



**LAMPIRAN**

**LAMPIRAN**



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
DAN RSUP dr KARIADI SEMARANG  
Sekretariat : Kantor Dekanat FK Undip Lt.3  
Jl. Dr. Soefomo 18. Semarang  
Telp.024-8311523/Fax. 024-8446905



## ETHICAL CLEARANCE No.373/EC/FK-RSDK/2014

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro- RSUP.  
Dr. Kariadi Semarang, setelah membaca dan menelaah USULAN Penelitian  
dengan judul :

### PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SALAM TERHADAP PENURUNAN EKSPRESI FIBRONEKTIN MESANGIAL TIKUS SPRAGUE DAWLEY DIABETES MELLITUS

Peneliti Utama : Nunung Hasanah  
Pembimbing : 1. Prof. Dr. dr. Winarto, DMM,Sp.MK,Sp.M(K)  
2. Prof.Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes  
Penelitian : Dilaksanakan di LPPT Unit IV UGM Yogyakarta.

Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang  
dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, yang diamended di Seoul 2008 dan  
Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI  
2011.

Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi  
hewan coba dan melaporkan ke KEPK bahwa penelitian sudah selesai di lampiri  
Abstrak Penelitian.

Semarang, 01 JUL 2014



Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Fakultas Kedokteran Undip-RSUP Dr. Kariadi  
Ketua

Prof.Dr.dr.Suprihati, M.Sc, Sp.THT-KL(K)  
NIP. 19500621197703 2 001



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU  
( LPPT - UGM )**

Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan

Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM  
Telp. (0274) 7497705, FAX. ( 0274 ) 546868, e-mail: lppt\_info@mail.ugm.ac.id

27 Maret 2014

Nomor : 190/UGM/LPPT/LP3HP/27 - 3/2014  
Lamp : -  
Hal : Ijin Penelitian

Kepada  
Yth : Ketua Program  
Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Universitas Diponegoro Semarang

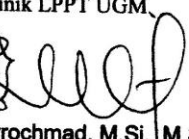
Dengan Hormat,

Menjawab surat saudara nomor 291/UN7.3.4/MIB/PP/2014 tgl. 27 Maret 2014 perihal permohonan ijin Penelitian bagi mahasiswa Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yaitu :

Nama : Nunung Hasanah, S.Kep  
NIM : 22010112410039  
Judul Penelitian : Pemberian ekstrak etanol daun salam terhadap penurunan ekspresi Fibronektin Mesangial tikus *Sprague Dawley* Diabetes Melitus

Dengan ini kami beritahukan bahwa permohonan ijin penelitian tersebut dapat kami setujui sesuai peraturan yang berlaku. Adapun dalam pelaksanaannya akan dibantu oleh teknisi kami sdr. Wasino.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Kabid Pra-Klinik LPPT UGM  
  
Dr. Anwar Nurrochmad, M.Si., M.Sc., Apt.  
NIP : 19730716 199803 1 001

### Lampiran 3

#### Pemeliharaan Hewan Coba

1. Tikus dipelihara dalam ruangan yang berventilasi cukup. Suhu ruangan berkisar 28-32°C.
2. Makanan dan minuman diberikan *ad libitum* dalam bentuk *pellet* dan pakan tikus.
3. Untuk kesehatan, setiap hari dilakukan pembersihan kandang.
4. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai jam 06.00 pagi s/d 18.00 WIB).

### Lampiran 4

#### Prosedur Pemberian Pakan

1. Duapuluh empat ekor tikus diadaptasikan terdahulu selama 7 hari dan diberi pakan standar *Comfeed AD II* dan air *ad libitum*. Komposisi pakan *Comfeed AD II* terdiri dari:

Air	: maks	12%
Protein kasar	: min	15%
Lemak kasar	: 3-7%	
Serat kasar	: maks	6%

Abu : maks 7%

Kalsium : 0,9-1,1%


Phosphor : 0,6-0,9%

Antibiotika : +

Coccidiostat : +

2. Tikus dipuasakan selama 12 jam, selanjutnya diinduksi STZ 40mg/BB ip, dibiarkan selama 72 jam, kemudian diukur kadar gula darah sewaktu sehingga ditemukan tikus DM.
3. Tikus dibagi secara acak menjadi 4 kelompok: 1 kelompok control negative tanpa pemberian EEDS dan 3 kelompok perlakuan diberi EEDS dengan 3 dosis bertingkat: 150mg/200g BB, 300mg/200g BB dan 450mg/200g BB.
4. Selanjutnya tikus kembali diberi pakan satndar *Comfeed AD II* dan air *ad libitum* selama 15 hari.


## Lampiran 5

	LEMBAR KERJA UJI EKSTRAKSI LABORATORIUM PENGUJIAN "LPPT-UGM"		RDP/5.10.2/LPPT Rev.01
Nama sample	Daun Salam	No. Pengujian	
Kode sample	14040100465	Tanggal Diterima	06 Juni 2014
Tanggal Pengujian	02 April 2014	Tanggal Selesai	16 Juni 2014
Suhu Ruangan		Kelembaban	
Metode Uji	1. Ekstraksi Maserasi	2.	
	3.	4.	

### Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Salam

1. Daun Salam dicuci dalam air mengalir.
2. Dikeringkan di dalam almari pengering suhu 45 °C selama 48 jam.
3. Diserbuk menggunakan mesin penyerbuk dengan diameter lubang saringan 1 mm.
4. Serbuk Daun Salam ditambah Ethanol 70%.
5. Diaduk selama 30 menit, didiamkan 24 jam, kemudian disaring (diulang 2 kali).
6. Filtrat diuapkan dengan Vacuum Rotary Evaporator pemanas waterbath suhu 70 °C
7. Ekstrak kental dituang dalam cawan porselin.
8. Dipanaskan dengan waterbath suhu 70 °C sambil terus diaduk.
9. Hasil ekstrak Daun Salam ditimbang dan dikemas.

Diperiksa/Disetujui Oleh :	Dikerjakan Oleh :  Dani Sapdani
----------------------------	---------------------------------------

	<b>LEMBAR KERJA KOMPILASI DATA LABORATORIUM PENGUJIAN "LPPT-UGM"</b>		RDP/5.10.2/LPPT Rev.01
Nama sampel	Daun Salam	No. Pengujian	
Kode sampel	14040100465	Tanggal Diterima	06 Juni 2014
Tanggal Pengujian	02 April 2014	Tanggal Selesai	16 Juni 2014
Suhu Ruangan		Kelembaban	
Metode Uji	1. Ekstraksi Maserasi	2.	
	3.	4.	

### DATA PEMBUATAN EKSTRAK DAUN SALAM

Br. Daun Salam Basah	Br. Daun Salam Kering	Susut Pengerinan
10 gram	3,59 gram	35,90 %
10 gram	3,58 gram	35,80 %
10 gram	3,75 gram	37,50 %
<b>Rata-rata</b>		<b>36,40 %</b>

Berat serbuk Daun Salam : 700,00 gram  
 Ethanol 70% : 4000 ml  
 Berat Ekstrak Daun Salam : 45,12 gram



## Lampiran 7

### Perlakuan Pemberian STZ

1. Berat badan tikus jantan *Sprague dawley* jantan diukur dengan ditimbang.
2. Tikus yang terpilih kemudian dilakukan aklimatisasi untuk penyesuaian iklim dengan keadaan lingkungan baru.
3. Hewan dipuasakan 10-12 jam.
4. Hewan diinduksi dengan STZ 40mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1M, pH 4,.

Setelah 72 jam hewan perlakuan diukur kadar gula darah sewaktu. Untuk memenuhi criteria DM, dipilih tikus dengan

Diperiksa/Disetujui Oleh :	Dikerjakan Oleh :  Dani Sapdani
----------------------------	---------------------------------------

## Lampiran 10

### Prosedur IHC

1. Jaringan blok paraffin dipotong dengan ketebalan 3  $\mu$ , letakkan diatas objek glassPoly L Lysin .
2. Letakkan objek glass diatas incubator suhu 45°C, biarkan semalam .
3. Diiparafinisasi (Xylol 3x5 menit, alkohol absolut, alcohol 96 %, alcohol 70% masing-masing Selma 5 menit.
4. Cuci dengan air kran mengalir, cuci aqudest.
5. Inkubasi dengan H2O2 3 % selama 15 menit.
6. Cuci dengan air kran mengalir, cuci dengan aquadest.
7. Untuk Retrivel dengan citrate buffer ph 6 selama 40 menit pada 95° dengan Decolaking Chamber atau 10-20 menit dengan microwave.  
Khusus untuk VEGF retrivel dengan EDTA PH 8.
8. Dinginkan  $\pm$  selama 10 menit.
9. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
10. Inkubasi dengan bloking serum atau normal serum selama 15 menit.
11. Tiriskan, bersihkan.
12. Inkubasi dengan antibody ...biarkan selama 1 jam.
13. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.

14. Inkubasi dengan antibody sekunder atau trekkie universal link selama 20 menit.
15. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
16. Inkubasi dengan trekkie avidin HRP selama 10 menit.
17. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
18. Teteskan cromogen DAB (1:50), biarkan selama 2 menit.
19. Cuci air.
20. Counterstain dengan Hematoxylin mayer 2 menit.
21. Cuci air.
22. Celupkan ke alcohol bertingkat 70%, 96%, 100%, xylol.
23. Mounting.



UNIVERSITAS GADJAH MADA

**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU  
( LPPT - UGM )**

Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan  
Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM

Telp. (0274) 7497705, FAX. ( 0274 ) 546868, e-mail: lppt\_info@mail.ugm.ac.id

**SURAT KETERANGAN  
NO : 713/LP3HP/17 - VII/2014**

Bersama ini kami menerangkan bahwa ;

Nama : Nunung Hasanah, S.Kep  
NIM : 22010112410039  
Instansi : Program Studi Ilmu Biomedik Fak Kedokteran  
UNDIP Semarang  
Jenjang Studi : S2

Benar – benar telah selesai melakukan Penelitian di Unit Layanan Penelitian  
Pra – Klinik dan pengembangan Hewan Percobaan (LP3HP) LPPT UGM.  
Pada bulan Juni 2014 sesuai Proposal yang diajukan dengan judul :

"PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SALAM  
TERHADAP PENURUNAN EKSPRESI FIBRONEKTIN  
MESANGIAL TIKUS *Sprague Dawley* DIABETES MELITUS"

Dan dinyatakan bebas dari segala tanggungan di Laboratorium Penelitian  
dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada.

Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana  
mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

Yogyakarta, 17 Juli 2014  
P.L., Kabid Unit Pra- Klinik LPPT UGM

Drh. Claude Mona Airin, MP.  
NIP : 19760708 200801 2 012



