

## **LAMPIRAN**

Lampiran 1. *Sertifikat* Ethical Clearance

**KOMISI BIOETIKA PENELITIAN KEDOKTERAN/KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG SEMARANG**

Sekretariat : Gedung C Lantai I Fakultas Kedokteran Unissula  
Jl. Raya Kaligawe Km 4 Semarang, Telp. 024-6583584, Fax 024-6594366

# Ethical Clearance

**No. 214/III/2019/Komisi Bioetik**

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, setelah melakukan pengkajian atas usulan penelitian yang berjudul :

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS (metode CMCE) TERHADAP KADAR TNF –  $\alpha$  DAN  
C- Reaktif Protein (CRP) SEL HATI**

**Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) Diinduksi oleh  
Carbo Tetraklorida (CCl<sub>4</sub>)**

Peneliti Utama : Afief Adi Saputro  
Pembimbing : Prof. Dr. dr. Taufiq R. Nasihun, M.Kes., Sp.And  
Dr. Dra. Atina Husaana, M.Si., Apt  
Tempat Penelitian : Pusat Studi Pangan dan Gizi Pusat Antar Unit Mahasiswa Universitas  
Gajah Mada Yogyakarta

dengan ini menyatakan bahwa usulan penelitian diatas telah memenuhi prasyarat etik penelitian. Oleh karena itu Komisi Bioetika merekomendasikan agar penelitian ini dapat dilaksanakan dengan mempertimbangkan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki dan panduan yang tertuang dalam Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI tahun 2004.

Semarang, 14 Maret 2019

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan  
Fakultas Kedokteran Unissula

Ketua,



(dr. Sofwan Dahlan, Sp.F(K))

## Lampiran 2. Surat Penelitian PSPG UGM



## UNIVERSITAS GADJAH MADA

Pusat Studi Pangan dan Gizi

Jln. Teknika Utara, Berek, YOGYAKARTA 55281

Telepon : 0274-589242, Web : [www.cfns.ugm.ac.id](http://www.cfns.ugm.ac.id)Email : [cfns@ugm.ac.id](mailto:cfns@ugm.ac.id)

## SURAT KETERANGAN BEBAS PEMINJAMAN

Menerangkan bahwa :

Nama Mahasiswa/Peneliti

: ARIEF ADI SAPUTRO

No. Mahasiswa

: 173.01.0111

Jurusan/Fakultas/Universitas

: BIOMEDIE / FAKULTAS KEDEKTERAN /  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

Alamat Rumah &amp; Nomor Telpn/HP

: Jl. Raya Basito Gang Rambayan Desa  
Panganjoran RT 01 / RW 02 Kecamatan  
Bac Kab. Kudus HP: 081 32 791 42 65

Tidak mempunyai pinjaman peralatan dan bon bahan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta, 13 Mei 2019Teknisi,  
Laboratorium Mikrobiologi

  
Teknisi,  
Laboratorium Kimia dan Biokimia

  
Teknisi,  
Laboratorium Gizi

  
Teknisi,  
Laboratorium Rekayasa Pangan,

  
Mengetahui :  
Sekretaris,Dr. Ir. Setyastuti Purwanti, SU  
NIP. 195203021979032001

## Lampiran 3. Hasil Olah Data Kadar TNF-a

**TNF-a****Case Processing Summary**

	KELOMPOK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
TNF-a	KONTROL POSITIF	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%

**Descriptives**

	KELOMPOK		Statistic	Std. Error
TNF-a	KONTROL POSITIF	Mean	17,2957	,59058
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 15,8506	
			Upper Bound 18,7408	
		5% Trimmed Mean	17,2613	
		Median	17,1700	
		Variance	2,441	
		Std. Deviation	1,56253	
		Minimum	15,43	
		Maximum	19,78	
		Range	4,35	
		Interquartile Range	2,61	
		Skewness	,430	,794
		Kurtosis	-,891	1,587
	DOSIS EKSTRAK	Mean	10,4043	,51016

DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,1		
		Upper Bound	11,€		
	5% Trimmed Mean		10,4492		
	Median		10,6500		
	Variance		1,822		
	Std. Deviation		1,34975		
	Minimum		8,04		
	Maximum		11,96		
	Range		3,92		
	Interquartile Range		2,17		
	Skewness		-,845	,794	
	Kurtosis		,240	1,587	
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	Mean		6,1786	,29571
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5,4550	
		Upper Bound	6,9021		
5% Trimmed Mean			6,1890		
Median			6,3000		
Variance			,612		
Std. Deviation			,78238		
Minimum			5,00		
Maximum			7,17		
Range			2,17		
Interquartile Range			1,31		
Skewness			-,368	,794	
Kurtosis			-1,143	1,587	
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g		Mean		3,2629	,35518
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,3938	
		Upper Bound	4,1319		
	5% Trimmed Mean		3,2626		
	Median		3,2600		
	Variance		,883		
	Std. Deviation		,93971		
	Minimum		1,96		
	Maximum		4,57		
	Range		2,61		

Interquartile Range		
Skewness		4
Kurtosis	-1,200	1,587

### Tests of Normality

	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
TNF-a	KONTROL POSITIF	,167	7	,200 <sup>*</sup>	,958	7	,805
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	,160	7	,200 <sup>*</sup>	,950	7	,732
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	,192	7	,200 <sup>*</sup>	,954	7	,766
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	,109	7	,200 <sup>*</sup>	,978	7	,949

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

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TNF-a	Based on Mean	1,437	3	24	,257
	Based on Median	1,175	3	24	,340
	Based on Median and with adjusted df	1,175	3	18,443	,346
	Based on trimmed mean	1,381	3	24	,273

## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

TNF-a

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,437	3	24	,257

### ANOVA

TNF-a

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
--	----------------	----	-------------	---	------

Between Goups	779,383	3	259,794	180,460	,000
Within Goups	34,551	24	1,440		
Total	813,934	27			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF-a

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KONTROL POSITIF	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	6,89143 <sup>*</sup>	,64134	,000	5,5678	8,2151
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	11,11714 <sup>*</sup>	,64134	,000	9,7935	12,4408
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	14,03286 <sup>*</sup>	,64134	,000	12,7092	15,3565
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	KONTROL POSITIF	-6,89143 <sup>*</sup>	,64134	,000	-8,2151	-5,5678
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	4,22571 <sup>*</sup>	,64134	,000	2,9020	5,5494
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	7,14143 <sup>*</sup>	,64134	,000	5,8178	8,4651
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	KONTROL POSITIF	-11,11714 <sup>*</sup>	,64134	,000	-12,4408	-9,7935
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	-4,22571 <sup>*</sup>	,64134	,000	-5,5494	-2,9020
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	2,91571 <sup>*</sup>	,64134	,000	1,5920	4,2394
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	KONTROL POSITIF	-14,03286 <sup>*</sup>	,64134	,000	-15,3565	-12,7092
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200 g	-7,14143 <sup>*</sup>	,64134	,000	-8,4651	-5,8178
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	-2,91571 <sup>*</sup>	,64134	,000	-4,2394	-1,5920

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

## KELOMPOK CRP

### Case Processing Summary

	KELOMPOK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CRP	KONTROL POSITIF	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%

#### Descriptives

	KELOMPOK		Statistic	Std. Error	
CRP	KONTROL POSITIF	Mean	2,9500	,25709	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,3209	
			Upper Bound	3,5791	
		5% Trimmed Mean		2,9706	
		Median		2,7900	
		Variance		,463	
		Std. Deviation		,68020	
		Minimum		1,77	
		Maximum		3,76	
		Range		1,99	
		Interquartile Range		,97	
		Skewness		-,510	,794
		Kurtosis		,505	1,587
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	Mean	2,0112	,24845	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,40	
			Upper Bound	2,62	
		5% Trimmed Mean		2,02	
		Median		1,8600	
		Variance		,432	
		Std. Deviation		,65734	
		Minimum		,90	





CRP	KONTROL POSITIF	,236	7	,200*	,911	7	,404
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	,253	7	,198	,894	7	,295
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	,252	7	,200*	,871	7	,188
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	,225	7	,200*	,873	7	,198

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

a. Lilliefors Significance Correction

#### Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CRP	Based on Mean	2,561	3	24	,079
	Based on Median	1,688	3	24	,196
	Based on Median and with adjusted df	1,688	3	16,766	,208
	Based on trimmed mean	2,575	3	24	,077

#### Descriptives

CRP

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
					Lower Bound	Upper Bound		
					KONTROL POSITIF	7		
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	7	2,0143	,65734	,24845	1,4063	2,6222		
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	7	1,3857	,48438	,18308	,9377	1,8337	,93	2,19
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	7	,6114	,09299	,03515	,5254	,6974	,43	,70

Total	28	1,7404	1,00734	,19037	1,3498	2,1310	,43	3,76
-------	----	--------	---------	--------	--------	--------	-----	------

### Test of Homogeneity of Variances

CRP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,561	3	24	,079

### ANOVA

CRP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20,570	3	6,857	24,100	,000
Within Groups	6,828	24	,285		
Total	27,398	27			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CRP

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KONTROL POSITIF	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	,93571 <sup>*</sup>	,28511	,003	,3473	1,5242
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	1,56429 <sup>*</sup>	,28511	,000	,9758	2,1527
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	2,33857 <sup>*</sup>	,28511	,000	1,7501	2,9270
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	KONTROL POSITIF	-,93571 <sup>*</sup>	,28511	,003	-1,5242	-,3473
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	,62857 <sup>*</sup>	,28511	,037	,0401	1,2170

	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	1,40286 <sup>*</sup>	,28511	,000	,8144	1,9913
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	KONTROL POSITIF	-1,56429 <sup>*</sup>	,28511	,000	-2,1527	-,9758
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	-,62857 <sup>*</sup>	,28511	,037	-1,2170	-,0401
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	,77429 <sup>*</sup>	,28511	,012	,1858	1,3627
DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 14,4 mg/200g	KONTROL POSITIF	-2,33857 <sup>*</sup>	,28511	,000	-2,9270	-1,7501
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 3,6 mg/200g	-1,40286 <sup>*</sup>	,28511	,000	-1,9913	-,8144
	DOSIS EKSTRAK PROPOLIS 7,2 mg/200g	-,77429 <sup>*</sup>	,28511	,012	-1,3627	-,1858

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

#### Lampiran 4. Proses Penelitian

##### 1. Cara Pembuatan Ekstrak

Propolis yang digunakan pada penelitian didapatkan dari ekstrak propolis (merek dagang HDI Propoelix Cap 200 mg) yang didapat dari *High Desert* Indonesia. Adapun teknik pembuatan ekstrak etanol propolis adalah dengan teknik CMCE (*Continuous Multi-stage Countercurrent Extraction*). Ekstraksi multistage adalah pengembangan ekstraksi satu stage dimana rafinat yang keluar dari stage pertama dicampur dengan solven segar pada stage kedua dan rafinat dari stage kedua dicampur dengan solven segar pada stage ketiga. Ekstrak dari stage pertama digabung dengan ekstrak dari stage kedua dan stage ke tiga. Hasil akhir adalah ekstrak (E1+E2+E3) dan Rafinat R3. Komposisi komponen – komponen di dalam aliran E dan R sudah dalam kesetimbangan sehingga E dan R lokasinya terletak pada kurve kesetimbangan: E1 setimbang dengan R1, E2 setimbang dengan R2 dan E3 setimbang dengan R3.<sup>48</sup>

##### 2. Cara pembuatan serum TNF-a

- a. Menyediakan tikus jantan galur wistar umur 8-12 minggu 28 ekor
- b. Bulu tikus didaerah yang akan dilukai dibersihkan dengan silet cukur (daerah kanan paha )
- c. Melakukan anestesi terlebih dahulu tikus dengan eter
- d. Melukai tikus dengan gunting steril pada daerah sekitar paha, buat sayatan sebesar diameter 1,5 cm, kedalaman 0,1 cm setebal kulit tikus
- e. Mengambil darah melalui sinus orbitalis mata tikus sebanyak 1ml

- f. Menempatkan pada tabung darah berisi EDTA
- g. Melakukan sentrifugasi 1.200 rpm selama 10 menit
- h. Mengambil serum darah
- i. Menguji kadar TNF menggunakan ELISA kit Rat TNF-a pada sumuran 48-well yang coating dengan antigen

ELISA Kit RAT TNF-a :

1. Penyimpanan pada 4 C
2. Berisi semua reagen yang di perlukan untuk melakukan pengukuran kuantitatif tingkat Raat TNF-a dari sampel termasuk serum, plasma, medium kultur atau cairan biologis lainnya dalam *Sandwich Format ELISA*.
3. Kisaran standar 47-3000 pg/ml
4. Rekontruksi dan penyimpanan :
  - Standar Rat TNF-a : 55 ng (1vial) rekombinan harus dilarutkan dalam 55 ml air steril untuk konsentrasi 1 ug/ml
  - Deteksi antibodi: 2,75 ug (1 vial) dari afinitas murni – antigen terbiotinilasi anti-Rat TNF-a

Harus dilakukan dalam 275 air steril ul untuk konsentrasi 10 ug/ ml

Catatan : cairan terlarut stabil pada suhu -20 C hingga 2 bulan jangan dibekukan dan dicairkan ulang

5. Persiapan reagen

Semua persiapan harus dicampur secara menyeluruh dan dihangatkan pada suhu kamar sebelum digunakan.

- a. Mencuci larutan (PBST) : mengencerkan Wash Buffer pada 1:20 dalam air steril dan diaduk rata

Catatan : karena konsentrasi tinggi larutan selama penyimpanan dingin dapat mengkristal, maka larutan yang mengandung kristal dipanaskan dan digunakan saat endapan benar-benar sudah larut

- b. Pre-coated ELISA 48 well plate : memilih jumlah sumur dilapisi diperlukan untuk pengujian tersebut. Sumur yang tersisa harus ditempatkan dalam kantong tertutup dengan desiccant. Kantong harus disegel untuk melindungi dari kelembaban.

- c. Standar

Mencairkan standar dan sampel dalam Assay Pengencer pada 1:2 seri pengenceran sebagai berikut :

Tabel 1.2 Serial pengenceran reagen untuk pembuatan serum TNF-a

Step	Dilution Method	Standard cone
Step A	3 ul of Standard + 1 ml of Assay Diluent	3000 pg/ml
Step B	0,5 ml of Step A + 0,5 ml of Assay Diluent	1500 pg/ml
Step C	0,5 ml of Step B + 0,5 ml of Assay Diluent	750 pg/ml
Step D	0,5 ml of Step C + 0,5 ml of Assay Diluent	375 pg/ml
Step E	0,5 ml of Step D + 0,5 ml of Assay Diluent	187,5 pg/ml
Step F	0,5 ml of Step E + 0,5 ml of Assay Diluent	93,75 pg/ml
Step G	0,5 ml of Step F + 0,5 ml of Assay Diluent	46,87 pg/ml

Catatan : transfer 100 ul *Assay Diluent* untuk pengosongan sumur sebagai standar kosong. Sumuran diaspirasi untuk menghilangkan kancairan dan cuci piring 4 kali sebagai langkah 1.

- d. Pengenceran Sampel : Encerkan sampel untuk konsentrasi yang tepat dalam uji pengencer

Catatan encerkan sampel berdasarkan konsentrasi diharapkan analit, dalam kisaran konsentrasi standar

- e. Deteksi antibodi : Encerkan antibodi deteksi dalam *Assay Diluent* untuk konsentrasi 0,5 ug/ml (1:20 pengenceran)

- f. *Color Development Enzym* (Enzim Penguat Warna) Encerkan Steptavidin-HRP konjugat 1:20 di *Assay Diluent*

### **3. Cara pengukuran Kadar CRP dengan metode ELISA**

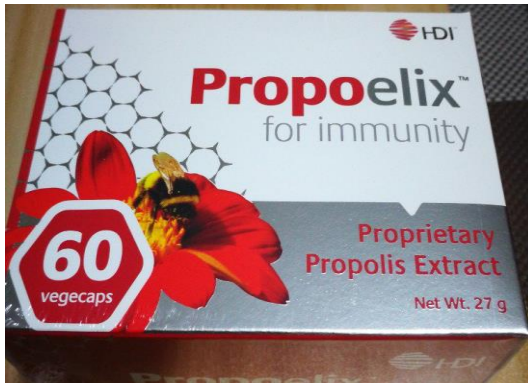
Pengukuran kadar CRP menggunakan metode ELISA dengan merk tertentu. Sampel yang digunakan adalah serum tikus wistar sebanyak 18 sampel serum. Prinsip pemeriksaan CRP adalah sampel direaksikan dengan antibodi yang mengandung antibodi spesifik terhadap CRP, kemudian ditambahkan *Horse radish Peroxidase* (HRP) dan Avidin perubahan warna hanya akan terjadi pada sumur yang mengandung CRP. Perubahan warna diukur dengan spektrofotometer /ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi CRP ditentukan dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap kurva standar. Cara pengukuran kadar CRP sebagai berikut :

- a. Menambahkan 100 uL standard, sampel, atau blangko pada setiap sumuran, tutup dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C



- b. Membuang cairan pada sumuran
- c. Menambahkan 100  $\mu$ l reagen A ke setiap sumuran, inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C
- d. Mencuci sumuran sebanyak 3 kali dengan menambahkan *wash buffer* sebanyak 350  $\mu$ L ke dalam setiap sumuran, buang semua cairan ketuk dengan kuat pada kertas serap
- e. Menambahkan 100  $\mu$ l reagen B pada setiap sumuran, tutup dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
- f. Mencuci semua sumuran seperti tahap ke-4
- g. Menambahkan 90  $\mu$ l *substrate solution* ke setiap sumuran, homogenkan, dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C, hindarkan dari cahaya
- h. Menambahkan 50  $\mu$ L *stop solution* ke setiap sumuran
- i. Membaca absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm

Lampiran 5. Dokumentasi



Propoelix



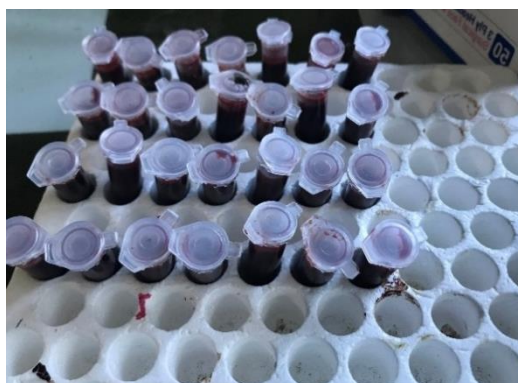
Tikus dalam kandang



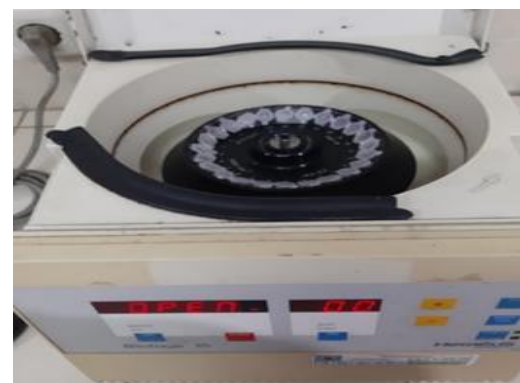
Pengambilan darah tikus



Pembedahan tikus



Sampel darah tikus



Alat sentrifuge



Tim Pemberian Ekstrak Propolis Pada Tikus Jantan Wistar Yang Diinduksi CCL4