi Dosis 600 mg/kg BB)							
	U1		U2		U3		U4	
	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa
1	13	5	5	6	9	3	8	4
2	8	6	6	3	6	5	6	7
3	6	4	4	3	12	4	4	9
4	11	2	2	4	9	6	6	8
5	12	5	8	6	9	3	12	4
6	9	5	12	4	12	1	5	9
7	9	6	8	5	12	3	2	6
8	6	2	7	4	6	2	8	3
9	5	2	4	3	7	3	6	4
10	7	3	5	3	6	5	4	2
Jumlah	86	40	61	41	88	35	61	56
Rata-rata	8,6	4	6,1	4,1	8,8	3,5	6,1	5,6
<b>Jumlah ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>12,6</b>		<b>10,2</b>		<b>12,3</b>		<b>11,7</b>	

Lapang Pandang	Jumlah Ekspresi TNF- $\alpha$ (Terapi Dosis 900 mg/kg BB)							
	U1		U2		U3		U4	
	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa	Epitel	Submukosa
1	4	2	0	0	4	2	6	1
2	2	1	2	3	2	5	2	1
3	6	4	2	1	1	4	1	3
4	5	2	0	1	4	0	6	2
5	4	1	3	1	3	2	2	4
6	4	2	5	8	2	1	5	2
7	2	3	2	3	1	3	2	6
8	6	1	1	2	6	2	0	3
9	6	5	0	0	4	1	1	4
10	7	3	3	2	6	2	3	1
Jumlah	46	24	18	21	33	22	28	27
Rata-rata	4,6	2,4	1,8	2,1	3,3	2,2	2,8	2,7
<b>Jumlah ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>7</b>		<b>3,9</b>		<b>5,5</b>		<b>5,5</b>	



### Lampiran 8. Data dan Uji Statistik Ekspresi TNF- $\alpha$

Tabel 8.1 Data Ekspresi TNF- $\alpha$

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
Kontrol Negatif	4,2	4,2	2,8	3,7	3,725
Kontrol Positif	25,6	30,8	28,2	28,2	28,200
Terapi dosis 300 mg/kg BB	25,6	19,1	22,4	22,4	22,375
Terapi dosis 600 mg/kg BB	12,6	10,2	12,3	11,7	11,700
Terapi dosis 900 mg/kg BB	7	3,9	5,5	5,5	5,475

Induksi indometasin mampu meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus (*Rattus norvegicus*) dan terapi yogurt susu sapi dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ . Presentasi peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  adalah sebagai berikut :

#### Kelompok Kontrol Positif

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Negatif}} \times 100\% \\ &= \frac{28,200 - 3,725}{3,725} \times 100\% \\ &= 657,047 \text{ \%} \end{aligned}$$

Presentasi penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  adalah sebagai berikut :

#### Kelompok Terapi 300 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{28,200 - 22,375}{28,200} \times 100\% \\ &= 20,656 \text{ \%} \end{aligned}$$

#### Kelompok Terapi 600 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{28,200 - 11,700}{28,200} \times 100\% \\ &= 58,510 \text{ \%} \end{aligned}$$

### Kelompok Terapi 900 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{28,200 - 5,475}{28,200} \times 100\% \\ &= 80,585 \text{ \%} \end{aligned}$$

### 8.1 Uji Normalitas Data

#### Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol negatif	,264	4	.	,836	4	,183
Kontrol positif	,250	4	.	,945	4	,683
Dosis 300	,254	4	.	,945	4	,682
Dosis 600	,250	4	.	,895	4	,405
Dosis 900	,258	4	.	,944	4	,680

### 8.2 Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi TNFalfa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,626	4	15	,651

### 8.3 Uji One Way Anova

#### ANOVA

Ekspresi TNFalfa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1819,547	4	454,887	154,434	,000
Within Groups	44,183	15	2,946		
Total	1863,730	19			

## 8.4 Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNFalfa

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-24,4750*	1,2136	,000	-28,222	-20,728
	Dosis 300	-18,6500*	1,2136	,000	-22,397	-14,903
	Dosis 600	-7,9750*	1,2136	,000	-11,722	-4,228
	Dosis 900	-1,7500	1,2136	,612	-5,497	1,997
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	24,4750*	1,2136	,000	20,728	28,222
	Dosis 300	5,8250*	1,2136	,002	2,078	9,572
	Dosis 600	16,5000*	1,2136	,000	12,753	20,247
	Dosis 900	22,7250*	1,2136	,000	18,978	26,472
Dosis 300	Kontrol Negatif	18,6500*	1,2136	,000	14,903	22,397
	Kontrol Positif	-5,8250*	1,2136	,002	-9,572	-2,078
	Dosis 600	10,6750*	1,2136	,000	6,928	14,422
	Dosis 900	16,9000*	1,2136	,000	13,153	20,647
Dosis 600	Kontrol Negatif	7,9750*	1,2136	,000	4,228	11,722
	Kontrol Positif	-16,5000*	1,2136	,000	-20,247	-12,753
	Dosis 300	-10,6750*	1,2136	,000	-14,422	-6,928
	Dosis 900	6,2250*	1,2136	,001	2,478	9,972
Dosis 900	Kontrol Negatif	1,7500	1,2136	,612	-1,997	5,497
	Kontrol Positif	-22,7250*	1,2136	,000	-26,472	-18,978
	Dosis 300	-16,9000*	1,2136	,000	-20,647	-13,153
	Dosis 600	-6,2250*	1,2136	,001	-9,972	-2,478

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

### 8.5 Uji Tukey

#### TNF $\alpha$

Tukey HSD<sup>a</sup>

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1(a)	2(b)	3(c)	4(d)
Kontrol Negatif	4	3,725			
Dosis 900	4	5,475			
Dosis 600	4		11,700		
Dosis 300	4			22,375	
Kontrol Positif	4				28,200
Sig.		,612	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### 8.6 Grafik ekspresi TNF- $\alpha$

