

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70 % DAUN KENITU
(*Chrysophyllum cainito*) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABERKULAR VERTEBRA MENCIT BETINA
YANG DIINDUKSI DEKSAMETASON**

SKRIPSI

OLEH
NUR IMAMAH UTAMININGTYAS
NIM. 13670052



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70 % DAUN KENITU
(*Chrysophyllum cainito*) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABERKULAR VERTEBRA MENCIT BETINA
YANG DIINDUKSI DEKSAMETASON**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada
Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)**

**Oleh
Nur Imamah Utamingtyas
NIM. 13670052**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% DAUN KENITU
(*Chrysophyllum cainito*) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABERKULAR VERTEBRA MENCIT BETINA
YANG DIINDUKSI DEKSAMETASON**

SKRIPSI

Oleh
Nur Imamah Utamingtyas
NIM. 13670052

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 26 Oktober 2017

Pembimbing I,



Dewi Sinta Megawati, M.Sc
NIDT. 19840116 20170101 2 125

Pembimbing II,



Dr. H. Ahmad Barizi, MA
NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi



Dr. Rofiqah Muli'ah, M.Kes., Apt
NIP. 19800203 200912 2 003

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% DAUN KENITU
(*Chrysophyllum cainito*) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABERKULAR VERTEBRA MENCIT BETINA
YANG DIINDUKSI DEKSAMETASON**

SKRIPSI

Oleh
Nur Imamah Utamingtyas
NIM. 13670052

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

Tanggal 26 Oktober 2017

Penguji Utama : Ria Ramadhani D.A. S.Kep., Ns, M.Kep
NIP. 19850617 200912 2 005

Ketua Penguji : Burhan Ma'arif ZA., M.Farm., Apt
NIDT. 19900221 20170101 1 124

Sekretaris Penguji : Dewi Sinta Megawati, M.Sc
NIDT. 19840116 20170101 2 125

Anggota Penguji : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi



Dr. Rohatul Muti'ah, M.Kes., Apt
NIP. 19800203 200912 2 003

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nur Imamah Utaminingtyas

NIM : 13670052

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kesehatan dan Ilmu-ilmu Kesehatan

Judul Skripsi : Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Kenitu
(*Chrysophyllum cainito*) terhadap Peningkatan Kepadatan
Tulang Traberkular Vertebra Mencit Betina yang Diinduksi
Deksametason

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 13 September 2017

Yang membuat pernyataan,



Nur Imamah Utaminingtyas
NIM. 13670052

MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ

“Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan suatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri” (QS.Ar-Ra’ad ayat 11).



PERSEMBAHAN

Bukan tentang waktu yang dilalui, namun bagaimana bertahan dalam asa.
“*Alhamdulillah*”, skripsi terselesaikan jua.

Teruntuk orangtua tercinta,
ayahanda M. Imron Rosyadi dan ibunda Taminah
terimakasih karena tak pernah lelah memperjuangkan serta memanjatkan doa.
Saudara tersayang, mas M. Khafid Al azhar dan neng Alfiyatul Nur Hafidhoh
terimakasih karena tak pernah bosan memberikan semangat.

Sahabat seperjuangan Kos Apik, *Golden of Pharmacy* dan banyak pihak yang tak
bisa disebutkan satu persatu,
terimakasih atas energi positif yang diberikan kepada penulis.

“*Jazakumullah khairan wa ahsanal jaza*”
Amin

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji bagi Allah Swt. yang telah melimpahkan nikmat, rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam bidang farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Dalam proses penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bimbingan serta arahan dari berbagai pihak. Untuk itu ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan terutama kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Prof. Dr. Bambang Pardjianto, Sp.B, Sp.BP-REDr selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt, selaku ketua Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Dewi Sinta Megawati, M.Sc, selaku dosen pembimbing I yang banyak memberikan arahan, nasihat, motivasi dan berbagai pengalaman yang berharga kepada penulis

5. Dr. H. Ahmad Barizi, M.A, selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan arahan dan berbagai ilmunya kepada penulis
6. Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm., Apt, selaku konsultan yang telah memberikan arahan, motivasi dan berbagai ilmunya kepada penulis
7. Segenap sivitas akademika Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang terutama seluruh dosen, terima kasih atas segala ilmu dan bimbingannya
8. Ayah dan ibu tercinta yang telah mencurahkan cinta kasih, doa, bimbingan, dan motivasi hingga selesainya skripsi ini
9. Saudara-saudara tersayang yang telah memberikan semangat kepada penulis
10. Seluruh teman-teman di Jurusan Farmasi angkatan 2013 yang berjuang bersama-sama untuk meraih mimpi dan terima kasih untuk setiap kenangan indah yang dirajut bersama dalam menggapai impian
11. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik moril maupun materiil

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Malang, September 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.	i
HALAMAN PENGAJUAN.	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.	iii
HALAMAN PENGESAHAN.	iv
HALAMAN PERNYATAAN.	v
MOTTO.	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN.	vii
KATA PENGANTAR.	viii
DAFTAR ISI.	x
DAFTAR TABEL.	xii
DAFTAR GAMBAR.	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.	xv
DAFTAR SINGKATAN.	xvi
ABSTRAK.	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Islam	8
2.2 Tinjauan Tentang Kenitu (<i>Chrysophyllum cainito</i> L.)	10
2.2.1 Klasifikasi <i>C. cainito</i>	10
2.2.2 Morfologi <i>C. cainito</i>	10
2.2.3 Kandungan Kimia <i>C. cainito</i>	11
2.2.4 Aktivitas <i>C. cainito</i>	12
2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi.....	13
2.4 Tinjauan Tentang Tulang.....	14
2.4.1 Struktur Tulang.....	14
2.4.2 Jenis Tulang.....	15
2.4.3 Sel Tulang.....	17
2.4.4 Modeling dan Remodeling Tulang.....	21
2.5 Tinjauan Tentang Estrogen.....	24
2.6 Tinjauan Tentang Osteoporosis	26
2.6.1 Definisi Osteoporosis	26
2.6.2 Patofisiologi Osteoporosis.....	27
2.6.3 Faktor Risiko Osteoporosis	27
2.6.4 Klasifikasi Osteoporosis	31
2.6.5 Terapi Osteoporosis.....	32

2.7 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra	
Mencit Betina	35
2.7.1 Tinjauan tentang Hewan Coba <i>Mus Musculus</i>	35
2.7.2 Pemeriksaan Tulang Traberkular Vertebra.....	36
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Bagan Kerangka Konseptual	39
3.2 Uraian Kerangka Konseptual.....	40
3.3 Hipotesis Penelitian	41
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	42
4.1.1 Jenis Penelitian	42
4.1.2 Rancangan Penelitian	42
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	42
4.3 Sampel Penelitian	43
4.3.1 Sampel Tanaman	43
4.3.2 Sampel Hewan Coba	43
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	44
4.4.1 Variabel Penelitian	44
4.4.2 Definisi Operasional	45
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	45
4.5.1 Alat	45
4.5.2 Bahan	46
4.6 Prosedur Penelitian	46
4.6.1 Preparasi Simplisia Daun <i>C. cainito</i>	46
4.6.2 Pengukuran Nilai Kadar Air.....	46
4.6.3 Ekstraksi Daun <i>C. cainito</i>	47
4.6.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	47
4.6.5 Uji Aktivitas Peningkatkan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra.....	48
4.7 Skema Rancangan Penelitian.....	57
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
5.1 Preparasi Simplisia Daun <i>C. cainito</i>	58
5.2 Pengukuran Nilai Kadar Air	59
5.3 Ekstraksi Daun <i>C. cainito</i>	60
5.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	61
5.5 Uji Aktivitas Peningkatkan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra	
Mencit Betina yang Diinduksi Deksametason.....	63
5.5.1 Penginduksian Osteoporosis.....	64
5.5.2 Analisis data	68
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	75
6.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN-LAMPIRAN	85

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sitokin terhadap aktivitas RANKL dan OPG.....	23
Tabel 5.1 Nilai kadar air simplisia kering daun <i>C. cainito</i>	59
Tabel 5.2 Data rerata ketebalan tulang tiap kelompok.....	66
Tabel 5.3 <i>P-value</i> uji normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	68
Tabel 5.4 <i>P-value</i> uji homogenitas varian <i>Levene's test</i>	68
Tabel 5.5 <i>P-value</i> ANOVA <i>one-way</i>	69
Tabel 5.6 Hasil uji LSD.....	69

DAFTAR GAMBAR

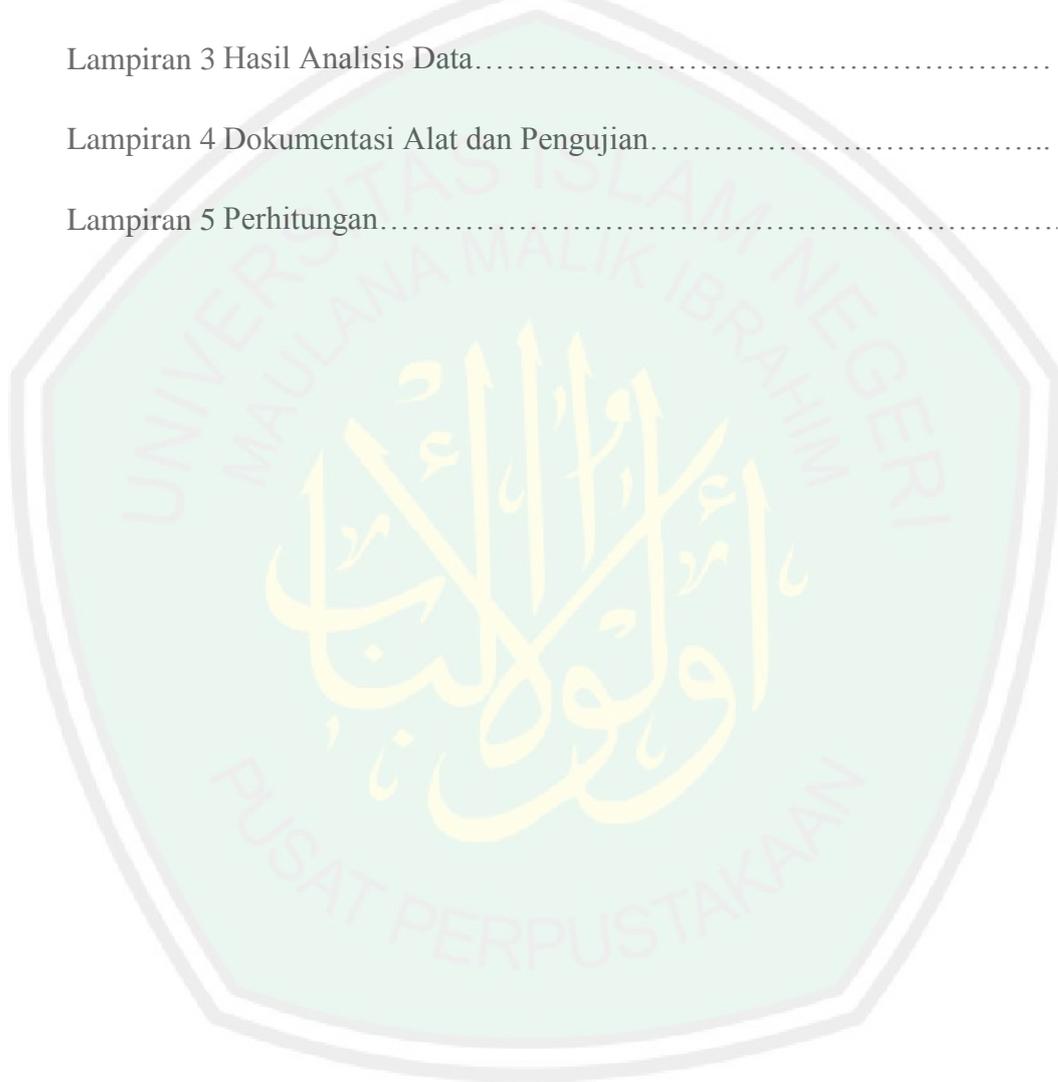
Gambar 2.1	Tanaman <i>C. cainito</i>	11
Gambar 2.2	Tulang kortikal dan tulang traberkular.....	15
Gambar 2.3	Jenis tulang berdasarkan bentuknya.....	16
Gambar 2.4	Sel tulang.....	21
Gambar 2.5	Proses <i>remodeling</i> tulang.....	24
Gambar 2.6	Struktur estron, 17β -estradiol dan estriol.....	25
Gambar 2.7	Produksi estrogen dalam tubuh.....	25
Gambar 2.8	Tulang normal dan tulang osteoporosis.....	27
Gambar 2.9	Mekanisme kerja bisfosfonat pada jalur mevalonat.....	33
Gambar 2.10	Estrogean 17β estradiol dan fitoestrogen.....	34
Gambar 2.11	Morfologi mencit.....	36
Gambar 2.12	Histomorfologi tulang vertebra normal dan tulang setelah diinduksi deksametason.....	38
Gambar 3.1	Bagan Kerangka Konseptual.....	39
Gambar 4.1	Skema Rancangan Penelitian.....	57
Gambar 5.1	Daun <i>C. cainito</i> setelah dikeringkan di dalam oven dengan suhu konstan 40°C	58
Gambar 5.2	Simplisia serbuk kering daun <i>C. cainito</i> setelah dilakukan penggilingan berwarna hijau tua.....	59
Gambar 5.3	Proses ekstraksi maserasi dan ekstrak kering daun <i>C. cainito</i>	61

Gambar 5.4	Hasil uji KLT senyawa flavonoid daun <i>C. cainito</i> yang diamati secara visual, dibawah sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm..	62
Gambar 5.5	Mencit normal dan osteoporosis.....	66
Gambar 5.6	Histopatologi tulang traberkular vertebra mencit betina.....	67



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Simplisia Kering Daun <i>C. cainito</i> ...	86
Lampiran 2 Hasil Pembacaan Histofotometri.....	88
Lampiran 3 Hasil Analisis Data.....	92
Lampiran 4 Dokumentasi Alat dan Pengujian.....	94
Lampiran 5 Perhitungan.....	97



DAFTAR SINGKATAN

BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CRH	: <i>Corticotrophin Releasing Hormone</i>
DES	: <i>Diethylstilbesterol</i>
E1	: <i>Estron</i>
E2	: <i>17β-estradiol</i>
E3	: <i>Estriol</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
ER- α	: <i>Estrogen alpha</i>
ER- β	: <i>Estrogen betha</i>
FPPS	: <i>Farnesil Pirofosfonat Sintase</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GF	: <i>Folikel de Graff</i>
GnRH	: <i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
GTP	: <i>Guanosin Trifospat</i>
HE	: <i>Hematoksilin dan Eosin</i>
HRT	: <i>Hormon Replacment Therapy</i>
IFN γ	: <i>Interferon γ</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IL 1	: <i>Interleukin 1</i>
IL6	: <i>Interleukin 6</i>
IL 11	: <i>Interleukin 11</i>

IOF	: <i>International Osteoporosis Foundation</i>
LH	: <i>Lutenising Hormone</i>
LT	: <i>Lymphotoxin</i>
NFATC1	: <i>Nuclear Factor of Activated T Cell 1</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PTH	: <i>Parathyroid Hormone</i>
PTHrp	: <i>Parathyroid Hormone Related Protein</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor-κB</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand</i>
T ₃	: <i>Triiodothyronin</i>
T ₄	: <i>Tetraiodothyronin</i>
TGF α	: <i>Transforming Growth Factor α</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF β	: <i>Beta Tumor Necrosis Factor β</i>

ABSTRAK

Utamingtyas, Nur Imamah. 2017. **Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70 % Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito*) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebrata Mencit Betina yang Diinduksi Deksametason**. Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Pembimbing I :Dewi Sinta Megawati, M.Sc

Pembimbing II:Dr. H. Ahmad Barizi, M.A

Konsultan :Burhan Ma'arif Z., M.Farm., Apt

Kenitu atau yang memiliki nama ilmiah *Chrysophyllum cainito* diketahui mengandung senyawa flavonoid. Salah satu senyawa turunan flavonoid yang termasuk dalam kelompok fitoestrogen yaitu, isoflavon. Isoflavon merupakan fitoestrogen yang banyak dimanfaatkan karena memiliki efek estrogenik yang cukup tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas dari ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dan dosis optimumnya dalam meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebrata mencit betina yang mengalami defisiensi hormon estrogen akibat diinduksi deksametason selama 4 minggu sebagai model osteoporosis pada wanita pascamenopause. Penelitian dilakukan dengan 5 perlakuan dan 5 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah kontrol positif (mencit yang diinduksi alendronat), kontrol negatif (mencit osteoporosis tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan (pemberian ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 2 mg/20 g BB, 4 mg/20 g BB dan 8 mg/20 g BB). Pengambilan datadiperoleh dari pengamatan preparat histologis tulang traberkular vertebra. Data dianalisis dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA*, dilanjutkan dengan uji *Least Significant Different (LSD)* untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* berpengaruh terhadap peningkatan kepadatan tulang karena dalam daun *C. cainito* terkandung fitoestrogen yang memiliki efek estrogenik. Hal ini menunjukkan bahwa daun *C.cainito* merupakan tanaman yang baik, sebagaimana Firman Allah QS. asy-Syu'ara'/26:7. Adapun dosis optimum ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dalam meningkatkan kepadatan tulang adalah 8 mg/20 g BB dengan nilai perbedaan tidak signifikan bila dibandingkan dengan kontrol positif.

Kata kunci: Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito*), Deksametason, Fitoestrogen, Kepadatan Tulang

ABSTRACT

Utamingtyas, Nur Imamah. 2017. **Test Activity of Ethanol Extract 70 % of Kenitu Leaf (*Chrysophyllum cainito*) to Increase Vertebrate Trabecular Bone Density of Dexamethasone-Induced Female Mice.** Thesis. Department of Pharmacy Faculty of Medical and Health Science, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang

Advisor I :Dewi Sinta Megawati, M.Sc
Advisor II :Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
Cosnsultant :Burhan Ma'arif Z., M.Farm., Apt

Kenitu has a scientific name *Chrysophyllum cainito* is known to contain flavonoid compounds. One of the flavonoid derived compounds belonging to the phytoestrogens group, isoflavones. Isoflavones are phytoestrogens that are widely used because they have a high estrogenic effect.

This research aims to find out the activity of ethanol extract 70 % *C. cainito* leaf and its optimum dosage in increasing vertebrate trabecular bone density of dexamethasone-induced female mice that suffer from estrogen hormone deficiency, due to 4 weeks of dexamethasone induced as a model of osteoporosis in postmenopausal women. The study was conducted with 5 treatments and 5 replications. The treatments used were treatment group (giving ethanol extract 70 % leaf *C. cainito* dose 2 mg/20 g Weight, 4 mg/20 g Weight and 8 mg/20 g Weight), positive control (alendronate-induced mice) and negative control (untreated osteoporosis mice). Data collection was obtained from observations of histologic preparations of the vertebral trabecular bone. The data were analyzed using One-Way ANOVA test, followed by Least Significant Different (LSD) test to know which treatment group was significantly different from the other treatment groups.

The results showed that ethanol extract of 70 % of *C. cainito* leaves have an effect on bone density increase because *C. cainito* leaves contained phytoestrogens which give estrogenic effect. This suggests that *C. cainito* leaves are a good crop, as the Word of God QS. asy-Shu'ara ' / 26: 7. The optimum dose of ethanol extract of 70 % of *C. cainito* leaf in increasing bone density was 8 mg/20 g Weight with insignificant difference value when compared with positive control.

Keywords: Leaf Kenitu (*Chrysophyllum cainito*), Dexamethasone, Phytoestrogens, Bone Density

ملخص

أوتمينينجتياس، نور إمامة. ٢٠١٧. نشاط اختبار مستخلص الإيثانول من ٧٠٪ ورقة كينيتو (كريسوفيلوم كاينتو) لزيادة كثافة العظام من الفقاريات الحطاطية من الفئران الإناث ديكساميثازون التي يسببها الذكور. البحث العلمي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج.

المشرف (١) : دآوي سينتا ميحاواقي الماجستير

المشرف (٢) : الدكتور الحاج أحمد بارزي الماجستير

المستشار : برهان معارف الماجستير

كاينتو أو الذي لديه الاسم العلمي كريسوفيلوم كينيتو هو معروف لاحتواء المركبات الفلافونويد. واحدة من مركبات الفلافونويد المشتقة التي تنتمي إلى مجموعة فيتوستروغنز، الايسوفلافون. الايسوفلافون هي فيتويستروغنز التي تستخدم على نطاق واسع لأن لديهم تأثير الاستروجين عالية تهدف هذه الدراسة إلى تحديد وجود أو عدم وجود نشاط استخراج الإيثانول من ٧٠٪ منورقة كاينتو والجرعة المثلى في زيادة كثافة العظام من الفقاريات التريبية من الفئران الإناث مع التي يسببها ديكساميثازون الناجم عن نقص سكر العنب لمدة ٤ أسابيع كنموذج من وهشاشة العظام في النساء بعد سن اليأس. أجريت الدراسة ب ٥ معاملات و ٥ مكررات. وكانت المعاملة المستخدمة هي السيطرة الإيجابية (الفئران التي يسببها أليندرونات)، والسيطرة السلبية (الفئران هشاشة العظام غير المعالجة) ومجموعة العلاج (٧٠٪ مستخلص الإيثانول ورقة جرعة كاينتو ٢ ملغ / ٢٠ غرام بب، ٤ ملغ / ٢٠ غرام بب و ٨ ملغ / ٢٠ غرام بب). تم الحصول على جمع البيانات من الملاحظات من المستحضرات النسيجية للعظم التريبي الفقري. تم تحليل البيانات باستخدام اختبار أنوفا-أنوفا، متبوعا باختبار أقل معنوي (لسد) لمعرفة مجموعة العلاج التي كانت مختلفة بشكل كبير عن مجموعات العلاج الأخرى.

وأظهرت النتائج أن مستخلص الإيثانول من ٧٠٪ من أوراق كاينتو كان له تأثير على زيادة كثافة العظام لأنه فيكاينتورقة تحتوي على فيتويستروغنز التي كان لها تأثير الاستروجين. وهذا يشير إلى أن أوراق كاينتو هي محصول جيد، كما كلمة الله في سورة الشعراء / ٢٦ : ٧. الجرعة المثلى من مستخلص الإيثانول من ٧٠٪ منكاينتو ورقة في زيادة كثافة العظام ٨ ملغ / ٢٠ غرام بب مع قيمة الفرق ضعيلة بالمقارنة مع السيطرة الإيجابية.

كلمة المفتاح: ورقة كاينتو، ديكساميثازون، فيتويستروغنز، كثافة العظام.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Prevalensi osteoporosis di Indonesia sudah mencapai 19,7 %. Berdasarkan hasil analisis data risiko osteoporosis oleh Puslitbang Gizi DepKes bekerja sama dengan Fonterra Brands Indonesia yang dipublikasikan tahun 2006 menyatakan 2 dari 5 orang Indonesia memiliki risiko osteoporosis. Angka ini lebih tinggi dari prevalensi dunia yaitu 1 dari 3 orang berisiko osteoporosis. Hal ini juga didukung oleh Indonesian White Paper yang dikeluarkan Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) pada tahun 2007 yaitu osteoporosis pada wanita yang berusia di atas 50 tahun mencapai 32,3 % dan pada pria usia di atas 50 tahun mencapai 28,8 %. Secara keseluruhan percepatan proses penyakit osteoporosis pada wanita Indonesia sebesar 80 % dan pria 20 % (Junaidi, 2007).

Pria memiliki perbandingan risiko osteoporosis lebih kecil dari wanita. Kondisi ini dapat terjadi karena tulang pria berukuran lebih besar dan pria kehilangan massa tulang dengan penipisan sedangkan wanita diakibatkan oleh kehilangan elemen trabekula dari tulang (Setyohadi, 2009). Risiko osteoporosis meningkat secara nyata pada wanita sekitar usia menopause yaitu 50 tahun (Kosnayani, 2007). Wanita yang telah melewati masa menopause 3 hingga 5 tahun disebut wanita pascamenopause. Pada wanita dengan keadaan pascamenopause akan mengalami defisiensi hormon estrogen yang berfungsi untuk mempertahankan resorpsi tulang normal dalam tubuhnya. Defisiensi estrogen terjadi karena ovarium sudah tidak lagi memproduksi hormon tersebut (Baziad,

1999; Manolagas, 2000). Wanita dengan kondisi ini akan mengalami peningkatan *turnover* yaitu, ketidakseimbangan antara aktivitas osteoklas dan osteoblas dimana proses resorpsi tulang oleh osteoklas lebih dominan (meeta, 2013).

Risiko osteoporosis pada wanita pascamenopause sama halnya ketika mengkonsumsi obat-obatan golongan kortikosteroid dalam jangka waktu yang lama yaitu lebih dari 3 hingga 6 bulan (Brunton *et al.*, 2005; Kemenkes, 2015). Kortikosteroid dan turunan sintesisnya yang aktif secara biologis memiliki aktivitas metabolisme (glukokortikoid) dan pengaturan elektrolit (mineralokortikoid) yang berbeda. Dekametason merupakan salah satu obat golongan kortikosteroid dengan aktivitas glukokortikoid yang tinggi. Selain berdampak pada absorpsi kalsium dan ekskresi kalsium, obat ini juga akan menyebabkan supresi hipofisis sehingga hormon gonadotropin juga tersupresi dan produksi estrogen akan menurun (Lane 1999 dalam Wardhana 2012).

Terapi osteoporosis umumnya dengan pemberian substansi estrogen dari luar tubuh yaitu *Hormon Replacment Therapy* (HRT) (Beral V, 2003). Namun, penggunaan HRT dalam jangka panjang menimbulkan suatu efek samping seperti kanker payudara, serangan jantung, *stroke* dan penggumpalan darah (Lindsay *et al.*, 1976;. Lindsay *et al.*, 1978; Wibowo, 2009). Penggunaan HRT menurunkan risiko fraktur tulang 24% namun meningkatkan risiko penyakit kanker payudara 26%, jantung 29% dan *stroke* 41% (Cosman, 2009).

Kelemahan HRT mendorong perlunya alternatif terapi yang mempunyai efek samping yang lebih minimal yaitu fitoestrogen (Darmadi, 2011). Fitoestrogen merupakan substansi derivat tanaman yang secara struktur atau

fungsional mirip seperti estrogen 17β -estradiol, yaitu hormon gonad wanita yang paling poten. Secara klasik fitoestrogen terdiri dari isoflavon, *coumestane*, *stillbene* dan lignin. Fitoestrogen yang banyak dimanfaatkan karena memiliki efek estrogenik yang cukup tinggi adalah isoflavon (Grippe *et al.*, 2007).

Kenitua atau yang memiliki nama ilmiah *Chrysophyllum cainito* diketahui mengandung senyawa polifenol, flavonoid, tanin, katekin, gallokatekin, kuersetin, kuersetrin, isokuersetrin, mirisitrin dan asam galat (Luo *et al.*, 2002; D'Archivio *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fatimatuz Zuhro (2015) ekstrak daun *C. cainito* dengan pelarut etanol 70 % memiliki total flavonoid paling tinggi daripada etanol 50 % dan 96 %. Adanya total flavonoid yang tinggi tersebut, daun *C. cainito* diperkirakan mengandung senyawa isoflavon. Senyawa isoflavon merupakan salah satu fitoestrogen yang memiliki cincin fenolik sebagai *binding site* dan memiliki inti dengan 2 gugus-OH yang berjarak 1,0-11,5 Å yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yakni afinitas berikatan dengan reseptor estrogen sehingga mampu meningkatkan aktivitas osteoblas dalam pembentukan tulang dan menghambat resorpsi tulang oleh osteoklas pada osteoporosis wanita pascamenopause atau akibat induksi deksametason jangka lama (Benassayag, 2002; Achadiat, 2003; Urasopon *et al.*, 2008).

Adapun firman Allah dalam QS. asy-Syu'ara'/26:7, yaitu:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

“Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”(QS. Asy-Syu’ara’/26:7).

Lafadz *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى* menunjukkan kepada manusia untuk memaksimalkan potensi yang dimiliki dengan cara mengeksplorasi manfaat dari tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT. Lafadz *زَوْجٍ كَرِيمٍ* berasal dari kata *زَوْجٍ* yang berarti pasangan dan *كَرِيمٍ* yang berarti baik. Pasangan (*zauj*) yang dimaksud dalam ayat ini adalah pasangan tumbuhan dengan berbagai macam jenisnya yang kesemuanya tumbuh subur dan bermanfaat, sedangkan kata baik (*karim*) menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objeknya yang dalam hal ini adalah tumbuhan. Ayat ini membuktikan keniscayaan Allah SWT, karena aneka tumbuhan yang terhampar di muka bumi sedemikian banyak dan bermanfaat lagi berbeda-beda jenis, rasa dan warna (Shihab, 2002).

Allah menciptakan seluruh tumbuhan yang ada di bumi dengan manfaat masing-masing. Manusia sebagai khalifah di bumi dianjurkan untuk memaksimalkan potensi yang terdapat pada seluruh tumbuhan yang ada di bumi untuk diambil manfaatnya salah satunya untuk diolah menjadi obat (Rahmawati, 2014). Adapun firman Allah dalam QS. An-Nahl/16:10-11, yaitu:

هُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً ۖ لَكُمْ مِنْهُ شَرَابٌ وَمِنْهُ شَجَرٌ فِيهِ تُسِيمُونَ ۚ ۱۰ يُنبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ۚ ۱۱

“Dia-lah yang telah menurunkan air hujan dari langit untuk kamu, sebagiannya menjadi minuman dan sebagiannya (menyuburkan) tumbuh-tumbuhan, yang pada (tempat tumbuhnya) kamu menggembalakan ternakmu. Dia menumbuhkan bagimu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.” (QS. An-Nahl/16:10-11).

Allah SWT telah menyediakan berbagai kenikmatan di bumi agar dimanfaatkan oleh manusia dengan sebaik-baiknya. Salah satu ciptaan Allah SWT yang bermanfaat dan membawa berkah bagi manusia adalah tumbuh-tumbuhan. Apabila manusia mau berpikir dan mengkaji rahasia dibalik tumbuhan maka akan diketahui betapa banyaknya fungsi tumbuhan berdasarkan jenis-jenisnya. Dengan demikian, ujisenyawa fitoestrogen daun tanaman *C. cainito* dilakukan untuk mengetahui khasiatnya dalam meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra sebagai alternatif pengobatan osteoporosis pada mencit betina yang diinduksi deksametason sebagai model wanita pascamenopause.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Apakah ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason ?
- b. Berapa dosis optimum ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui ada atau tidaknya aktivitas dari ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dalam meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason
- b. Mengetahui dosis optimum ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason

1.4 Batasan Masalah

Agar penulisan skripsi ini tidak memunculkan masalah yang bertentangan dengan maksud penulis, maka diperlukan batasan masalah. Adapun batasan masalahnya adalah:

- a. Sampel daun *C. cainito* yang digunakan didapatkan dari Balai Materia Medika Kota Batu, Jawa Timur
- b. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kasar dari daun *C. cainito* menggunakan pelarut etanol 70 %
- c. Ekstraksi dilakukan secara maserasi
- d. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina berumur 70-80 hari dengan berat badan rata-rata 25-30 gram

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan dari penulisan skripsi ini adalah:

- a. Penelitian dapat memberikan informasi mengenai aktivitas peningkatan kepadatan tulang traberkular vertebra

- b. Uji aktivitas fitoestrogen yang dilakukan dapat dijadikan sebagai salah satu upaya pengembangan pengobatan osteoporosis yang lebih aman untuk penggunaan jangka panjang
- c. Meningkatkan nilai ekonomis daun *C. cainito*



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Wilayah Indonesia secara geografis terdiri atas dataran rendah, dataran tinggi dan pegunungan dengan puncak-puncaknya yang menjulang tinggi. Hal itu yang menyebabkan terdapatnya perbedaan variasi suhu, curah hujan dan kelembapan udara. Akan tetapi, secara astronomi Indonesia terletak pada daerah tropis yang memiliki curah hujan tinggi sehingga memungkinkan memiliki tanah yang subur dengan berbagai macam fauna yang tumbuh. Sebagaimana firman Allah Swt dalam QS. Al-A'raf / 07:58, yaitu

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۗ وَالَّذِي خَبِثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًّا ۚ كَذَلِكَ نُصَرِّفُ
الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

“Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur” (QS. Al-A'raf / 07:58).

Berdasarkan QS. Al-A'raf / 07:58 dapat diketahui bahwa tumbuhan akan mudah tumbuh pada tanah yang subur. Apabila suatu negeri memiliki dasar tanah yang tandus maka akan susah ditumbuhi oleh tumbuhan. Betapapun hujan turun dengan lebat, kalau tanahnya tandus maka yang terjadi hanyalah banjir dan putik bunga akan hanyut oleh air ke laut (Hamka, 2015).

Banyak jenis tumbuhan yang dapat tumbuh di bumi dengan adanya air hujan. Tumbuhan yang tergolong tumbuhan tingkat rendah yaitu tumbuhan yang belum jelas bagian daun, batang dan akarnya. Golongan selanjutnya yang lebih

mengalami perkembangan adalah tumbuhan tingkat tinggi yaitu tumbuhan yang dapat dibedakan dengan jelas bagian daun, batang dan akarnya (Savitri, 2008).

Sebagaimana firman Allah Swt dalam QS. Al-An'am / 06 : 99, yaitu

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا مَخْرُجًا مِنْهُ
حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ
مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ



“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (QS. Al-An'am / 06 : 99).

Allah Swt menumbuhkan bermacam-macam tumbuhan yang baik untuk makhluk-Nya. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Salah satu manfaat tumbuhan ini adalah digunakan sebagai tanaman obat, seperti halnya sabda Nabi Muhammad Saw dalam HR. Ibnu Majah di bawah ini (Farooqi, 2005),

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Allah tidak menciptakan suatu penyakit tanpa menciptakan pula obat untuknya” (HR. Ibnu Majah).

Terjemahan hadist di atas menunjukkan betapa adilnya Allah Swt yang memberikan suatu penyakit beserta penawarnya (obat). Pengetahuan yang akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan yang telah tersedia di alam, seperti obat dari tumbuh-tumbuhan.

2.2 Tinjauan Tentang Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.)

2.2.1 Klasifikasi *C. cainito*

Chrysophyllum cainito L. umumnya dikenal oleh masyarakat dengan istilah kenitu, sedangkan di daerah asalnya (Amerika tengah) disebut *star apple*. Kenitu berasal dari dataran rendah Amerika Tengah dan Hindia Barat. Tanaman ini termasuk dalam famili Sapotaceae dan banyak tumbuh di daerah dengan curah hujan tinggi dan lembab yaitu pada ketinggian 5-1000 meter dari permukaan laut. *C. cainito* merupakan jenis tumbuhan pohon yang tingginya berkisar 10-30 meter, berumur menahun (perennial). Termasuk tumbuhan hermafrodit (*self-fertile*) (Zulaikhah, 2015).

Secara sistematis tumbuhan kenitu diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dileniidae
Ordo	: Ebenales
Famili	: Sapotaceae
Genus	: <i>Chrysophyllum</i> L.
Spesies	: <i>Chrysophyllum cainito</i> L. (USDA, 2003)

2.2.2 Morfologi *C. cainito*

Pohon *C. cainito* memiliki tinggi 25-100 kaki (8-30 meter) dengan batang pendek 3 kaki (1 meter), tebal dan padat. Isi buah berwarna putih dan bergetah

lateks. Buah berbentuk bulat atau elips yang berbentuk seperti buah pir dengan diameter 5-10 cm, berwarna merah-ungu, hitam-ungu atau hijau pucat, tekstur buah halus dan mengkilap. Bijinya 3-10 butir, keras, mengkilap, pipih agak bulat telur dengan panjang 1 cm berwarna coklat sampai hitam keunguan (Morton, 1987).

C. cainito memiliki daun tunggal dengan permukaan atas berwarna hijau dan bawah coklat atau coklat keemasan karena ada bulu-bulu halus yang tumbuh terutama disisi bawah daun dan rerantingan. Umumnya panjang daun kenitu 9-14 cm dan lebar 3-5 cm. Helaiian daun kenitu agak tebal, kaku, bentuk lonjong (*elliptica*), ujung runcing (*acutus*), pangkal meruncing (*acuminatus*), tepi rata dan pertulangan menyirip (*pinnate*). Duduk daun berseling, memencar, bentuk lonjong sampai bundar telur terbalik dengan luas 3-6 x 5-16 dan panjang tangkai daun 0,6-1,7 cm (Zulaikhah, 2015). Gambar daun *C. cainito* dapat dilihat pada gambar 2.1 berikut:



Gambar 2.1 Tanaman *C. cainito* (Anonim, 2015)

2.2.3 Kandungan Kimia *C. cainito*

C. cainito berisi 67,2 kalori dengan kandungan protein 0,72-2,33 g, karbohidrat 14,7 g dan serat 0,55-3,33 g. Vitamin yang terkandung dalam *C. cainito* yaitu karoten 0,004-0,039 mg, tiamin 0,018-0,08 mg, riboflavin 0,013-

0,04 mg, niacin 0,935-1,340 mg dan asam askorbat 3,0-15,2 mg. Sedangkan asam amino yang terkandung dalam *C. cainito* yaitu triptofan 4 mg, metionin 2 mg dan lisin 22 mg (Morton, 1987).

Daun *C. cainito* telah diidentifikasi mengandung beta-amirin asetat dan asam gentisat sedangkan untuk buahnya telah diidentifikasi mengandung sembilan polifenol yaitu katekin, eokatekin, galokatekin, epigalokatekin, kuersetin, kuersitrin, isokuersitrin, mirisitrin dan asam galat (Luo *et al.*, 2002). Selain itu, kenitu juga mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, sterol dan triterpen (N'guessan, 2008 dalam Koffi *et al.*, 2009).

2.2.4 Aktivitas *C. cainito*

C. cainito oleh masyarakat banyak dikonsumsi sebagai buah segar, meski juga dapat digunakan sebagai bahan baku es krim atau serbat. Pohon *C. cainito* umumnya digunakan sebagai tanaman hias dan peneduh di taman-taman dan tepi jalan. Kayunya cukup baik sebagai bahan bangunan dan cabang-cabangnya yang tua dimanfaatkan untuk menumbuhkan anggrek (Zulaikhah, 2015).

Di samping itu, banyak bagian pohon yang berkhasiat obat misalnya kulit kayunya, getah, buah dan biji. Buah *C. cainito* segar yang dikonsumsi dapat mengurangi peradangan pada tenggorokan dan paru-paru. Di Venezuela buah setengah masak digunakan untuk mengobati gangguan usus, namun bila berlebihan dapat menyebabkan sembelit. Sedangkan infus kulit buah kaya akan zat tannin yang dapat digunakan untuk tonik, stimulant, obat diare, disentri, menghentikan pendarahan, radang dan obat ginirhoe. Biji *C. cainito* yang rasanya pahit

dimanfaatkan sebagai obat penurun panas, tonik dan diuretik dengan cara ditumbuk (Morton, 1987).

2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat berkhasiat atau zat aktif dari bagian tanaman dengan pelarut yang sesuai. Pemilihan pelarut merupakan faktor yang menentukan dalam ekstraksi. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat menarik komponen aktif dari campuran. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam memilih pelarut adalah selektivitas, sifat pelarut, kemampuan untuk mengekstraksi, tidak bersifat racun, mudah diuapkan dan harganya relatif murah (Gamse, 2002). Perendaman suatu bahan dalam pelarut dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel dalam 3 tahapan, yaitu masuknya pelarut ke dalam dinding sel tanaman dan membengkakkan sel, kemudian senyawa yang terdapat dalam dinding sel akan terlepas dan masuk dalam pelarut, diikuti oleh difusi senyawa yang terekstraksi oleh pelarut keluar dinding sel tanaman (Supriadi, 2008).

Tujuan ekstraksi adalah untuk mengambil senyawa kimia yang terdapat pada bahan ekstraksi (Depkes RI, 2000). Proses ini merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat, karena preparasi ekstrak kasar tanaman merupakan titik awal untuk isolasi dan pemurnian komponen kimia yang terdapat pada tanaman (Khopkar, 2002).

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi, metode ini bertujuan untuk mengambil zat yang tidak tahan terhadap pemanasan. Prinsip ekstraksi menggunakan maserasi yaitu adanya difusi cairan penyari ke dalam sel tumbuhan yang mengandung senyawa aktif. Difusi tersebut mengakibatkan perbedaan

tekanan osmosis di dalam dan di luar sel sehingga senyawa aktif terdesak untuk keluar (Dean J 2009 dalam Budilaksono 2005).

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan simplisia ke dalam bejana, kemudian direndam dengan pelarut, lalu ditutup dan dibiarkan selama 24 hingga 48 jam. Ditempatkan di lokasi yang terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut. Kelebihan dari maserasi yaitu sederhana, alat dan bahan mudah diperoleh. Kekurangan dari maserasi adalah prosesnya lama jika dibandingkan dengan ekstraksi cara panas (Depkes RI, 2000).

2.4 Tinjauan Tentang Tulang

Tulang adalah substansi paling keras yang ada pada tubuh manusia yang terdiri dari sel yang berlimpah dan materi ekstraseluler yang keras. Beberapa fungsi penting yang dimiliki oleh tulang adalah sebagai penopang, pemberi bentuk tubuh, alat gerak pasif, pelindung organ-organ vital, tempat pembentukan sel-sel darah dan sebagai cadangan mineral (Pujiyanto, 2008).

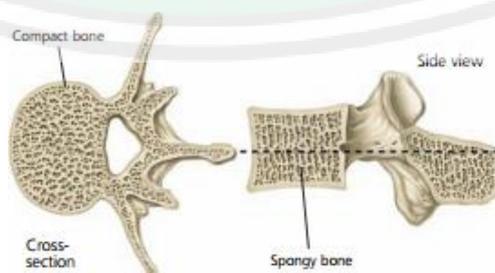
2.4.1 Struktur Tulang

Tulang matur terdiri atas 30 % materi organik (hidup) dan 70 % deposit garam. Materi organik disebut matriks dan terdiri dari 90 % serabut kolagen dan kurang dari 10 % proteoglikan (protein plus polisakarida). Deposit garam terutama adalah kalsium dan fosfat dengan sedikit natrium, kalium karbonat dan ion magnesium. Deposit garam ini menutupi matriks dan berikatan dengan serabut kolagen melalui proteoglikan. Matriks organik menyebabkan tulang memiliki kekuatan tensil (resistensi terhadap tarikan yang meregangkan), sedangkan

deposit garam menyebabkan tulang memiliki kekuatan kompresi (kemampuan menahan kompres). Keseimbangan yang baik antara keduanya dibutuhkan oleh tulang agar mampu menahan stres dan mencegah fraktur. Ketidakseimbangan yang terjadi akan mengakibatkan kerusakan tulang dan penurunan kekuatan tulang (O'Connell, 2008; Corwin, 2009; Rogers, 2011).

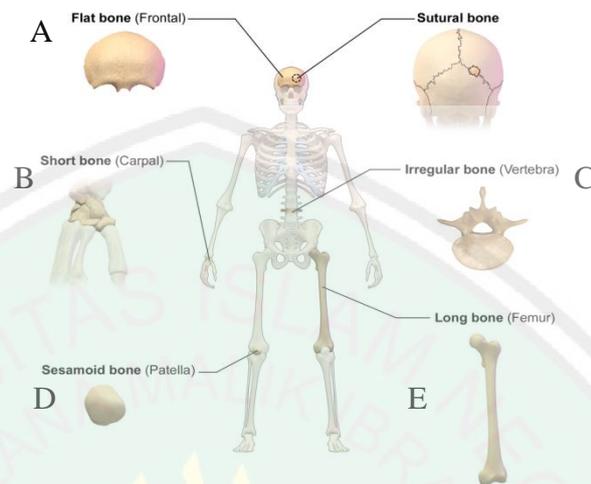
2.4.2 Jenis Tulang

Berdasarkan jumlah komponen atau strukturnya, tulang kortikal (*compact*) mengandung 80 % dan tulang trabekular (*spongy atau cancellous*) mengandung 20 %. Tulang kortikal adalah bagian yang tersusun rapat dan bagian trabekular adalah bagian yang seperti spon atau sarang lebah. Tulang kortikal diklasifikasikan sebagai bagian yang kuat dan memenuhi sebagian besar struktur tulang serta berperan sebagai protektor. Tulang trabekular diklasifikasikan sebagai bagian yang kurang kuat dan memiliki luas permukaan yang lebih besar yang memungkinkan untuk menjadi metabolik aktif. Tulang trabekular lebih cepat mengalami proses *remodelling* daripada tulang kortikal dan memiliki efek yang lebih cepat terpengaruh oleh kondisi yang terkait dengan peningkatan pergantian tulang dibandingkan dengan tulang kortikal, oleh sebab itu tulang trabekular rentan untuk mengalami kehilangan masa tulang (David, 2011; Walsh, 2014).



Gambar 2.2 Tulang kortikal (*compact*) dan tulang trabekular (*spongy*) (Blaus, 2013).

Berdasarkan bentuknya, tulang dapat dibedakan menjadi lima jenis, antara lain (Pujiyanto, 2008):



Gambar 2.3 Jenis tulang berdasarkan bentuknya. Tulang pipih (A), tulang pendek (B), tulang tak berbentuk (C), tulang sesamoid (D) dan tulang pipa (E) (Blaus, 2013).

a. Tulang Pipih

Tulang ini berbentuk pipih dan tersusun atas dua lapis tulang kortikal yang dipisahkan oleh tulang traberkular. Rongga didalamnya berisi sumsum merah. Fungsi utamanya adalah sebagai pelindung organ penting, seperti otak, jantung, paru-paru dan kantong kemih. Namun, beberapa jenis tulang pipih, seperti tulang belikat dan tulang panggul, merupakan tempat perlekatan otot (Pujiyanto, 2008).

b. Tulang Pendek

Tulang ini berbentuk pendek, bulat atau menyerupai kubus. Bagian luar tulang pendek dibentuk oleh lapisan tipis tulang kortikal. Bagian dalamnya disusun oleh tulang traberkular dengan rongga-rongga yang berisi sumsum merah. Tulang pendek berfungsi untuk menyerap guncangan yang keras dan terdapat pada persendian yang kompleks, seperti pada persendian lutut dan mata kaki.

Selain itu, tulang pendek juga berfungsi sebagai penyerap jika terjadi suatu tekanan (Pujiyanto, 2008).

c. Tulang Tak Berbentuk (Tulang Tak Beraturan)

Dinamakan tulang tak beraturan karena bentuk tulang ini bermacam-macam dan sulit dideskripsikan. Tulang tak beraturan merupakan tulang yang tidak berpasangan dan terdapat pada bidang sumbu tubuh. Fungsi tulang ini adalah sebagai pelindung, penyokong dan tempat perlekatan otot (Pujiyanto, 2008).

d. Tulang Sesamoid

Tulang sesamoid (diambil dari bahasa Inggris, *sesame* = biji wijen) adalah tulang kecil yang dianggap memiliki bentuk seperti biji wijen. Tulang ini terdapat didalam tendon yang menghubungkan tulang ke otot. Fungsi tulang sesamoid adalah untuk mengurangi pergeseran tendon atau perubahan jalur tendon (Pujiyanto, 2008).

e. Tulang Pipa

Tulang pipa adalah suatu tabung tulang kortikal dengan tulang traberkular didalamnya. Sesuai dengan namanya, tulang ini berbentuk seperti pipa, yaitu bulat, panjang dan berongga. Rongga tulang pipa berisi sumsum kuning dan sumsum merah. Fungsi utama tulang pipa adalah sebagai pengungkit dan penyokong, serta untuk gerak (Pujiyanto, 2008).

2.4.3 Sel Tulang

Tulang tersusun atas tiga jenis sel utama yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas. Berikut ini adalah jenis sel tulang:

a. Osteoblas

Osteoblas adalah sel yang berperan dalam aktivitas sintesis komponen organik tulang, yang disebut sebagai *prebone* atau osteoid. Osteoblas terletak dalam suatu garis di sepanjang permukaan jaringan tulang. Saat aktif, osteoblas cenderung berbentuk kubus dan bersifat basofilik. Sedangkan saat kurang aktif, maka bentuknya akan menjadi lebih kempis dan kurang basofilik. Ketika aktivitas sintesis matriks berhenti dan osteoblas telah memasuki matriks tersebut maka osteoblas berubah namanya menjadi osteosit (Samuelson 2007).

Osteoblas berasal dari sel primiti mesenkim yang membentuk matriks tulang dan ditemukan pada daerah cekungan erosi setelah terjadinya proses resorpsi tulang. Osteoblas berperan dengan mensekresi kolagen untuk membentuk matriks nonmineral yang disebut osteoid dengan ketebalan 6-10 μm . Osteoid merupakan jaringan *preosseous* yang terdiri dari kolagen dan sejumlah protein tulang termasuk osteoklasin. Dibawah kendali dari osteoblas, osteoid menjadi matur dalam waktu 5-10 hari diikuti dengan deposisi dari kristal hidroksiapatit (Riis, 1996).

Osteoblas adalah sel yang berinti tunggal, terdapat di permukaan luar dan dalam tulang. Dalam keadaan aktif sel osteoblas berbentuk kuboid dan dalam keadaan tidak aktif berbentuk pipih. Biasanya osteoblas yang aktif ditemukan diantara matriks sesudah mensintesis tulang diawali dengan proses mineralisasi dan terjadinya pembentukan kristal. Awal mineralisasi berarti kalsifikasi awal yang biasanya bergerak 5-10 nm dari permukaan osteoblas. Fungsi osteoblas adalah formasi tulang yang dipengaruhi oleh faktor lokal maupun sistemik. Faktor lokal

meningkatkan formasi tulang : *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Transforming Growth Factor β* (TGF β), *Insulin Growth Factor* (IGF), estrogen, *Triiodothyronin* (T₃), *Tetraiothyronin* (T₄), kalsitriol dan Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Riis, 1996).

Faktor sistemik yang meningkatkan formasi tulang adalah fluorid, *Parathyroid Hormone* (PTH) dan prostaglandin, sedangkan faktor sistemik yang menghambat formasi tulang adalah hormon kortikosteroid. Saat menjalankan fungsinya, osteoblas juga memproduksi enzim alkali fosfatase yang mempunyai sifat spesifik dibandingkan dengan alkali fosfatase yang dihasilkan jaringan lainnya dengan membebaskan protein nonkolagen osteokalsin dalam pembentukan tulang. Aktivitas osteoblas dapat dipantau secara biokimia dengan menilai kadar enzim alkali fosfatase tulang dan osteokalsin serum. Dalam perkembangan penelitian selanjutnya telah ditemukan reseptor estrogen dan reseptor kalsitriol di osteoblas (Riis, 1996).

b. Osteosit

Osteosit berada di dalam suatu ruangan berbentuk oval bernama lakuna yang terletak di dalam matriks yang telah termineralisasi. Lakuna memiliki penjururan halus yang disebut kanalikuli. Kanalikuli menghubungkan antar lakuna yang berdekatan sehingga osteosit mampu mencapai pembuluh darah untuk pertukaran nutrisi dan sisa metabolisme (Samuelson 2007).

Osteosit diperkirakan dapat menjawab mekanisme rangsang gaya mekanik dengan memicu dikeluarkan IGF 1 dan menyebabkan osteoblas tidak aktif menjadi osteoblas aktif dan merangsang juga pembentukan osteoblas baru (Herlina, 2000).

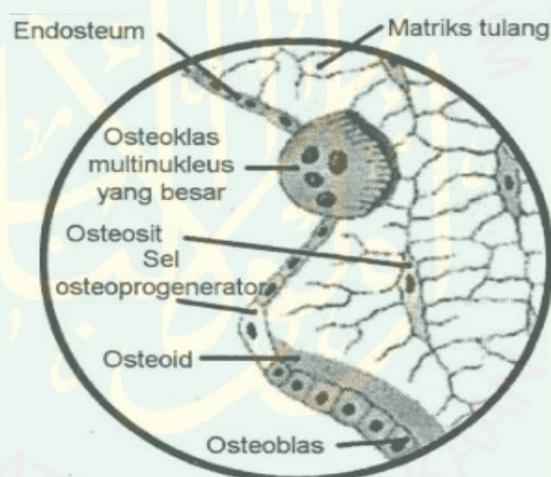
Sitoplasma osteosit memiliki ukuran yang lebih kecil bila dibandingkan dengan sitoplasma osteoblas, serta memiliki organel sel yang lebih sedikit sehubungan dengan aktivitas metaboliknya. Osteosit memfasilitasi pemeliharaan lingkungan ekstraseluler yang telah termineralisasi. Saat terstimulasi oleh PTH, osteosit mampu segera melepaskan mineral (termasuk Ca) dari matriks ekstraseluler dengan menyekresikan hidrolase. Proses ini dikenal sebagai *osteocytic osteolysis* yang berperan penting dalam pelepasan Ca secara cepat (Samuelson 2007).

c. Osteoklas

Osteoklas merupakan sel raksasa multinukleus ($\geq 6-50$ inti) yang terlibat dalam resorpsi dan *remodeling* tulang. Sel ini, yang terlihat asidofilik secara sitologi, memiliki banyak lisosom serta organel sel lainnya yang berkembang baik. Osteoklas yang diketahui berasal dari sumsum tulang, merupakan turunan dari sejumlah gabungan monosit. Pada proses pertumbuhan dan *remodeling* tulang, osteoklas secara kontinu akan melakukan penyerapan (*osteoclasia*). Proses *osteoclasia* merupakan hasil dari sekresi beberapa macam material termasuk asam dan enzim hidrolitik. Asam yang disekresikan seperti asam laktat dan sitrat, memiliki pH rendah sehingga memudahkan pelepasan mineral. Sedangkan enzim hidrolitik, seperti *acid hydrolase*, *collagenase* dan lainnya, mampu mencerna matriks ekstraseluler. *Osteoclasia* terutama diatur oleh sistem endokrin, antara lain: kelenjar tiroid yang menyekresikan hormon kalsitonin dan kelenjar paratiroid yang menyekresikan hormon paratiroid (Samuelson 2007).

Osteoklas meningkat jumlah dan aktivitasnya karena adanya PTH, *Parathyroid Hormone Related Protein* (PTHrp), 1,25-vitamin D, *Lymphotoxin*

(LT), *Alpha Transforming Growth Factor α* (TGF α), *Beta Tumor Necrosis Factor β* (TNF β), *Interleukin 1* (IL 1), *Interleukin 6* (IL6) dan *Interleukin 11* (IL 11). Akan tetapi, aktivitas dan jumlahnya akan menurun dengan kalsitonin, estrogen, TGF β , *Interferon γ* (IFN γ) dan PGE2. Dalam proses peningkatan dan penghambatan aktivitas osteoklas, beberapa sitokin diproduksi oleh osteoblas sehingga dapat dikatakan terdapat poros osteoblas-osteoklas dalam pengendalian densitas tulang. Dibutuhkan 100-150 osteoblas untuk membentuk sejumlah tulang yang dapat menahan terjadinya patah tulang karena aktivitas satu osteoklas (Riis, 1996).



Gambar 2.4 Sel tulang (Anonim, 2014)

2.4.4 Modeling dan Remodeling Tulang

Sel-sel tulang mengalami *modelling* dan *remodelling* untuk memungkinkan tulang untuk tumbuh dan beradaptasi sesuai kebutuhan. *Modelling* adalah ketika proses resorpsi dan pembentukan tulang terjadi pada permukaan tulang yang berlainan (pembentukan dan resorpsi tidak berpasangan). Contohnya adalah

pertambahan panjang dan diameter tulang panjang. *Modeling* tulang terjadi sejak kelahiran hingga dewasa dan berperandalam penambahan massa serta perubahan bentuk kerangka. Pada kondisi ini proses pembentukan tulang lebih dominan terjadi daripada proses resorpsi tulang (Mills 2007).

Remodelling tulang adalah penggantian jaringan tulang tua dengan jaringan tulang muda. Penggantian jaringan ini terutama terjadi pada kerangka dewasa untuk mempertahankan massa tulang. *Remodeling* mencakup pembentukan dan resorpsi tulang secara bersamaan (berpasangan). Proses ini merupakan sebuah proses yang dinamis, terus-menerus terjadi untuk mempertahankan massa tulang serta integritas dan fungsi kerangka. Proses ini terjadi secara kompleks, dikendalikan oleh susunan syaraf pusat melalui hormon dan oleh tekanan mekanis (Mills 2007).

Remodeling memungkinkan perubahan arsitektur tulang dalam menanggapi faktor-faktor seperti beban mekanis, tapi tanpa merubah ukuran kerangka keseluruhan. Proses ini tidak terjadi secara merata di seluruh kerangka, 80% dari renovasi terjadi di tulang trabekular (IOF, 2016).

Proses *remodeling* bergantung pada keterpaduan aksi dari osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Adapun beberapa faktor yang berperan pada proses ini yaitu hormon estrogen, sitokin, *growth factors* dan *Reseptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand* (RANKL)-*Reseptor Activator of Nuclear Factor- κ B* (RANK)-*Osteoprotegerin* (OPG) (Mills 2007; IOF, 2009; Kawiyana, 2009).

RANKL merupakan protein transmembran. Apabila tubuh kekurangan estrogen maka akan terjadi ikatan antara RANKL dengan RANK yang merupakan

salah satu reseptor TNF. Ketika terbentuk ikatan RANKL-RANK pada proses *remodeling* tulang maka akan menghasilkan faktor osteoklastogenik *Nuclear Factor of Activated T Cell 1* (NFATC1) yang merupakan prekursor atau calon osteoklas. Pada aktivitas inilah peran OPG diperlukan untuk mengimbangi proses osteoklastogenesis (Meeta, 2013).

OPG merupakan salah satu reseptor TNF yang bekerja dengan cara berikatan dengan RANKL. Ketika OPG berikatan dengan RANKL maka RANK tidak bisa berikatan dengan RANKL, sehingga tidak akan terjadi osteoklastogenesis karena calon osteoklas tidak terbentuk. Adapun kehadiran beberapa sitokin yang mampu mempengaruhi fungsi dari RANKL dan OPG diantaranya (Meeta, 2013):

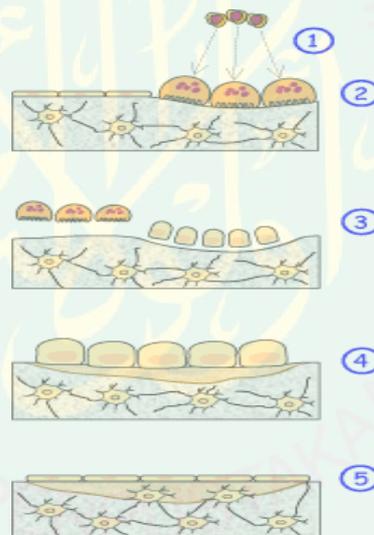
Tabel 2.1 Sitokin terhadap aktivitas RANKL dan OPG (Meeta, 2013)

	RANKL	OPG
Estradiol	-	Meningkatkan aktivitas
Glukokortikoid	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
1,25 (OH)₂ Vitamin D	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
PTH	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
IGF-1	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
IL-1	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
IL-6	Meningkatkan aktivitas	-
TNF-α	Meningkatkan aktivitas	Menurunkan aktivitas
TNF-β	Menurunkan aktivitas	Meningkatkan aktivitas

Proses *remodeling* tulang dibagi menjadi beberapa fase, yaitu (O'Connell, 2008):

1. Aktivasi: pre-osteoklas terstimulasi menjadi osteoklas dewasa yang aktif. Pada fase ini RANKL yang dihasilkan oleh prekursor osteoblas berikatan dengan reseptor yang ada pada permukaan prekursor osteoklas yaitu RANK, kemudian terbentuk sel osteoklas yang matang dan aktif

2. Resorpsi: osteoklas mencerna matriks tulang tua
3. Pembalikan: akhir dari proses resorpsi, saat osteoklas digantikan oleh osteoblas. Pada fase ini, setelah tulang selesai diresorpsi dan terbentuk rongga pada tulang maka dilepaskan sitokin-sitokin dan *growth factors* yang merupakan osteoblas dewasa pertama dari *mesenchymal stem cells* yang kemudian menstimulasi pembentukan sel osteoblas
4. Pembentukan: osteoblas menghasilkan matriks tulang yang baru
5. Fase pasif: osteoblas selesai menghasilkan matriks dan terbenam di dalamnya. Beberapa osteoblas membentuk sederet sel yang berjejer di permukaan tulang yang baru

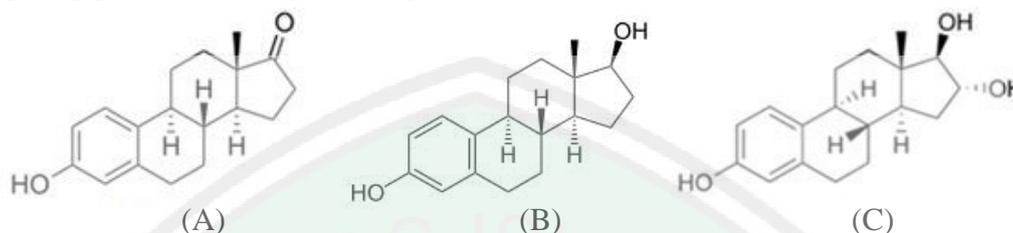


Gambar 2.5 Proses *remodeling* tulang (IOF, 2009)

2.5 Tinjauan Tentang Estrogen

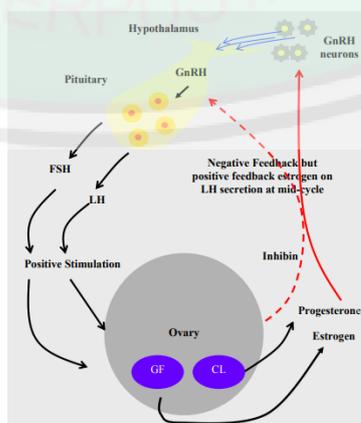
Estrogen merupakan steroid dengan 18 atom karbon yang mengandung satu cincin fenofilik (cincin aromatik dengan gugus hidroksil) dan gugus β hidroksi atau keton. Cincin fenofilik inilah yang bertanggung jawab terhadap ikatan selektif dan afinitas tinggi pada reseptor estrogen (Hardman and Limbric, 2001).

Terdapat tiga jenis utama estrogen pada manusia yaitu estron (E1), 17β -estradiol (E2), dan estriol (E3). 17β -estradiol (E2) adalah hormon gonad wanita yang paling poten dibandingkan dengan estron dan estriol (Gruber *et al.*, 2002).



Gambar 2.6 Struktur estron (E1) (A), 17β -estradiol (E2) (B) dan estriol (E3) (C) (Poppy, 2010)

Produksi estrogen dalam tubuh diawali dengan aktivitas hipotalamus dalam mensekresikan *Gonadotrophin releasing hormone (GnRH)* yang merangsang pelepasan *lutensizing hormone (LH)* dan *follicle stimulating hormone (FSH)* dari pituitary (hipofisis) anterior. Telah diketahui bahwa pada wanita FSH dan LH penting untuk perkembangan reproduksi normal dan menghasilkan hormon estrogen. LH menstimulir produksi androgen (prekursor estrogen), sedangkan FSH menstimulasi perkembangan folikuler dan aktivitas enzim aromatase. FSH merangsang perkembangan folikel-folikel, salah satu diantaranya berkembang cepat menjadi *folikel de Graff (GF)*. GF inilah yang akan mensekresikan estrogen (Hernawati, 2012).



Gambar 2.7 Produksi estrogen dalam tubuh (Hernawati, 2012)

Estrogen juga berperan dalam pemeliharaan terhadap tulang. Estrogen secara langsung akan mempengaruhi fungsi osteoblas. Pada keadaan normal, estrogen menuju ke osteoblas melalui reseptor estrogen *alpha* dan *betha* (ER- α dan ER- β) yang terdapat di dalam sitosol sel dan mengakibatkan penurunan sekresi sitokin seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α . Ketiga sitokin tersebut berfungsi terhadap penyerapan tulang, maka dalam hal ini estrogen dapat menurunkan aktivitas penyerapan tulang. Selain itu estrogen juga meningkatkan sekresi TGF- β yang merupakan *growth factor* yaitu mediator untuk menarik osteoblas ke dalam tulang untuk menutup lubang pada tulang akibat penyerapan oleh osteoklas dan terjadi peningkatan apoptosis dari sel osteoklas. IL-6 meningkatkan pembentukan sel osteoklas, terutama apabila kadar estrogen turun. Meski demikian, estrogen secara tidak langsung juga mempengaruhi osteoklas karena dengan terproduksinya TGF β akan menginduksi osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Kawiyana, 2009; Meeta, 2013).

2.6 Tinjauan Tentang Osteoporosis

2.6.1 Definisi Osteoporosis

Kata osteoporosis berasal dari bahasa Yunani, yaitu *osteon* yang berarti tulang dan *poros* yang berarti keropos (Agrawal *et al.*, 2013). Osteoporosis didefinisikan sebagai penyakit tulang sistemik yang ditandai dengan massa tulang rendah dan kerusakan mikroarsitektur jaringan tulang sehingga terjadi penurunan atau gangguan kekuatan tulang (*bone strength*) dan meningkatkan risiko fraktur pada tulang (Ahmed *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2013 dalam Praja 2014).



Gambar 2.8 (a) Tulang normal dan (b) Tulang osteoporosis (Compston, 2002)

Osteoporosis merupakan penyakit progresif yang bersifat kronis dan merupakan *silent epidemic disease* yaitu tidak terdapat gejala khusus sampai pada titik akhir klinis yang menakutkan yaitu terjadinya fraktur (Kemenkes RI, 2008; Meeta, 2013). Akan tetapi, beberapa kasus osteoporosis ditandai dengan dirasakannya nyeri pada punggung oleh penderita, penurunan tinggi badan dan munculnya kelainan bentuk tulang vertebra seperti kiposis. Kiposis merupakan keadaan tulang vertebra yang terlihat membungkuk kedepan (Fernandez, 2006; Meeta 2013).

2.6.2 Patofisiologi Osteoporosis

Pada keadaan osteoporosis, kerusakan mikroarsitektur jaringan tulang berhubungan erat dengan proses *remodeling* tulang yaitu terjadinya abnormalitas *turnover* tulang. Pada keadaan osteoporosis terjadi ketidakseimbangan antara osteoklas dan osteoblas atau dengan kata lain terjadi abnormalitas *turnover* tulang dimana proses penyerapan lebih dominan kemudian akan mengakibatkan penurunan massa tulang (Meeta, 2013).

2.6.3 Faktor Risiko Osteoporosis

Faktor risiko osteoporosis dibagi menjadi dua, yaitu faktor yang dapat dirubah dan yang tidak dapat dirubah. Faktor risiko yang dapat dirubah yaitu

kurangnya aktivitas fisik, asupan kalsium yang rendah dan kebiasaan konsumsi obat golongan kortikosteroid. Kurangnya aktivitas fisik membuat terhambatnya proses pembentukan massa tulang oleh osteoblas, namun sebaliknya semakin banyak bergerak maka otot akan menginduksi tulang untuk membentuk massa. Rendahnya asupan kalsium mengakibatkan kalsium dalam tubuh akan berkurang, sehingga tubuh akan mengambil kalsium dari bagian tubuh lain termasuk dari tulang. Alkohol dan kafein bersifat toksin bagi tubuh, sehingga kalsium dalam tubuh akan ikut terbuang bersamanya melalui ginjal yang berakibat pada terganggunya proses pembentukan tulang karena tidak adanya kalsium (Kemenkes RI, 2015).

Penggunaan obat golongan kortikosteroid digunakan pada dosis fisiologis untuk terapi pengganti jika produksinya dalam tubuh terganggu. Kortikosteroid dan turunan sintesisnya yang aktif secara biologis memiliki aktivitas metabolisme (glukokortikoid) dan aktivitas pengaturan elektrolit (mineralokortikoid) yang berbeda. Salah satu kortikosteroid sintesis dengan aktivitas glukokortikoid yang sangat tinggi dan aktivitas mineralokortikoid yang rendah adalah deksametason. Deksametason merupakan supresor kuat terhadap radang dan salah satu golongan obat yang paling sering diresepkan (Brunton *et al.*, 2005). Akan tetapi, dalam jangka waktu yang lama yaitu lebih dari 3-6 bulan dapat mengakibatkan terhambatnya proses pembentukan tulang pada osteoblas karena pengaruh penurunan produksi estrogen. Penurunan estrogen terjadi akibat penekanan hormon gonadotropin karena penekanan hipofisis dan korteks adrenal oleh glukokortikoid (Lane, 1999 dalam Wardhana, 2012; Kemenkes RI, 2015).

Aktivitas metabolisme yang dipengaruhi glukokortikoid yaitu kalsium. Perubahan metabolisme kalsium menginduksi terjadinya peningkatan PTH, sedangkan keberadaan PTH akan meningkatkan jumlah dan aktivitas osteoklas dalam meresorpsi tulang (Riis, 1996).

Faktor risiko yang tidak dapat dirubah meliputi riwayat keluarga, jenis kelamin, usia dan ras. Wanita memiliki risiko lebih tinggi mengalami osteoporosis (Wardhana, 2012; Kemekes RI, 2015). Pada wanita dengan kondisi pascamenopause akan mengalami defisiensi hormon estrogen dalam tubuhnya karena ovarium sudah tidak lagi memproduksi estrogen (Baziad, 1999). Ketika tingkat estrogen (estradiol dan setron) turun, siklus *remodeling* tulang berubah dan pengurangan jaringan tulang dimulai. Salah satu fungsi estrogen adalah mempertahankan tingkat *remodeling* tulang normal. Ketika tingkat estrogen turun, tingkat resorpsi tulang menjadi lebih tinggi daripada pembentukan tulang, yang mengakibatkan berkurangnya massa tulang. Yang sangat berpengaruh dengan kondisi ini adalah tulang traberkular karena sangat rentan terhadap defisiensi estrogen dan tingkat *turnover*-nya yang tinggi (Lane, 2001).

Kehilangan estrogen memicu abnormalitas kualitatif, yakni erosi esteoklas yang lebih dalam dibandingkan kavitas normal. Dalamnya erosi dapat diterangkan bahwa estrogen beraksi pada osteoklas matur berupa dukungan terhadap apoptosis sehingga defisiensi estrogen menyebabkan perpanjangan daya kerja osteoklas. Estrogen memicu apoptosis osteoklas dua sampai tiga kali lipat pada *in vivo* dan *in vitro* yang efeknya diperantarai oleh TGF- β . Secara langsung berkebalikan dengan efek tersebut, estrogen berperan sebagai antiapoptosis pada osteoblas dan

osteosit, sehingga defisiensi estrogen akan memperpendek daya hidup osteoblas dan osteosit (Manolagas, 2000).

Pada saat hamil wanita juga memiliki risiko osteoporosis. Hal tersebut disebabkan karena pada saat kehamilan proses pembentukan janin membutuhkan banyak kalsium. Semakin tua usia maka fungsi penyerapan kalsium akan menurun, namun fungsi PTH justru semakin meningkat (Kemenkes RI, 2015). Selain itu, depresi juga merupakan faktor risiko dari osteoporosis dimana depresi dapat mengakibatkan penurunan pembentukan tulang. Dalam hal ini yang sangat berperan yaitu kondisi hiperkortisolemia. Pada kondisi depresi mengakibatkan teraktivasinya *system stress* untuk mengeluarkan *hypothalamic corticotrophin releasing hormone* (CRH), sehingga kadar kortisol dalam darah akan meningkat. Tingginya kortisol dalam darah akan mempengaruhi proses pembentukan tulang yaitu penurunan osteokalcin dan penurunan alkalin fosfat (Cizza, 2009 dalam Imananta 2017).

Perbedaan ras juga mempengaruhi massa tulang seseorang. Pada umumnya ras Afrika-Amerika memiliki massa tulang tertinggi, sedangkan ras kulit putih terutama Eropa Utara memiliki massa tulang terendah. Massa tulang pada ras campuran Asia-Amerika berada diantara keduanya. Penelitian menunjukkan bahwa, pada usia muda terdapat perbedaan antara anak Afrika-Amerika dan anak kulit putih. Wanita Afrika-Amerika umumnya memiliki massa otot yang lebih tinggi. Massa tulang dan otot memiliki kaitan yang sangat erat, dimana semakin berat otot, maka tekanan pada tulang semakin tinggi sehingga tulang semakin besar. Penurunan massa tulang pada wanita Afrika-Amerika yang semua

cenderung lebih lambat daripada wanita berkulit putih. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan hormon diantara kedua ras tersebut (Wardhana, 2012).

2.6.4 Klasifikasi Osteoporosis

2.6.4.1 Osteoporosis Primer

Osteoporosis primer merupakan istilah untuk menggambarkan kondisi menurunnya kepadatan tulang tanpa adanya kondisi klinis yang menyebabkan (Tubaikh, 2009). Biasanya osteoporosis primer terdapat dua tipe yaitu osteoporosis pascamenopause dan osteoporosis senilis. Osteoporosis pascamenopause terjadi dimana ovarium sudah tidak lagi memproduksi estrogensehingga dalam tubuhakan mengalami defisiensi hormon estrogen (Baziad, 1999). Adapun osteoporosis senilis terjadi pada pria dimana produksi hormon endokrin testosterone mengalami penurunan. Diketahui bahwa hormon testosterone juga memiliki peran untuk meningkatkan densitas tulang (Wirakusumah, 2007). Selain karena faktor usia, osteoporosis dapat disebabkan karena faktor genetik yaitu terdapatnya abnormalitas komposisi matriks tulang (Shaw, 2008).

2.6.4.2 Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder terjadi karena kondisi penyakit lain seperti neuromuscular, penyakit kronis, endokrin atau juga dapat dikarenakan penggunaan obat-obatan lain serta konsumsi sehari-hari (Goroll, 2009; Setyorini, 2009). Berikut yang menyebabkan kondisi osteoporosis sekunder (Goroll, 2009):

a. Penggunaan obat-obatan dan konsumsi sehari-hari

1. Kekurangan kalsium dan vitamin D

2. Kelebihan hormon tiroid
3. Penggunaan glukokortikoid
4. Penggunaan anticonvusan

b. Endokrin

1. Hipogonadisme
2. Hiperparatiroidisme
3. Hipertiroidisme
4. Hiperprolaktinemia

2.6.5 Terapi Osteoporosis

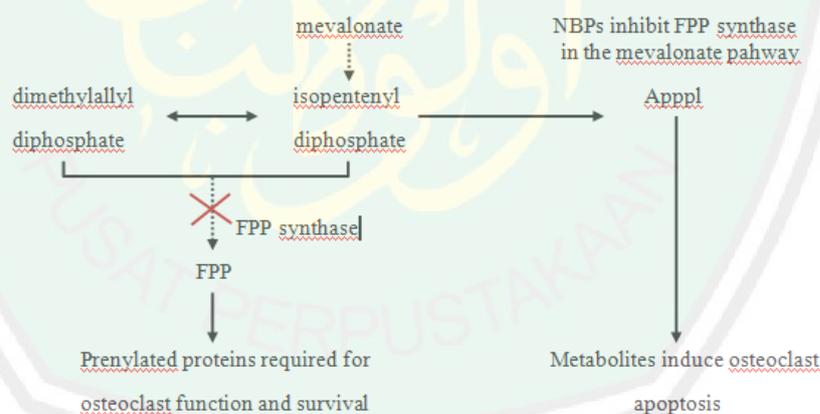
2.6.5.1 Terapi dengan Alendronat (Bisfosfonat)

Bisfosfonat adalah obat yang paling banyak digunakan untuk pengobatan osteoporosis dan merupakan obat lini pertama untuk osteoporosis (American Association of Clinical Endocrinologists, 2010; Dipiro *et al.*, 2014 dalam Imananta, 2017). Bisfosfonat termasuk ke dalam obat antiresorpsi atau menghambat penyerapan tulang yang merupakan analog pirofosfonat terdiri dari dua asam fosfonat yang masing-masing diikat oleh atom karbon (Kawiyana, 2009; Papaioannou *et al.*, 2010 dalam Imananta, 2017).

Penelitian menunjukkan bahwa alendronat efektif untuk pencegahan maupun terapi osteoporosis dengan pemberian dosis 10 mg sehari sekali dalam bentuk tablet. Namun obat ini memiliki absorpsi yang rendah disaluran pencernaan pada pemberian secara oral, sehingga untuk meningkatkan penyerapan diusus harus diminum pada saat perut kosong, menggunakan air dan setidaknya meminum 30-40 menit sebelum makan. Preparat ini meningkatkan massa tulang

disemua tulang kerangka lebih banyak jika dibandingkan dengan obat antiresorptif lainnya dan mengurangi perombakan tulang lebih banyak (Cosman, 2009; Imananta, 2017).

Berdasarkan mekanisme menghambat aktivitas osteoklast, alendronat bekerja dengan cara menghambat enzim farnesil pirofosfonat sintase (FPPS) dalam jalur mevalonate yang berperan pada penambahan rantai lipid (prenilase) atau modifikasi pasca-translasi menjadi Guanosin Trifosfat (GTP) kecil seperti Ras, Rac dan Rho yang berperan penting pada fungsi dan kelangsungan hidup osteoklas. Penghambatan FPPS ini akan mencegah GTP untuk berikatan dengan membran sel, sehingga osteoklas terhambat dan mengalami apoptosis kemudian fungsi resorptif akan menghilang (Baron *et al.*, 2011; Harison *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2015 dalam Imananta, 2017).



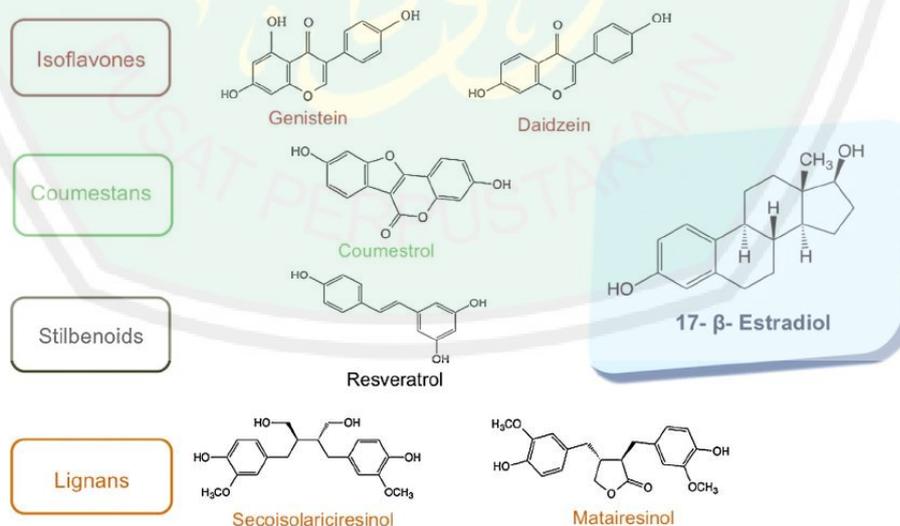
Gambar 2.9 Mekanisme kerja bisfosfonat pada jalur mevalonat (Baron *et al.*, 2011)

2.6.5.2 Terapi dengan Fitoestrogen

Fitoestrogen dianggap sebagai zat alternatif yang efektif dalam mencegah keropos tulang yang disebabkan oleh defisiensi estrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur dengan estrogen

sehingga dapat menunjukkan sifat agonis pada *Estrogen Receptor* (ER). Kemampuan meniru efek estrogen oleh fitoestrogen didasarkan oleh keberadaan senyawa dengan berat molekul setara dengan estrogen yaitu 272 g/mol, cincin fenolik sebagai binding site dan memiliki inti dengan 2 gugus –OH atau hidroksil yang berjarak 1,0-11,5 Å. Para peneliti sepakat bahwa jarak 11 Å dan gugus –OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik, yakni memiliki afinitas tertentu untuk dapat “menduduki” *estrogen receptors*. Substrat-substrat tersebut baru akan berefek estrogenik apabila telah berikatan dengan reseptor-reseptor estrogen (Benassayag, 2002; Urasopon *et al.*, 2008).

Secara klasik fitoestrogen terdiri dari isoflavon, *coumestane*, *stilbene* dan lignan. Pada kelompok fitoestrogen tersebut isoflavon merupakan senyawa golongan flavonoid yang banyak dimanfaatkan karena memiliki efek estrogenik yang cukup tinggi (Grippio *et al.*, 2007).



Gambar 2.10 Estrogen 17β estradiol dan fitoestrogen (Anonim, 2014)

Mekanisme fitoestrogen secara *in vitro* untuk pencegahan osteoporosis dengan merangsang aktivitas pembentukan sel osteoblas dan menghambat pembentukan osteoklas (Branca, 2003).

2.7 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra

Mencit Betina

2.7.1 Tinjauan tentang Hewan Coba *Mus Musculus*

Selain tumbuh-tumbuhan yang berada di muka bumi ini Allah SWT juga menciptakan hewan-hewan di dalamnya. Hewan-hewan tersebut berbeda antara satu dengan yang lain baik dari segi habitat, makanan dan tingkah laku seperti halnya yang telah disebutkan dalam QS. an-Nuur/ 24: 45,

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ ۖ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ ۖ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ ۗ خَلَقَ اللَّهُ مَا يَشَاءُ ۚ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿٤٥﴾

“Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, Maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, Sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu” (QS. an-Nuur/ 24: 45).

Berdasarkan ayat al Quran tersebut, Allah Swt telah menyebarkan دَابَّةٍ di semua langit dan bumi. Pengertian dari istilah دَابَّةٍ yaitu makhluk hidup yang punya cara berjalan berbeda-beda, ada yang merayap seperti hewan melata ada yang berjalan dengan dua kaki sebagaimana halnya dengan manusia dan ada juga yang berjalan dengan empat kaki seperti kuda, anjing dan kucing (Maragi, 1993).

Mencit yang digunakan sebagai hewan coba pada penelitian ini menurut ayat di atas adalah hewan يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ atau hewan yang berjalan dengan empat

kaki seperti halnya anjing dan kuda. Mencit dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Animalia

Filum : Chordata

Subfilum: Vertebrata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : *Mus*

Spesies : *Mus musculus* L



Gambar 2.11 Morfologi mencit (Wulandari, 2015)

Mencit secara umum dapat digunakan sebagai pengganti dari subjek diinginkan, sebagai model dalam penelitian biomedis, sebagai instrumen untuk mengukur suatu besaran kualitas atau kuantitas biologis (uji biologis) dan sebagai penghasil produk-produk biologi (Setijono, 1985).

2.7.2 Pemeriksaan Tulang Traberkular Vertebra

Perlakuan pada hewan coba dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok uji. Pemeriksaan tulang pada hewan coba dilakukan dengan

menggunakan pewarnaan. Tujuan dari teknik pewarnaan adalah untuk memberikan warna yang kontras pada komponen selular sehingga dapat dibedakan antar sel. Setiap jenis sel memiliki afinitas yang berbeda terhadap warna, sehingga jenis pewarnaan harus berbeda untuk tiap jenis sel (Waheed, 2012).

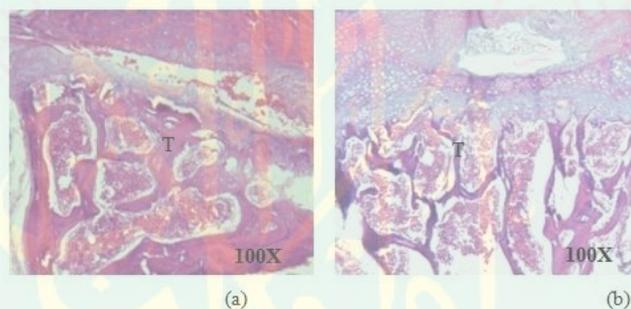
Faktor-faktor yang mempengaruhi pewarnaan adalah sebagai berikut (Waheed, 2012):

- a. Reaksi asam-basa. Komponen selular yang bersifat asam dapat diwarnai dengan pewarnaan yang bersifat basa dan berlaku juga sebaliknya
- b. Adsorpsi. Molekul pewarnaan yang kecil dapat menempel pada molekul sel yang lebih besar
- c. Tingkat kelarutan. Jenis pewarnaan tergantung dari tingkat kelarutan pada sel

Pewarnaan HE (Hematoksilin dan Eosin). Pewarnaan HE akan memberikan keseimbangan warna biru dan merah dengan jelas pada jaringan, sehingga komponen sel dapat diidentifikasi dengan jelas. Hematoksilin bersifat basa sedangkan inti sel bersifat asam, keduanya menimbulkan suatu ikatan lemah sehingga inti sel dapat berwarna. Namun sebelum dapat mewarnai inti sel, zat warna ini dioksidasi terlebih dahulu menjadi hematein. Hal tersebut dikarenakan hematein tidak larut dalam air dan alkohol, sehingga tidak mudah pudar ketika proses pewarnaan dilakukan. Eosin adalah zat warna sitoplasma yang sangat baik, karena zat warna ini dapat memberikan corakan pada jaringan dan corakan ini dapat bertambah apabila ditambah zat warna lain (Stevens, 1990).

Persyaratan dalam melakukan pengambilan sampel jika jaringan berupa tulang pada pewarnaan ini yaitu dilunakkan terlebih dahulu dalam larutan dekalsifikasi dengan perbandingan antara jaringan dan larutan 1:20 dengan waktu perendaman selama 24 jam. Larutan dekalsifikasi yaitu larutan yang berfungsi untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang sehingga tulang menjadi lunak dan memudahkan pemotongan (Muntiha, 2001).

Pemeriksaan histopatologi diawali dengan pemeriksaan preparat histologi dibawah mikroskop yang dihubungkan pada suatu komputer dan software (Muntiha, 2001).



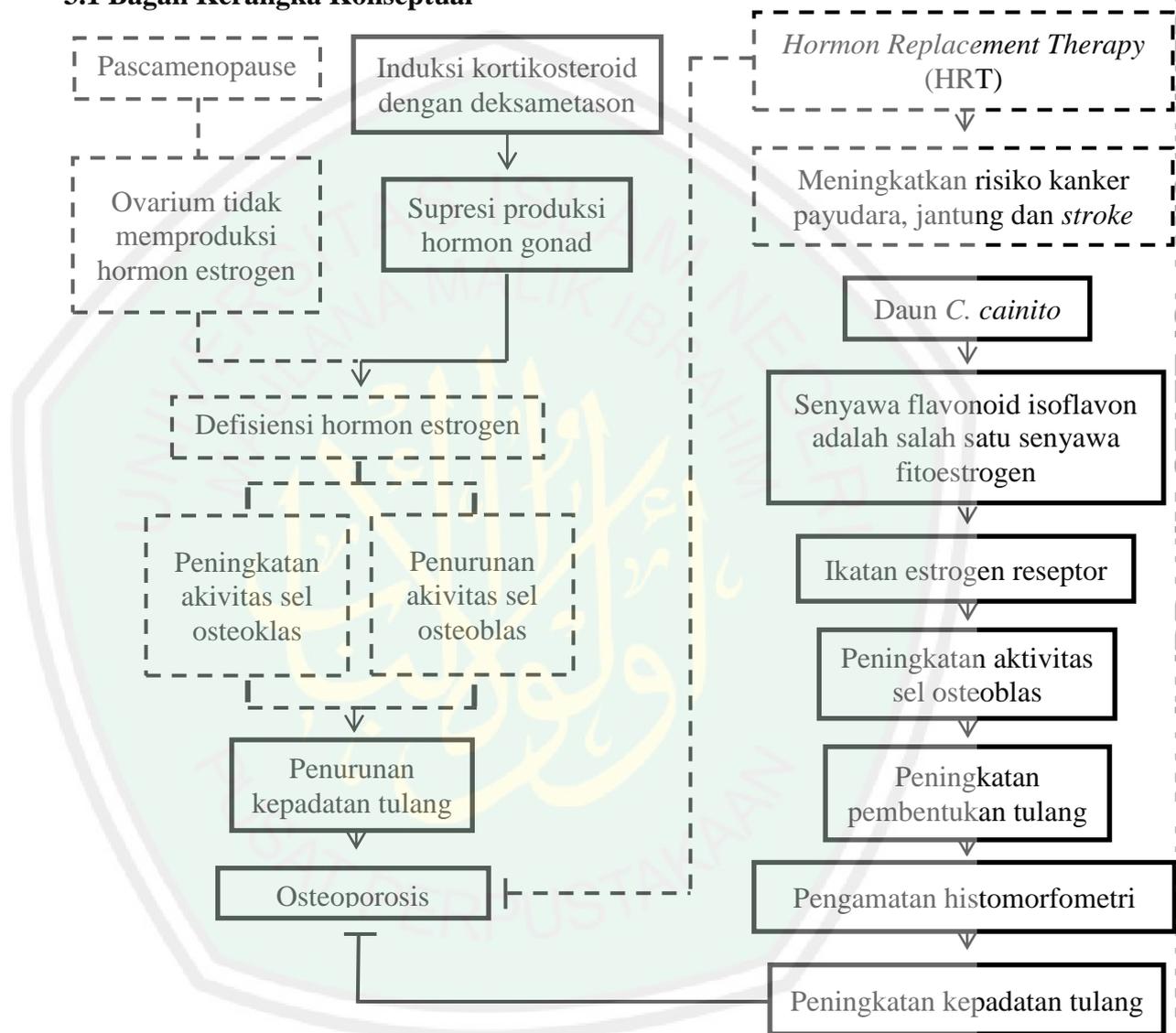
Gambar 2.12 Histomorfologi tulang vertebra (a) Tulang normal (b) Tulang setelah diinduksi deksametason

Rerata ketebalan tulang traberkularyang diambil dari tulang vertebra bagian torak antara ruas ke X-XII hewan coba yang dihitung secara mikroskopidengan menggunakan pewarnaan HE, dengan satuan mikrometer (μm).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

Keterangan: —| : Menghambat — : Variabel yang diteliti
 → : Memicu - - - : Variabel yang tidak diteliti

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Keadaan wanita pascamenopause dan penginduksian kortikosteroid dengan deksametason selama lebih dari 3 hingga 6 bulan dapat memicu terjadinya defisiensi estrogen. Pada wanita pascamenopause ini mengalami defisiensi hormon estrogen karena ovarium sudah tidak lagi memproduksi estrogen, sedangkan induksi deksametason menyebabkan supresi produksi hormon gonad yaitu dengan penekanan hipofisis yang mengakibatkan *lutensizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) menurun. LH berfungsi menstimulir produksi androgen (prekursor estrogen) dan FSH menstimulasi perkembangan folikuler seperti *folikel de Graff* (GF) yang akan mensekresikan estrogen. Jika supresi hipofisis oleh deksametason terjadi dalam jangka lama, maka tubuh dimungkinkan tidak bisa memproduksi estrogen atau mengalami penurunan dalam produksinya. Defisiensi hormon estrogen yang terjadi dapat menyebabkan osteoporosis dengan risiko penurunan kepadatan tulang karena resorpsi tulang oleh osteoklas menjadi lebih tinggi daripada formasi tulang oleh osteoblas (Baker, 1982 dalam Hafizuddin 2012; Baziad, 1999; Lane, 1999; Suherman 2011; Hernawati, 2012).

Terapi osteoporosis umumnya dengan pemberian substansi estrogen dari luar tubuh yaitu *Hormon Replecment Therapy* (HRT). Namun penggunaan jangka panjang menimbulkan efek samping yaitu meningkatkan risiko penyakit kanker payudara 26%, jantung 29% dan *stroke* 41% (Beral V, 2003; Cosman, 2009). Kelemahan HRT mendorong perlunya alternatif terapi yang mempunyai efek samping yang lebih minimal yaitu fitoestrogen (Darmadi, 2011).

Kenitu atau yang memiliki nama ilmiah *Chrysophyllum cainito* diketahui mengandung senyawa polifenol, flavonoid, tanin, katekin, galloktekin, kuersetin, kuersetin, isokuersetin, mirisitrin dan asam galat (Luo *et al.*, 2002; D'Archivio *et al.*, 2007). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam tanaman ini diantaranya adalah isoflavonyaitu fitoestrogen yang memiliki cincin fenolik sebagai *binding site* dan memiliki inti dengan 2 gugus-OH yang berjarak 1,0-11,5 Å yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yakni afinitas berikatan dengan reseptor estrogen sehingga mampu meningkatkan aktivitas osteoblas dalam formasi tulang dan meningkatkan kepadatan tulang pada osteoporosis akibat induksi deksametason jangka lama atau wanita pascamenopause (Benassayag, 2002; Achadiat, 2003; Urasopon *et al.*, 2008). Peningkatan kepadatan tulang dapat diketahui setelah dilakukan pengamatan secara histomorfometri yaitu pengukuran ketebalan dari tulang traberkular vertebra yang diperoleh dari rerata ketebalan tulang tersebut dalam satuan µm.

3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dapat meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason. Penelitian eksperimental laboratoris merupakan kegiatan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan tertentu (Notoatmojo, 2010).

4.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas preparasi bahan, pengukuran kadar air, ekstraksi bahan, identifikasi senyawa dan uji aktivitas ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dalam meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebrata mencit betina yang diinduksi deksametason.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan April 2017. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi, Laboratorium Fitokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.3 Sampel Penelitian

4.3.1 Sampel Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah simplisia daun *C. cainito* yang diperoleh dari Balai Materia Medika Kota Batu, Jawa Timur.

4.3.2 Sampel Hewan Coba

Sampel hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menurut rumus replikasi Federer (Hanafiah, 2004):

$$(tr - 1)(r - 1) \geq 15$$

dimana $tr = \textit{treatment}$

$r = \textit{replication}$

Pada penelitian ini diberikan lima perlakuan, sehingga $tr = 5$ dan jumlah sampel yang diperlukan dalam satu grup yaitu:

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15 : 4$$

$$r \geq 3,75 + 1$$

$$r \geq 4,75$$

Dari perhitungan di atas, didapatkan bahwa jumlah sampel untuk setiap grup adalah 5 ekor, sehingga total sampel yang diperlukan adalah 5×5 , yaitu 25 ekor.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

4.4.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak daun *C. cainito* 2 mg, 4 mg dan 8 mg/20 g BB mencit

4.4.1.2 Variabel Tergantung

Peningkatan kepadatan tulang trabekular vertebra dalam satuan μm

4.4.1.3 Kriteria Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Berikut adalah kriteria yang digunakan pada penelitian ini.

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit (*Mus musculus*) betina
- b. Usia 70-80 hari
- c. Berat badan 25-30 g
- d. Sehat, yang ditandai dengan bergerak aktif

Kriteria Eksklusi:

- a. Memiliki kelainan anatomi (cacat fisik)
- b. Mati selama penelitian berlangsung
- c. Hamil
- d. Melahirkan

4.4.2 Definisi Operasional

- a. Ekstrak adalah sediaan kering yang diperoleh dari penyarian simplisia daun *C. cainito* dengan pelarut etanol 70 % yang telah diuapkan pada *rotary evaporator*
- b. Dosis adalah takaran bahan obat untuk induksi osteoporosis ataupun *treatment* yang diberikan kepada mencit betina sejumlah mg yang diinduksikan dalam ml
- c. Osteoporosis merupakan penyakit degeneratif tulang akibat tidak seimbangnya antara resorpsi tulang dibandingkan dengan pembentukan tulang
- d. Kepadatan tulang traberkular vertebrata diamati secara histomorfometri yaitu pengukuran ketebalan dari tulang traberkular vertebra yang diperoleh dari rerata ketebalan tulang tersebut dalam satuan μm

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang plastik, botol minum, tempat makan, penutup kandang berupa jarring-jaring kawat, timbangan analitik, *handscoon*, pembersih kandang, gelas beker, gelas ukur, labu ukur, gelas arloji, pipet tetes, pipet ukur, batang pengaduk, corong gelas, erlenmeyer, wadah maserat, cawan porselen, sendok tanduk, spatula, aluminium foil, timbangan digital, *rotary evaporator*, plat KLT, *chamber*, instrumen sinar UV, sonde, mortar dan stamper, alat dan papan fiksasi serta mikroskop dan komputer.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia daun *C. cainito*, etanol 70 %, aquades, deksametason, alendronat, CMC Na 0,5 %, ekstrakdaun *C. cainito*, n-butanol, asam asetat, kloroform, formalin 10 %, asam formiat 10 %, asam nitrat 3 %, aseton, xylol, paraffin cair, gliserin, alkohol 96 %, ammonia air, alkohol 80 %, cat Harris Hematoksilin dan cat pembanding Eosin.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Preparasi Simplisia Daun *C. cainito*

Preparasi simplisiadaun *C. cainito* dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- a. Dikumpulkan daun *C. cainito* yang masih segar kemudian disortasi basah
- b. Dilakukan pencucian dengan air mengalir
- c. Dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C hingga diperoleh simplisia kering
- d. Digiling simplisia kering sehingga diperoleh serbuk yang halus
- e. Disimpan serbuk simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah kerusakan dan penurunan mutu

4.6.2 Pengukuran Nilai Kadar Air

Pengukuran nilai kadar air simplisia kering daun *C. cainito* dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- a. Dikalibrasi *moisture content analyzer*
- b. Dimasukkan simplisia $\pm 0,5$ g kedalam wadah metal bulat
- c. Ditutup *moisture content analyzer*

- d. Ditunggu hingga pengukuran oleh alat selesai

4.6.3 Ekstraksi Daun *C. cainito*

Ekstraksi daun *C. cainito* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Langkah ekstraksi yang dilakukan sebagai berikut:

- a. Ditimbang simplisia daun *C. cainito* sebanyak 500 g
- b. Simplisia dimasukkan dalam wadah maserat sambil dibasahi dengan etanol 70% sebanyak 2 liter sedikit demi sedikit hingga etanol 70% masuk semua
- c. Dilakukan pengadukan
- d. Didiamkan selama 24 jam
- e. Disaring dan didiamkan filtratnya
- f. Residu kemudian diremaserasi selama 24 jam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 liter dan disaring
- g. Residu kemudian diremaserasi lagi selama 24 jam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 liter dan disaring
- h. Filtrat yang telah terkumpul dimasukkan dalam labu *rotary evaporator*
- i. *Rotary evaporator* diatur pada suhu 55° C dengan kecepatan 90 rpm untuk menguapkan etanol
- j. Dioven pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental
- k. Ditutup ekstrak kental dengan aluminium foil

4.6.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan dengan cara seperti berikut:

- a. Diaktifasi plat KLT dalam oven pada suhu 100°C selama 1 jam
- b. Dsiapkan eluen, n-butanol: asam asetat: air dengan perbandingan 4:1:5

- c. Dijenuhkan eluen dalam *chamber* kurang lebih selama 20-30 menit
- d. Disiapkan plat KLT yang telah diaktivasi dengan ukuran 8 x 2 cm
- e. Disiapkan larutan ekstrak
- f. Ditotolkan larutan pada plat KLT, kemudian diangin-anginkan
- g. Dimasukkan plat ke dalam *chamber* hingga terjadi elusi sampai pada batas atas
- h. Diangin-anginkan plat KLT
- i. Diamati noda secara visual, dibawah sinar UV 365 nm dan 254 nm
- j. Disemprot asam sulfat 10%, kemudian diamati secara visual

4.6.5 Uji Aktivitas Peningkatkan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra

4.6.5.1 Prosedur Penyiapan Hewan Coba

Prosedur penyiapan hewan coba dilakukan seperti berikut:

- a. Hewan percobaan mencit betina sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi ditempatkan dalam kandang
- b. Dilakukan aklimatisasi selama 14 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar mencit dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan
- c. Diberi makan dan minum secukupnya

Dibagi mencit menjadi 5 kelompok, masing-masing diinduksi deksametason dengan dosis 0,0029 mg/20 g BB sebanyak 0,6 ml/20 g mencit/hari secara peroral selama 4 minggu. 4 minggu merupakan waktu yang ekuivalen 3-4 tahun pada manusia yang menyebabkan penurunan densitas massa tulang yang berhubungan dengan penurunan jumlah osteoblas (Manogalas, 2000 dalam Noor 2014).

d. Pembagian kelompok berdasarkan terapi yang diberikan:

Kelompok 1 Terapi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dosis 2 mg	Diberikan suspensi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dengan dosis 2 mg/20 g BB mencit sebanyak 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu
Kelompok 2 Terapi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dosis 4 mg	Diberikan suspensi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dengan dosis 4 mg/20 g BB mencit sebanyak 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu
Kelompok 3 Terapi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dosis 8 mg	Diberikan suspensi ekstrak etanol 70% daun <i>C. cainito</i> dengan dosis 8 mg/20 g BB mencit sebanyak 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu
Kelompok 4 Kontrol positif	Diberikan suspensi alendronat sebanyak 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu
Kelompok 5 Kontrol negatif	Tidak diberikan perlakuan

Pembuatan Larutan Uji

1. Pembuatan suspensi deksametason sebagai penginduksi osteoporosis

- Perhitungan dosis:

Dosis deksametason untuk manusia (70 kg)

$$= 1,125 \text{ mg/hari (Laswati, 2015)}$$

Dosis deksametason untuk mencit (20 g)

$$= 1,125 \times 0,0026$$

$$= 0,0029 \text{ mg/20 g BB mencit/hari}$$

- Dosis dan cara pemakaian:

Suspensi deksametason diberikan dengan volume 0,6 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu (setiap 0,6 ml suspensi mengandung 0,0029 mg deksametason)

- Cara pembuatan suspensi deksametason:
 - a. Ditimbang CMC-Na 0,5 % sebanyak 2500 mg
 - b. (a) Didispersikan merata dalam air panas 50 ml sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian gerus hingga terbentuk mucilago
 - c. Digerus 5 tablet deksametason 0,5 mg, ditimbang sesuai dosis yang diperlukan
 - d. (b) + (c) Diaduk hingga homogen
 - e. (d) Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml kemudian ditambahkan aquadest sampai tanda batas, kocok sampai homogen

2. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito*

- Perhitungan dosis:

Penentuan dosis ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* yang akan diberikan pada mencit harus dihitung dengan konversi dosis dari manusia ke hewan uji. Konversi dosis untuk manusia ke mencit adalah 0,0026. Namun Perhitungan dosis yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Laswati (2015) yaitu, dosis ekstrak etanol *spilanthus acmella* 4,14 mg/20 g BB yang telah memberikan efek pada kepadatan tulang, sehingga dosis ekstrak daun *C. cainito* yang menggunakan pelarut etanol 70 % sebagai berikut (mg/g BB dan jumlah ekstrak yang ditimbang) :

- a. Dosis 1 = 2 mg/20 g BB
 = 5 x 2 mg x 28 = 280 mg

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak = 280 mg

$$\begin{aligned} \text{b. Dosis 2} &= 4 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \\ &= 5 \times 4 \text{ mg} \times 28 = 560 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak = 560 mg

$$\begin{aligned} \text{c. . Dosis 3} &= 8 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \\ &= 5 \times 8 \text{ mg} \times 28 = 1120 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak = 1120 mg

Keterangan:

Angka 5 : Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

Angka 28 : Jumlah hari terapi selama 4 minggu

Perhitungan dosis ekstrak daun *C. cainito* dalam ml:

$$\begin{aligned} \text{a. Dosis 1} \\ \frac{2 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{280 \text{ mg}} &= 0,36 \text{ ml} \end{aligned}$$

Sehingga larutan stok dosis 2 mg/g BB dibuat dengan melarutkan 280 mg ekstrak kental ke dalam 50 ml CMC Na 0,5%, sehingga dalam 0,36 ml mengandung 2 mg

$$\begin{aligned} \text{b. Dosis 2} \\ \frac{4 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{560 \text{ mg}} &= 0,36 \text{ ml} \end{aligned}$$

Sehingga larutan stok dosis 4 mg/g BB dibuat dengan melarutkan 560 mg ekstrak kental ke dalam 50 ml CMC Na 0,5%, sehingga dalam 0,36 ml mengandung 4 mg

c. Dosis 3

$$\frac{8 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{1120} = 0,36 \text{ ml}$$

1120 mg

Sehingga larutan stok dosis 8 mg/g BB dibuat dengan melarutkan 1120 mg ekstrak kental ke dalam 50 ml CMC Na 0,5 %, sehingga dalam 0,36 ml mengandung 8mg

- Dosis dan cara pemakaian:

Suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* diberikan dengan volume 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu (setiap 0,36 ml suspensi mengandung 2 mg, 4 mg dan 8 mg ekstrak daun *C. cainito*)

- Cara pembuatan suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainio*:

- Ditimbang CMC-Na 0,5 % sebanyak 500 mg
- (a) Didispersikandalam air panas 10 ml hingga mengembang (\pm 15 menit) kemudian diaduk hingga terbentuk mucilago
- Ditimbang ekstrak sebanyak 280 mg, 560 mg dan 1120 mg
- (b) + (c) Diaduk hingga homogen
- (d) Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas, kocok sampai homogen

3. Pembuatan suspensi alendronat untuk kelompok kontrol positif

- Perhitungan dosis

Dosis alendronat untuk manusia (70 kg)

$$= 10 \text{ mg/hari (Ferguson, 2004)}$$

Dosis alendronat untuk mencit (20 g)

$$= 10 \text{ mg} \times 0,0026$$

$$= 0,026 \text{ mg}/20 \text{ g BB mencit/hari}$$

- Dosis dan cara pemakaian:

Suspensi alendronat diberikan dengan volume 0,36 ml/20 g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu (setiap 0,36 ml suspensi mengandung 0,026 mg alendronat)

- Cara pembuatan suspensi alendronat:

- a. Ditimbang CMC-Na 0,5 % sebanyak 500 mg
- b. (a) Didispersikan dalam air panas 10 ml hingga mengembang (± 15 menit) kemudian digerus hingga terbentuk mucilago
- c. Digerus 1 tablet alendronat 10 mg, ditimbang sebanyak 25,12 mg
- d. (b) + (c) Diaduk hingga homogen
- e. (d) Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas, kocok sampai homogen

4.6.5.2 Pembedahan Hewan Coba

Setelah mencit diberi perlakuan maka dilakukan pembedahan untuk pengambilan tulang vertebra. Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah mencit tidak sadar, mencit difiksasi. Tulang vertebra dipotong pada bagian toraks dan dimasukkan dalam botol tertutup yang berisi formalin 10 %.

4.6.5.3 Prosedur Pembuatan Preparat

b. Dekalsifikasi (pelunakan)

1. Larutan dekalsifikasi: aluminium klorida 7,0 g, asam klorida 8,5 g, asam formiat 5,0 ml ditambah aquades hingga 100 ml
2. Dimasukkan tulang vertebra dengan ukuran secukupnya ke dalam larutan dekalsifikasi (vol. bahan : larutan dekalsifikasi min. 1 : 20)
3. Di tes kelunakan tulang dengan jarum pentul
4. Setelah dekalsifikasi selesai, kemudian dinetralisasi dalam natrium sulfat 2 % (natrium sulfat 2 g dan aquades hingga 100 ml) selama 24 jam (2x ganti)
5. Dicuci dengan air mengalir selama setengah hari kemudian dengan alkohol 70 %

c. Memproses bahan

Setelah tulang diblok dengan parafin, kemudian dilakukan pemotongan dengan mikrotom seperti berikut:

1. Blok tulang ditempatkan pada alat pemegang blok dengan bantuan lempengan besi tipis yang telah dipanaskan
2. Didinginkan pada suhu kamar sampai melekat erat
3. Dipersiapkan *Rotary Mikrotom*, ketajaman pisau dan sudut kemiringan
4. Dipersiapkan *Water Bath*, kebersihan dan temperatur air (dibawah titik leleh parafin)
5. Dipersiapkan gelas obyek, perekat (gliserin) dan label

6. Blok yang sudah menempel pada alat pemegang blok dipasang pada mikrotom dan atur ketebalan sayatan
7. Dilakukan penyayatan blok, lalu diangkat sayatan dan dimasukkan ke dalam *Water Bath* agar sayatan mengembang dengan baik
8. Dipilih sayatan terbaik dan diangkat dengan obyek *glass* sesuai label, lalu dikeringkan pada suhu kamar

4.6.5.4 Pengecatan Preparat dengan Hematoksilin dan Eosin

Preparat yang telah selesai diproses tersebut kemudian dilakukan hidrasi dengan alkohol 96 % sebanyak tiga kali masing-masing 2 menit. Masukkan ke dalam air selama 10 menit. Tetesi dengan cat utama Harris Hemaktosilin selama 10 menit, cuci dengan air mengalir selama 20 menit. Dichelupkan ke dalam alkohol asam 1 % sebanyak 3-5 celup, lalu ammonia air sebanyak 5-10 celup. Kemudian, tetesi dengan cat pembanding Eosin 1 % selama 0,5-1 menit. Setelah itu, lakukan dehidrasi dengan menggunakan alkohol 80 % selama 2 menit dan alkohol 96 % dua kali masing-masing 2 menit. Lakukan *clearing* (penjernihan) dengan menggunakan xylol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Setelah itu, lakukan *mounting* dengan meletakkan entelan di atas gelas obyek dan kemudian merekatkannya dengan *deckglass*.

4.6.5.5 Pengamatan Gambaran Histopatologi Tulang Traberkular Vertebra

Mencit Betina yang Diinduksi Deksametason

Pengamatan slide dilakukan dengan menggunakan program *Image Raster* dengan perbesaran 10x pada tiap slide. Nilai kepadatan tulang diperoleh dari rerata perhitungan ketebalan pada tulang traberkular vertebra.

4.6.5.6 Analisis Data

Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi menggunakan *software IBM Statistical Product and Service Solution (SPSS) 23* dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan *P value* 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95 %. Pada penelitian ini akan dianalisis kepadatan tulang traberkular vertebra. Metode yang digunakan yaitu uji parametrik *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) yang bertujuan untuk menganalisis ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

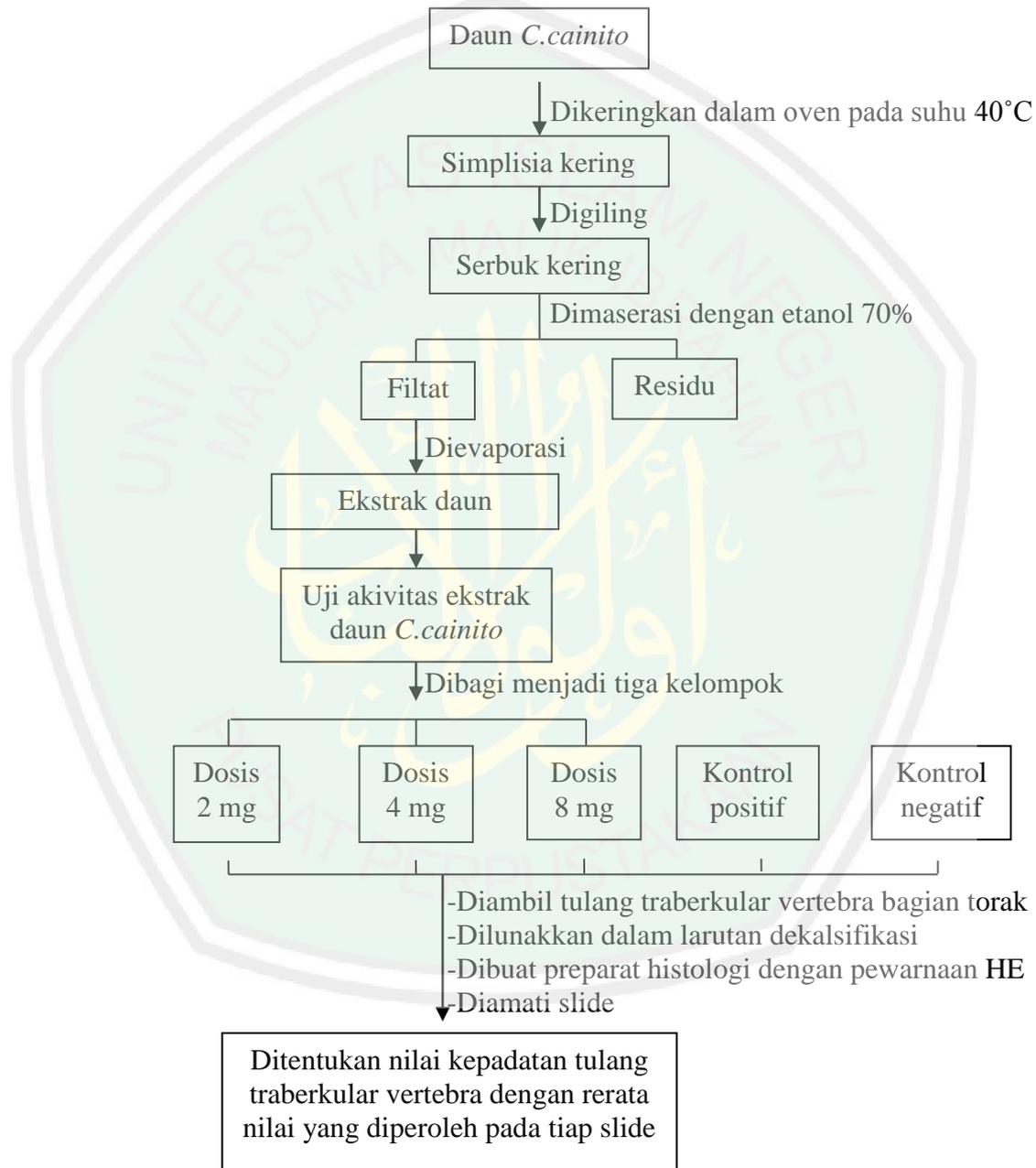
Metode *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat uji parametrik sebagai berikut (Dahlan, 2004):

1. Distribusi data normal (*P value* > 0,05), yang dapat diketahui dari uji normalitas. Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan data sehingga didapatkan distribusi data normal
2. Varians data sama atau homogen (*P value* > 0,05), yang dapat diketahui dari uji homogenitas. Jika varians data tidak sama atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan sehingga didapatkan varians data sama atau homogen

Jika uji *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) didapat *P value* < 0,05 maka terdapat perbedaan kepadatan tulang traberkular vertebra yang signifikan pada kelompok perlakuan. Uji statistik dilanjutkan dengan *Pos Hoc Test* yaitu LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Namun bila *P value* > 0,05 berarti

tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan, dengan kata lain hipotesis tersebut ditolak (Dahlan, 2004).

4.7 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Preparasi Simplisia Daun *C. cainito*

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *C.cainito* yang diperoleh dari Balai Materia Medika Kota Batu, Jawa Timur. Daun berwarna hijau pada bagian atas dan berwarna coklat keemasan pada bagian bawah. Daun segar dipanen kemudian disortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya seperti tanah, kerikil, rumput maupun batang. Setelah disortasi daun segera dicuci. Pencucian daun *C. cainito* dilakukan dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran yang masih menempel. Kemudian daun *C.cainito* ditiriskan dan dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C untuk membantu proses pengeringan. Proses ini berguna untuk menguapkan air dari daun. Penguapan dapat menurunkan kadar air dalam daun, hal ini dapat mencegah tumbuhnya kapang dan menurunkan reaksi enzimatik sehingga dapat mencegah terjadinya pengrusakan simplisia. Pengeringan pada daun *C. cainito* menggunakan metode oven karena waktu yang diperlukan relatif cepat dan panas yang diberikan relatif konstan (Agoes, 2007; Laksana, 2010; Mamonto, 2014).



Gambar 5.1 Daun *C. cainito* setelah dikeringkan di dalam oven dengan suhu konstan 40°C

Simplisia kering daun *C. cainito* selanjutnya digiling sehingga diperoleh serbuk yang halus. Penggilingan dilakukan untuk mempermudah proses ekstraksi dengan memperbesar kontak antara bahan dan pelarut. Selanjutnya simplisia disimpan dalam kantong plastik di tempat yang kering, tidak lembab dan terhindar dari sinar matahari langsung untuk melindungi simplisia agar tidak rusak atau berubah mutunya (Harbone, 1996; Laksana,2010).



Gambar 5.2 Simplisia serbuk kering daun *C. cainito* setelah dilakukan penggilingan berwarna hijau tua

5.2 Pengukuran Nilai Kadar Air

Menurut Badan POM (2002) semakin kecil nilai kadar air maka penarikan senyawa aktif oleh pelarut lebih efektif ketika proses ekstraksi. Adapun persentase 10-12 % adalah kadar air yang aman bagi bahan kering, sedangkan kurang dari 10 % adalah kadar air yang baik.

Pengukuran nilai kadar air serbuk simplisia kering daun *C. cainito* menggunakan *moisture content analyzer* disajikan pada tabel 5.1 berikut ini:

Tabel 5.1 Nilai kadar air simplisia kering daun *C. cainito*

Sampel	Replikasi	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Simplisia kering daun <i>C. cainito</i>	1	6,75 %	6,84 %
	2	6,53 %	
	3	7,25 %	

Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh nilai rerata sebesar 6,84 %. Dari nilai tersebut diketahui bahwa serbuk simplisia memiliki kadar air yang baik karena kurang dari 10 %. Hal ini diduga karena pengeringan pada proses preparasi simplisia telah dilakukan secara maksimal pada suhu yang konstan.

5.3 Ekstraksi Daun *C. cainito*

Ekstraksi daun *C. cainito* dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dipilih karena dapat mengekstraksi senyawa dengan baik dan dapat mencegah dekomposisi senyawa yang labil terhadap pemanasan. Adapun senyawa yang dibutuhkan pada penelitian kali ini adalah golongan flavonoid yang mempunyai sifat khas mudah terurai pada temperatur tinggi (Dinata, 2006).

Prinsip ekstraksi menggunakan maserasi yaitu adanya difusi cairan penyari ke dalam sel tumbuhan yang mengandung senyawa aktif. Difusi tersebut mengakibatkan perbedaan tekanan osmosis di dalam dan di luar sel sehingga senyawa aktif terdesak untuk keluar (Dean J 2009 dalam Budilaksono 2005). Pelarut yang sesuai untuk penelitian kali ini adalah etanol 70 %. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fatimatuz Zuhro (2015), ekstraksi daun *C. cainito* dengan pelarut etanol 70 % memiliki total flavonoid paling tinggi daripada etanol 50 % ataupun 96 %.



Gambar 5.3 Proses ekstraksi maserasi (A) dan ekstrak kering daun *C. cainito* (B)

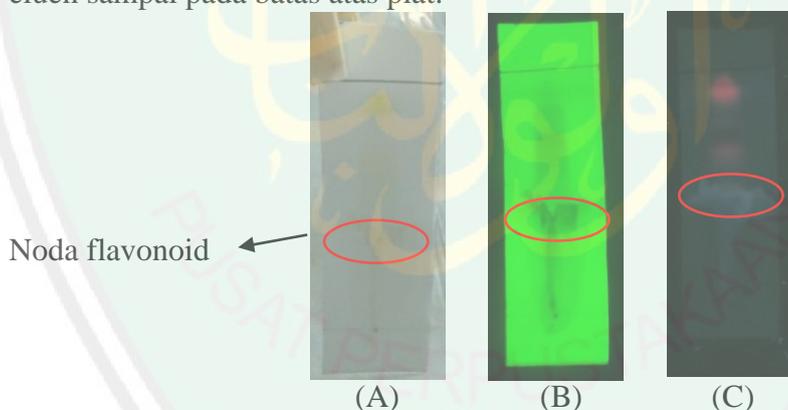
Pada proses ekstraksi maserasi diperoleh dua lapisan (Gambar 5.3 A). Lapisan bagian bawah adalah residu dari serbuk simplisia sedangkan lapisan bagian atas adalah filtrat yang mengandung senyawa aktif. Filtrat yang diperoleh kemudian ditampung dalam wadah terpisah. Ekstraksi ini dilakukan pengulangan sebanyak dua kali untuk mengangkat senyawa aktif yang diduga masih tertinggal dalam residu. Selanjutnya, filtrat yang terkumpul dari proses ekstraksi diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh berwarna kecoklatan dengan bentuk yang masih cair, agar diperoleh ekstrak kering (Gambar 5.3 B) maka dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C. Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen dan diperoleh nilai rendemen 13,92 % (lampiran 5).

5.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi senyawa flavonoid daun *C. cainito* dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). KLT merupakan suatu metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan ialah plat silika gel yang bersifat polar, plat KLT silika gel diaktifasi terlebih dahulu dengan cara dioven pada suhu 100°C selama 1 jam

untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT. Fase gerak yang digunakan eluen yaitu, campuran n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4:5:1. Kepolaran fase diam dan fase gerak hampir sama, tetapi masih lebih polar fase geraknya sehingga senyawa flavonoid yang dipisahkan terangkat mengikuti eluen, karena senyawa flavonoid bersifat polar (Sastrohamidjojo, 2007).

Campuran eluen fase gerak dapat digunakan apabila sudah dalam kondisi jenuh. Cara mengetahui eluen sudah jenuh atau belum dapat digunakan kertas saring untuk memeriksanya yaitu dengan membasahi kertas saring dengan uap eluen. Penjenuhan ini dilakukan selama 20-30 menit untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian *chamber* (Latifah, 2015). Setelah eluen jenuh, maka plat KLT yang ditotol sampel dimasukkan ke dalam *chamber* untuk dielusi hingga eluen sampai pada batas atas plat.



Gambar 5.4 Hasil uji KLT senyawa flavonoid daun *C. cainito* yang diamati secara visual (A), dibawah sinar UV 254 nm (B) dan sinar UV 366 nm (C)

Pengamatan yang dilakukan secara visual menunjukkan adanya noda kuning pada plat setelah diberi asam sulfat 10 %, noda kuning yang tampak diduga karena adanya senyawa flavonoid. Namun, untuk memastikan keberadaan senyawa tersebut, maka dilakukan pengamatan dibawah sinar UV 254 nm dan UV

366 nm. Pada sinar UV 254 nm tampak warna kehitaman, sedangkan pada sinar 366 nm tampak 3 noda yaitu merah, jingga dan biru muda berfluoresensi. Senyawa flavonoid akan menunjukkan warna kuning atau biru berfluoresensi ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm (Sani, 2014). Jadi dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* mengandung flavonoid dengan noda biru muda berfluoresensi dibawah sinar UV 366 nm.

5.5 Uji Aktivitas Peningkatkan Kepadatan Tulang Traberkular Vertebra

Mencit Betina yang Diinduksi Deksametason

Penelitian uji aktivitas ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan tulang traberkular vertebra dilakukan pada mencit betina yang telah diinduksi deksametason dengan tujuan sebagai model osteoporosis pada wanita pascamenopause.

Pada keadaan osteoporosis, kerusakan mikro arsitektur jaringan tulang berhubungan erat dengan proses *remodeling* tulang yaitu terjadinya abnormalitas *turnover* tulang. Pada *remodeling* tulang, proses yang terjadi diantaranya yaitu penyerapan tulang oleh sel osteoklas dan pembentukan tulang oleh sel osteoblas. Pada keadaan osteoporosis terjadi ketidakseimbangan antara osteoklas dan osteoblas atau dengan kata lain terjadi abnormalitas *turnover* tulang dimana proses penyerapan lebih dominan kemudian akan mengakibatkan penurunan massa tulang (Meeta, 2013).

Beberapa faktor yang berperan pada proses *remodeling* tulang yaitu hormon estrogen, sitokin, *growth factors* dan *Reseptor Activator of Nuclear Factor- κ Ligand* (RANKL)-*Reseptor Activator of Nuclear Factor- κ* (RANK)-

Osteoprotegerin (OPG) (Kawiyana, 2009). Faktor-faktor tersebut akan menjadi acuan peneliti terkait mekanisme yang terjadi pada tahap penginduksian dan terapi osteoporosis.

5.5.1 Penginduksian Osteoporosis

Kondisi osteoporosis dilakukan menggunakan deksametason 0,0029 mg/20g BB dengan volume 0,6 ml sehari satu kali selama 4 minggu pada mencit. Deksametason adalah salah satu kortikosteroid sintesis dengan aktivitas glukokortikoid yang sangat tinggi. Konsumsi obat ini selama 4 minggu pada mencit setara dengan 3-4 tahun penggunaan pada manusia (Manogalas, 2000 dalam Noor 2014; Brunton *et al.*, 2005). Padahal menurut Kemenkes RI (2015) penggunaan obat golongan ini dalam jangka waktu lebih dari 3-6 bulan dapat mengakibatkan terhambatnya proses pembentukan tulang pada osteoblas.

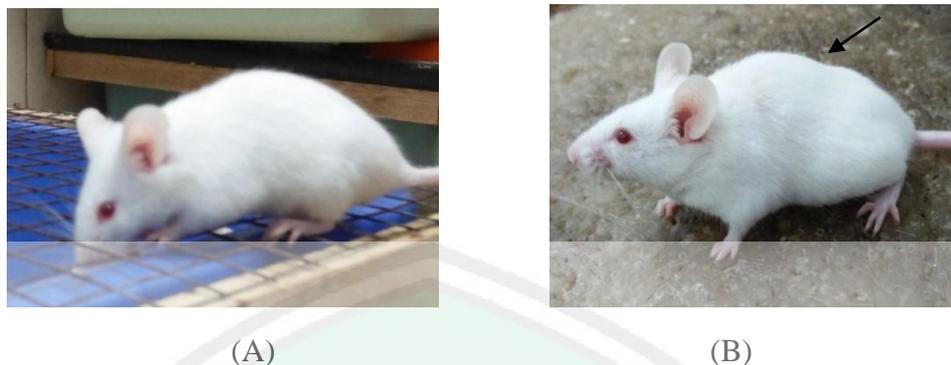
Terhambatnya proses pembentukan tulang pada osteoblas oleh glukokortikoid dapat dihubungkan dengan osteoklastogenesis akibat defisiensi estrogen seperti halnya kondisi yang terjadi pada wanita pascamenopause. Penggunaan obat glukokortikoid seperti deksametason apabila dilakukan dalam waktu yang lama dapat menurunkan estrogen secara terus-menerus yang memicu defisiensi estrogen. Proses yang terjadi cukup rumit. Obat ini secara langsung menyebabkan supresi hipofisis, kondisi ini akan berpengaruh pada produksi estrogen dalam tubuh karena kelenjar hipofisis anterior mensekresi hormon gonadotropin *lutensising hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) dimana LH menstimulir produksi androgen (prekursor estrogen) dan FSH menstimulasi perkembangan folikuler seperti *folikel de Graff* (GF) yang akan

mensekresikan estrogen (Lane, 1999; Hernawati, 2012). Jika supresi hipofisis oleh glukokortikoid terjadi, maka tubuh dimungkinkan tidak bisa memproduksi estrogen atau mengalami penurunan dalam produksinya.

Penurunan estrogen memicu peningkatan RANKL, sedangkan OPG mengalami penurunan. Ketika tubuh kekurangan estrogen maka akan terjadi ikatan antara RANKL dengan RANK. Apabila ikatan RANKL-RANK terbentuk pada proses *remodeling* tulang maka akan menghasilkan faktor osteoklastogenik *Nuclear Factor of Activated T Cell 1* (NFATC1) yang merupakan prekursor atau calon osteoklas. (Meeta, 2013).

OPG merupakan salah satu reseptor TNF yang yang diperlukan untuk mengimbangi proses osteoklastogenesis. OPG bekerja dengan cara berikatan dengan RANKL. Ketika OPG berikatan dengan RANKL maka RANK tidak bisa berikatan dengan RANKL sehingga tidak akan terjadi osteoklastogenesis karena calon osteoklas tidak terbentuk. Jadi, apabila OPG mengalami penurunan maka akan terjadi abnormalitas *turnover* karena proses osteoklastogenesis tidak dapat diimbangi sehingga proses resorpsi tulang oleh osteoklas lebih dominan daripada proses formasi tulang oleh osteoblas. Hal tersebut mengakibatkan kondisi osteoporosis dengan penurunan massa tulang (Meeta, 2013).

Pada penelitian ini, kondisi osteoporosis pada mencit ditunjukkan secara visual dengan adanya pembentukan kipotik yaitu keadaan tulang vertebra yang terlihat membungkuk kedepan (Gambar 5.5) yang merupakan indikasi terjadinya penurunan massa tulang (Fernandez, 2006; Meeta,2013; Laswati, 2015). Berikut gambar pengamatan osteoporosis secara visual:



Gambar 5.5 Mencit normal (A) dan osteoporosis (B). Perubahan postur vertebra menjadi kipotik ditunjukkan oleh anak panah (←)

Pemeriksaan Histofotometri Tulang Traberkular Vertebra

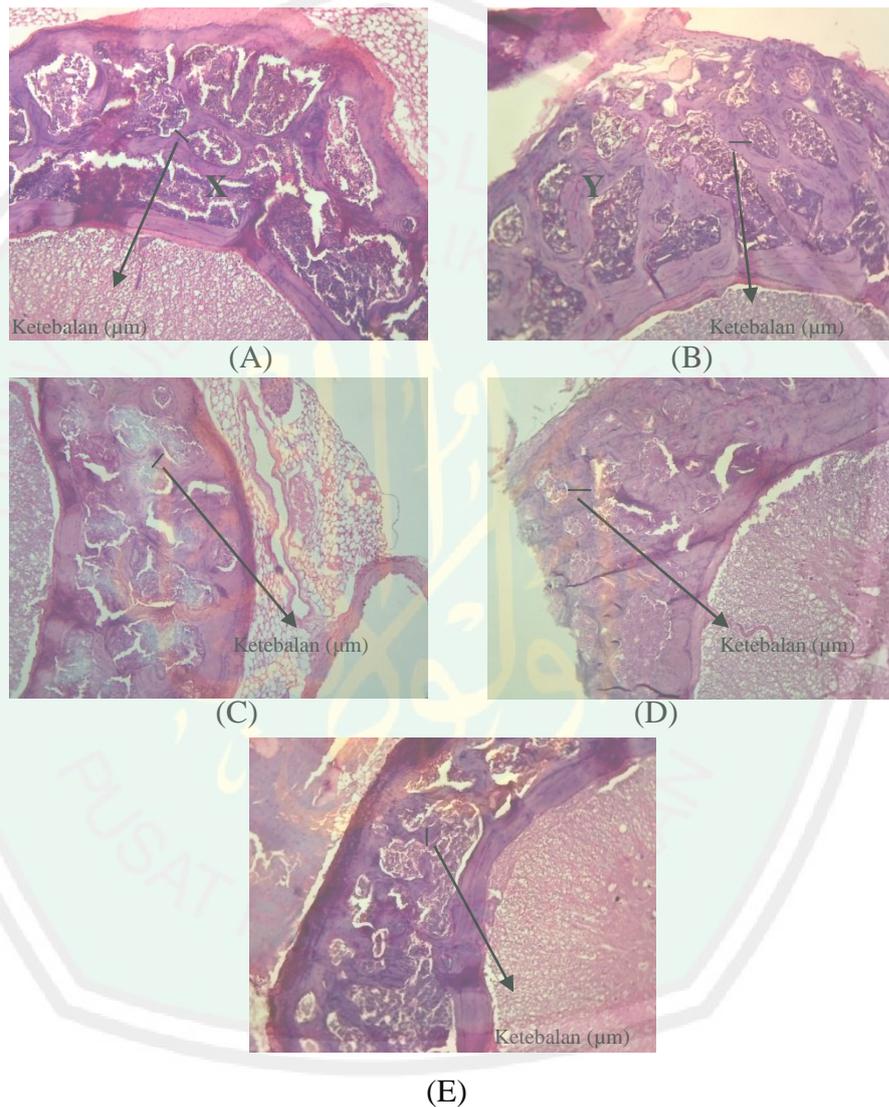
Pemeriksaan secara histofotometri dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan kepadatan tulang antara kelompok uji dan kelompok kontrol. Data yang digunakan adalah rerata ketebalan tulang traberkular vertebra dalam satuan μm (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Data rerata ketebalan tulang tiap kelompok (lampiran 2 f)

Kelompok Uji	Rerata Ketebalan Tulang (μm)
Kelompok 1 Terapi ekstrak etanol 70 % daun <i>C. cainito</i> 2 mg	288.91
Kelompok 2 Terapi ekstrak etanol 70 % daun <i>C. cainito</i> 4 mg	407.85
Kelompok 3 Terapi ekstrak etanol 70 % daun <i>C. cainito</i> 8 mg	549.71
Kelompok 4 sebagai kontrol positif	626.96
Kelompok 5 sebagai kontrol negatif	258.97

Berdasarkan hasil yang diperoleh terlihat bahwa kelompok 1,2,3 dengan terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 2 mg, 4 mg dan 8 mg dan kelompok 4 sebagai kontrol positif memiliki tulang yang lebih padat dibandingkan dengan kelompok 5 sebagai kontrol negatif, hal ini menunjukkan telah terjadi peningkatan kepadatan tulang setelah dilakukan terapi.

Pembuatan preparat histologi menggunakan teknik pengecatan Hemaktosilin dan Eosin (HE) dimana tulang yang keropos (X) dan padat (Y) ditunjukkan dengan berwarna yang berbeda. Adapun hasil pengamatan gambar histopatologi sebagai berikut:



Gambar 5.6 Histopatologi tulang trabekular vertebra mencit betina dengan perbesaran 100x. (A) Kelompok 1 terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 2 mg; (B) Kelompok 2 terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 4 mg; (C) Kelompok 3 terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 8 mg; (D) Kelompok 4 sebagai kontrol positif dan (E) Kelompok 5 sebagai kontrol negatif

5.5.2 Analisis data

Data rerata ketebalan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason dianalisis menggunakan metode ANOVA *one-way* dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95 % dari *software* IBM SPSS Statistic 23. ANOVA dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat uji parametrik yaitu nilai uji normalitas dan homogenitas *p-value* > 0,05.

Uji normalitas ketebalan tulang traberkular vertebra ini menggunakan *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 *P-value* uji normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	<i>P-value Shapiro-Wilk</i>	Keterangan
1	0.52	Normal
2	0.99	Normal
3	0.74	Normal
4	0.21	Normal
5	0.80	Normal

Berdasarkan tabel 5.3 diperoleh *p-value* kelima kelompok > 0,05, maka distribusi data dinyatakan normal. Setelah dinyatakan normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian menggunakan *Levene's test*. Hasil uji homogenitas varian pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 *P-value* uji homogenitas varian *Levene's test*

Kelompok	<i>P-value Levene's test</i>	Keterangan
1	0,08	Homogen
2		
3		
4		
5		

Berdasarkan tabel 5.4 diperoleh *p-value* kelima kelompok $> 0,05$, maka dapat diketahui bahwa varian data homogen. Setelah data dinyatakan normal dan homogen, maka analisis selanjutnya adalah analisis perbedaan dengan ANOVA *One-way*. Hasil uji perbedaan ANOVA *One-way* dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 *P-value* ANOVA *one-way*

Kelompok	<i>P-value</i> ANOVA <i>One-way</i>	Keterangan
1	0,00	Berbeda signifikan
2		
3		
4		
5		

Berdasarkan uji ANOVA *One-way* yang diperoleh, data memiliki signifikansi *p-value* $< 0,05$ artinya terdapat perbedaan signifikan ketebalan tulang traberkular vertebra antar kelompok. Analisis kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD). Nilai ketebalan tulang traberkular vertebra suatu kelompok dinyatakan berbeda signifikan dengan ketebalan tulang traberkular vertebra kelompok lainnya apabila memiliki *p-value* $< 0,05$. Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.6 dan secara lengkap dapat dilihat di lampiran 3.d

Tabel 5.6 Hasil uji LSD

Kelompok	1	2	3	4	5
1		BS*	BS*	BS*	-
2	BS*		BS*	BS*	BS*
3	BS*	BS*		-	BS*
4	BS*	BS*	-		BS*
5	-	BS*	BS*	BS*	

*BS= Berbeda Signifikan

Berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok, yaitu kelompok 1 terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito*

dosis 2 mg, kelompok 2 dosis 4mg, kelompok 3 dosis 8 mg, kelompok 4 sebagai kontrol positif dan kelompok 5 sebagai kontrol negatif.

a. Hasil uji LSD antara kelompok terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif

Pada kelompok terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* diberikan suspensi dengan dosis masing-masing 2 mg, 4 mg dan 8 mg (kelompok 1,2 dan 3) dengan volume 0,36 ml/20 g BB selama 4 minggu sebagai terapi herbal pada mencit betina yang menderita osteoporosis akibat induksi deksametason.

- **Hasil uji LSD antara kelompok terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dengan kelompok kontrol negatif**

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kepadatan tulang kelompok 2 (terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 4 mg) dan kelompok 3 (terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 8 mg) dengan kelompok 5 sebagai kontrol negatif dengan *P value* masing-masing 0,015 dan 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* pada dosis tersebut dapat meningkatkan kepadatan tulang. Sedangkan untuk kelompok 1 (terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 2 mg) dengan $P\ value = 0,568$ ($P\ value > 0,05$) tidak dapat meningkatkan kepadatan tulang karena tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok 5 sebagai kontrol negatif.

- **Hasil uji LSD antara kelompok terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dengan kelompok kontrol positif**

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 (terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 2 mg) dan kelompok 2

(terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 4 mg) dengan kelompok 4 sebagai kontrol positif dengan masing-masing *P value* 0,000 dan 0,002 ($p < 0,05$). Sedangkan untuk kelompok 3 (terapi ekstrak daun *C. cainito* dosis 8 mg) memiliki *P value*=0,139 ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* pada dosis tersebut tidak memiliki perbedaan signifikan.

Berdasarkan hasil uji LSD di atas, dapat diketahui bahwa suspensi yang diberikan pada kelompok 1 dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 2 mg tidak memberikan efek farmakologis sehingga tidak bisa digunakan untuk terapi. Pada kelompok 2 dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 4 mg telah memberikan efek farmakologis dengan meningkatkan kepadatan tulang. Pada kelompok 3 dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 8 mg memiliki efek farmakologis yang hampir sama dengan alendronat yang diberikan pada kelompok 4 sebagai kontrol positif dalam meningkatkan kepadatan tulang. Jadi, apabila ketiganya dibandingkan maka suspensi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 8 mg merupakan sediaan obat terapis yang paling baik daripada sediaan dengan dosis 2 mg atau 4 mg.

Setiap obat memiliki dosis efektif dalam penggunaannya sehingga dapat melakukan fungsinya secara optimal, sebagaimana dikaji dalam QS.al-Qamar /54:49

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٥٤﴾

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”(QS. al-Qamar /54:49).

Dalam tafsir Ath-Thabari (2010), ayat ini mencakup semua makhluk dan alam bagian atas maupun bawah. Dia menciptakannya dengan qadha' (qadar) yang telah diketahui-Nya, tertulis oleh pena-Nya, demikian pula sifat-sifat yang ada padanya dan bahwa yang demikian itu mudah bagi Allah. Berdasarkan ayat dijelaskan bahwa sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah (Shihab, 2002). Ukuran yang sesuai dengan hikmah juga dapat diartikan sebagai dosis yang sesuai menurut Allah SWT. Dosis yang sesuai menurut Allah SWT juga dapat berarti dosis yang tidak berlebihan atau sesuai dengan ukuran. Pada penelitian ini, konteks dosis yang digunakan adalah takaran suatu bahan berkhasiat yang mampu memberikan efek farmakologis yaitu suspensi yang diberikan pada kelompok 3 dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* dosis 8 mg.

Efek farmakologis yang berupa peningkatan kepadatan tulang vertebra pada mencit betina diduga akibat adanya khasiat estrogenik fitoestrogen dari daun tanaman *C. cainito*. Fitoestrogen merupakan substansi derivat tanaman yang secara struktural atau fungsional mirip seperti 17β -estradiol (E2). Khasiat estrogenik terjadi karena fitoestrogen juga memiliki 2 gugus -OH atau hidroksil yang berjarak 1,0-11,5 Å pada intinya, inilah yang menyebabkan memiliki afinitas tertentu untuk dapat "menduduki" *estrogen receptors* (Benassayag, 2002; Urasopon *et al.*, 2008).

Mekanisme fitoestrogen secara *in vitro* untuk pencegahan osteoporosis dengan merangsang aktivitas pembentukan sel osteoblas dan menghambat pembentukan osteoklas (Branca., 2003). Pada keadaan normal, estrogen menuju

ke osteoblas melalui reseptor estrogen *alpha* dan *betha* (ER- α dan ER- β) yang terdapat di dalam sitosol sel dan mengakibatkan penurunan sekresi sitokin seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α . Ketiga sitokin tersebut berfungsi terhadap penyerapan tulang, maka dalam hal ini estrogen dapat menurunkan aktivitas penyerapan tulang. Selain itu estrogen juga meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) yang merupakan *growth factor* yaitu mediator untuk menarik osteoblas ke dalam tulang untuk menutup lubang pada tulang akibat penyerapan oleh osteoklas dan terjadi peningkatan apoptosis dari sel osteoklas. Meski demikian, estrogen juga secara tidak langsung mempengaruhi osteoklas karena dengan terproduksinya TGF- β akan menginduksi osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Kawiyana, 2009; Meeta, 2013).

b. Hasil uji LSD antara kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif

Kelompok kontrol positif diberikan suspensi alendronat 0,026 mg dengan volume 0,36 ml/20 g BB. Alendronat merupakan bifosfonat yang digunakan untuk pengobatan penyakit osteoporosis. Obat ini juga merupakan anti-resorpsi, yaitu golongan obat yang mampu menghambat osteoklas (Dipiro *et al.*, 2014).

Pada kelompok 4 sebagai kontrol positif memiliki rerata kepadatan tulang paling tinggi (Gambar 5.6). Hasil statistik menggunakan uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok 4 sebagai positif dan kelompok 5 sebagai negatif dengan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$). Dengan demikian, diketahui bahwa alendronat paling efektif dalam meningkatkan kepadatan tulang pada penderita osteoporosis.

Efikasi alendronat terletak pada dua kunci yaitu kemampuannya dalam mengikat mineral tulang dan efek penghambatan terhadap osteoklas yang matur. Bifosfonat selektif mengikat mineral tulang, kemudian masuk dan menghambat osteoklas matur pada bagian resorpsi tulang (Bronner *et al*, 2007).



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason
- b. Dosis optimum ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan tulang traberkular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason adalah 8 mg

6.2 Saran

Diharapkan untuk peneliti selanjutnya dapat melakukan identifikasi senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam daun *C. cainito* dengan optimasi berbagai pelarut dan menguji aktivitas daun *C. cainito* terhadap penyakit lainnya yang dipengaruhi oleh hormon estrogen seperti jantung koroner pada wanita pascamenopause.

DAFTAR PUSTAKA

- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Jakarta: Depkes RI. Hal.10-11
- [IOF] International Osteoporosis Foundation. 2010. *Basic Bone Biology*. [terhubung berkala]. [http://www.International Osteoporosis Foundation.com](http://www.InternationalOsteoporosisFoundation.com) [5 Maret 2017]
- [USDA] United States Departemen of Agriculture. *Chrysopyllum cainito* L. Star Apple. <http://www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=CHCA10> [diakses tanggal 30 November 2016]
- Achadiat C. *Fitoestrogen untuk Wanita Menopause*. (online) 2003. <http://situs.kesrepro.info/aging/jul/2003/ag01htm>
- Adlercreutz H. 1999. Phytoestrogens.State of the art. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7, 201-207.
- Agoes. Goeswin. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: Penerbit ITB
- Agrawal, V dan Gupta. 2013. Recent Update On Osteoporosis. *Int J Med Sci Public Health*, II (2), 164-168
- Ahmed SF dan Elmantaser M. 2009. Secondary Osteoporosis. *Endocr Dev*, 16:90-170
- American Association of Clinical Endocrinologists. 2010. *American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines of Clinical Practice for the diagnosis and Treatment of Postmenopause Osteoporosis*. Endocrine Practice, p. 18-20.
- Anandya, Rizky. 2016. Uji Efektivitas Injeksi Alendronat Pada Defect Tulang Akibat Osteoporosis. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Anonim, 2014. https://www.researchgate.net/figure/260440945_fig1_Fig-1-Different-classes-of-phytoestrogens-Isoflavones-lignans-coumestans-and
- Anonim.2015. <http://www.arbamedia.com/2015/05/manfaat-khasiat-buah-kenitu.html>. 14 Maret 2017

- Baker, T.G. 1982. *Oogenesis and Ovulation*. In C.R. Austn and R.V. Short (Eds). *Reproduction in Mammals*. Cambridge University Press P.55-70
- Baron R., Ferrari S., and Russell R. Denosurnab and Bisphosphonates: Different Mechanisms of Action and Effects. *Bone*, 2011, 48:677-692
- Baziad A. 1999. Kesehatan Fisik Wanita Usia Lanjut. Makalah disajikan pada Seminar tentang Garis Besar Kebijakan Pengelolaan Lansia, Pertemuan Ilmiah Tahunan XI, Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia, Semarang
- Benassayag C, Perrot-Applanat M, Ferre F. 2002. *Phytoestrogen as Modulators of Steroid Action in Target Cells*. *J. Chromatogr. B* 777: 233-248
- Beral V. 2003. Breast Cancer and Hormon Replacement Therapy in Women Study. *The Lancet*, 362: 413-427 dalam Lestari, Beni, Naisbitt Iman Hanif, Ariska Deffy Anggarany, Thoriq Ziyad, Ziana Walidah, Retno Murwanti. *Potensi Biji Labu Kuning Sebagai Agen Fitoestrogen Pada Wanita Post Menstrual*. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada
- Blaus, Bruce. 2013. *Clasification of Bones by Shape*. Wikimedia
- Branca F. 2003. Dietary Phyto Oestrogens and Bone Health. *Proceeding of the Nutrition Society*, 877-887.
- Budilaksono, Widyo dkk. 2005. *Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga Merah (Hylocereus lemairei Britton dan Rose) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Difenil—Pikrilhidrazil)*
- Buhner . Stephen Harrold. 2007. *The Natural Testosterone Plan: for sexual health and energy*. Vermont: Healing Art Press
- Brunton LL. Goodman & Gilman's. 2005. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. San Diego: McGraw-Hill
- Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD. 2007. Insights into material and structural basis of bone strength and fragility from disease associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocr Rev* 28 : 151-164
- Cizza G., Primma S., and Csako G. Depression as a Risk Factor for Osteoporosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009, 20(8): 368-369
- Compston, Juliet. 2002. *Osteoporosis*. Jakarta: Dian Rakyat
- Corwin, Elizabeth. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Jakarta: EGC

- Cosman, Felicia. 2009. *Osteoporosis: Panduan Lengkap agar Tulang Anda Tetap Sehat*. Yogyakarta: B-First
- Dahlan, S. 2004. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Uji Hipotesis*. Jakarta: Bina Mitra Press
- Darmadi, Nurdiana dan Eviana Norahmawati. 2011. Efek Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Osteolas dan Osteoklas pada Tikus dengan Ovarektomi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang; vol. 26 No.3 (152)
- David, Reid M. 2011. *Handbook of Osteoporosis*. London: Springer Health Care Ltd. C. 2 & 7
- Dean, J. 2009. *Extraction Techniques in Analytical Science*. London: John Wiley and Sons LTD. Hal: 43-46
- Dinata. 2006. *Basmi lalat dengan jeruk manis*, (online)
- Dipiro J.T., Talbert R.L, Yee G.C., Matzke G.R, Wells B.G., and Possey L.M., 2014. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, 9th Ed., Mc Graw Hill, New York, p. 1482-1500
- D'Archivio, M., Carmela, F., Roberta, D, Raffaella, G., Claudio, G., dan Roberta, M. 2007. Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Annali Dell'istituto Superiore Sanita*, 43 (4): 348-361
- Farooqi, M.H.I. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam; Manfaat Tumbuhan Menurut Al-quran dan Sunnah Nabi*. Pnj. Ahmad Y. Samantho. Jakarta: PT Mizan Publika
- Ferguson, N. 2004. *Osteoporosis in Focus*. Chicago: Pharmaceutical Press
- Fernandez F. 2006. *Deep Tissue Massage Treatment A Handbook of Neuromuscular Therapy*, Mosby Elsevier. Kansas City
- Gamse T. 2002. *Liquid-liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction*. Graz University of Technology
- Goroll A.H and Mulley A.G. 2009. *Primary Care Medicine: Ofice Evaluation And Management of The Adult Patient*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1139

- Grippe A, Capps K, Rougeau B and Gurley BJ. 2007. *Analysis of flavonoid phytoestrogens in botanical and ephedra-containing dietary supplements*. *Ann Pharmacother*. 41:1375–82.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. (2002) Production and action of estrogens. *English Journal of Medicine* 346, 340-352
- Hafizuddin, Tongku N, Siregar dan Muslim Akmal. 2012. Hormon Dan Perannya Dalam Dinamika Folikuler Pada Hewan Domestik. *Jesbio Vol.I No.I November*. Prodi Peternakan Universitas Almuslim Bireuen
- Hamka. 2015. *Tafsir al-azhar*. Jakarta: Gema Insani
- Hanafiah K.A. 2004. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: PT raja Grafindo Persada
- Harrison M. and Woolrych., 2015. *Medicines for Woman*, Springer International Publishing, Switzerland, p. 348-349
- Harbone, J.B. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Cetakan II. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. 1987. Bandung : ITB
- Harbone JB. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: ITB Press. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Herlina, Eka Chandra. 2000. Hubungan Kontrasepsi Hormonal dengan Densitas Mineral Tulang Pada Wanita Menopause dan Pascamenopause. *Tesis*. Program Pendidikan Dokter Spesialis I, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
- Hernawati. Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari Tanaman Kedelai. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Imananta, Fadhila Putri. 2017. Perubahan Nilai Densitas Mineral Tulang (DMT) Pada Pasien Osteoporosis dan Osteopenia dengan Terapi Bisfosfonat. *Skripsi tidak dipublikasikan*. Malang: Universitas Brawijaya
- Junaidi, I, 2007. Osteoporosis - Seri Kesehatan Populer. Cetakan Kedua, Penerbit PT Bhuana Ilmu Populer
- Kawiyana I.K.S. Osteoporosis Patogenesis Diagnosis dan Penanganan Terkini. *J. Peny Dalam*, 2009, 10(2): 166

- Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1142/MENKES/SK/XII/2008. 2008. Jakarta
- Kementrian Kesehatan RI. 2015. *Indofatin Data dan Kondisi Penyakit Osteoporosis di Indonesia*, Pusat data dan informasi Kemenkes RI. Jakarta, hal.3
- Khopkar SM. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Saptorahardjo, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Basic Concept of Analytical Chemistry*
- Koffi, N., Amoikon, K. E., Tiebre, M. S., Kadja, B., dan Zirihi, G. N. 2009. Effect of Aqueous Extract of *Chrysophyllum cainito* Leaves on The Glycaemia of Diabetic Rabbits. *African Journal Pharmacy Pharmacology*, 3 (10): 501-506
- Kosnayani, Ai Sri. 2007. Hubungan Asupan Kalsium, Aktivitas Fisik, Paritas, Indeks Massa Tubuh dan Kepadatan Tulang Pada Wanita Pascamenopause. *Tesis*. Universitas Diponegoro Semarang
- Laksana, Toga. 2010. *Pembuatan Simplisia dan Standarisasi Simplisia*. Yogyakarta: UGM
- Lane NE. 1999. *The Osteoporosis Book a Guide for Patients and Their Families*. New York: Oxford University Press
- Lane, Nancy E. 2001. *Osteoporosis Petunjuk untuk Penderita dan Langkah-langkah Penggunaan bagi Keluarga*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada
- Laswati, Hening, Mangestuti Agil dan Retno Widyowati. 2015. Efek Pemberian *Spilanthes Acmella* dan Latihan Fisik Terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit yang Diinduksi Deksametason. *Media Litbangkes*, vol.25 No.1: 43-50
- Laswati, Hening, Hendi Hendaro, Dian Irawati dan Laba Mahaputra. 2015. Jus Tomat Meningkatkan Kepadatan Tulang Tikus Menopause. *Jurnal Veteriner*. Departemen Ilmu Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran Unair (Vol. 16 No. 3 : 457-462)
- Latifah. 2005. Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Anioksidan Pada ekstrak Rimpang Kencur *kaempferia galangal L.* dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia UIN Maliki
- Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald ED, Anderson JB, Clarke AC. (1976) Long Term Prevention of Postmenopausal Osteoporosis by Oestrogen. *Lancet* 1, 1038-1041.

- Lindsay R, Hart DM, MacLeah A, Clarke AG, Kraszewiski A, Garwood J. (1978) Bone response to termination of oestrogen treatment. *Lancet* 1, 1325-1327.
- Luo XD, Basile, MJ, dan Kennely, EJ, 2002. Polyphenolic Antioxidants from *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6): 1379-1382
- Mamonto, Siti Iqroma, Max Revolta John Runtuwene dan Frenly Wehantouw. 2014. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Buah Pinang Yaki (*Areca Vestiararia Giseke*) yang Diekstraksi Secara Soklet. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. Vol. 3 No. 3
- Manolagas S C. 2000. Birth and death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *EndocrineReviews* 21(2): 115-137
- Martin, T.J. and E. Seeman. 2007. New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. *Clin.Sci.* 112:77-91 Morton J, 1987.
- Meeta, 2013. *Postmenopause Osteoporosis basic and Clinical Consept*s. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, p. 2, 20-22
- Mills SE. 2007. *Histology for Pathologists*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins
- Morton. 1987. Star Apple Fruits of Warm Climates. *Miami Florida*. 408-410
- Mudjaddid.2003.<http://kesehatan.kompas.com/read/xml/2008/06/26/1912429/was> pada:de presi,pada lansia, kompas 2008. 15Maret 2017
- Muntiha, Mohamad. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin. *Balai Penelitian Veterine*. Bogor
- Noor, Zairin. 2014. *Buku Ajar: Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Jakarta: Salemba Medika
- Notoatmojo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta
- N'guessan, K. 2008. Plantes medicinales et pratiques medicalestraditionnelles chez les peuples Abbey et Krobou du Departement d'Agboville (Cote-d'Ivoire). These de Doctorat es Sciences Naturalles. *Universite de Cocody-Abidjan; U.F.R. Bioscience; Laboratoire de Botanique*. N' d'ordre, 561: 235.

- O'Connell M and Vondracek S. 2008. Chapter 93: Osteoporosis and Other Metabolic Disease. Dalam: J.T. Dipiro penyunt. *Pharmacotherapy a Pathophysiologic Approach*. 7th ed. US: The mc Graw-Hill Companies, Inch. P. 1483-1496
- Ososki A, Kennelly EJ. (2003) Phytoestrogens, a review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research* 17, 845-869.
- Papaioannou A., Morin S., Cheung A.M., Atkinson S., Brown J.P., Feldman S., *et al.*, 2010. *Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Osteoporosis in Canada: Background ang Technical Report*, Canadian Medical Association.
- Peters S. and Besse B., 2015. *New Therapeutich Strategies in Lung Cancers*, Springer International Publishing, Switzerland, p. 228
- Poppy, Maria. 2010. *Sistem Endokrin 2*. Jakarta: Poltekkes Kemenkes Jkt 11
- Praja, Dewangga Wahyu. 2014. Hubungan antara Usia, Boddy Mass Index dan Jenis Kelamin dengan Terjadinya Osteoporosis. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Universitas Brawijaya
- Pujianto, Sri.2008. *Menjelajah Dunia Biologi 2*.Tiga Serangkai. Solo : xii-324 hlm
- Putri, Liyas Atika. 2015. Aktivitas Inhibisi Alfa-Glukosidase Fraksi Etil Asetat Beberapa Varian Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito*) Daerah Jember Sebagai Antidiabetes. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember
- Rahmawati, Ririn. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides (L). Presl*) dan Binahong (*Anredera cordifolia (Ten.)Steenis*) terhadap Bakteri Streptococcus mutans. *Skripsi*. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Riis BJ. 1996. The Role of Bone turnover in The Pathophysiology of Osteoporosis. *Br J Obstet Gynaecol* 103 (Suppl 13):9-15
- Rogers, K. 2011. *Bone and Muscle: Structure, Force and Motion*. New York: Britannica Educational Publishing. P. 44-45
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Dasar-dasar Spektrosfotokopi*, edisi kedua, cetakan kedua. Jogjakarta: Liberty
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Press

- Samuelson DA. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Missouri: Saunders Elsevier
- Setijono, M.M. 1985. Mencit (*Mus musculus*) Sebagai Hewan Coba. *Tugas Akhir/skripsi* Tidak Diterbitkan. Fak. Kedokteran Hewan IPB
- Setyohadi B. 2009. Osteoporosis. In: Sudoyo WA, Setyohadi B, Alwi I, Simadibrata KM, Setati S. Editor. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Ed. 5*. Jakarta: Interna Publishing, 2009. Hal: 2650
- Setyorini A, Suandi I.K.G, Sidiartha I.G.L dan Sutyan W.B. Pencegahan Osteoporosis dengan Suplementasi Kalsium dan Vitamin D pada Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang. *Sari Pediatri*, 2009, 11(1): 32.
- Shaw N.J. Management of Osteoporosis in Children. *European Journal of Endocrinology*, 2008. 159: 34
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir al Misbah: Pesan Kesan dan Keserasian Al Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Stevens, Alan, Bancroft, John D. 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques: The Haematoxylin*. 3rd edition. Edinburgh: New York
- Suherman, Suharti K dan Purwentyasuti Ascobat. 2011. *Adrenokortikotropin, Adrenokortikosteroid, Analog-Sintetik dan Antagonisnya dalam Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Universitas Indonesia
- Supriadi D. 2008. Optimalisasi Ekstraksi Kurkuminaoid Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
- Tubaikh J.A.A., 2010. *Internal Medicine: An Illustrated Radiological Guide*, Springer, Berlin
- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008. "Preventive effects of Pueraria mirifica on bone loss in ovariectomized rats," *Maturitas*, vol. 59, no. 2, pp. 137–148.
- Walsh, J. 2014. *Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation*. Basic Science: Elsevier Ltd. P.1
- Waheed, Usman; Ansari, Asim. 2012. *Laboratory Techniques in Histopathology: A Handbook for Medical Technologies*. Pakistan: Lambert Academic Publishing

- Wardhana, Wisnu. 2012. Faktor-faktor Risiko Osteoporosis Pada Pasien dengan Usia Di Atas 50 Tahun. *Karya Tulis Ilmiah*. Semarang: universitas Diponegoro
- Wibowo, agus.2009. *Cerdas Memilih Obat dan Mengenal Penyakit*. Jakarta selatan: PT. Lingkar Pena Kreativa
- Wirakusuma E.S. 2007. *Mencegah Osteoporosis*. Penebar Plus. Jakarta: Hal 11
- Wulandari, Apriani Susilo. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Katuk terhadap Berat Uterus dan Tebal Endometrium pada Tikus Putih Menopause. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maliki
- Zuhro, F. 2015. Uji Aktivitas Inhibitor α -Glukosidase Ekstrak Etanol 70% Daun Kenitu. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas jember
- Zulaikhah, Siti. 2015. Uji Aktivitas, Polifenol dan Flavonoid Ekstrak Air, Aseton, Etanol beberapa Varian Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito L.*) dari Daerah Jember. Universitas Jember Fakultas Farmasi



LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1: Hasil Uji *Moisture Content* Simplisia Kering Daun *C. cainito*

a. Replikasi 1

Measured values and drying curve

End result **6.53%MC**
Duration 01:20 min



Comment: IME R2

Start weight	0.505 g
Dry Weight	0.472 g
Moisture Content	0.033 g

Method parameters and instrument data

Main parameter		Workflow handling	
Drying program	Standard	Start mode	Automatic
Drying temperature	105 °C		
Switch-off criterion	3(1mg/50s)		
Result and value handling			
Instrument data			
Type	HC103/01		
SNR (Drying unit)	B624595599	SNR (Terminal)	B624595599
SW (Drying unit)	1.20	SW (Terminal)	1.31
Last weight adjustment	14.06.2016 09:33	Last temperature adjustment	16.06.2016 11:44

b. Replikasi 2

Measured values and drying curve

End result **7.25%MC**
Duration 01:20 min



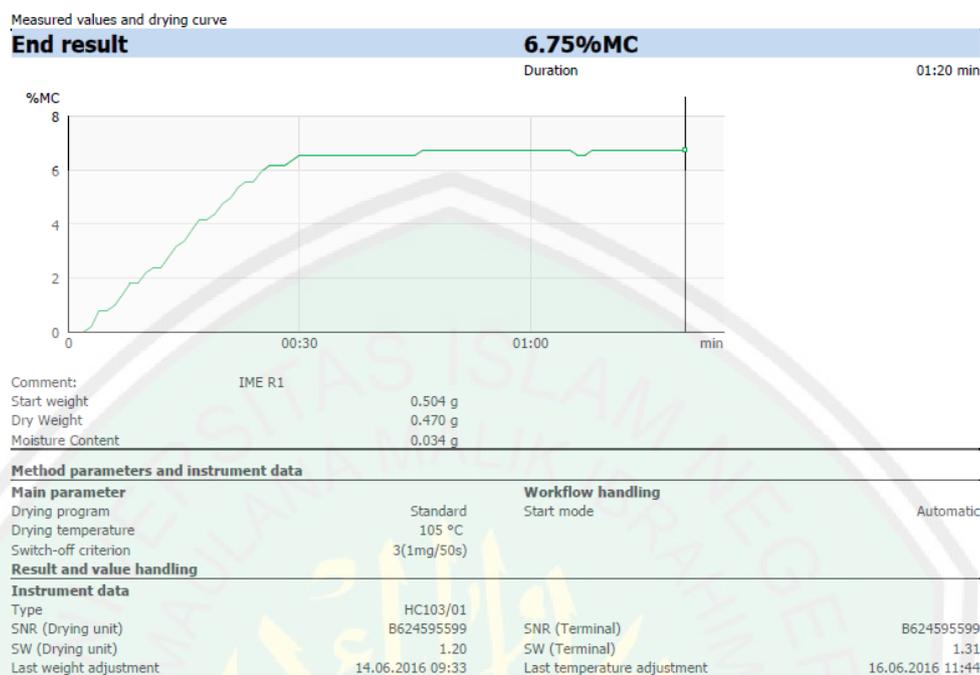
Comment: IME R3

Start weight	0.510 g
Dry Weight	0.473 g
Moisture Content	0.037 g

Method parameters and instrument data

Main parameter		Workflow handling	
Drying program	Standard	Start mode	Automatic
Drying temperature	105 °C		
Switch-off criterion	3(1mg/50s)		
Result and value handling			
Instrument data			
Type	HC103/01		
SNR (Drying unit)	B624595599	SNR (Terminal)	B624595599
SW (Drying unit)	1.20	SW (Terminal)	1.31
Last weight adjustment	14.06.2016 09:33	Last temperature adjustment	16.06.2016 11:44

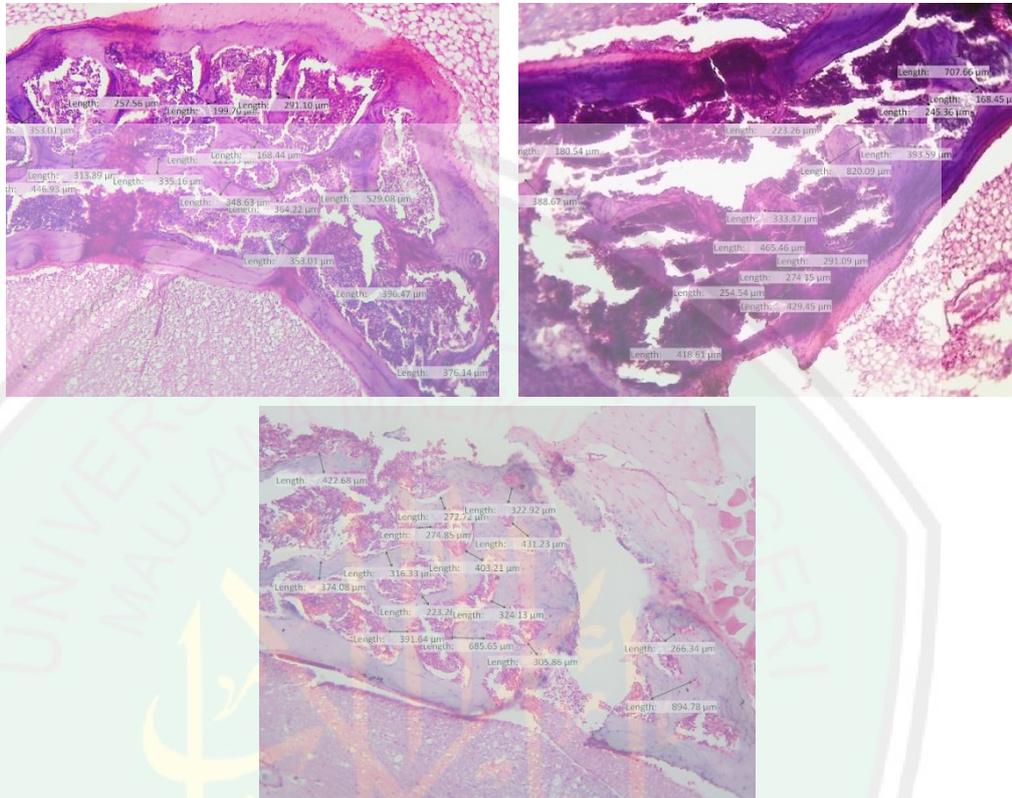
c. Replikasi 3

d. Rerata nilai kadar air simplisia kering daun *C. cainito*

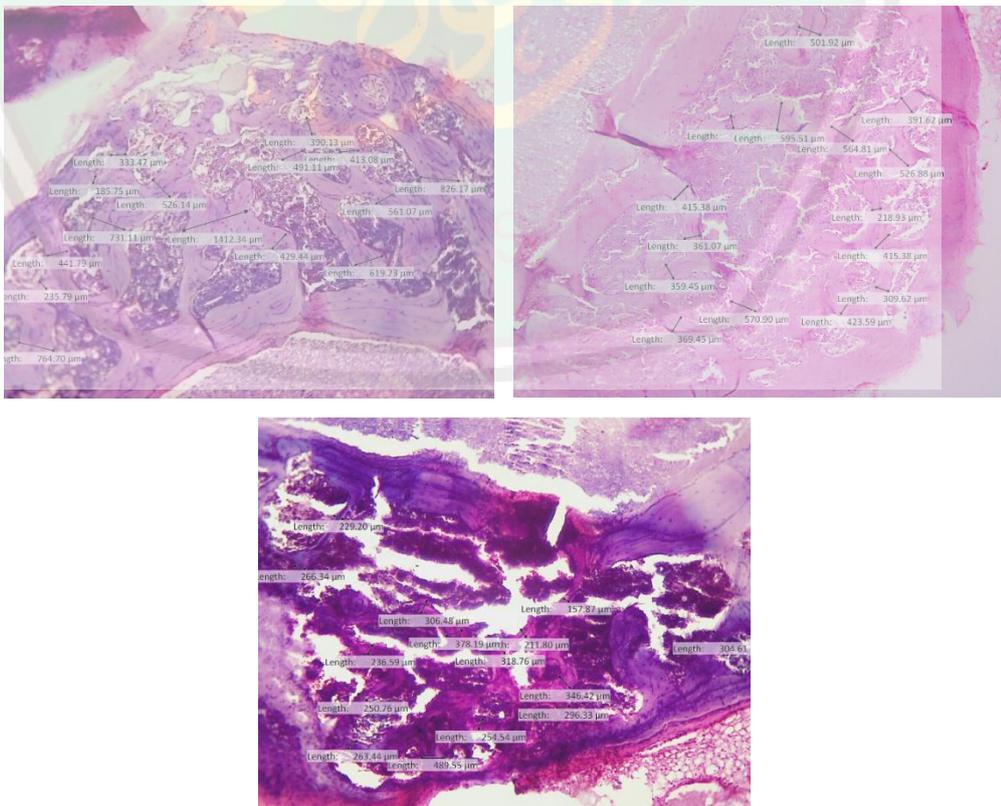
Sampel	Replikasi	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Simplisia kering daun <i>C. cainito</i>	1	6,75 %	6,84 %
	2	6,53 %	
	3	7,25 %	

Lampiran 2: Hasil Pembacaan Histofotometri dengan perbesaran 100x

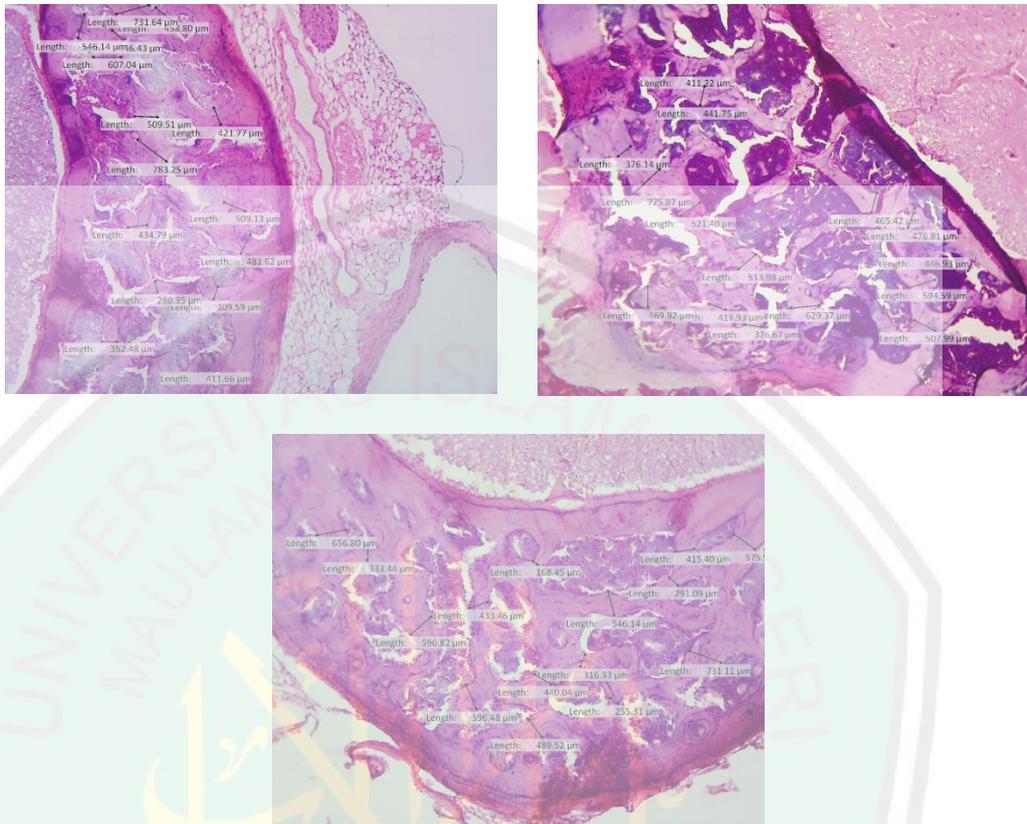
a. Kelompok 1 dengan terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 2 mg



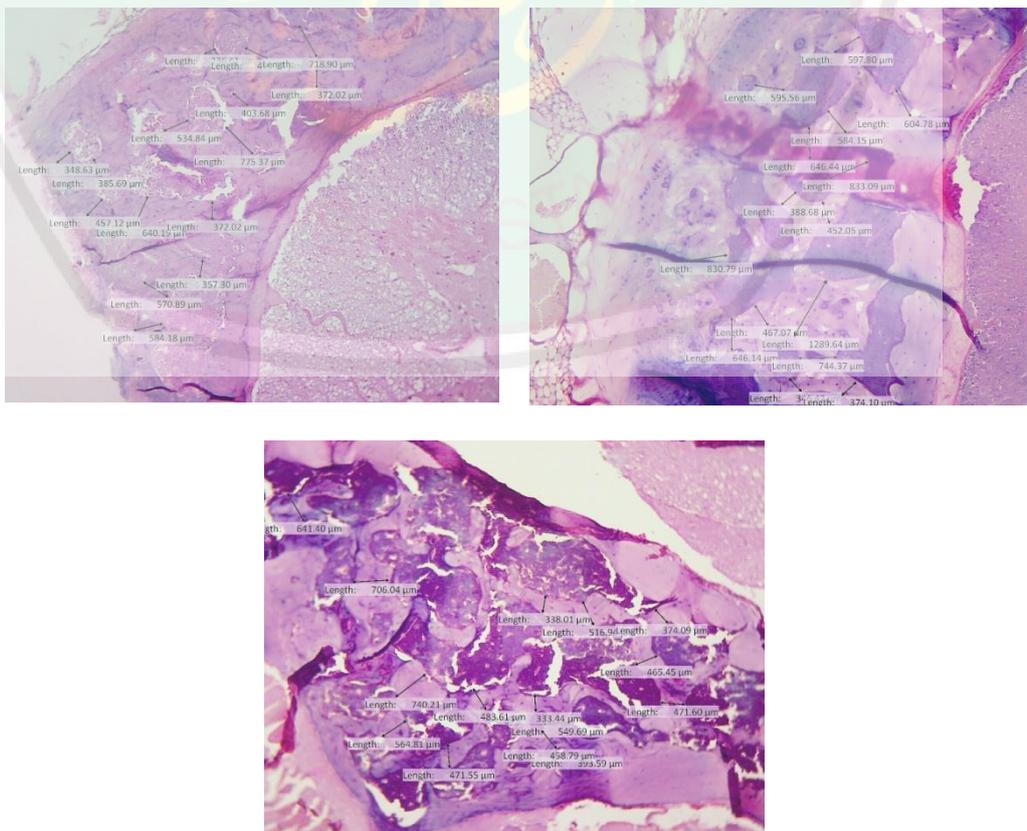
b. Kelompok 2 dengan terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 4 mg



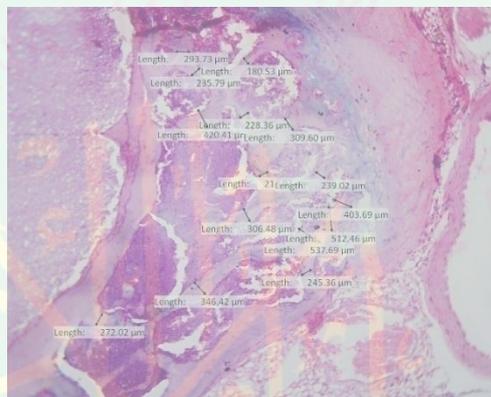
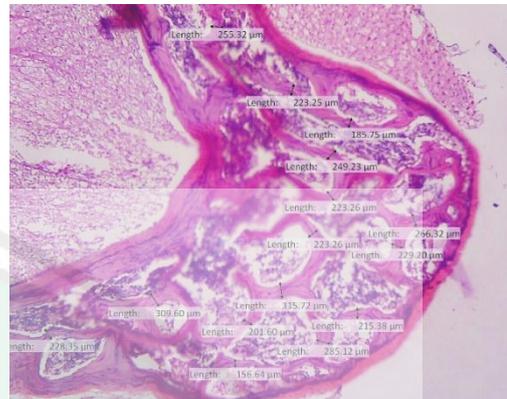
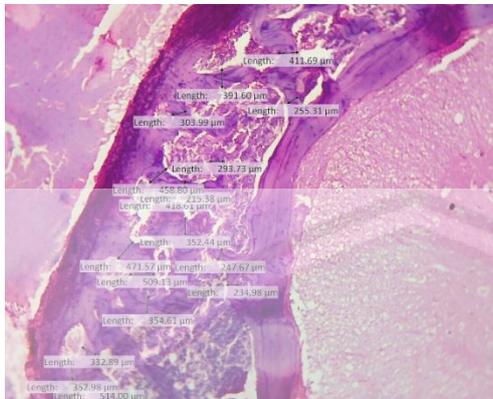
c. Kelompok 3 dengan terapi ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 8 mg



d. Kelompok 4 sebagai kontrol positif dengan terapi menggunakan alendronat



e. Kelompok 5 sebagai kontrol negatif



f. **Data ketebalan tulang** trabekular vertebra tiap kelompok dalam satuan um

No.	Kelompok 1		Kelompok 2		Kelompok 3		Kelompok 4		Kelompok 5						
1	353.01	180.54	374.08	441.79	415.38	266.34	731.64	775.87	656.8	718.9	597.8	641.4	255.31	223.25	293.73
2	313.89	388.67	272.72	731.11	361.07	306.48	458.8	521.4	433.46	499.24	595.56	706.04	303.99	185.75	180.33
3	257.56	254.54	274.85	333.47	359.45	378.19	546.14	513.98	596.82	403.68	604.78	516.94	293.73	249.23	235.79
4	335.16	274.15	316.33	526.14	369.45	254.54	546.43	469.92	596.48	534.84	584.15	740.21	215.38	223.26	228.36
5	199.7	291.09	223.26	390.13	391.62	263.44	607.04	629.37	415.4	775.37	646.44	483.61	352.44	223.26	309.6
6	221.53	333.47	391.64	413.08	526.88	489.55	509.51	465.42	546.14	640.19	833.09	549.69	247.67	229.2	218.92
7	348.63	393.59	305.86	491.11	415.38	318.76	783.25	476.81	731.11	570.89	830.79	564.81	234.98	215.38	239.02
8	291.1	223.26	324.13	561.07	309.62	346.42	509.13	446.93	440.04	457.12	1289.64	471.55	332.89	201.6	306.48
9	168.44	245.36	322.92	429.44	423.59	296.33	434.79	594.59	489.52	640.19	646.14	465.45	352.98	156.64	245.36
10	353.01	168.45	266.34	619.23	501.92	304.61	481.62	507.99	575	584.18	744.37	471.6	514	228.35	272.02
Total	2842.03	2753.12	3072.13	4936.6	4074.4	3224.66	5608.35	5402.3	5480.77	5824.6	7372.76	5611.3	3103.37	2135.92	2529.81
Rata-rata	284.203	275.312	307.213	493.66	407.44	322.466	560.835	540.23	548.077	582.46	737.276	561.13	310.337	213.592	252.981
Rata-rata total	288.91		407.85		549.71		626.96		258.97						

Keterangan:

Kelompok 1: Terapi ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* 2 mg

Kelompok 2: Terapi ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* 4 mg

Kelompok 3: Terapi ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* 8 mg

Kelompok 4: Kontrol positif dengan terapi alendronat

Kelompok 5: Kontrol negatif/tanpa perlakuan

Lampiran 3: Hasil Analisis Data

a. Uji normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ketebalan Kelompok 1	.279	3	.	.939	3	.522
Ketebalan Kelompok 2	.175	3	.	1.000	3	.992
Ketebalan Kelompok 3	.229	3	.	.981	3	.739
Ketebalan Kelompok 4	.345	3	.	.839	3	.212
Ketebalan Kelompok 5	.216	3	.	.989	3	.796

b. Uji homogenitas varian

Test of Homogeneity of Variances

Ketebalan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.875	4	10	.080

c. Uji ANOVA *One-way* (p= 0,05)

ANOVA

Ketebalan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	308127.202	4	77031.800	19.941	.000
Within Groups	38628.900	10	3862.890		
Total	346756.102	14			

d. Uji *Least Significant Difference* (LSD)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ketebalan

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok 1	Kelompok 2	-118.94367*	50.74702	.041	-232.0151-	-5.8723-
	Kelompok 3	-260.80400*	50.74702	.000	-373.8754-	-147.7326-
	Kelompok 4	-338.04600*	50.74702	.000	-451.1174-	-224.9746-
	Kelompok 5	29.93933	50.74702	.568	-83.1321-	143.0107
Kelompok 2	Kelompok 1	118.94367*	50.74702	.041	5.8723	232.0151
	Kelompok 3	-141.86033*	50.74702	.019	-254.9317-	-28.7889-
	Kelompok 4	-219.10233*	50.74702	.002	-332.1737-	-106.0309-
	Kelompok 5	148.88300*	50.74702	.015	35.8116	261.9544
Kelompok 3	Kelompok 1	260.80400*	50.74702	.000	147.7326	373.8754
	Kelompok 2	141.86033*	50.74702	.019	28.7889	254.9317
	Kelompok 4	-77.24200	50.74702	.159	-190.3134-	35.8294
	Kelompok 5	290.74333*	50.74702	.000	177.6719	403.8147
Kelompok 4	Kelompok 1	338.04600*	50.74702	.000	224.9746	451.1174
	Kelompok 2	219.10233*	50.74702	.002	106.0309	332.1737
	Kelompok 3	77.24200	50.74702	.159	-35.8294-	190.3134
	Kelompok 5	367.98533*	50.74702	.000	254.9139	481.0567
Kelompok 5	Kelompok 1	-29.93933-	50.74702	.568	-143.0107-	83.1321
	Kelompok 2	-148.88300*	50.74702	.015	-261.9544-	-35.8116-
	Kelompok 3	-290.74333*	50.74702	.000	-403.8147-	-177.6719-
	Kelompok 4	-367.98533*	50.74702	.000	-481.0567-	-254.9139-

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

Keterangan:

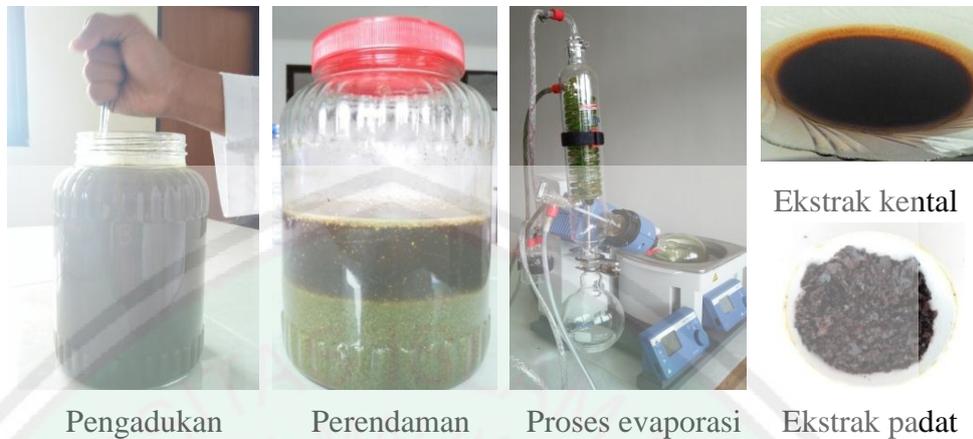
Kelompok 1: Terapi dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 2 mgKelompok 2: Terapi dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 4 mgKelompok 3: Terapi dengan ekstrak etanol 70 % daun *C. cainito* 8 mg

Kelompok 4: Terapi dengan alendronat sebagai kontrol positif

Kelompok 5: Tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif

Lampiran 4: Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian

a. Ekstraksi daun *C. cainito*



Pengadukan

Perendaman

Proses evaporasi

Ekstrak kental

Ekstrak padat



Oven yang digunakan untuk menguapkan sisa air yang masih terkandung dalam ekstrak kental

b. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Aktifasi plat KLT dalam oven dengan suhu 100°C selama 1 jam

Alat sinar UV 254 nm dan 366 nm digunakan untuk mengamati noda pada plat sebelum dan setelah disemprot penampak noda



Proses elusi
batas atas plat



Eluen sampai pada



Alat semprot KLT

c. Perlakuan Hewan Coba



Penimbangan mencit



Aklimatisasi dalam lingkungan laboratorium



Pencekohan saat perlakuan



Anestesi inhalasi
dengan kloroform



Alat dan papan untuk fiksasi
Mencit



Proses pembedahan



Tulang traberkular vertebra dalam formalin 10 %



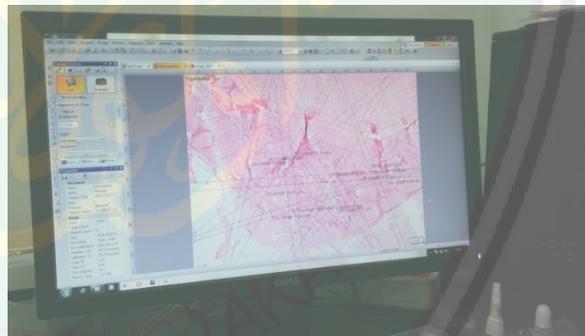
Hasil pemblokkan pada tulang traberkular vertebra menciit



Hasil preparat dengan pewarnaan HE



Pengamatan preparat (slide)



Pembacaan ketebalan tulang pada komputer yang terhubung dengan mikroskop

Lampiran 5: Perhitungan

a. Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \% \\ &= \frac{69,62 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 13,92 \% \end{aligned}$$

b. Perhitungan eluen n-butanol: air: asam asetat (4:5:1)

$$\begin{aligned} \text{n-butanol} &= \frac{4}{10} \times 4 \text{ ml} = 1,6 \text{ ml} \\ \text{Air} &= \frac{5}{10} \times 4 \text{ ml} = 2 \text{ ml} \\ \text{Asam asetat} &= \frac{1}{10} \times 4 \text{ ml} = 0,4 \text{ ml} \end{aligned}$$

c. Perhitungan H₂SO₄ 10 %

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

$$10 \% \times 25 \text{ ml} = 100 \% \times V_2$$

$$2,5 \text{ ml} = V_2$$

