



**LAMPIRAN**



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"

No: 552-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 : SUPLEMENTASI WATER SOLUBLE EXTRACT (WSE)  
YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP KADAR  
TIROKSIN (T4), JUMLAH MAKROFAG DAN IL-10 PADA  
TIROID TIKUS INDUKSI dTg

PENELITI : ALDILA NOVIANTRI  
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
DINYATAKAN : LAIK ETIK

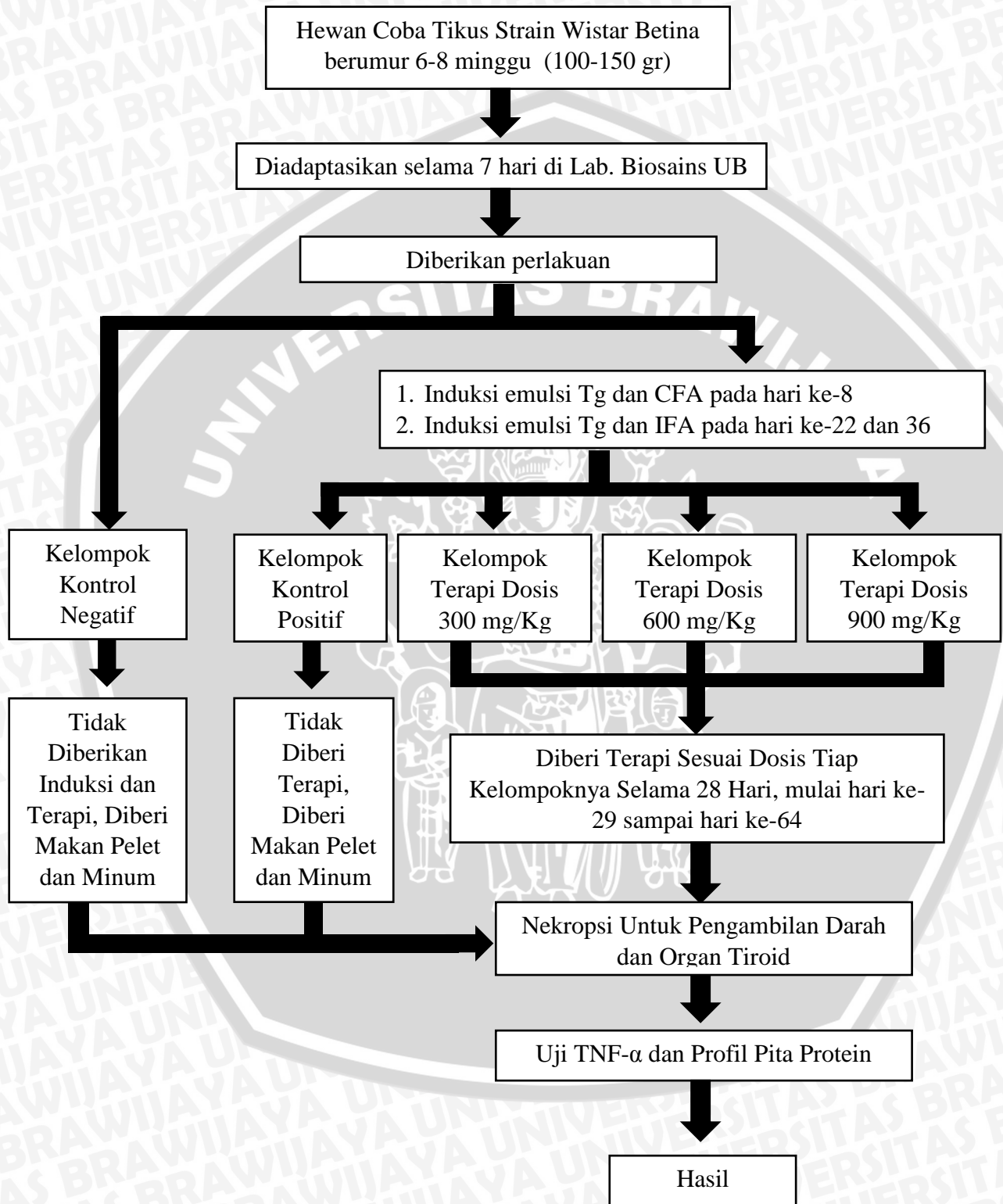
Malang, 30 Mei 2016  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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



**Lampiran 2. Kerangka Operasional**



**Lampiran 3. Isolasi Tiroglobulin Anjing**

#### Lampiran 4. Perhitungan Dosis CFA, IFA, dan Tg

Hasil nanodrop menunjukkan konsentrasi protein dTg sebesar 11.800 µg/ml.  
Jumlah konsentrasi protein untuk mencapai dosis optimal adalah 200 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$11.800 \text{ µg/ml} \times V_1 = 200 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}$$

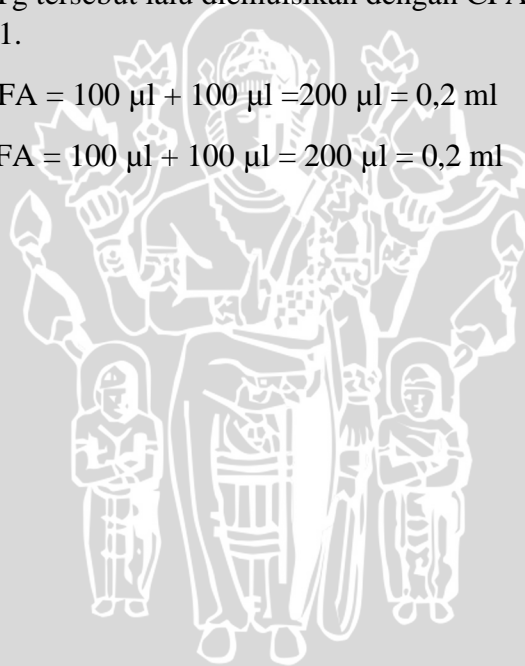
$$V_1 = \frac{200 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}}{11.800 \text{ µg/ml}} = 1,7 \text{ µl}$$

Berdasarkan perhitungan volume di atas didapatkan volume crude protein sebesar 1,7 µl yang kemudian ditambahkan 98,3 µl Tris HCl, sehingga volumenya menjadi 100 µl.

Crude protein dTg tersebut lalu diemulsikan dengan CFA atau IFA dengan perbandingan 1:1.

$$\text{Emulsi dTg + CFA} = 100 \text{ µl} + 100 \text{ µl} = 200 \text{ µl} = 0,2 \text{ ml}$$

$$\text{Emulsi dTg + IFA} = 100 \text{ µl} + 100 \text{ µl} = 200 \text{ µl} = 0,2 \text{ ml}$$



**Lampiran 5. Metode Pembuatan WSE**

Yoghurt disentrifus dengan kecepatan  
12000 rpm selama 10 menit pada suhu 5°C

Di pisahkan supernatan WSE

Di saring menggunakan kertas Watman 1 µm

Supernatan yang dihasilkan di *freeze  
dry*

Disimpan dalam refrigrator pada suhu -4-5°C.



**Lampiran 6.** Perhitungan Dosis WSE

$$\text{Volume WSE} = \text{Dosis (mg/kg bb)} \times \text{BB (kg)} : \text{Konsentrasi Sediaan}$$

**Kelompok C (Terapi dengan dosis 300 mg/kg BB)**

$$\text{Tikus 1} : 0,164 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 49,2 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2} : 0,181 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 54,3 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3} : 0,138 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 41,4 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4} : 0,140 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = \underline{42 \text{ mg}} + \\ 186,9 \text{ mg}$$

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 ml, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 ml.

$$\text{Konsentrasi} : 186,9 \text{ mg} : 6 \text{ ml} = 31,15 \text{ mg/ml}$$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

$$\text{Tikus 1} : 49,2 \text{ mg} : 31,15 \text{ mg/ml} = 1,6 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2} : 54,3 \text{ mg} : 31,15 \text{ mg/ml} = 1,7 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3} : 42 \text{ mg} : 31,15 \text{ mg/ml} = 1,3 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4} : 41,4 \text{ mg} : 31,15 \text{ mg/ml} = 1,3 \text{ ml}$$

**Kelompok D (Terapi dengan dosis 600 mg/kg BB)**

$$\text{Tikus 1} : 0,151 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 90,6 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2} : 0,139 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 83,4 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3} : 0,177 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 106,2 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4} : 0,161 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = \underline{96,6 \text{ mg}} + \\ 376,8 \text{ mg}$$

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 ml, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 ml.

$$\text{Konsentrasi} : 376,8 \text{ mg} : 6 \text{ ml} = 62,8 \text{ mg/ml}$$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

$$\text{Tikus 1} : 90,6 \text{ mg} : 62,8 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2} : 83,4 \text{ mg} : 62,8 \text{ mg/ml} = 1,3 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3} : 106,2 \text{ mg} : 62,8 \text{ mg/ml} = 1,7 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4} : 96,6 \text{ mg} : 62,8 \text{ mg/ml} = 1,5 \text{ ml}$$

**Kelompok E (Terapi dengan dosis 900 mg/kg BB)**

$$\text{Tikus 1} : 0,157 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 141,3 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2} : 0,123 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 110,7 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3} : 0,142 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 127,8 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4} : 0,158 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = \underline{142,2 \text{ mg}} + \\ 522 \text{ mg}$$

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 ml, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 ml.

$$\text{Konsentrasi} : 522 \text{ mg} : 6 \text{ ml} = 87 \text{ mg/ml}$$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

$$\text{Tikus 1} : 141,3 \text{ mg} : 87 \text{ mg/ml} = 1,6 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2} : 110,7 \text{ mg} : 87 \text{ mg/ml} = 1,3 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3} : 127,8 \text{ mg} : 87 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4} : 142,2 \text{ mg} : 87 \text{ mg/ml} = 1,6 \text{ ml}$$



**Lampiran 7. Metode Imunohistokimia (IHK)****Preparat**

- dideparafinasi dengan xylol I, xylol II
- direhidrasi dengan alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) aquadest (1x3menit)
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi 3% Hidrogen Peroksidase (dalam diozine water) 45 menit
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi BSA (Bovine Serum Albumin) 1% dalam PBS 45 menit
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi antibodi primer (*anti rat TNF- $\alpha$* ) dibiarkan satu malam pada suhu 4oC
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi antibodi sekunder berlabel biotin (*Rabbit anti rat IgG*) kemudian diinkubasi 1 jam pada suhu ruang
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi SAHRP kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang
- dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- ditetesi cromagen DAB kemudian diinkubasi selama 7 menit pada suhu ruang
- dicuci dengan aquadest 3x5menit
- dicounterstain dengan *mayer hematoxylin* selama 5 menit pada suhu ruang
- dicuci dengan aquadest 3x5menit
- dimounting dengan entellan
- ditutup dengan *cover glass*

**Preparat  
Imunohistokimia**

**Lampiran 8.** Metode Pembuatan Larutan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

**Gel Poliakrilamid**

**a. Akrilamid-Bis 30%**

Akrilamid (14,6 gr), Bis Akrilamid (0,4 gr), dan dH<sub>2</sub>O (50 ml)

- Dimasukkan kedalam *beaker glass*, kemudian dicampur menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dipindahkan larutan kedalam botol kaca dan simpan dalam lemari es

Hasil

**b. Tris-CL 1,5 M pH 8,8**

*Tris base* (18,15 gr) dan dH<sub>2</sub>O (100 ml)

- Dimasukkan kedalam *beaker glass* berukuran 100 ml, kemudian dicampur menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dilakukan *adjust* pH hingga pH larutan 8,8 menggunakan pH meter
- Dipindahkan larutan kedalam botol kaca dan simpan dalam lemari es

Hasil

**c. Tris CL 0,5 M pH 6,8**

*Tris base* (6 gr) dan dH<sub>2</sub>O (100 ml)

- Dimasukkan kedalam *beaker glass* berukuran 100 ml, kemudian dicampur menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dilakukan *adjust* pH hingga pH larutan 6,8 menggunakan pH meter
- Dipindahkan larutan kedalam botol kaca dan simpan dalam lemari es

Hasil

**d. SDS 10%**

SDS (0,2 gr) dan akuades (2 ml)

- Dimasukkan kedalam *beaker glass*, kemudian dihomogenkan dengan cara *pipeting*
- Dipindahkan larutan kedalam botol kaca dan simpan dalam lemari es

Hasil

**e. APS**

APS (0,1 gr) dan dH<sub>2</sub>O (1 ml)

- Dimasukkan kedalam *valcon*, kemudian dihomogenkan dengan cara *pipeting*
- Dicampurkan dengan larutan *staining* dan larutan *stacking* (CATATAN : pembuatan dilakukan saat akan dicampurkan dengan larutan *staining* dan *stacking*)

Hasil

**Running Electrophoresis****a. Bromophenol blue 0,25%**

Bromophenol blue (0,025 gr) dan akuades (10 ml)

- Dicampurkan hingga homogen
- Dimasukkan kedalam labu ukur kemudian ditambahkan akuades hingga mencapai garis batas 10 ml

Hasil

**b. Reducing Sample Buffer (RSB)**

*Tris HCL* pH 6,8 (1 ml), Gliserol 25% (0,8 ml), SDS 10% (1,6 ml),  $\beta$ -mercaptoetanol (0,4 ml), dan *Bromophenol blue* 0,25%

- Dicampurkan dalam *beaker glass* berukuran 100 ml, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dimasukkan kedalam falcon berukuran 15 ml, kemudian disimpan dalam lemari es

Hasil

**c. Running Buffer**

Glisin (14,4 gr), Tris base (3,03 gr), SDS 10% (1 gr), dan akuades (1000 ml)

- Dicampurkan dalam *beaker glass* berukuran 1L, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dilakukan *adjust* pH sambil terus di *stirrer* hingga pH larutan 8,8
- Dimasukkan kedalam botol kaca, kemudian disimpan dalam lemari es

Hasil

**d. Larutan Staining**

*Commasie brilliant blue R-250* (0,25 gr), methanol absolut (45,4 ml), asam asetat glasial (9,2 ml), dan akuades (100 ml)

- Dicampurkan dalam *beaker glass*, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen
- Dimasukkan larutan kedalam botol kaca dan simpan dalam lemari es

Hasil

### e. Larutan *Destaining*

Methanol absolut (70 ml), asam asetat glasial (70 ml),  
dan akuades (1000 ml)

- Dicampurkan dalam *beaker glass* berukuran 1000 ml
- Ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas 1000 ml, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen

Hasil

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 9. Metode Profil Pita Protein

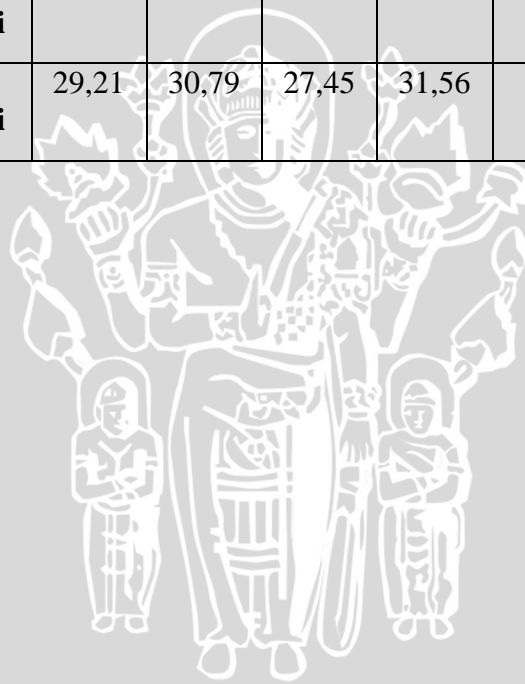
### Plat Elektroforesis

- Dimasukkan larutan *separating gel* kedalam plat
- Dibiarkan hingga mengeras
- Ditambahkan larutan *separating* di atas larutan *stacking gel* yang telah mengeras
- Dipasangkan sisiran pembentuk sumuran sampel
- Dibiarkan hingga *gel* mengeras
- Dilepaskan sisir pada *gel* secara perlahan
- Dimasukkan 5 sampel pada tiap sumur
- Dimasukkan marker pada salah satu sumur yang kosong
- Dimasukkan *gel* dalam alat elektroforesis
- Dituangkan running buffer
- Dielektroforesis
- Dikeluarkan *gel* dari alat elektroforesis
- Dicuci dengan larutan distaining
- Dishaker selama 24 jam

### Hasil

**Lampiran 10.** Perhitungan Ekspresi TNF- $\alpha$ 

Kelompok Perlakuan	Tikus				Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$
	1	2	3	4	
<b>Kontrol negatif</b>	25,23	29,87	27,85	26,31	27,31
<b>Kontrol positif</b>	80,91	75,09	78,52	74,88	77,35
<b>Terapi 300 mg/kg BB/hari</b>	57,42	62,78	62,01	59,65	60,46
<b>Terapi 600 mg/kg BB/hari</b>	42,39	40,17	39,73	39,11	40,35
<b>Terapi 900 mg/kg BB/hari</b>	29,21	30,79	27,45	31,56	29,75



**Lampiran 11.** Hasil uji statistika pengaruh pemberian WSE yoghurt susu kambing terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) model *Autoimmune thyroiditis* (AITD)

### 11.1 Uji normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.0000
	Std. Deviation	1.45095
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.692
Asymp. Sig. (2-tailed)		.725

a. Test distribution is Normal.

Hasil pengujian normalitas nilai menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,725. Oleh karena nilai  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.



### 11.2 Uji homogenitas varian

**Test of Homogeneity of Variances**

TNF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.302	4	15	.314

Hasil pengujian normalitas nilai menunjukkan nilai *levene statistic* sebesar 1,302 dengan nilai signifikansi sebesar 0,314. Oleh karena itu nilai  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan data dapat yang digunakan mempunyai ragam yang homogeny.

Pengujian nilai homogenitas dan nilai normalitas sampel telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dapat dilakukan menggunakan uji statistika ANOVA.

### 11.3 Uji statistika ANOVA

**ANOVA**

TNF	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7326.464	4	1831.616	386.090	.000
Within Groups	71.160	15	4.744		
Total	7397.624	19			

Nilai  $p < 0,05$  maka dapat diputuskan bahwa  $H_0$  ditolak, hal ini dikarenakan adanya perbedaan yang signifikan antara tiap perlakuan.

11.4 Uji tukey

Multiple Comparisons

TNF

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-50.03500*	1.54013	.000	-54.7908	-45.2792
	3	-33.15000*	1.54013	.000	-37.9058	-28.3942
	4	-13.03500*	1.54013	.000	-17.7908	-8.2792
	5	-2.43750	1.54013	.529	-7.1933	2.3183
2	1	50.03500*	1.54013	.000	45.2792	54.7908
	3	16.88500*	1.54013	.000	12.1292	21.6408
	4	37.00000*	1.54013	.000	32.2442	41.7558
	5	47.59750*	1.54013	.000	42.8417	52.3533
3	1	33.15000*	1.54013	.000	28.3942	37.9058
	2	-16.88500*	1.54013	.000	-21.6408	-12.1292
	4	20.11500*	1.54013	.000	15.3592	24.8708
	5	30.71250*	1.54013	.000	25.9567	35.4683
4	1	13.03500*	1.54013	.000	8.2792	17.7908
	2	-37.00000*	1.54013	.000	-41.7558	-32.2442
	3	-20.11500*	1.54013	.000	-24.8708	-15.3592
	5	10.59750*	1.54013	.000	5.8417	15.3533
5	1	2.43750	1.54013	.529	-2.3183	7.1933
	2	-47.59750*	1.54013	.000	-52.3533	-42.8417
	3	-30.71250*	1.54013	.000	-35.4683	-25.9567
	4	-10.59750*	1.54013	.000	-15.3533	-5.8417

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



TNF

Tukey HSD

Perlakuan n	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	4	27.3150			
5	4	29.7525			
4	4		40.3500		
3	4			60.4650	
2	4				77.3500
Sig.		.529	1.000	1.000	1.000

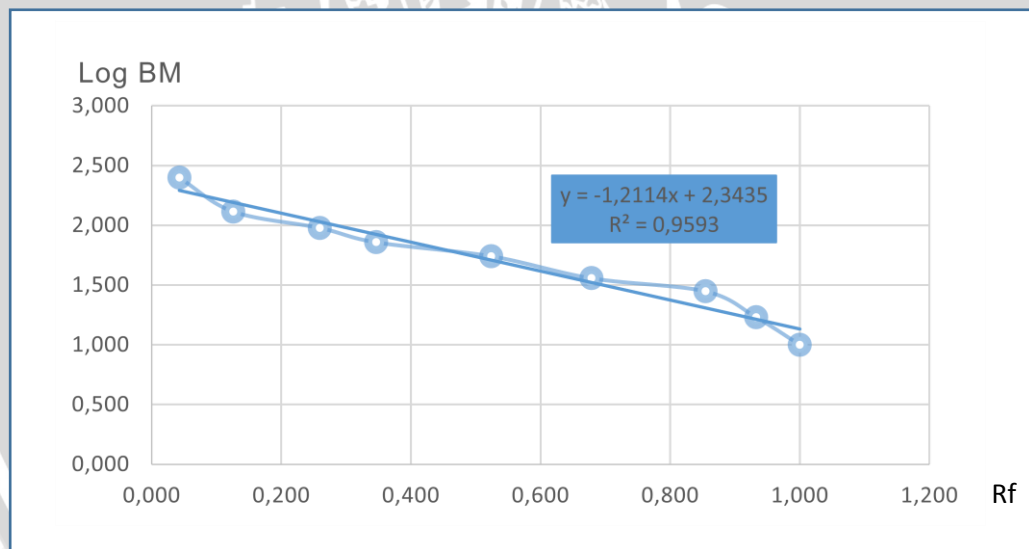
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



**Lampiran 12.** Hasil uji statistika pengaruh pemberian WSE yoghurt susu kambing terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) model *Autoimmune thyroiditis* (AITD)

**a. Marker**

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.24	5.63	0.043	250	2.398
2	0.71	5.63	0.126	130	2.114
3	1.46	5.63	0.259	95	1.978
4	1.95	5.63	0.346	72	1.857
5	2.95	5.63	0.524	55	1.740
6	3.82	5.63	0.679	36	1.556
7	4.81	5.63	0.854	28	1.447
8	5.25	5.63	0.933	17	1.230
9	5.63	5.63	1	10	1



## b. Kontrol positif

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.608	5.63	0.108	163.184	2.213
2	0.915	5.63	0.163	140.159	2.147
3	1.312	5.63	0.233	<b>115.133</b>	2.061
4	1.651	5.63	0.293	97.332	1.988
5	2.140	5.63	0.380	76.390	1.883
6	2.865	5.63	0.509	53.339	1.727
7	3.438	5.63	0.611	<b>40.156</b>	1.604
8	3.885	5.63	0.690	32.179	1.508
9	5.020	5.63	0.892	18.338	1.263
10	5.431	5.63	0.965	14.960	1.175

## c. Kontrol negatif

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.601	5.63	0.107	163.751	2.214
2	0.913	5.63	0.162	140.298	2.147
3					
4	1.640	5.63	0.291	97.864	1.991
5	2.137	5.63	0.380	76.504	1.884
6	2.870	5.63	0.510	53.207	1.726
7					
8	3.852	5.63	0.684	32.709	1.515
9	5.032	5.63	0.894	18.229	1.261
10	5.433	5.63	0.965	14.945	1.174

## d. Terapi 300 mg/kg BB/ hari

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.602	5.63	0.107	163.670	2.214
2	0.911	5.63	0.162	140.437	2.147
3	1.310	5.63	0.233	<b>115.247</b>	2.062
4	1.654	5.63	0.294	97.188	1.988
5	2.142	5.63	0.380	76.315	1.883
6	2.873	5.63	0.510	53.128	1.725
7	3.416	5.63	0.607	<b>40.596</b>	1.608
8	3.881	5.63	0.689	32.243	1.508
9	5.029	5.63	0.893	18.256	1.261
10	5.491	5.63	0.975	14.521	1.162

## e. Terapi 600 mg/kg BB/ hari

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.608	5.63	0.108	163.184	2.213
2	0.912	5.63	0.162	140.367	2.147
3	1.311	5.63	0.233	<b>115.190</b>	2.061
4	1.650	5.63	0.293	97.380	1.988
5	2.138	5.63	0.380	76.466	1.883
6	2.869	5.63	0.510	53.233	1.726
7	3.440	5.63	0.611	<b>40.116</b>	1.603
8	3.875	5.63	0.688	32.339	1.510
9	5.041	5.63	0.895	18.148	1.259
10	5.448	5.63	0.968	14.834	1.171

**f. Terapi 900 mg/kg BB/ hari**

No.	a	b	Rf	BM	Log BM
1	0.598	5.63	0.106	163.994	2.215
2	0.911	5.63	0.162	140.437	2.147
3					
4	1.655	5.63	0.294	97.139	1.987
5	2.132	5.63	0.379	76.694	1.885
6	2.872	5.63	0.510	53.154	1.726
7					
8	3.890	5.63	0.691	32.099	1.506
9	5.035	5.63	0.894	18.202	1.260
10	5.467	5.63	0.971	14.695	1.167



Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian



Protein tiroglobulin anjing

Protein-iU

Product NanoPhotometer  
Version 7122 Q2.3.1  
Serial Number 3242  
Date 24 March 2016  
Time 10:30:03

Instrument Calibration Pass  
24 March 2016 10:27:52

Lid Factor 50  
Dilution Factor 1.000  
Background 0.0  
Units mg/ml  
Protein Name BSA

Sample 1  
Concentration 25.7 mg/ml  
Lid Factor 50

A260	A280	A320
n	n	n
0.506	0.504	0.150

Hasil konsentrasi protein tiroglobulin anjing



Kasein yoghurt susu Kambing



Cairan (WSE) yoghurt susu kambing



Cairan (WSE) yoghurt susu kambing yang telah di freeze dry



Pengukuran pH yoghurt susu kambing







Pemberian terapi peroral menggunakan sonde lambung



Tiroid tikus



pH 6,8 dari Tris CL 0,5 M



pH 8,8 dari Tris CL 1,5 M



Pemasangan alat cetak gel elektroforesis