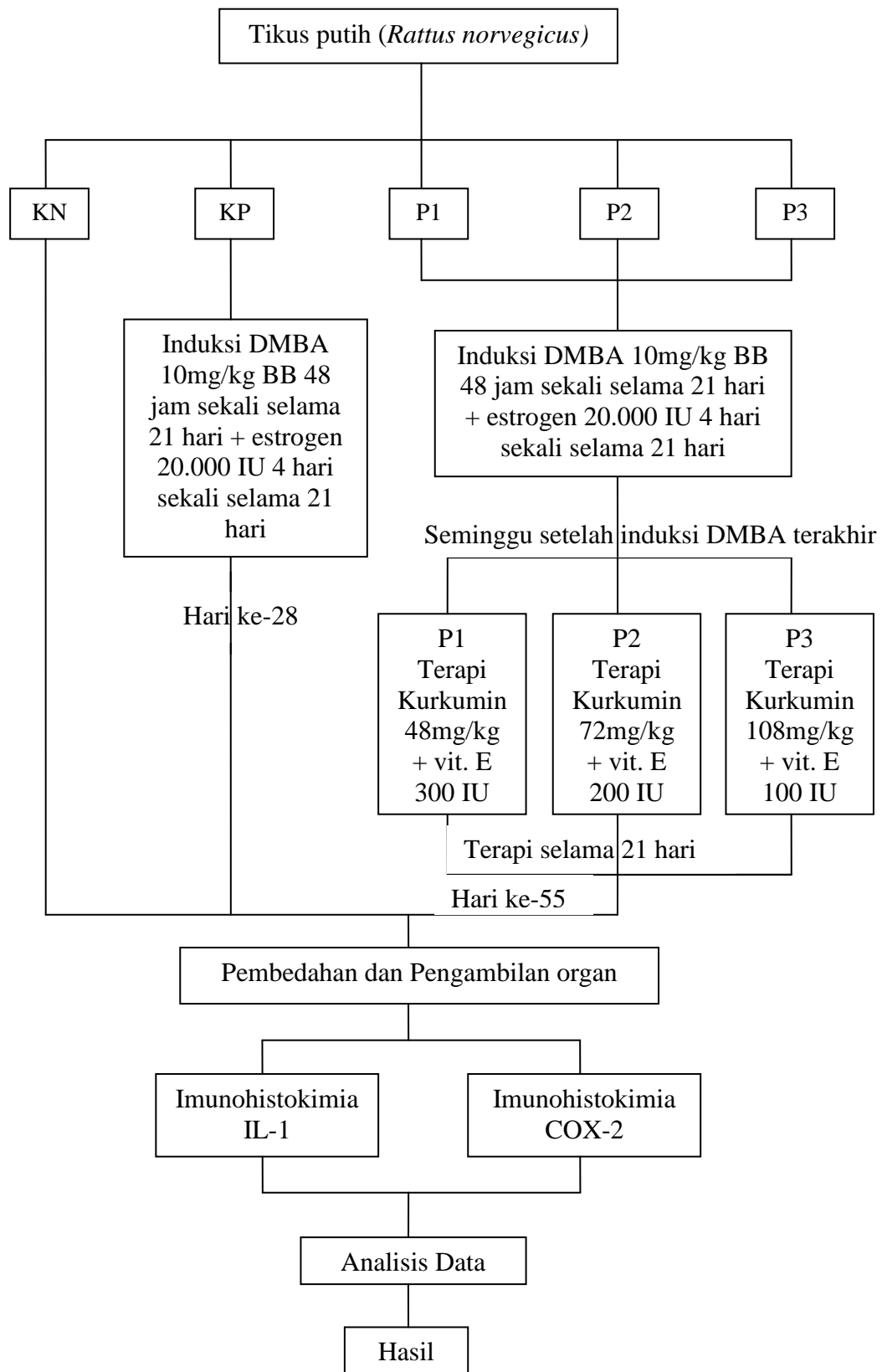
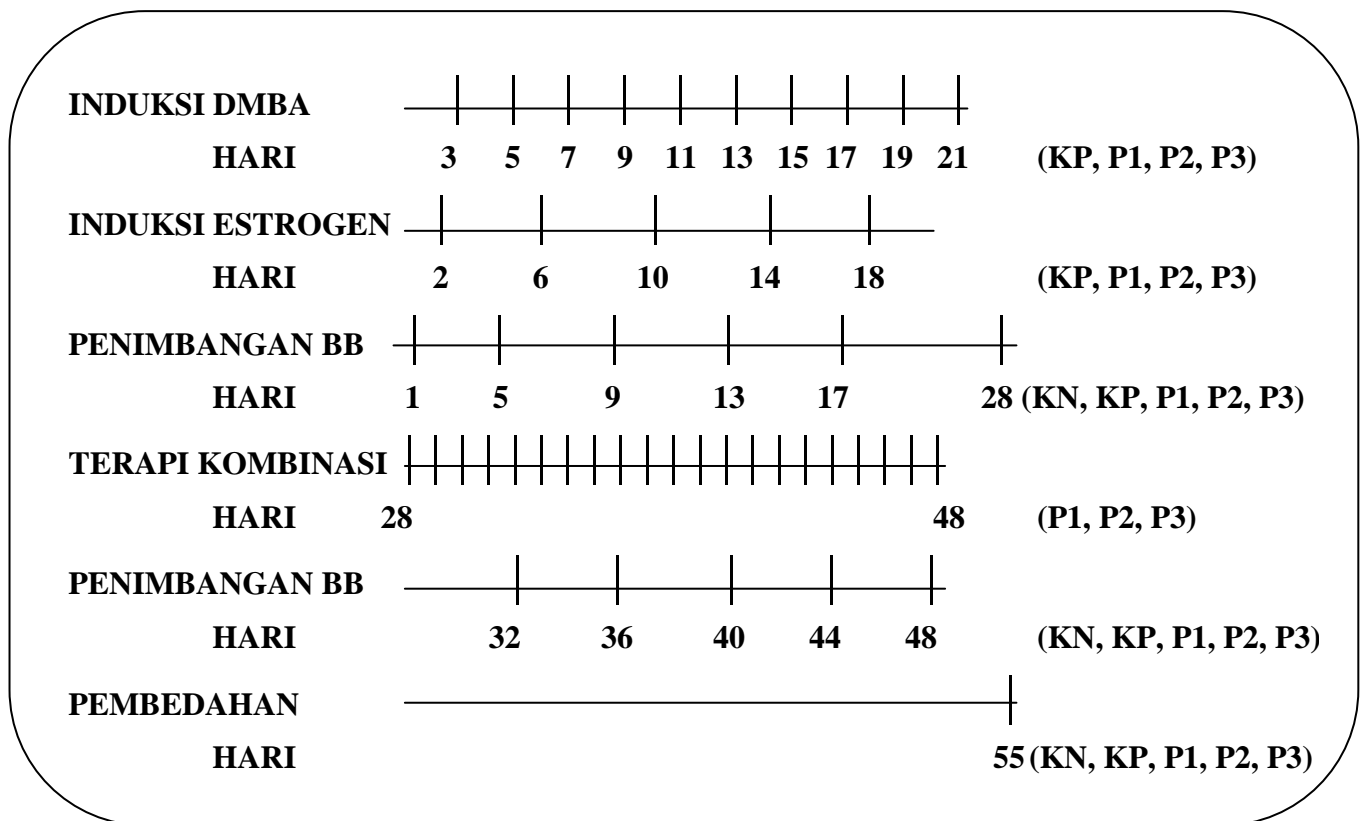


Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian

Lampiran 2. Timeline Penelitian



Keterangan:

1. Induksi DMBA dilakukan pada kelompok KP, P1, P2 dan P3 sebanyak 10 kali pada hari ke-3, ke-5, ke-7, ke-9, ke-11, ke-13, ke-15, ke-17, ke-19, dan hari terakhir induksi ke-21.
2. Induksi estrogen dilakukan sebanyak lima kali pada kelompok KP, P1, P2 dan P3 pada hari ke-2, ke-6, ke-10, ke-14, dan hari ke-18.
3. Penimbangan berat badan dilakukan pada kelompok KN, KP, P1, P2 dan P3 sebanyak enam kali pada hari ke-1, ke-5, ke-9, ke-13, ke-17 dan ke-28.
4. Terapi kombinasi kurkumin dengan vitamin E dilakukan pada kelompok P1, P2, P3 sebanyak 21 kali selama 21 hari pada hari ke-28 hingga hari ke-48 dilakukan setiap hari.

5. Penimbangan berat badan dilakukan pada kelompok KN, KP, P1, P2 dan P3 sebanyak lima kali pada hari ke-32, ke-36, ke-40, ke-44 dan ke-48.
6. Pembedahan dilakukan pada hari ke-55 pada kelompok KN, KP, P1, P2 dan P3.

Lampiran 3. Perhitungan Dosis DMBA

Perhitungan dosis DMBA untuk KP, P1, P2, P3 dengan rata-rata berat badan tikus 175 gram dengan dosis 10 mg/kg BB.

$$\begin{aligned} \text{Perhitungan} &= \frac{175 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 175 \text{ gram} \\ &= 1,75 \text{ mg/ekor} \end{aligned}$$

DMBA dilarutkan dalam pelarut dengan volume 1 ml dengan perbandingan NaCl fisiologis dan MBBM 1 dibanding 3 (Pugalendi *et al.*, 2011).

$$\begin{aligned} \text{Pelarut} = \text{NaCl fisiologis} : \text{MBBM} &= 1 : 3 \\ &= 0,25 \text{ ml} : 0,75 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Estrogen

Dosis estrogen 20.000 IU/kg BB dengan berat badan rata-rata adalah 175 gram.

$$\begin{aligned} \text{Perhitungan} &= \frac{175 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 20.000 \text{ IU} \\ &= 3500 \text{ IU} \\ \text{Volume pemberian} &= \frac{3.500 \text{ IU}}{20.000 \text{ IU}} \times 1 \text{ ml} \\ &= 0.175 \text{ ml} \\ &= 0.2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan dosis Kurkumin

- P1
Dosis kurkumin 48 mg/kg BB dengan berat rata-rata tikus adalah 182 gram
Perhitungan = $\frac{182 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 48 \text{ mg}$
= 8,73 mg/ekor
- P2
Dosis kurkumin 72 mg/kg BB dengan berat rata-rata tikus adalah 183 gram
Perhitungan = $\frac{183 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 72 \text{ mg}$
= 13,17 mg/ekor
- P3
Dosis kurkumin 108 mg/kg BB dengan berat rata-rata tikus adalah 181 gram
Perhitungan = $\frac{181 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 108 \text{ mg}$
= 19,54 mg/ekor

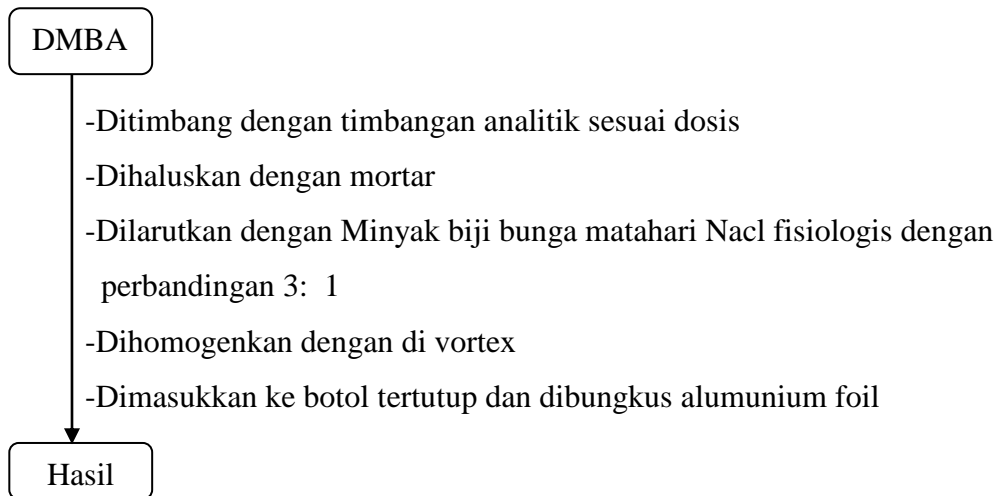
Lampiran 6. Perhitungan dosis vitamin E

- P1
Dosis vitamin E 300 IU per ekor
- P2
Dosis vitamin E 200 IU per ekor
- P3
Dosis vitamin E 100 IU per ekor

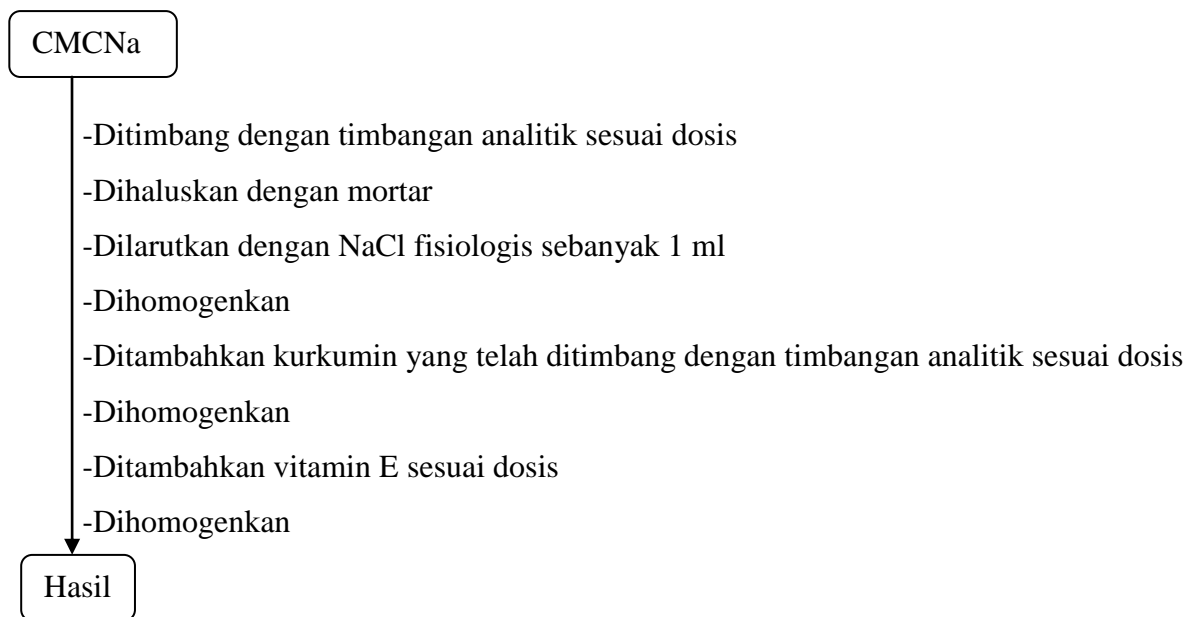
Lampiran 7. Perhitungan pelarut kurkumin dan vitamin E

Kurkumin dan vitamin E dilarutkan dalam NaCl fisiologis dengan volume total 1 ml per ekor dengan ditambahkan CMCNa 5 % dari total larutan yaitu 0,05 mg.

Lampiran 8. Pembuatan larutan DMBA



Lampiran 9. Pembuatan larutan kombinasi kurkumin + vitamin E



Lampiran 10. Pembuatan Paraformaldehid (PFA) 4%

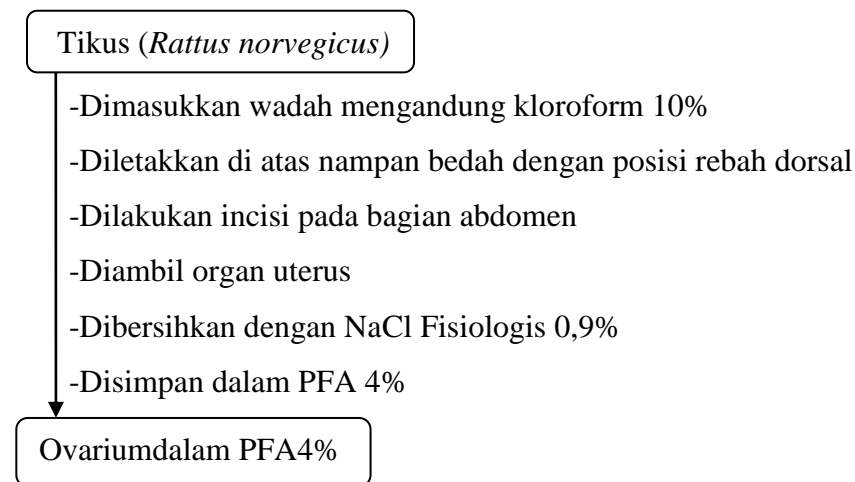
$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 37\% = 1000 \text{ ml} \times 4\%$$

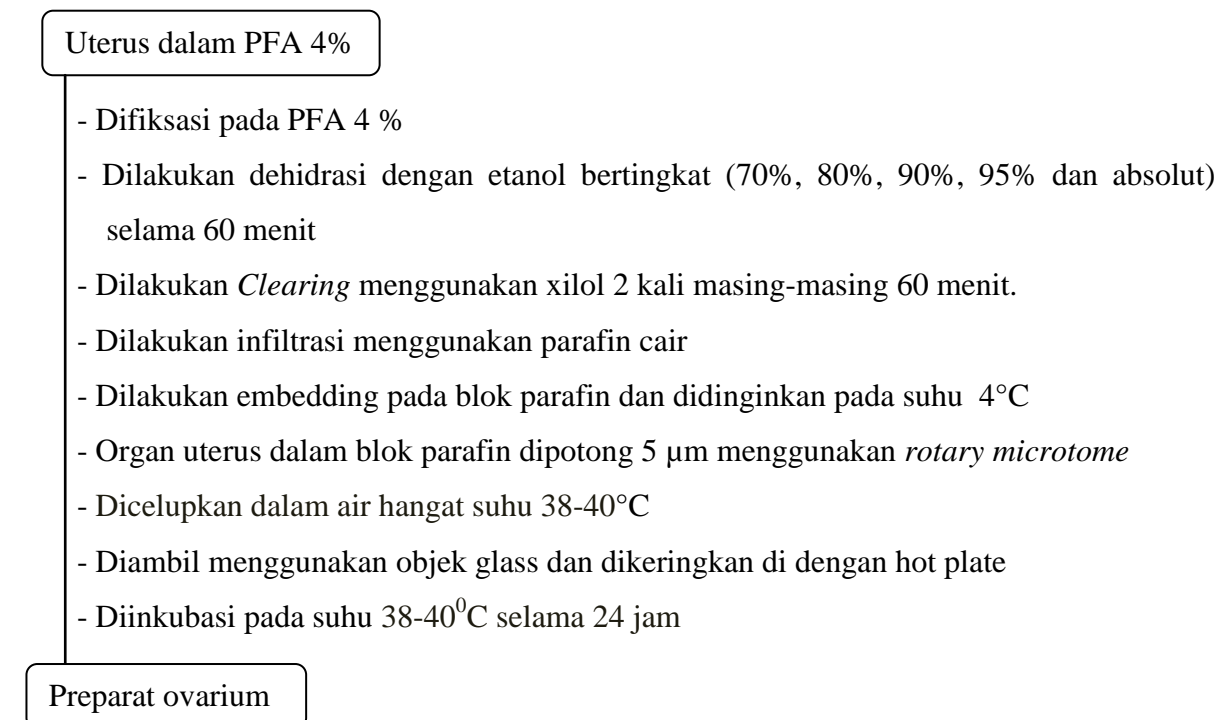
$$V1 = 108,1 \text{ ml}$$

Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 108,1 ml formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah NaCl fisiologis sampai tanda batas.

Lampiran 11. Pengambilan organ ovarium pada tikus



Lampiran 12. Pembuatan preparat ovarium



Lampiran 13. Teknik Imunohistokimia IL-1 dan COX-2

Preparat ovarium

- Dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol 1, 2, masing-masing 3menit
- Dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan ethanol absolut, ethanol 90% (2menit), 80% (2menit), 70% (1menit), ethanol 30% (1menit) dan terakhir dengan aquades selama 1 menit
- Dicuci dengan PBS 3x
- Direndam dalam peroxidase blocking jaringan dengan H₂O₂ 3% dalam methanol pada suhu kamar selama 10 menit
- Dicuci dengan PBS 3x5 menit
- Dilakukan blocking pada slide dalam susu skim 1% dalam PBS tween selama 30 menit
- Diberi antibodi primer rabbit (antibodi monoklonal p53)(1:100) dalam susu skim 1% dalam PBS tween suhu 4°C overnight (12-16 jam)
- Dicuci dengan PBS 3x5 menit
- Diberi antibodi sekunder (1:200)
- Diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam
- Dicuci dengan PBS 3x5 menit
- Preparat diberi sa-HRp (1:500) dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 45 menit
- Dicuci dengan PBS 3x5 menit
- Diinkubasi dengan kromogen DAB (Diaminobenzinidine) 25°C selama 30 menit
- Dicuci dengan PBS 3x5 menit
- Dilakukan counterstaining dengan Mayer Hematoxylen selama 5 menit
- Dicuci dengan aquades dan dikeringkan
- Dilakukan mounting dengan etellen dan ditutup dengan cover glass
- Diamati ekspresi IL-1 dan COX-2 pada sel menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x

HASIL

Lampiran 14. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 189-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 : KOMBINASI TERAPI CURCUMIN DENGAN
VITAMIN E SEBAGAI PRODUK HERBAL
PENUNJANG PENGOBATAN KANKER MAMMAE
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL KANKER
MAMMAE**

PENELITI : ANNA ROOSDIANA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : KIMIA /F-MIPA/ UNIVERSITAS BRAWIJAYA

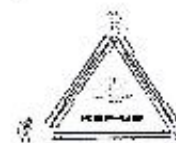
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

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



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Jl. Veteran Malang 65145
Telp/Fax (0341) 559054, 575836
Email : binetikub@ub.ac.id



Judul Penelitian : Kombinasi terapi curcumin dengan vitamin E sebagai produk herbal penunjang pengobatan kanker mammae pada tikus (*Rattus norvegicus*) model kanker mammae

Ketua Peneliti : Dra. Anna roosdlana, Mapp.Sc

Anggota Peneliti : Syarcfina P (105130100111005)
Neny Novita W (105130100111032)
Yesy Vita A (105130100111012)
Rahmatul Laili P (105130100111007)
Reny Purnama H (105130100111008)
Dianidya K.S (105130100111028)
Citra Yuli (105130100111027)
Roski Maulidna (105130100111015)
Merika Pradini (105130100111033)
Almira Sophia (105130100111005)
Firda Nuri (105130100111004)
Eryke Fitriyani (105130100111018)
Intan Charolina (105130100111029)
Yayu Nurani (105130100111019)
Anda Okky (105130100111031)
Reza Erlangga (105130100111030)
Candara Agung (105130100111006)
Rizki Annur (105130100111032)
Putri Dewi (105130100111016)
Putri Astikasanti (105130100111001)
Nurmala Gultom (105130100111024)

Ketua
Komisi Etik Penelitian

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

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL-1	.141	20	.200*	.947	20	.318

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

IL-1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	4	24.8750	2.18384	1.09192	21.4000	28.3500	22.40	27.50
K Pos	4	55.2925	5.58058	2.79029	46.4125	64.1725	49.60	62.47
P1	4	41.6225	3.55762	1.77881	35.9615	47.2835	38.25	46.24
P2	4	30.0625	3.37598	1.68799	24.6906	35.4344	26.20	33.17
P3	4	22.0800	1.62006	.81003	19.5021	24.6579	20.30	24.15
Total	20	34.7865	12.94668	2.89497	28.7273	40.8457	20.30	62.47

Test of Homogeneity of Variances

IL-1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.283	4	15	.109

ANOVA

IL-1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2996.944	4	749.236	59.852	.000
Within Groups	187.772	15	12.518		
Total	3184.716	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL-1

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-30.4175*	2.50181	.000	-38.1429	-22.6921
	P1	-16.7475*	2.50181	.000	-24.4729	-9.0221
	P2	-5.1875	2.50181	.281	-12.9129	2.5379
	P3	2.7950	2.50181	.795	-4.9304	10.5204
K Pos	K Neg	30.4175*	2.50181	.000	22.6921	38.1429
	P1	13.6700*	2.50181	.001	5.9446	21.3954
	P2	25.2300*	2.50181	.000	17.5046	32.9554
	P3	33.2125*	2.50181	.000	25.4871	40.9379
P1	K Neg	16.7475*	2.50181	.000	9.0221	24.4729
	K Pos	-13.6700*	2.50181	.001	-21.3954	-5.9446
	P2	11.5600*	2.50181	.003	3.8346	19.2854
	P3	19.5425*	2.50181	.000	11.8171	27.2679
P2	K Neg	5.1875	2.50181	.281	-2.5379	12.9129
	K Pos	-25.2300*	2.50181	.000	-32.9554	-17.5046
	P1	-11.5600*	2.50181	.003	-19.2854	-3.8346
	P3	7.9825*	2.50181	.041	.2571	15.7079
P3	K Neg	-2.7950	2.50181	.795	-10.5204	4.9304
	K Pos	-33.2125*	2.50181	.000	-40.9379	-25.4871
	P1	-19.5425*	2.50181	.000	-27.2679	-11.8171
	P2	-7.9825*	2.50181	.041	-15.7079	-.2571

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

IL-1

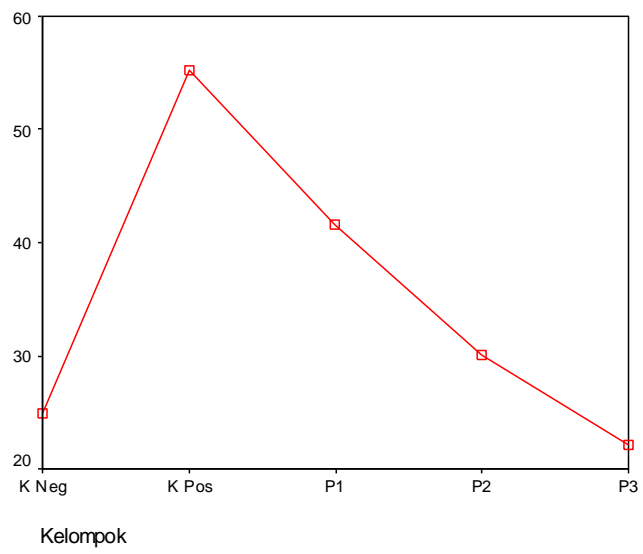
Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
P3	4	22.0800			
K Neg	4	24.8750	24.8750		
P2	4		30.0625		
P1	4			41.6225	
K Pos	4				55.2925
Sig.		.795	.281	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Means Plots



Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
COX2	.197	20	.041	.928	20	.142

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

COX2

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	4	22.2925	1.76415	.88207	19.4853	25.0997	20.40	24.60
K Pos	4	44.0100	5.12891	2.56446	35.8488	52.1712	36.70	48.50
P1	4	34.6575	2.43253	1.21627	30.7868	38.5282	31.40	37.28
P2	4	26.5675	2.87997	1.43998	21.9848	31.1502	22.45	28.70
P3	4	24.8025	1.92011	.96006	21.7472	27.8578	22.34	26.90
Total	20	30.4660	8.59100	1.92101	26.4453	34.4867	20.40	48.50

Test of Homogeneity of Variances

COX2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.216	4	15	.345

ANOVA

COX2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1260.353	4	315.088	33.296	.000
Within Groups	141.949	15	9.463		
Total	1402.302	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: COX2

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-21.7175*	2.17523	.000	-28.4344	-15.0006
	P1	-12.3650*	2.17523	.000	-19.0819	-5.6481
	P2	-4.2750	2.17523	.328	-10.9919	2.4419
	P3	-2.5100	2.17523	.776	-9.2269	4.2069
K Pos	K Neg	21.7175*	2.17523	.000	15.0006	28.4344
	P1	9.3525*	2.17523	.005	2.6356	16.0694
	P2	17.4425*	2.17523	.000	10.7256	24.1594
	P3	19.2075*	2.17523	.000	12.4906	25.9244
P1	K Neg	12.3650*	2.17523	.000	5.6481	19.0819
	K Pos	-9.3525*	2.17523	.005	-16.0694	-2.6356
	P2	8.0900*	2.17523	.015	1.3731	14.8069
	P3	9.8550*	2.17523	.003	3.1381	16.5719
P2	K Neg	4.2750	2.17523	.328	-2.4419	10.9919
	K Pos	-17.4425*	2.17523	.000	-24.1594	-10.7256
	P1	-8.0900*	2.17523	.015	-14.8069	-1.3731
	P3	1.7650	2.17523	.923	-4.9519	8.4819
P3	K Neg	2.5100	2.17523	.776	-4.2069	9.2269
	K Pos	-19.2075*	2.17523	.000	-25.9244	-12.4906
	P1	-9.8550*	2.17523	.003	-16.5719	-3.1381
	P2	-1.7650	2.17523	.923	-8.4819	4.9519

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

COX2

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
K Neg	4	22.2925		
P3	4	24.8025		
P2	4	26.5675		
P1	4		34.6575	
K Pos	4			44.0100
Sig.		.328	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Means Plots

