

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl.) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABEKULAR FEMUR PADA MENCIT (*Mus musculus* L.)
JANTAN**

SKRIPSI

Oleh :
KURNIAWAN HIDAYAT PERDANA PUTRA
NIM. 14670030



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl.) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABEKULAR FEMUR PADA MENCIT (*Mus musculus* L.)
JANTAN**

SKRIPSI

Oleh :
KURNIAWAN HIDAYAT PERDANA PUTRA
NIM. 14670030

Diajukan kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN AN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl.) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABEKULAR FEMUR PADA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN**

SKRIPSI

Oleh :
KURNIAWAN HIDAYAT PERDANA PUTRA
NIM. 14670030

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 7 November 2018

Pembimbing I

Pembimbing II



Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm, Apt.
NIP. 19900221 20170101 1 124



Weka Sidha Bhagawan, M.Farm., Apt.
NIP. 19881124 20160801 1 085

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi



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

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl.) TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN
TULANG TRABEKULAR FEMUR PADA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN**

SKRIPSI

Oleh:
KURNIAWAN HIDAYAT PERDANA PUTRA
NIM. 14670030

Telah dipertahankan di depan dewan penguji skripsi
dan dinyatakan diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar sarjana farmasi (S.Farm)
Tanggal: 7 November 2018

Ketua Penguji : Weka Sidha Bhagawan, M.Farm., Apt. (.....)
NIP. 19881124 20160801 1 085

Anggota penguji : 1. Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm., Apt. (.....)
NIP. 19900221 20170101 1 124

2. Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt. (.....)
NIP. 19800203 200912 2 003

3. Abdul Hakim, S.Si., M.PI., Apt. (.....)
NIP. 19761214 200912 1 002

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Farmasi



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

LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'aalamiin

Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT beserta shalawat dan salam kepada nabi Muhammad SAW sehingga bias terselesaikannya skripsi ini. Dengan rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan tulisan karya sederhana ini kepada:

Kedua orang tua, ayahanda tercinta Zainul Rozak dan ibunda tercinta Suhartatik yang senantiasa menyeebut nama penulis dalam setia doa yang dipanjatkan, memberi motivasi, dukungan dalam segala bentuk, semangat dan kasih sayang yang tak pernah putus sehingga penulis dapat menempuh pendidikan sarjana dengan lancar. Ketiga adik yang tercinta R.M.T.M. Nasyrudin, R.M.T.M. Abdulrozak dan M. Farid Fatrchurrozak yang telah mendukung dan mendoakan selama ini.

Keluarga Besar H.Abdurrochman atas barokah doanya, Alhamdulillah.

Terimakasih tak terhingga kepada sahabat, teman-teman tersayang farmassi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, dan teman-teman proyek Fitoestrogen telah memberikan semangat dan warna selama menempuh perkuliahan. Tak cukup kata-kata untuk menggambarkan perjuangan yang telah ditempuh, kecuali rasa syukur yang penulis panjatkan kepada Allah SWT atas kehadiran kalian. Semoga senantiasa dipertemukan dalam kebaikan. Selamat dan sukses selalu untuk teman-teman.

Kepada semua pihak yang telah memebantu terselesainya skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Kurniawan Hidayat Perdana Putra / 14670030

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Kurniawan Hidayat Perdana Putra

NIM : 14670030

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea crenata C. Presl.*) terhadap Peningkatan Ketebalan Tulang Trabekular Femur pada Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan

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

Malang, 16 November 2018

Yang membuat pernyataan,



Kurniawan Hidayat Perdana Putra

NIM. 14670030

MOTTO

“TALK LESS, DO MORE”

“DIBALIK KERJA KERAS ADA HASIL YANG BAIK”



KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis haturkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus musculus* L.) Jantan**” dengan baik. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita baginda Rasulullah Muhammad SAW yang telah membawa ajaran agama islam kepada umatnya sehingga kita dapat membedakan hal yang haq dan yang bathil. Skripsi ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program Strata-1 (S-1) di Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Seiring terselesaikannya penyusunan skripsi ini, saya haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya proposal skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt selaku ketua Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Bapak Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm., Apt. dan Bapak Weka Sidha Bhagawan, M.Farm., Apt. selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
3. Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt. selaku dosen penguji utama.

4. Terima kasih untuk ayahanda Zainul Rozak dan ibunda Suhartatik yang selalu mendoakan dan mendukung selama perkuliahan dan dapat menyelesaikan skripsi ini
5. Keluarga besar “Kurniawan Hidayat Perdana Putra” tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
6. Terima kasih kepada saudari Janita Putri Meiyana Ermansyah yang telah mendukung, membimbing dan mensupport dalam menyusun skripsi ini
7. Terima kasih kepada teman-teman proyek fitoestrogen dan teman-teman angkatan *Platinum generation* yang selama ini sudah berjuang bersama
8. Terimakasih pada semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 16 November 2018

Penulis

Kurniawan Hidayat Perdana Putra

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
LEMBAR PERSEMBAHAN	
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	
MOTTO	
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	vii
ABSTRAK	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Masalah	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tinjauan tentang Tumbuhan sebagai Obat dalam Prespektif Islam	7
2.2 Tinjauan Semanggi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl.).....	8
2.2.1 Klasifikasi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl.)	9
2.2.2 Penyebaran dan Tempat Tumbuh	9
2.2.3 Habitus dan Morfologi	10
2.2.4 Kandungan	10
2.2.5 Kegunaan	11
2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi	11
2.3.1 Definisi Ekstraksi.....	11
2.3.2 Jenis-Jenis Ekstraksi	12
2.4 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	16
2.5 Tinjauan tentang Tulang	17
2.5.1 Klasifikasi Tulang.....	20

2.5.2 Tulang Trabekular Femur	21
2.6 Tinjauan Tentang Osteoporosis	23
2.7 Tinjauan Tentang <i>Remodelling</i> Tulang.....	25
2.8 Tinjauan Tentang Fitoestrogen	26
2.9 Tinjauan Tentang Golongan Senyawa Metabolit Skunder	27
2.9.1 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Saponin	27
2.9.2 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Terpenoid	29
2.9.3 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Flavonoid	29
2.10 Tinjauan Tentang Mencit (<i>Mus musculus L.</i>)	30
2.11 Tinjauan Tentang Histomorfometri	31
2.12 Tinjauan tentang <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA)	32
2.13 Tinjauan tentang Indeks Terapi.....	33
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	34
3.1 Skema Kerangka Konseptual	34
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	35
3.3 Hipotesis Penelitian	36
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian	37
4.2 Waktu Dan Tempat Penelitian	37
4.3 Populasi Dan Sampel	38
4.3.1 Populasi.....	38
4.3.2 Sampel.....	38
4.3.2 Teknik Pengambilan Sampel	38
4.4 Variabel penelitian	38
4.4.1 Variabel Bebas	38
4.4.2 Variabel Tergantung	38
4.4.3 Variabel Kontrol	39
4.5 Definisi Operasional	39
4.6 Alat Dan Bahan Penelitian.....	40
4.6.1 Bahan Tanaman.....	40
4.6.2 Bahan Hewan Coba.....	40
4.6.3 Bahan Kimia	41
4.6.4 Instrumen Penelitian	41
4.7 Prosedur Penelitian	42
4.7.1 Penyiapan Bahan Tanaman.....	42

4.7.2	Prosedur Ekstraksi.....	42
4.7.3	Uji Etik dan Standarisasi Ekstrak.....	43
4.7.4	Skrining Fitokimia dengan KLT	43
4.7.5	Uji Aktivitas Antiosteoporosis.....	44
4.8	Analisa Data.....	54
4.8.1	Analisa Data Pengamatan Histologi Tulang dengan Metode ANOVA	54
4.8.2	Penentuan Dosis Efektif (ED ₅₀)	56
4.9	Alur Penelitian	57
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		58
5.1	Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman	58
5.2	Pengukuran Nilai Kadar Air	59
5.3	Pembuatan Ekstrak.....	59
5.4	Skrining Fitokimia	62
5.5	Perlakuan dan Pembuatan Preparat.....	66
5.6	Analisa Data Pengukuran Ketebalan Tulang	72
5.7	Mekanisme Aktivitas Senyawa Fitoestrogen	77
5.8	Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen dalam Perspektif Islam	84
BAB VI PENUTUP		87
6.1	Kesimpulan	87
6.2	Saran	87
DAFTAR PUSTAKA		88
LAMPIRAN-LAMPIRAN		94

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Jumlah Herba <i>M.crenata</i>	58
Tabel 5.2 Nilai Kadar Air Serbuk Kering Herba <i>M.crenata</i>	59
Tabel 5.3 Hasil Ekstraksi Herba <i>M.crenata</i>	62
Tabel 5.4 Hasil Uji Reaksi Warna Skrining Fitokimia	63
Tabel 5.5 Rincian Profil KLT Ekstrak Etanol 96% Herba <i>M.crenata</i>	66
Tabel 5.6 Data Rerata Total Ketebalan Tulang Tiap Kelompok Uji	72
Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	73
Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's Test</i>	74
Tabel 5.9 Hasil Uji <i>One-Way ANOVA</i>	74
Tabel 5.10 Hasil Uji <i>Least Significant Difference (LSD)</i>	75
Tabel 5.11 Hasil Uji <i>Chi-Square</i>	76
Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas Uji <i>Chi-Square</i>	77

DAFTAR GAMBAR

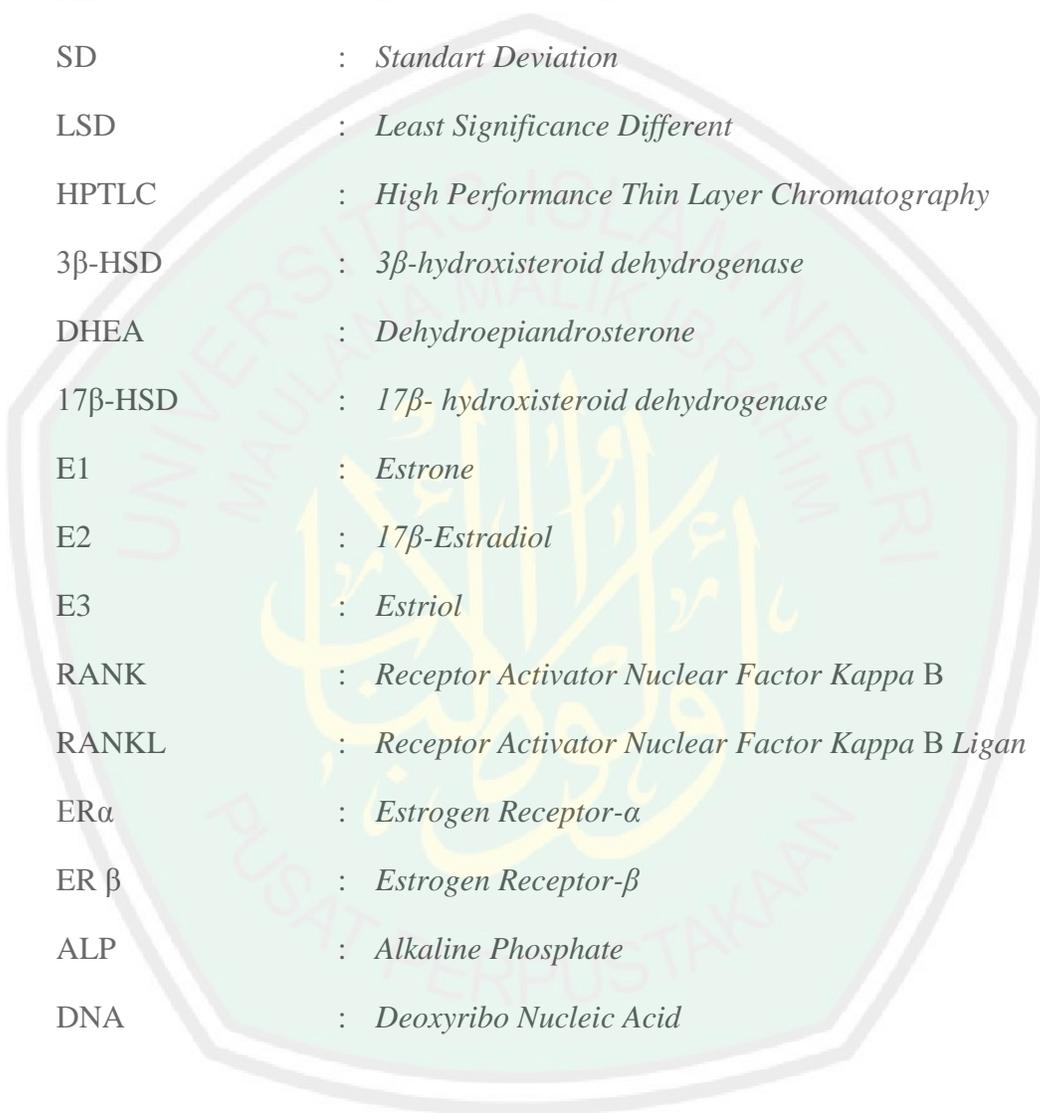
Gambar 2.1 <i>Marsilea crenata</i> Presl	9
Gambar 2.2 TLC <i>Visualizer</i> dan UV <i>Lamp with View Box</i>	17
Gambar 2.3 Struktur Tulang Trabekular Femur	22
Gambar 2.4 Perbedaan Tulang Normal dengan Osteoporosis	24
Gambar 2.5 Proses Mekanisme <i>Remodelling</i> Tulang	26
Gambar 2.6 Struktur dasar Saponin Steroid	28
Gambar 2.7 Struktur dasar Senyawa Terpenoid	29
Gambar 2.8 Struktur dasar Senyawa Flavonoid	30
Gambar 2.9 Rumus <i>One Way</i> ANOVA	32
Gambar 2.10 Rumus <i>Two Way</i> ANOVA	33
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual	34
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian	57
Gambar 5.1 Hasil ekstrak kental etanol 96% herba <i>M.crenata</i>	61
Gambar 5.2 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan <i>TLC Visualizer</i>	65
Gambar 5.3 Mencit Normal dan Osteoporosis	67
Gambar 5.4 Contoh Hasil Preparat Jaringan Tulang Trabecular Femur ...	70
Gambar 5.5 Pengukuran Ketebalan Tulang	71
Gambar 5.6 Grafik Pengukuran Ketebalan Tulang	72
Gambar 5.7 Sintesis Estrogen	79
Gambar 5.8 Mekanisme Fitoestrogen pada Remodeling Tulang	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman <i>M.crenata</i>	95
Lampiran 2. Etik Prosedural Penelitian.....	96
Lampiran 3. Hasil Uji <i>Moisture Content</i>	97
Lampiran 4. Hasil Skrining Fitokimia “Uji Reaksi Warna”	99
Lampiran 5. Hasil <i>TLC Visualizer</i> Ekstrak herba <i>M.crenata</i>	103
Lampiran 6. Hasil Pembacaan Histomorfometri	108
Lampiran 7. Data Hasil Pengukuran Kepadatan Tulang Trabekular Femur	112
Lampiran 8. Hasil Analisa Data	114
Lampiran 9. Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian	119
Lampiran 10. Perhitungan Rendemen dan Dosis	121

DAFTAR SINGKATAN

SULTE1	: <i>Sulfotransferase Enzyme</i>
ED ₅₀	: <i>Effective Dose 50</i>
ED ₉₉	: <i>Effective Dose 99</i>
LD ₅₀	: <i>Letal Dose 50</i>
Nilai Rf	: Nilai Faktor Retardasi
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
UV lamp	: <i>Ultraviolet lamp</i>
CFU	: <i>Colony Formation Unit</i>
CFU-GM	: <i>Colony Formation Unit-Garanulosit Makrofag</i>
CFU-F	: <i>Colony Formation Unit-Fibrosit</i>
O-DMA	: <i>O-desmetilangolesin</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-2	: <i>Interleukin-2</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-7	: <i>Interleukin-7</i>
IGF I	: <i>Insulin Growth Factor-I</i>
IGF II	: <i>Insulin Growth Factor-II</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenic Proteins</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>



BB	: Berat Badan
tr	: <i>Treatment</i>
r	: <i>Replication</i>
HE	: <i>Hematoxilin dan Eosin</i>
SD	: <i>Standart Deviation</i>
LSD	: <i>Least Significance Different</i>
HPTLC	: <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
3 β -HSD	: <i>3β-hydroxisteroid dehydrogenase</i>
DHEA	: <i>Dehydroepiandrosterone</i>
17 β -HSD	: <i>17β- hydroxisteroid dehydrogenase</i>
E1	: <i>Estrone</i>
E2	: <i>17β-Estradiol</i>
E3	: <i>Estriol</i>
RANK	: <i>Receptor Activator Nuclear Factor Kappa B</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator Nuclear Factor Kappa B Ligan</i>
ER α	: <i>Estrogen Receptor-α</i>
ER β	: <i>Estrogen Receptor-β</i>
ALP	: <i>Alkaline Phosphate</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>

ABSTRAK

Putra, Kurniawan Hidayat Perdana. 2018. **Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus Musculus*) Jantan.** *Skripsi*. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I)Burhan Ma'arif ZA., M.Farm., Apt. (II)Weka Sidha Bagawan, M.Farm., Apt. Penguji:Dr.Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.

Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur atau fungsi yang sama seperti estrogen. Defisiensi estrogen menyebabkan penyakit *degenerative* seperti osteoporosis, dimana terdapat penurunan masa kepadatan tulang. *Marsilea crenata* C. Presl. diduga mengandung senyawa fitoestrogen dan dapat dijadikan sebagai *hormone replacement therapy*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dan dosis efektif dari ekstrak etanol 96% *M.crenata* pada peningkatan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan. Uji aktivitas dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol 96% *M.crenata* dengan dosis 1,2; 2,4; 4,8 dan 9,6 mg/BB mencit/hari yang telah diinduksi deksametason 0,0029 mg/BB mencit/hari selama 4 minggu sebagai model osteoporosis, dan pemberian alendronate 0,0026 mg/BB mencit/hari sebagai kontrol positif. Analisa pengamatan peningkatan kepadatan tulang trabekular femur mencit menggunakan metode pewarnaan histologi Hematoxylin dan Eosin (HE). Analisa statistic menggunakan *One-Way ANOVA* dan untuk dosis efektif menggunakan uji LSD dan analisis probit. Hasil menunjukkan bahwa pemberian variasi dosis meningkatkan kepadatan tulang dan dosis efektif ditunjukkan pada nilai (ED₅₀ dan ED₉₉) secara berturut-turut yaitu 1,908 mg dan 1,451 mg.

Kata kunci: *Marsilea crenata* C. Presl., Kepadatan Tulang, Tulang Trabekular Femur

ABSTRACT

Putra, Kurniawan Hidayat Perdana. 2018. **Activity of 96% ethanol extract Herb Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl.) to increase of trabecular femure bone in male mice (*Mus Musculus*)** . Thesis. Departement of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Science , Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Mentors: (I) Burhan Ma'arif ZA., M.Farm., Apt. (II) Weka Sidha Bagawan, M.Farm., Apt. Consultant : Dr.Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.

Phytoestrogen is a group of estrogen-like substances that can replace the estrogen function in the body. Estrogen deficiency caused degenerative diseases like osteoporotic that happened of bone loses. *Marsilea crenata* Presl. As known semanggi had phytoestrogen compounds that can be hormone replacement therapy. The aim of this research was to know the activity and effective dose of 96% ethanol extract herb *M.crenata* to increase trabecular femur bones in male mice. An activity and effective dose was identified by using four doses of 96% ethanol extract herb *M.creanata* which are 1,2; 2,4; 4,8 and 9,6 mg/BB mice/day in 4 weeks after induced by dexamethasone 0,0029 mg/BB mice/day in 4 weeks as osteoporotic model and induction of alendronate 0,026 mg/BB mice/day as positive control. The trabecular femur bones density were measured by using hematoxylin and Eosin (HE) staining methods and statistical analyses were using One-Way ANOVA, followed by LSD test and probit analysis. The result of this research is all of doses variance had activity and the effective dose value (ED₅₀ and ED₉₉) obtained were 1,908 mg and 1,451 mg.

Keyword: *Marsilea crenata* C. Presl., Bone density, Trabecular femure bones

مستخلص البحث

بوترا، كورنياوان هداية فردانا. 2018. نشاط مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة السراخس المائية (*Marsilea crenata C. Presl.*) على زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: ويكا سيدا بيغاوان، الماجستير. والمناقش: د. رائحة المطيعة، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: السراخس المائية (*Marsilea crenata C. Presl.*)، كثافة كتلة العظم، ترابيق العظم الإسفنجي. الفيتواستروجينات هي مركبة لها هيكل أو وظيفة مثل الأستروجين. انخفاض هرمون الأستروجين يسبب الأمراض التنكسية مثل هشاشة العظام، حيث تقللت كثافة كتلة العظم. يتوقع من نبات السراخس المائية (*Marsilea crenata C. Presl.*) أنها تحتوي على مركبة الفيتواستروجينات ويمكن استخدامها في العلاج بالهرمونات البديلة (*Hormone Replacement Therapy*). وكان الهدف من هذا البحث هو تحديد النشاط والجرعة الفعالة من مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة السراخس المائية على زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. تم اختبار النشاط من خلال إعطاء مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة السراخس المائية ببعث الجرعات 1.2؛ 2.4؛ 4.8 و 9.6 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا بعد تحريضها بديكساميثازون (*Deksametason*) على المقدار 0,0029 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا لمدة 4 أسابيع كنموذج لهشاشة العظام، وتحريضها بأليندرونات (*Alendronat*) على المقدار 0026 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا كعنصر تحكم إيجابي. وقد لاحظ الباحث زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي باستخدام تلوين الهيماتوكسيلين وصبغة إيوسين (*Hematoksilin-Eosilin (HE)*). واستخدم اختبار تحليل التباين في اتجاه واحد (*One-Way ANOVA*) وأما في الجرعة الفعالة فاستخدم اختبار أقل فرق معنوي (*Least Significant Difference*). وأشارت نتائج هذا البحث إلى أن التنوع في إعطاء الجرعة أدى إلى زيادة كثافة كتلة العظم وتبين أن الجرعة الفعالة في مقدار 50 و 99 بشكل متتالي؛ وهو 1.908 ملغ و 1.451 ملغ.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Estrogen merupakan suatu hormon *sex* yang terdapat pada sistem reproduksi mamalia dimana mempengaruhi terhadap siklus menstruasi dan aktivitas biologi dalam tubuh. Estrogen berperan dalam proses perkembangan dan pertumbuhan sistem reproduksi wanita dan sifat karakteristik sekunder pada wanita. (Gong *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2014). Seiring dengan bertambahnya umur, produksi estrogen pada tubuh akan mengalami penurunan, kondisi ini sering disebut sebagai defisiensi estrogen.

Defisiensi estrogen merupakan suatu kondisi dimana menurunnya kadar dari hormon estrogen yang terdapat dalam tubuh terutama pada wanita. Penyebab alami kurangnya estrogen adalah seiring dengan bertambahnya usia yang berakibat berhentinya aktivitas molekular beberapa organ, penyebab lain dari turunnya kadar estrogen dalam tubuh seperti histerektomi (operasi pengangkatan rahim) sindrom turner, gangguan tiroid, disfungsi kelenjar pituitari, latihan fisik yang intensif, diet yang terlalu ketat, asupan obat steroid seperti obat golongan glukokortikoid untuk pengobatan kanker (Andini, 2014). Penggunaan obat-obatan golongan glukokortikoid secara berlebihan merupakan kunci dari regulator proses proliferasi sel dan biasanya digunakan secara ekstensif pada penderita kanker. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa glukokortikoid menghambat ikatan antara estrogen dengan reseptor estrogen (Karmakar *et al.*, 2013). Penghambatan antara estrogen reseptor

dengan glukokortikoid terjadi karena pada mekanisme ini memberikan efek untuk pembentukan mRNA sulfotransferase (SULT1E) yang menyebabkan penghambatan pada aktivitas estrogenik sehingga mengalami defisiensi estrogen, hal ini karena estrogen tidak dapat berikatan dengan estrogen reseptor (Gong *et al.*, 2008).

Turunnya aktivitas estrogenik dalam tubuh menyebabkan munculnya berbagai penyakit degeneratif, salah satunya yaitu osteoporosis. Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai dengan berkurangnya masa tulang adanya perubahan dari segi mikroarsitektur jaringan tulang yang berakibat menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang. Kecepatan resorpsi dan deposisi tulang baru untuk menggantikan mineral yang hilang dipengaruhi oleh sirkulasi dari kadar hormon estrogen pada tubuh. Ketika terjadinya penurunan kadar estrogen yang biasanya terjadi pada wanita menopause, kemampuan pembentukan tulang akan menurun sedangkan resorpsi tulang akan meningkat (Lestari *et al.*, 2014). Pengobatan osteoporosis telah banyak dilakukan terutama dengan pengembangan pada pengobatan herbal untuk menekan efek samping dari terapi sulih hormon seperti penggunaan senyawa fitoestrogen yang telah terbukti dapat mengurangi keluhan menopause dan pascamenopause (Ghani, 2009).

Fitoestrogen merupakan senyawa yang mirip dengan estrogen akan tetapi memiliki aktifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan aktifitas hormon estrogen itu sendiri (Muljati *et al.*, 2003). Fitoestrogen merupakan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, tanaman yang baik memiliki manfaat bagi manusia sebagaimana yang telah diterangkan di Al-Qur'an Surah Asy-Syu'ara' ayat 7 sebagai berikut :

لَوْلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : *Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik (QS: Asy-Syu'ara': 07).*

Pada tafsir ini diartikan bahwa tumbuhan yang baik paling tidak yaitu yang tumbuh subur dan memiliki manfaat (Shihab, 2002). Banyak manfaat yang dapat diambil dari tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, salah satunya yaitu tumbuhan semanggi.

Semanggi secara turun-temurun telah dimanfaatkan oleh masyarakat di Surabaya sebagai makanan yang telah terbukti memiliki kandungan fitoestrogen. Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) merupakan salah satu jenis tanaman air yang termasuk dalam tumbuhan paku-pakuan dan banyak ditemukan di pematang sawah, kolam, danau, rawa dan sungai. Tumbuhan ini memiliki morfologi yang sangat khas yaitu bentuk daunnya menyerupai payung yang tersusun dari empat kelompok anak daun yang berhadapan. (Laswati, 2007; Nurjanah *et al.*, 2012). Kandungan senyawa yang terdapat dalam semanggi diantaranya yaitu saponin, triterpenoid bebas, steroid, flavonoid, polifenol, asam amino. Salah satu asam amino yang memiliki aktivitas fitoestrogen sebagai antiosteoporosis yaitu asam palmitat (Tyasningsih, 2007; Ma'arif *et al.*, 2016).

Pengamatan ketebalan tulang yang dilakukan yaitu pada tulang trabekular femur pada mencit yang diinduksi dengan glukokortikoid yaitu deksametason. Deksametason akan berikatan dengan reseptor glukokortikoid dan pada mekanisme ini memberikan efek untuk pembentukan mRNA sulfotransferase (SULT1E) yang menyebabkan penghambatan pada aktivitas estrogenik sehingga mengalami defisiensi estrogen

(Gong *et al.*, 2008). Peningkatan jumlah osteoblast yang akan diamati pada tulang trabekular femur dilakukan dengan menggunakan metode histomorfometri. Metode Histomorfometri yaitu suatu metode pengamatan dengan mengamati bagian biologis, pada penelitian ini dengan metode histomorfometri tulang (Djalaludin, 2015).

Berdasarkan ulasan dan penelitian yang telah terbukti sebelumnya, maka sangat penting dilakukan kajian yang lebih mendalam terhadap *M.crenata* untuk mengatasi dan mengurangi defisiensi estrogen akibat penggunaan obat-obat golongan glukokortikoid secara terus menerus. Selain itu *M.crenata* dapat bertindak sebagai terapi fitoestrogen yang dapat mengurangi penyakit osteoporosis yang termasuk penyakit degeneratif.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu :

1. Apakah ekstrak etanol 96% *M.crenata* dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur pada mencit jantan yang diinduksi deksametason ?
2. Berapakah dosis efektif ekstrak etanol 96% *M.crenata* yang dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur pada mencit jantan yang diinduksi deksametason?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Untuk mengetahui bahwa ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur pada mencit jantan yang diinduksi deksametason.

2. Untuk mengetahui dosis efektif ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur pada mencit jantan yang diinduksi deksametason.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian yang dilakukan ini yaitu :

1. Mempromosikan pengobatan alternatif yang memiliki potensi terhadap mengatasi gejala-gejala pada wanita pascamenopuse terutama pada tulang sebagai anti osteoporosis akibat dari defisiensi estrogen
2. Memberikan kajian informasi baru mengenai aktivitas fitoestrogen pada ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* memberikan aktivitas terhadap peningkatan jumlah sel osteoblast sebagai anti osteoporosis pada mencit yang diinduksi deksametason.
3. Memberikan kajian informasi mengenai dosis efektif ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* sebagai antiosteoporosis
4. Meningkatkan pemanfaatan budidaya tanaman *M.crenata* dengan memberikan informasi baru terkait dengan perkembangan produk herbal yang aman untuk dikonsumsi, sehingga diharapkan dapat meningkatkan perekonomian petani semanggi.

1.5 Batasan Masalah

1. Pada penelitian ini sebagian besar menggunakan bagian batang dan daun tanaman, sehingga untuk akar tanaman *M.crenata* tidak digunakan.
2. Ekstrak yang digunakan yaitu ekstrak etanol 96% *M.crenata* yang diperoleh dari ekstraksi dengan metode ekstraksi yaitu ekstraksi ultrasonikasi.
3. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dengan berat sekitar 20-25 gram yang diperoleh dari Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
4. Penelitian ini mengambil parameter peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur dan dosis efektif (ED_{50}) yang memberikan aktivitas dari ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*.
5. Peningkatan kepadatan massa tulang trabekula femur pada penelitian ini diamati secara histomorfometri.
6. Dosis yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu 1,2 mg; 2,4 mg; 4,8 mg; dan 9,6 mg/20g BB mencit.
7. Pemberian dosis diberikan sesuai dengan kelompok perlakuan yang dilakukan, dosis diberikan selama 4 minggu secara peroral.
8. Penelitian mengamati aktivitas dan penentuan dosis optimum yang dilakukan secara *in vivo* sehingga keakuratan data dilihat dari hasil pengamatan histomorfometri dan data pengolahan metode *One-Way ANOVA*, dan belum dilakukan uji secara *in vitro*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tumbuhan sebagai Obat dalam Prespektif Islam

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah yang memiliki banyak sekali manfaat. Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuhan agar dapat dimanfaatkan oleh manusia (Rahman, 1996) . Hal ini dijelaskan dalam firman-Nya :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن تَبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”
(QS. Taa Haa (20): 53)

Tumbuh-tumbuhan sangat erat kaitannya dalam kehidupan manusia, banyak nilai-nilai manfaat yang didapa dari tumbuhan namun masih banyak pula tumbuhan yang belum diketahui manfaatnya. Tumbuhan banyak memberikan manfaat dari adanya kandungan senyawa hingga pemanfaatan bagian fisik seperti batang, daun dan akar. Hal ini dijelaskan dalam firman-Nya :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Asy Syu’araa’(26) : 7)

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعِنَبًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾
وَفَاكِهَةً وَأَبًّا ﴿٣١﴾ مَّتَعًا لَكُمْ وَلَا نَعْمِيكُمْ ﴿٣٢﴾

Artinya : “Lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, 28) Anggur dan sayur-sayuran, 29) Zaitun dan kurma, 30) Kebun-kebun (yang) lebat, 31) Dan buah-buahan serta rumput-rumputan, 32) Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu”

(QS. 'Abasa (80) : 27-32)

Ayat diatas menjelaskan tentang kuasa Allah SWT menciptakan biji-bijian, sayur-sayuran, buah-buahan serta rumput yang bisa jadi bahan makanan bagi manusia, dan ternak. Setiap unsur makanan ini memiliki khasiat unik bagi tubuh manusia yang bisa diteliti dalam kehidupan kita, dan banyak hal dari unsur-unsur ini yang dapat dipelajari untuk mencerahkan dan memberikan pandangan mendalam akan keajaiban yang terkandung di dalam unsur tersebut (Imani, 2005). Tumbuhan yang baik paling tidak tumbuh subur dan memiliki manfaat (Shihab, 2002). Semua kejadian yang terjadi dialam adalah tanda-tanda kebesaran Allah SWT bagi hamba yang berfikir, berkaitan dengan adanya tumbuhan, al-qur'an secara tidak langsung memerintahkan manusia untuk berfikir bagaimana Allah SWT menumbuhkan berbagai jenis tanaman untuk dimanfaatkan oleh manusia (Rossidy, 2008). Pada konteks ini tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai obat yang dapat membantu manusia.

2.2 Tinjauan Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl.)

Semanggi merupakan tumbuhan air yang banyak terdapat dilingkungan air tawar seperti sawah, kolam, danau, dan sungai. (Afriastini, 2003).

2.2.1 Klasifikasi (*Marsilea crenata* C. Presl.)

Klasifikasi tanaman semanggi berdasarkan USDA (2003) :

Kingdom	: Plantae
Subkingdm	: Tracheobionta
Divisi	: Pteridophyta
Kelas	: Filicopsida
Ordo	: Hydropteridales
Famili	: Marsileaceae
Genus	: <i>Marsilea</i> L.
Spesies	: <i>Marsilea crenata</i> C. Presl.



Gambar 2.1 *Marsilea crenata* C. Presl.

2.2.2 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tanaman ini tumbuh tersebar di Asia Tenggara di daerah yang mempunyai ketinggian 900 meter di atas permukaan air laut. Di Indonesia banyak terdapat di pulau Jawa dan Madura. Tumbuhan liar yang sering dijumpai disawah, pematang, saluran air, selokan yang tidak dalam, dan genangan air (Hutapea, 1994). Tumbuhan semanggi

tumbuh merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm (Afriastini, 2003).

2.2.3 Habitus dan Morfologi

Habitus : Paku air atau paku rawa, dengan tangkai panjang dan tegak, panjang 2-30 cm.

Daun : Merupakan daun berdiri sendiri atau dalam berkas, menjari berbilangan 4, anak daun menyilang, berhadapan, berbentuk baji bulat telur, gundul atau hampir gundul, 3-22 kali 2-18 mm, urat daun rapat berbentuk kipas, pada air yang tidak dalam muncul di atas air, pada air yang mengapung (Ma'arif, 2012).

Akar : Akar pada tanaman semanggi tertanam dalam substrat di dasar perairan (Afriastini, 2003)

2.2.4 Kandungan

Daun dan batang *Marsilea crenata* Presl. mengandung saponin, triterpenoid bebas, steroid, flavonoid, dan polifenol (Tiyaningsih, 2007).

Semanggi memiliki kandungan air yang tinggi yaitu sebesar 82,59%, abu 1,72%, protein 1,91%, lemak 0,36%, karbohidrat 11,46 % dan serat kasar 1,96%. Ekstrak kasar semanggi mengandung 6 komponen bioaktif yaitu alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino (Nurjanah *et al.*, 2012).

Semangi banyak memiliki senyawa yang bersifat folatil diantaranya yaitu monoterpenoid, diterpenoid, dan beberapa kelompok asam amino yang memiliki aktivitas. Salah satu asam amino yang terdapat pada semangi yang memiliki aktivitas antiosteoporosis yaitu asam palmitat (Ma'arif *et al.*, 2016).

2.2.5 Kegunaan

Daun dan batang semangi mempunyai khasiat sebagai peluruh air seni (Hutapea, 1994), dan oleh masyarakat daun semangi dimanfaatkan sebagai sayuran untuk dikonsumsi sehari-hari (Ma'arif, 2012).

Semangi mempunyai khasiat anti-inflamasi (anti radang) , antioksidan, dan deuretik. Secara turun temurun sudah digunakan untuk mengobati penyakit asma, batu empedu, batu ginjal, infeksi saluran kemih, radang amandel, radang kerongkongan, sakit kuning, salesma, dan *cantengan* (bengkak pada jari tangan atau kaki karena infeksi), osteoporosis, batu ureter, dan infeksi telinga (Sar1,2008).

2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi

2.3.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan, dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif yang akan diekstraksi terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda, demikian pula metode ekstraksi yang digunakan. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014).

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Senyawa aktif yang telah diketahui yang dikandung dalam simplisia akan mempermudah dalam pemilihan pelarut dan metode ekstraksi (Dirjen POM, 2000).

2.3.2 Jenis-Jenis Ekstraksi

2.3.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

Metode ekstraksi yang dilakukan dipilih berdasarkan pertimbangan tertentu. Cara yang paling sering digunakan yaitu ekstraksi dengan menggunakan pelarut. Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut ini dibagi menjadi dua metode yaitu cara dingin dan cara panas (Dirjen POM, 2000).

1. Metode ekstraksi dengan pelarut cara dingin diantaranya yaitu maserasi dan perkolasi, sebagai berikut :

A. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar) (Dirjen POM, 2000).

Maserasi merupakan metode sederhana dan paling banyak dilakukan baik dalam skala kecil atau skala industri. Metode ini menggunakan prinsip kesetimbangan antara ekstrak dengan pelarut, proses ekstraksi akan dihentikan

ketikan diperkirakan telah tercapai kesetimbangan konsentrasi senyawa aktif dengan pelarut (Agoes, 2007; Mukhriani, 2014).

B. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru, sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area, metode ini membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Dirjen POM, 2000; Mukhriani, 2014).

2. Metode ekstraksi dengan pelarut cara pemanasan diantaranya yaitu refluks, sokhlet, digesti, infus, dan dekok, sebagai berikut :

A. Soxhletasi

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Dirjen POM, 2000).

B. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Dirjen POM, 2000).

C. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C (Dirjen POM, 2000).

D. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit) (Dirjen POM, 2000).

E. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (~30°C) dan temperatur sampai titik didih air (Dirjen POM, 2000).

2.3.2.2 Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Dirjen POM, 2000).

2.3.2.3 Cara Ekstraksi Lainnya

1. Ekstraksi Berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali.

Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Dirjen POM, 2000)

2. Superkritikal Karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida, dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu (Dirjen POM, 2000).

3. Ekstraksi Ultrasonik

Getaran ultrasonik (> 20.000 Hz.) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stres dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Dirjen POM, 2000).

Maserasi yang digunakan dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (alat yang memberikan sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan suatu tekanan mekanik pada sel sehingga menghasilkan rongga pada dinding sel. Kerusakan sel yang disebabkan tekanan ini menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi (Mukhriani, 2014).

4. Ekstraksi Energi Listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "*electric-discharges*" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik (Dirjen POM, 2000).

2.4 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan untuk mengetahui jumlah kuantitasnya yang akan digunakan atau kadarnya. Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya (Abidin, 2011). KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai selayaknya sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki system pelarut dan system penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (Roy and James, 1991). Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai R_f yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f dari senyawa standar. Nilai R_f dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan R_f selalu lebih kecil dari 1,0 (Abidin, 2011).

TLC *Visualizer* merupakan sistem analisa dengan memanfaatkan noda pada plat KLT, analisa yang dilakukan dikontrol dengan *visionCATS* sampai pada pengukuran gelombang tingkat rendah pada sampel. Sistem ini didukung dengan sistem pancaran panjang gelombang cahaya (metode absorbansi, metode *fluorescence* atau penggunaan kedua sistem) dengan pengukuran panjang gelombang UV 254 nm dan UV 366 nm menggunakan UV Lamp with view Box (Abidin, 2011).



Gambar 2.2 TLC Visualizer dan UV Lamp with View Box

2.5 Tinjauan tentang Tulang

Tulang adalah jaringan hidup yang strukturnya dapat berubah apabila mendapat tekanan. Seperti jaringan ikat lain, tulang terdiri atas sel-sel, serabut-serabut, dan matriks. Tulang bersifat keras oleh karena matriks ekstraselularnya mengalami kalsifikasi, dan mempunyai derajat elastisitas tertentu akibat adanya serabut-serabut organik (Snell, 2012).

Dapat dibedakan dua jenis tulang, yakni tulang kompakta dan tulang spongiosa. Perbedaan antara kedua jenis tulang tadi ditentukan oleh banyaknya bahan padat dan

jumlah serta ukuran ruangan yang ada di dalamnya. Semua tulang memiliki kulit luar dan lapisan substansia spongiosa di sebelah dalam, kecuali apabila masa substansia spongiosa diubah menjadi *cavitas medullaris* (rongga sumsum) (Moore dan Agur, 2002). Tulang dewasa dan yang sedang berkembang mengandung empat jenis sel berbeda: sel osteogenik (osteoprogenitor), osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Sel-sel osteogenik ialah sel-sel induk pluripoten yang belum berdiferensiasi, berasal dari jaringan ikat mesenkim. Sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum, dan dalam saluran vaskular dari tulang kompakta. Terdapat dua jenis sel osteoprogenitor: 1) preosteoblas yang memiliki sedikit retikulum endoplasma dan akan menghasilkan osteoblas; dan 2) preosteoklas yang mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas, dan menghasilkan osteoklas (Lesson dkk, 1996).

Osteoblast merupakan sel yang berhubungan dengan pembentukan tulang dan ditemukan pada permukaan tulang yaitu periosteum dan endosteum, osteoblast dibentuk dari sel stroma, osteoblast berfungsi menghasilkan kolagen, proteoglikan dan glikoprotein untuk pembuatan dan pertumbuhan tulang baru pada daerah permukaan tulang dan juga untuk pembentukan tulang pada kartilago (Hadi, 2017).

Osteosit atau sel tulang ialah osteoblas yang terpendam dalam matriks tulang. Mikroskop elektron memperlihatkan bahwa osteosit dan cabangnya tidak melekat langsung pada matriks sekitarnya, tetapi terpisah dari dinding lakuna dan kanalikuli oleh daerah amorf tipis. Daerah ini agaknya berfungsi sebagai medium pertukaran metabolit (Lesson dkk, 1996).

Osteoklas ialah sel multinuklear besar yang terdapat di sepanjang permukaan tulang tempat terjadinya resorpsi, *remodelling*, dan perbaikan tulang. Osteoklas ini sering terdapat di dalam sebuah lekuk dangkal pada tulang yang teresorpsi atau terkikis secara enzimatik yang disebut la-kuna Howship. Osteoklas yang mula-mula berada di dalam tulang berasal dari prekursor mirip monosit. Sel-sel ini terlibat mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik lain yang menyebabkan matriks tulang melepaskan bagian substansi dasar yang mengapur. Sesudah proses resorpsi rampung, osteoklas menghilang, mungkin berdegenerasi atau berubah lagi menjadi sel asalnya (Lesson dkk, 1996). Osteoblas dan osteoklas diproduksi pada sumsum tulang dan terbentuk melalui dua garis diferensiasi *Colony Formation Unit* (CFU) yang berbeda. Pembentukan osteoklas dari *Colony Formation Unit*-Granulosit Makrofag (CFU-GM) mengikuti garis diferensiasi hematopoietik, sedangkan pembentukan osteoblas dari *Colony Formation Unit*-Fibrosit (CFU-F) mengikuti garis diferensiasi mesensimal pada stroma sumsum tulang. Pembentukan osteoblas dapat berlangsung secara independen tanpa memerlukan interaksi dengan progenitor osteoklas. Sebaliknya, pembentukan osteoklas membutuhkan interaksi yang kompleks dengan progenitor osteoblas, dimana diferensiasi CFU-GM menjadi osteoklas ti-dak dapat berlangsung tanpa adanya interaksi seluler komponen sel-sel stroma yang memproduksi osteoblas (Sihombing dkk, 2012).

2.5.1 Klasifikasi Tulang

1. Tulang Panjang

Pada tulang ini, panjangnya lebih besar daripada lebarnya. Tulang ini mempunyai *corpus* berbentuk tubular, diafisis, dan biasanya dijumpai epifisis pada ujung-ujungnya. Selama masa pertumbuhan, diafisis dipisahkan dari epifisis oleh kartilago epifisis. Bagian diafisis yang terletak berdekatan dengan kartilago epifisis disebut metafisis. Tulang-tulang panjang yang ditemukan pada ekstremitas antara lain tulang humerus, femur, ossa metacarpi, ossa metatarsal dan *phalanges* (Amalia, 2015).

2. Tulang Pipih

Bagian dalam dan luar tulang ini terdiri atas lapisan tipis tulang kompakta, disebut tabula, yang dipisahkan oleh selaput tipis tulang spongiosa, disebut *diploe*. Scapula termasuk di dalam kelompok tulang ini walaupun bentuknya irregular. Selain itu tulang pipih ditemukan pada tempurung kepala seperti *os frontale* dan *os parietale* (Amalia, 2015).

3. Tulang Pendek

Tulang-tulang pendek ditemukan pada tangan dan kaki. Contoh jenis tulang ini antara lain *os Schapoideum*, *os lunatum*, dan *talus*. Tulang ini terdiri atas tulang spongiosa yang dikelilingi oleh selaput tipis tulang kompakta. Tulang-tulang pendek diliputi periosteum dan *facies articularis* diliputi oleh kartilago hialin (Amalia, 2015).

4. Tulang Iregular

Tulang-tulang iregular merupakan tulang yang tidak termasuk di dalam kelompok yang telah disebutkan di atas (contoh, tulang-tulang tengkorak, *vertebrae*, dan os *coxae*). Tulang ini tersusun oleh selapis tipis tulang kompakta di bagian luarnya dan bagian dalamnya dibentuk oleh tulang spongiosa (Amalia, 2015).

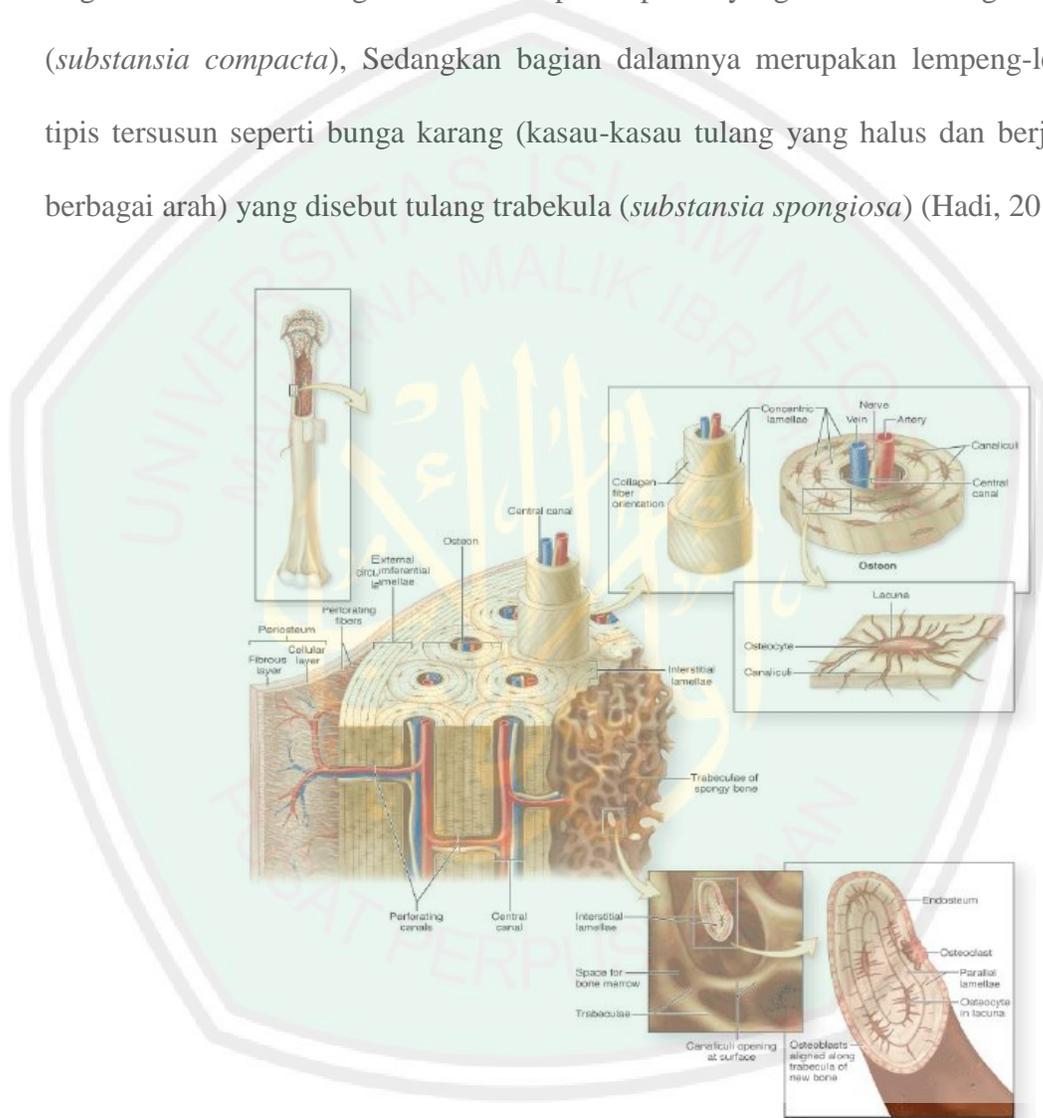
5. Tulang Sesamoid

Tulang sesamoid merupakan tulang kecil yang ditemukan pada tendo-tendo tertentu, tempat terdapat pergeseran tendo pada permukaan tulang. Sebagian besar tulang sesamoid tertanam di dalam tendon dan permukaan bebasnya ditutupi oleh kartilago. Tulang sesamoid yang terbesar adalah *patella*, yang terdapat pada tendo *musculus quadriceps femoris*, fungsi tulang sesamoid adalah mengurangi friksi pada tendo, dan merubah arah tarikan tendo (Snell, 2012).

2.5.2 Tulang Trabekular Femur

Klasifikasi tulang berdasarkan bentuknya diantaranya yaitu tulang panjang, tulang pipih, tulang pendek, tulang iregular, dan tulang sesamoid. Salah bentuk tulang yang banyak terdapat dalam tubuh yaitu tulang panjang yang diantaranya terdiri dari tulang humerus, femur, ossa metacarpi, ossa metatarsal dan phalanges. Tulang femur pada tubuh manusia yang lebih dikenal dengan tulang paha sering dijadikan sebagai objek dalam pengamatan tingkat kepadatan tulang terutama pada bagian tulang keras (Amalia, 2015).

Tulang femur tersusun atas tulang kompakta pada bagian luar dan tulang trabekula pada bagian dalam, dengan susunan seperti ini massa tulang menjadi lebih ringan tanpa mengurangi tingkat kekuatannya sehingga fungsinya menjadi optimal. Bagian luar dari tulang berbentuk lapisan padat yang disebut tulang kompakta (*substantia compacta*), Sedangkan bagian dalamnya merupakan lempeng-lempeng tipis tersusun seperti bunga karang (kasau-kasau tulang yang halus dan berjalan ke berbagai arah) yang disebut tulang trabekula (*substantia spongiosa*) (Hadi, 2017).

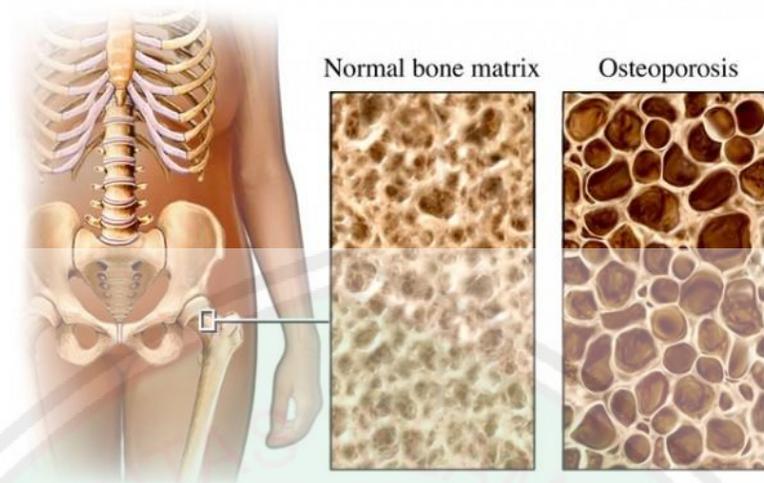


Gambar 2.3 Struktur tulang trabekular femur (Junqueira, 2010)

2.6 Tinjauan Tentang Osteoporosis

Osteoporosis merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan adanya kelainan tulang yakni penurunan masa kepadatan tulang terutama pada bagian femur, tulang belakang dan beberpa tulang yang lainnya. Osteoporosis dapat terjadi karena adanya gangguan metabolisme dimana tubuh tidak mampu melakukan penyerapan dan pembentukan sel tulang baru untuk prroses pematang tulang, sehingga dapat dikatakan osteoporosis merupakan kondisi pengeroposan pada tulang (Ramadani, 2010 ;Permana, 2016).

Osteoporosis pada dasarnya dibagi menjadi dua tipe berdasarkan dari penyebabnya yaitu osteoporosis primer dan sekunder. Osteoporosis primer yaitu osteoporosis yang diketahui sebab terjadinya sedangkan osteoporosis sekunder belum diketahui penyebabnya ataau akbat dari hal-hal tertentu yang lainnya. Seiring dengan berkembangnya pengetahuan, osteoporosis primer dibedakan menjadi dua tipe klasifikasi yaitu tipe I dan tipe II. Beberapa literatur lain menyebutkan bahwa osteoporosis dibagi dalam beberapa jenis yang berbeda, diantaranya yaitu osteoporosis postmenopause (tipe I), osteoporosis involutinal (tipe II), osteoporosis idiopatik, osteoporosis juvenil, osteoporosis sekunder (Solihah, 2015 ; Permana, 2016).



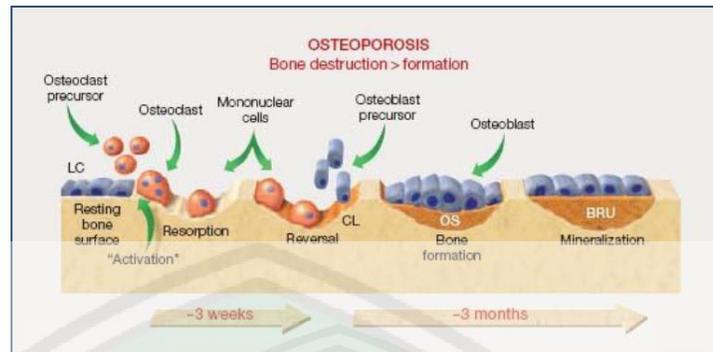
Gambar 2.4 Perbedaan tulang normal dengan osteoporosis (Solihah, 2015)

Patogenesis dalam terjadinya osteoporosis melibatkan dari proses resorpsi dan formasi dari tulang itu sendiri. Sepanjang perjalanan hidup, sel yang bertanggung jawab dalam remodeling tulang yaitu sel osteoblast dan sel osteoklast. Sel osteoblast bertanggung jawab dalam proses pembentukan tulang sedangkan untuk sel osteoklast berperan dalam proses resorpsi tulang. Pada orang normal tulang mengalami pertumbuhan dan pada masa tertentu akan mengalami puncak peningkatan masa tulang pada usia 30-35 tahun, namun setelah masa ini akan terjadi penurunan masa tulang dimana proses resorpsi tulang lebih tinggi dibandingkan dengan proses remodeling tulang. Hilangnya masa tulang dapat disebabkan beberapa faktor lokal dan sistemik. Faktor lokal yaitu usia, menopause, kecelakaan, sitokin, dan hal lain. Faktor sistemik yaitu hormon-hormon yang berkaitan dengan metabolisme kalsium, seperti hormon paratiroid, vitamin D, kalsitonin, estrogen, androgen, hormon pertumbuhan dan hormon tiroid (Ramadani, 2010; Solihah, 2015; Permana, 2016).

2.7 Tinjauan Tentang *Remodelling Tulang*

Tulang tua akan selalu diganti dengan tulang baru pada unit multiseluler tulang (*Bone Multicellular Unit*) dinamakan remodeling tulang. Terjadinya proses resorpsi dan pembentukan tulang dinamakan *bone turnover*. Adanya keseimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang agar tulang menjadi elastis, ringan namun kuat. Proses ini sering terjadi pada tulang dewasa yaitu pada tulang trabecular vertebra, femur proksimal, kalkaneus dan radius ultradistal. Gangguan keseimbangan tersebut membuat tulang lebih banyak diresorpsi dibandingkan dengan pembentukan tulangnya, tulang menjadi keropos dan mudah patah tulang yang disebut osteoporosis (Sim dan Baron, 2000).

Proses resorpsi tulang memerlukan waktu 3 hari, kemudian fase reversal (fase periode antara dengan pembentukan tulang) memerlukan waktu 14 hari dan pembentukan tulang selama 70 hari, sehingga total waktu yang diperlukan adalah 87 hari. Pada tulang dewasa normal proses pembentukan tulang hanya ditempatkan yang sudah terjadi reasorpsi, maka proses yang terjadi ditempat remodeling tulang ini melalui proses dasarnya yaitu Aktifasi-Resorpsi-Pembentukan (ARF=*Activation-Resorbtion-Formation*). Mekanisme pembentukan tulang melalui 3 tahap yaitu produksi, maturasi, dan mineralisasi (Amran, 2011).



Gambar 2.5 Proses mekanisme *remodelling* tulang (Solihah, 2015)

2.8 Tinjauan Tentang Fitoestrogen

Fitoestrogen adalah zat yang terdapat pada tumbuhan dan biji-bijian dengan struktur kimianya mirip estrogen, mempunyai efek estrogenik lemah dan bekerja pada reseptor estrogen. Fitoestrogen berasal dari kata “fito” yang berarti tanaman dan “estrogen” karena memiliki struktur dan aktifitas biologik menyerupai estrogen (Badziad, 2003).

Jenis fitoestrogen adalah *isoflavones*, *coumestans* dan *lignans*. Daidzein dibentuk dari formononetin oleh enzim hidrolitik bakteri lumen usus dan dimetabolisme menjadi equol dan O-desmetilangolesin (O-DMA). Sedangkan gensitein dibentuk dari biochanin A dan dimetabolisasi menjadi p-etilfenol estrogen inaktif. Sedangkan gensitein dibentuk dari biochanin A dan dimetabolisasi menjadi p-etilfenol estrogen inaktif. Enterodiol dan Enterolacton merupakan hasil metabolisme dari ligan tumbuh-tumbuhan yaitu Matairesinol dan Sekoisolarisiresinol. Enterodiol dibentuk dengan cara dehidroksilasi dan demetilasi sekoisolarisiresinol oleh mikroflora usus, sedangkan enterolactone selain dibentuk dari matairesinol juga dibentuk dengan

oksidasi sekoisolarisiresinol oleh mikroflora lumen usus. Lignan ditemukan dalam padi-padian dan sereal, gandum, wijen, sayuran seperti bawang putih, brokoli, wortel, buah-buahan seperti jeruk, apel dan pear, polong, minyak biji rami. Banyak ditemukan dalam kecambah (konsentrasi tertinggi), alfalfa, kacang-kacangan, biji bunga matahari, daun semanggi. Struktur kimiawinya yang paling mirip. Banyak terkandung pada tanaman *Cimifuga racemosa* (sering disebut sebagai tanaman Black cohosh) yang tumbuh di hutan-hutan Amerika Selatan dan sekarang telah diekstraksi dalam kemasan menjadi produk untuk menopause. Senyawa-senyawa berefek estrogenik lain yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yaitu *flavones*, *chalcones*, *diterpenoids*, *triterpenoids*, *coumarins*, *acylics* dan masih banyak lagi estrogen adalah *isoflavones* (Badziad, 2003).

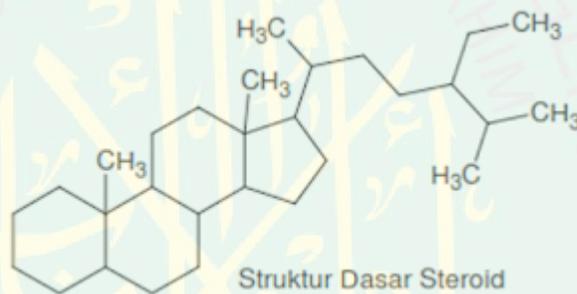
2.9 Tinjauan Tentang Golongan Senyawa Metabolit Skunder

2.9.1 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Saponin

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam. Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit, yang mempunyai massa dan molekul besar, dengan kegunaan luas. Saponin diberi nama demikian karena sifatnya menyerupai sabun “Sapo” berarti sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa bila dikocok dengan air. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Dikenal juga jenis saponin yaitu glikosida triterpenoid dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai spirotekal. Kedua saponin

ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis memakai enzim. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa apabila dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah (Robinsons, 1995; Harborne, 1996; Burger *et al.*, 1998).

Saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dengan molekul karbohidrat. Jika dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang disebut sapogenin. Masing-masing senyawa ini banyak dihasilkan di dalam tumbuhan (Hartono, 2009).



Gambar 2.6 Struktur Dasar Saponin Steroid

Saponin dalam bentuk gugus triterpenoid dan glikosida adalah steroid umum dalam produk tumbuh-tumbuhan. Berupa efek biologi telah dianggap dari saponin. Penelitian yang efektif telah dilakukan pada membrane permeable, sebagai pertahanan tubuh (sistem imun), antikanker, antionkisan, sifat antikolesterol dari saponin. Saponin juga telah terbukti secara signifikan mempengaruhi pertumbuhan, konsumsi makanan dan reproduksi pada hewan percobaan. (Yoshiki *et al.*, 1998).

2.9.2 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa kimia yang terdiri dari beberapa unit isoprene. Kebanyakan terpenoid mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat pada sitoplasma sel tumbuhan (Harbone, 1987)

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari karbon C-30 asiklik, yaitu skualena, senyawa ini tidak berwarna, berbentuk Kristal, bertitik leleh tinggi dan bersifat optis aktif (Harborne, 1987).

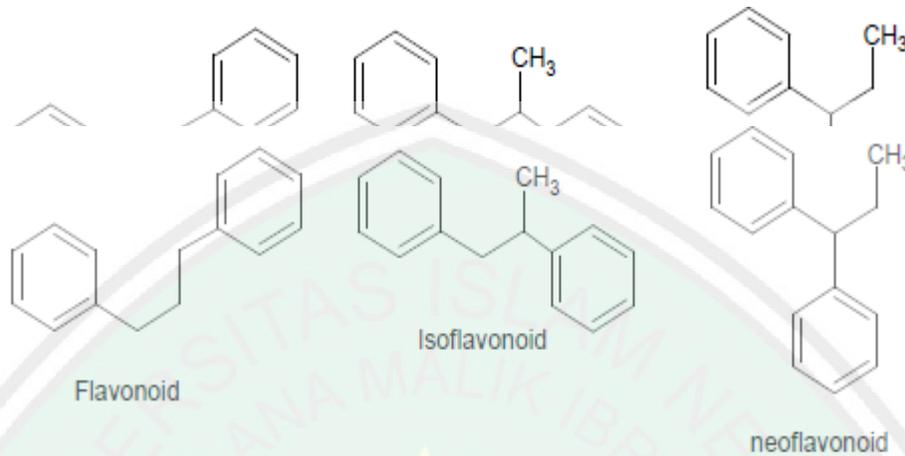


Gambar 2.7 Struktur dasar Senyawa Terpenoid

2.9.3 Tinjauan tentang Golongan Senyawa Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari 15 atom karbon yang umumnya tersebar di dunia tumbuhan. Senyawa flavanoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, dan biru serta sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Jika dilihat dari struktur dasarnya flavonoid terdiri dari dua cincin benzen yang terikat dengan 3 atom carbon (propana). Dari kerangka ini flavonoid dapat dibagi menjadi 3 struktur dasar yaitu Flavonoid atau 1,3-diarilpropana, isoflavonoid

atau 1,2-diarilpropana, dan neoflafonoid atau 1,1-diarilpropana (Achmad, 1986; Trevor, 1995).



Gambar 2.8 Struktur dasar Senyawa Flavonoid (Lenny, 2006)

Flavonoid bersifat asam sehingga larut dalam basa, merupakan senyawa polar karena memiliki gugus hidroksil, fungsi lain dari senyawa flavonoid adalah sebagai anti bakteri karena flavonoid sebagai derivat dari fenol dapat menyebabkan rusaknya susunan dan perubahan mekanisme permeabilitas dari dinding sel bakteri (Harborne, 1987).

2.10 Tinjauan Tentang Mencit (*Mus musculus L.*)

Mencit laboratorium merupakan turunan dari mencit liar yang telah mengalami pembiakan secara selektif. Mencit dikelompokkan ke dalam kingdom animalia, phylum chordata. Hewan ini termasuk hewan yang bertulang belakang dan menyusui sehingga dimasukkan ke dalam *subphylum* vertebrata dan kelas mamalia. Selain itu hewan ini juga memiliki kebiasaan mengerat (*ordo rodentia*), dan merupakan famili

muridae, dengan nama genus *Mus* serta memiliki nama spesies *Mus musculus* L (Priyambodo, 2003).

Mencit secara biologis memiliki ciri umum, yaitu berupa rambut berwarna putih atau keabu-abuan dengan warna perut sedikit lebih pucat. Mencit merupakan hewan nokturnal, perilaku mencit dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya faktor internal seperti seks, perbedaan umur, hormon, kehamilan, dan penyakit; faktor eksternal seperti makanan, minuman, dan lingkungan disekitarnya (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998).

Mencit memiliki berat badan yang bervariasi. Berat badan ketika lahir berkisar antara 2-4 gram, berat badan mencit dewasa berkisar antara 20-40 gram untuk mencit jantan dan 25-40 gram untuk mencit betina dewasa. Mencit dapat bertahan hidup selama 1-2 tahun dan dapat juga mencapai umur 3 tahun. Lama bunting 19-21 hari sedangkan umur untuk siap dikawinkan 8 minggu. Perkawinan mencit terjadi pada saat mencit betina mengalami estrus. Satu induk dapat menghasilkan 6-15 ekor anak (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

2.11 Tinjauan Tentang Histomorfometri

Histomorfometri merupakan pengamatan yang dilakukan pada bagian histologi tubuh. Histomorfometri tulang adalah alat yang dalam kemampuannya dipergunakan untuk menilai kualitas tulang dan untuk mengevaluasi efek pengobatan terhadap mineralisasi tulang dan mikroarsitektur tulang. Selain itu, histomorfometri

dipergunakan untuk penilaian kuantitatif dari perubahan terkait pengobatan di beberapa indeks remodeling tulang di tingkat sel dan jaringan (Djalaludin, 2015).

2.12 Tinjauan tentang *Analysis of Variance* (ANOVA)

Analysis of variance (ANOVA) merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya (Ghozali, 2009). Prinsip uji ANOVA adalah melakukan analisis variabilitas data menjadi dua sumber variasi yaitu variasi di dalam kelompok (*within*) dan variasi antar kelompok (*between*). Bila variasi *within* dan *between* sama (nilai perbandingan kedua varian mendekati angka satu), berarti nilai mean yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila variasi antar kelompok lebih besar dari variasi didalam kelompok, nilai mean yang dibandingkan menunjukkan adanya perbedaan (Aryani, 2013).

Source of variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean squares	F
Treatment	SSB	(k - 1)	MSB=SSB/(k - 1)	$\frac{MSB}{MSW}$
Within	SSW	(N - 1)	MSW=SSW/(N - k)	
Total	SST			

Gambar 2.9 Rumus *One Way* ANOVA

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F ₀
Factor A (between groups)	a-1	$SSA = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2$	$MSA = \frac{SSA}{(a-1)}$	$\frac{MSA}{MSE}$
Factor B (between groups)	b-1	$SSB = \sum_{j=1}^b n_j (\bar{y}_j - \bar{y}_{..})^2$	$MSB = \frac{SSB}{(b-1)}$	$\frac{MSB}{MSE}$
Error (within groups)	(a-1)(b-1)	$SSE = SST - SSA - SSB$	$MSE = \frac{SSE}{(a-1)(b-1)}$	
Total	N-1	$SST = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$		

Gambar 2.10 Rumus *Two Way* ANOVA

2.13 Tinjauan tentang Indeks Terapi

Indeks terapeutik suatu obat adalah rasio dari dosis yang menghasilkan toksisitas dengan dosis yang menghasilkan suatu respons yang efektif dan diinginkan secara klinik dalam suatu populasi individu.

$$\text{Indeks Terapi} = \frac{TD50}{ED50}$$

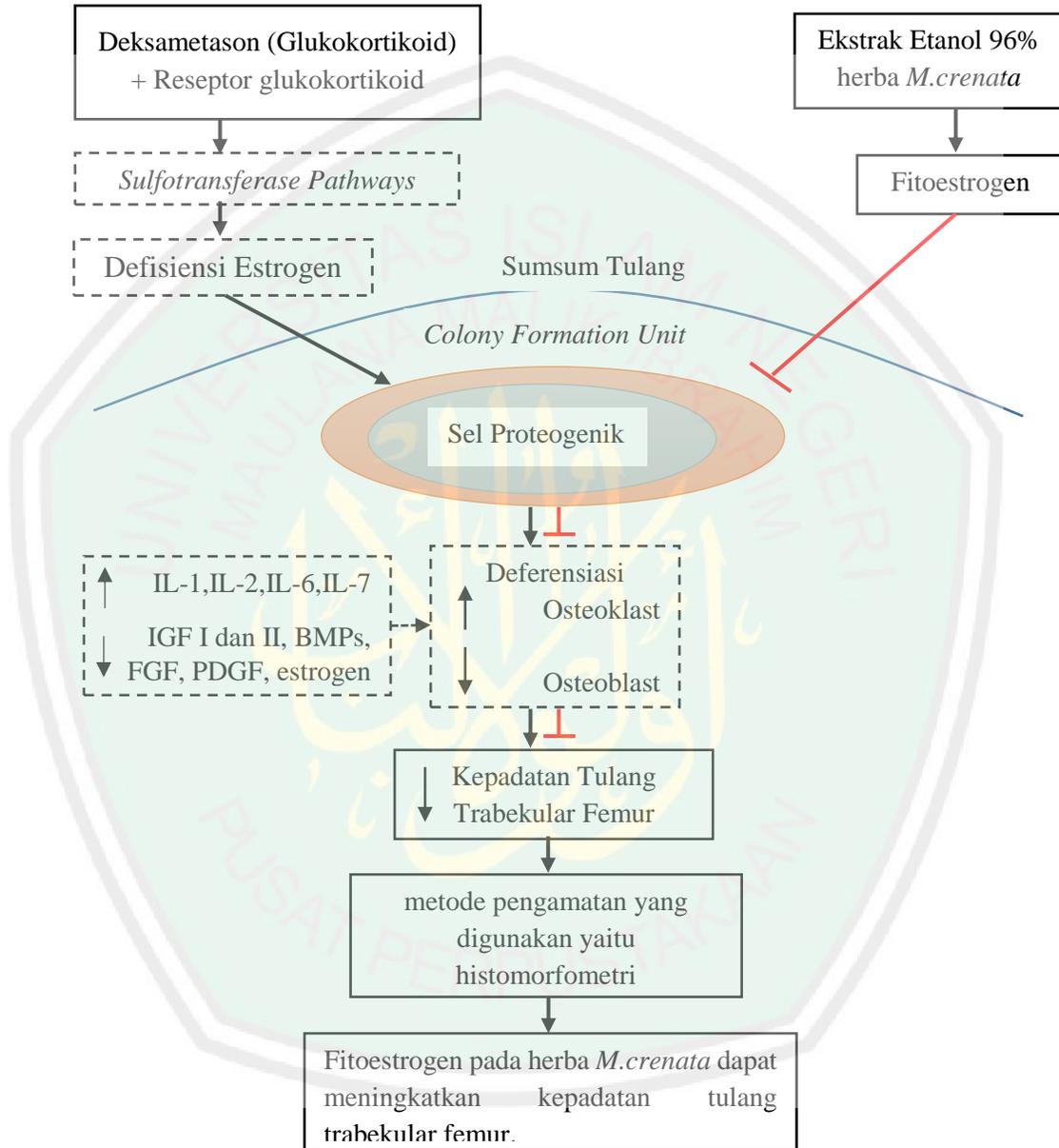
Ket : TD : Dosis Toksik
ED : Dosis Efektif

Indeks terapeutik merupakan suatu ukuran keamanan obat karena nilai yang besar menunjukkan bahwa terdapat suatu batas yang luas/ lebar diantara dosis-dosis yang efektif dan dosis-dosis yang toksik. Penentuan indeks terapeutik ditentukan dengan mengukur frkuensi respons yang diinginkan dan respons toksik pada berbagai dosis obat (Mary, 2001).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Skema Kerangka Konseptual



Keterangan :

- : Garis alur proses
- ⊥ : Garis menghambat
- : Variabel yang diteliti
- : Variabel yang tidak diteliti

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Salah satu penyebab terjadinya defisiensi estrogen yaitu adanya penggunaan obat golongan glukokortikoid. Penggunaan glukokortikoid seperti deksametason dapat menghambat kinerja dari reseptor estrogen, aktivitas dari glukokortikoid reseptor menggunakan induksi deksametason memberikan pengaruh dari peningkatan aktivitas enzim sulfotransferase pada reseptor estrogen (SULT1E1 atau EST). Aktivitas enzim ini menyebabkan menurunnya metabolik estrogen, karena terjadinya sulfonasi estrogen yang menyebabkan gagalnya aktivasi pada reseptor estrogen, penurunan ini menyebabkan defisiensi estrogen (Gong *et al.*, 2008). Adanya ikatan glukokortikoid dengan reseptor berpengaruh dalam proses *remodelling* tulang, glukokortikoid akan menekan jumlah sintesis kolagen yang digunakan untuk proses *remodelling* tulang, sehingga terjadinya penurunan kepadatan masa tulang (Permana, 2016).

Turunnya kadar estrogen dalam tubuh menimbulkan efek samping terutama dalam proses *remodelling* tulang yang terjadi pada penghambatan pembentukan sel osteoblast dan peningkatan diferensiasi sel osteoklast. Proses *remodelling* tulang mengalami penghambatan karena terjadinya peningkatan dari sistem imun seperti IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 dan sel osteoklast sehingga terjadi penurunan terhadap diferensiasi dan proliferasi osteoblast dalam pembentukan sel tulang baru yang diengaruhi oleh *growth factor* diantaranya *Insulin Growth Factor* (IGF I dan II), *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), yang bekerja secara autokrin dan parakrin, serta hormon estrogen (Djuwita dkk, 2012; Sihombing, 2012).

M.crenata mengandung senyawa golongan fitoestrogen. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ma'arif, *et al.*, (2016) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana *M.crenata* mengandung senyawa golongan terpenoid yang merupakan salah satu senyawa dari golongan fitoestrogen. Pada penelitian yang dilakukan oleh Laswati (2007), tanaman semanggi (*Marsilea crenata* Presl), telah digunakan secara turun-temurun sebagai makanan oleh masyarakat Surabaya yang telah terbukti memiliki kandungan fitoestrogen.

Fitoestrogen yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% *M.crenata*, akan berikatan dengan reseptor yang terdapat pada tulang trabekular femur, sehingga akan menghasilkan gen spesifik dimana yang mersepon sistem intraseluler sel untuk membentuk sel tulang baru. Terbentuknya sel tulang baru yang menghambat osteoporosis, pengamatan yang dilakukan dengan melihat sayatan melintang pada tulang trabekular femur pada mencit dengan menggunakan metode histomorfometri.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol 96% *M.crenata* pada mencit jantan yang diinduksi dengan deksametason dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur pada mencit jantan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik, dan untuk mencapai tujuan penelitian ini dilakukan beberapa tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Tahapan penyiapan sampel mencit (*Mus musculus*) diaklimatisasi selama 1 minggu dan diinduksi dengan deksametason dalam kandang dengan perawatan selama 30 hari
2. Ekstraksi herba *M.crenata* dengan pelarut etanol 96%
3. Uji aktivitas peningkatan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan

4.2 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan dilakukan mulai pada bulan Februari 2018. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Departemen Biologi Farmasi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian *in vivo* dilakukan di Laboratorium Biomedik, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histologi dilakukan di Laboratorium Patologi dan Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Populasi Dan Sampel

4.3.1 Populasi

Herba *M.crenata* yang ditanam di sawah di daerah Kecamatan Benowo, Surabaya, Jawa Timur.

4.3.2 Sampel

Ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*, mencit jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya yang diinduksi dengan deksametason dan beberapa perlakuan yang diberikan.

4.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu *Random sampling*.

4.4 Variabel penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang dibuat dengan dosis 1,2 mg/20g BB mencit/hari; 2,4 mg/20g BB mencit/hari; 4,8 mg/20g BB mencit/hari ; 9,6 mg/20g BB mencit/hari .

4.4.2 Variabel Tergantung

Kepadatan Tulang yang dilihat dari jumlah peningkatan sel osteoblast pada tulang trabekular femur mencit yang mengalami defisiensi esterogen akibat perlakuan induksi deksametason.

4.4.3 Variabel Kontrol

Jenis mencit (*Mus musculus*), Jenis kelamin mencit (jantan), umur mencit 70-80 hari, dengan berat badan rata-rata 20-25 gram, jenis makanan dan minuman, kesehatan mencit, perawatan mencit dan sanitasi kandang, temperatur dan kelembaban kandang, waktu pemberian makan dan minum, pelarut ekstrak yaitu etanol 96%, waktu dan tempat pengeringan semanggi, suhu pengeringan ekstrak, bahan kimia untuk pewarnaan sampel dalam hal ini hematoksinil, .

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 96% : Ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi metode ultrasonikasi herba *M.crenata* dengan pelarut etanol 96%, kemudian ekstrak dirotav dengan *rotary evaporator* dan dikeringkan didalam oven suhu 40°C.
2. Kontrol negatif : kontrol tanpa menambahkan pemberian Ekstrak etanol 96%, herba *M.crenata* dosis 1,2 mg/20g BB mencit/hari; 2,4 mg/20g BB mencit/hari; 4,8 mg/20g BB mencit/hari ; 9,6 mg/20g BB mencit/hari.
3. Kontrol positif : kontrol dengan menambahkan Ekstrak etanol 96%, herba *M.crenata* dosis 1,2 mg/20g BB mencit/hari; 2,4 mg/20g BB mencit/hari; 4,8 mg/20g BB mencit/hari ; 9,6 mg/20g BB mencit/hari.
4. Pengamatan peningkatan kepadatan tulang trabekular femur pada penelitian ini diamati secara histomorfometri, yaitu pengukuran ketebalan tulang trabekular femur yang diperoleh dari rerata ketebalan histologi tulang trabekular femur.
5. Preparat histologi tulang : preparat sampel yang diambil dari sayatan melintang tulang trabekular femur mencit jantan yang telah diberi perlakuan yaitu dengan

diinduksi ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* pada perlakuan kontrol positif, kontrol negatif .

6. Kepadatan tulang : nilai kadar massa tulang atau biasanya disebut dengan nilai massa mineral pada tulang

4.6 Alat Dan Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan Tanaman

Tanaman *M.crenata* yang digunakan dalam penelitian didapatkan di daerah Kecamatan Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur.

4.6.2 Bahan Hewan Coba

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan dewasa berumur 70-80 hari dengan kondisi badan yang sehat secara visual, mempunyai berat badan diantara 20-25 gram.

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian kali ini ditentukan dengan menggunakan rumus replikasi dari Steel dan Torrie (Hanafiah, 2004).

$$(tr - 1) (r - 1) > 15 \qquad \qquad \qquad tr = treatment$$

$$(5 - 1) (r - 1) > 15 \dots\dots\dots r > 15 \qquad \qquad \qquad r = replication$$

Berdasarkan rumus diatas maka ditentukan $n = 5$ dan untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian mencit sebesar 20% maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 6, sehingga jumlah seluruh sampel yang akan digunakan yakni menjadi 36 ekor mencit.

Mencit jantan yang digunakan sebagai hewan coba, diinduksi dengan deksametason dengan dosis 0,2 ml/20g BB mencit secara oral selama 4 minggu, mencit

yang mengalami osteoporosis ditandai dengan terlihatnya bagian punggung yang mulai membungkuk (Laswati, 2015).

4.6.3 Bahan Kimia

Larutan etanol 96%, Na-alendronat, deksametason, CMC Na, etanol 70%, formalin 10 %, asam formiat 10%, asam nitrat 3%, aquadest, CMC-Na 0,5%, ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*, asam asetat, kloroform, aseton, xylol, paraffin cair, gliserin, amonia air, cat Harris Hematoksilin dan cat pembanding Eosin.

4.6.4 Instrumen Penelitian

Wadah maserasi, Neraca analitik, batang pengaduk, alat-alat gelas seperti labu alas bulat, gelas ukur 50 dan 100 ml, *beaker glass* 100, 250, 500 ml, erlenmayer 250, 300, 500 ml, kaca arloji, pipet volume, pipet ukur, mortir, stemper, kandang mencit, spuit, sarung tangan (Latex), masker, alat-alat diseksi, jarum syringe, pisau scapel, pinset, kapas dan kain kasa, benang dan jarrum jahit, papan parafin, jarum pentul, pisau bedah, tabung anestesi, kertas saring Whatman no.42, penggaris, tempat jaringan, kaca preparat mikroskop *chamber* eluasi, plat KLT *glass*, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, TLC Visualizer, aluminium foil, cawan porselen, alat Ultrasonikasi, alat penengring (oven), komputer, seperangkat *rotary evaporator*, timbangan mencit, *softwere* visionCATS dan *software motic image*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penyiapan Bahan Tanaman

M.crenata dipanen, lalu dicuci dan dikeringkan dibawah sinar matahari. Proses pengeringan dijaga agar daun tidak berubah warna menjadi kecoklatan. *M.crenata* yang sudah kering lalu diserbuk dan kemudian ditimbang.

4.7.2 Prosedur Ekstraksi

1. Serbuk herba semanggi di ekstraksi menggunakan metode ultrasonikasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml. Dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan ekstraksi ultrasonik selama 3x2 menit. Kemudian dilakukan penyaringan, filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, alat diatur dengan suhu batch 50⁰C dengan kecepatan putaran 70 rpm, kemudian ekstrak yang diperoleh dilakukan pengeringan menggunakan oven.
2. Hasil dari penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* dioven untuk diperoleh ekstrak kering, penggunaan suhu pada oven yaitu 40⁰C selama waktu yang tidak ditentukan, namun hasil yang diperlukan untuk ekstrak benar-benar kering, hasil ekstrak ditimbang dan dilakukan perhitungan rendemen, kemudian ekstrak ddisimpan dalam wadah yang tertutup rapat dan terhindar dari sinar matahari langsung.

4.7.3 Uji Etik dan Standarisasi Ekstrak

1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis yang dilakukan terhadap ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* diantaranya pemeriksaan terhadap bentuk, warna, dan bau .

2. Menghitung Rendemen yang Dihasilkan

Rendemen yang didapat dari bobot hasil rendemen dibagi bobot simplisia awal dikalikan 100 %, dengan rumus sebagai berikut :

$$\% = \frac{\text{Bobot hasil (mg/ml)}}{\text{Bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

3. Uji etik

Uji etik dilakukan untuk semua hewan coba yang berjumlah 30 ekor mencit jantan, uji etik dilakukan di laboratorium BIOSAINS, Universitas Brawijaya

4.7.4 Skrining Fitokimia dengan KLT

Ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang telah kering dilakukan tahapan skrining fitokimia uji kromatografi lapis tipis (KLT) dimana pengecekan data dilakukan dengan pengamatan menggunakan *TLC Visualizer*. Tahapa skrining fitokimia yaitu :

- Ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* ditimbang sebanyak 10 mg
- Dilarutkan kedalam 10 ml etanol 96% dengan bantuan ultrasonifikasi hingga ekstrak secara merata larut dalam etanol

- Dilakukan optimasi eluen, eluen yang digunakan yaitu n-Heksan dan Etil Asetat dengan perbandingan (6:4) dan (7:3) dan dimasukkan kedalam chamber
- Plat KLT *glass* dipotong sebanyak 2 buah dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 1,5 cm. Ekstrak ditotolkan pada masing-masing plat yang sudah diberi tanda batas (atas = 0,5 cm), (bawah = 1 cm)
- Plat KLT yang telah ditotolkan sampel ekstrak, dimasukkan kedalam chamber dan diamati hingga sampai tanda batas. Kemudian plat diambil dan diamati dibawah penyinaran lampu *UV* dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.
- Hasil pemisahan yang bagus ditandai dengan adanya beberapa bercak senyawa yang memisah. Kemudian dilakukan pemeriksaan lagi dengan eluensi pelarut yang memberikan hasil pemisahan yang bagus dan hasilnya diamati dengan *TLC Visualizer*
- Pengamatan dengan *TLC Visualizer* menggunakan lampu *UV* dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasilnya diolah dengan *software visionCATS* untuk dapat menentukan nilai R_f nya.

4.7.5 Uji Aktivitas Antiosteoporosis

4.7.5.1 Penyiapan Hewan Coba

Hewan diaklimasi sejak selesai diinduksikan dengan deksametason didalam laboratorium selama 4 minggu dalam kandang pada suhu 20-25⁰C sebelum perlakuan. Selama proses aklimasi mencit diberikan makan pellet dan air minum PAM. Setelah

aklimasi, ditimbang berat badan mencit dan dilakukan pengelompokan sesuai dengan kelompok perlakuan yang akan digunakan. Mencit yang digunakan dalam proses penelitian yaitu mencit yang berada dalam kondisi pada gangguan-gangguan sekunder karena kekurangan kadar estrogen, untuk mengetahui gejala-gejala yang ditimbulkan yaitu adanya gangguan klimakterik seperti osteoporosis atau pengeroposan tulang dan kondisi fisik mencit tampak membungkuk dari posisi normal.

Pada penelitian kali ini menggunakan mencit sejumlah 30 ekor mencit jantan yang telah diketahui berat badannya dan telah mengalami kondisi defisiensi estrogen. Mencit dibagi menjadi dalam 6 kelompok dengan masing-masing perlakuan yang telah ditentukan dan perulangan sebanyak enam kali, yaitu :

1. Kelompok kontrol positif

Kelompok kontrol positif adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi Na-alendronat sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

2. Kelompok kontrol negatif

Kelompok kontrol negatif adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi CMC Na sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

3. Kelompok uji aktivitas ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dosis 1,2 mg/20g BB mencit

Kelompok uji aktifitas ekstrak adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 1,2 mg/20g BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

4. Kelompok uji aktivitas ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dosis 2,4 mg/20g BB mencit

Kelompok uji aktifitas ekstrak adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 2,4 mg/20g BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

5. Kelompok uji aktivitas ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dosis 4,8 mg/20g BB mencit

Kelompok uji aktifitas ekstrak adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 4,8 mg/20g BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

6. Kelompok uji aktivitas ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dosis 9,6 mg/20g BB mencit

Kelompok uji aktifitas ekstrak adalah kelompok mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Pada kelompok mencit ini diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 9,6 mg/20g BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

4.7.5.2 Penentuan Dosis

1. Dosis Penginduksian Osteoporosis

Deksametason dipilih sebagai bahan untuk penginduksi osteoporosis.

Perhitungan dosis dari deksametason yang digunakan :

Dosis deksametason untuk manusia (70kg) = 1,125 mg/hari

Dosis deksametason untuk mencit (20g) = 1,125 x 0,0026

= 0,0029 mg/20g mencit/hari

Penginduksian dengan menggunakan deksametason yang diberikan kepada mencit sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 30 hari (Laswati, dkk, 2015).

Tahapan pembuatan suspensi deksametason :

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 2,5 g, CMC-Na didispersikan merata diatas 50 ml aquadest panas, kemudian diaduk hingga rata dan membentuk suspensi.
- Digerus 15 tablet deksametason 0,5 mg, ditimbang sesuai dosis yang diperlukan dan dicampur dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
- Hasil pencampuran dipindahkan ke dalam labu ukur 500,0 ml
- Dilakukan pengenceran dengan menambahkan aquadest sampai tepat tanda batas, kocok hingga homogen.

2. Penentuan Dosis Alendronat

Dosis alendronat untuk manusia (70kg) = 10mg/hari (Ferguson, 2004)

Dosis alendronat untuk mencit (20g) = 10mg x 0,0026
= 0,026 mg/20g BB mencit/hari

Tahapan pembuatan suspensi alendronat :

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 500 mg
- CMC-Na didispersikan dalam air panas 10 ml hingga mengembang (\pm 15 menit) kemudian digerus hingga membentuk mucilago
- Digerus 1 tablet alendronat 10 mg, ditimban sesuai dosis yang diperlukan
- Mucilago CMC-Na dicampur dengan alendronat yang telah digerus hingga menjadi campuran yang homogen
- Hasil campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga tanda batas, dikocok hingga homogen.

3. Penentuan Dosis Ekstrak Etanol 96% daun *M.crenata*

Perhitungan dosis yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Laswati (2007), yaitu dosis ekstrak etanol daun semanggi (*M.crenata*) pada manusia dengan berat 50 kg = 0,66 gram, sehingga diperoleh perhitungan dosis yang akan digunakan :

Dosis pada manusia 70 kg = $70/50 \times 0,66$ gram
= 0,93 gram = 930 mg

Dosis untuk mencit dengan berat 20 g = 930 mg x 0,0026
= 2,4 mg/20g BB mencit

Sehingga perhitungan dosis daun *M.crenata* untuk mencit 20 g : 2,4 mg/20g BB mencit (Laswati, 2007). Maka untuk dosis yang digunakan, diberikan perlakuan yaitu dosis berdasarkan literatur dan variasi dosis: dosis 1,2 mg/20g BB mencit/hari; 2,4 mg/20g BB mencit/hari; 4,8 mg/20g BB mencit/hari; 9,6 mg/20g BB mencit/hari. Penentuan jumlah ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang diperlukan :

$$\begin{aligned} \text{a. Dosis 1} &= 1,2 \text{ mg/20g BB} \\ &= 5 \times 1,2 \text{ mg} \times 28 = 168 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 168 mg

$$\begin{aligned} \text{b. Dosis 2} &= 2,4 \text{ mg/20g BB} \\ &= 5 \times 2,4 \text{ mg} \times 28 = 336 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 336 mg

$$\begin{aligned} \text{c. Dosis 3} &= 4,8 \text{ mg/20g BB} \\ &= 5 \times 4,8 \text{ mg} \times 28 = 672 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 672 mg

$$\begin{aligned} \text{d. Dosis 4} &= 9,6 \text{ mg/20g BB} \\ &= 5 \times 9,6 \text{ mg} \times 28 = 1344 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 1.344 mg

Jadi, jumlah ekstrak yang diperlukan untuk induksi yaitu sebanyak 2.520 mg.

4.7.5.3 Pembuatan Bahan Uji

A. Pembuatan Mucilago CMC-Na 0,5%

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 500 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 10 ml aqudest yang telah dipanaskan, selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen.
2. Hasil pembuatan dipindahkan ke dalam labu ukur 100,0 ml
3. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit kontrol negatif sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

B. Pembuatan Suspensi Alendronat

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 500 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 10 ml aqudest yang telah dipanaskan, selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen.
2. Digerus 1 tablet alendronat 10 mg, ditimban sesuai dengan dosis dan dicampurkan dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
3. Hasil pencampuran dipindahkan kedalam labu ukur 100,0 ml
4. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit kontrol positif sebanyak 0,2 ml/20g BB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

C. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol 96% herba *M.crenata* dosis 1,2 mg/20g BB mencit

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 1000 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 20 ml aqudest yang telah dipanaskan, selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen.
2. Ditimbang ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 168 mg dan dicampurkan dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
3. Hasil pencampuran dipindahkan kedalam labu ukur 100,0 ml
4. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit uji aktivitass ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* dosis 1,2 mg/20g BB mencit sebanyak 0,2 ml/20g mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

D. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol 96% herba *M.crenata* dosis 2,4 mg/20g BB mencit

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 1000 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 20 ml aqudest yang telah dipanaskan,

selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen.

2. Ditimbang ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 336 mg dan dicampurkan dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
3. Hasil pencampuran dipindahkan kedalam labu ukur 100,0 ml
4. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit uji aktivitas ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* dosis 2,4 mg/20g BB mencit sebanyak 0,2 ml/20g mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

E. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol 96% herba *M.crenata* dosis 4,8 mg/20g BB mencit

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 1000 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 20 ml aquadest yang telah dipanaskan, selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen
2. Ditimbang ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 672 mg dan dicampurkan dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
3. Hasil pencampuran dipindahkan kedalam labu ukur 100,0 ml
4. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit uji aktivitass ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dosis 4,8 mg/20g BB mencit sebanyak 0,2 ml/20g mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

F. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol 96% herba *M.crenata* dosis 9,6 mg/20g BB mencit

1. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 1000 mg, kemudian CMC-Na didispersikan merata diatas 20 ml aqudest yang telah dipanaskan, selanjutnya didiamkan sampai mengembang (\pm 15 menit), kemudian digerus hingga membentuk suspensi yang homogen
2. Ditimbang ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* sebanyak 1.344 mg dan dicampurkan dengan suspensi CMC-Na, kemudian diaduk hingga homogen.
3. Hasil pencampuran dipindahkan kedalam labu ukur 100,0 ml
4. Dilakukan pengenceran dengan penambahan aquadest sampai tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan pada kelompok mencit uji aktivitass ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* dosis 9,6 mg/20g BB mencit sebanyak 0,2 ml/20g mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

4.7.5.4 Pembuatan Preparat Histomorfometri

Pembuatan preparat tulang trabekular femur mencit dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE). Tahapan pembuatan yang dilakukann pada penelitian kali ini pada pembuatan preparat histopatologis diataranya

yaitu fiksasi dan pencucian, dekalsifikasi, dehidrasi dan *clearing*, infiltrasi, pembuatan balok parafin (*embedding*), pengirisan tipis, pewarnaan dan penutupan sediaan.

4.7.5.5 Pemeriksaan Histomorfometri Tulang

Hasil dari uji aktivitas dilakukan dengan cara pemeriksaan histomorfometri tulang trabekular femur mencit. Pemeriksaan dan pengamatan histomorfometri dari tulang trabekular femur mencit pada penelitian kali ini adalah pengukuran ketebalan tulang trabekular femur pada mencit jantan yang diukur secara mikroskopis setelah dilakukan pemberian perlakuan kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M.cenata*. Mikroskop yang digunakan dalam pengamatan ini dihubungkan pada suatu komputer dan lensa kamera mikroskop dengan kualitas lensa 24 Megapixel, serta *software optilab dan motic image*. Kemudian dilakukan pengamatan dan perhitungan ketebalan tulang trabekular femur mencit.

4.8 Analisa Data

4.8.1 Analisa Data Pengamatan Histologi Tulang dengan Metode ANOVA

Data yang diperoleh dari perhitungan ketebalan tulang trabekular femur mencit akan dicatat sebagai nilai mean \pm SD. Analisa data yang dilakukan melihat dengan ada atau tidaknya perbedaan bermakna pada nilai ketebalan tulang trabekular femur mencit antara kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kelompok uji aktivitas ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*, dengan menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) pada $\alpha=0,05$. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, maka uji statistic dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* untuk mengetahui adanya perbedaan dalam kelompok perlakuan dalam penelitian ini menggunakan uji *Least Significance Different*

(LSD). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal, digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non-parametrik.
2. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One Way* ANOVA : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikansi, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau lebih dikenal dengan uji *Least Significance Different* (LSD).
4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Apabila *P value* < 0,05 berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

4.8.2 Penentuan Dosis Efektif (ED₅₀)

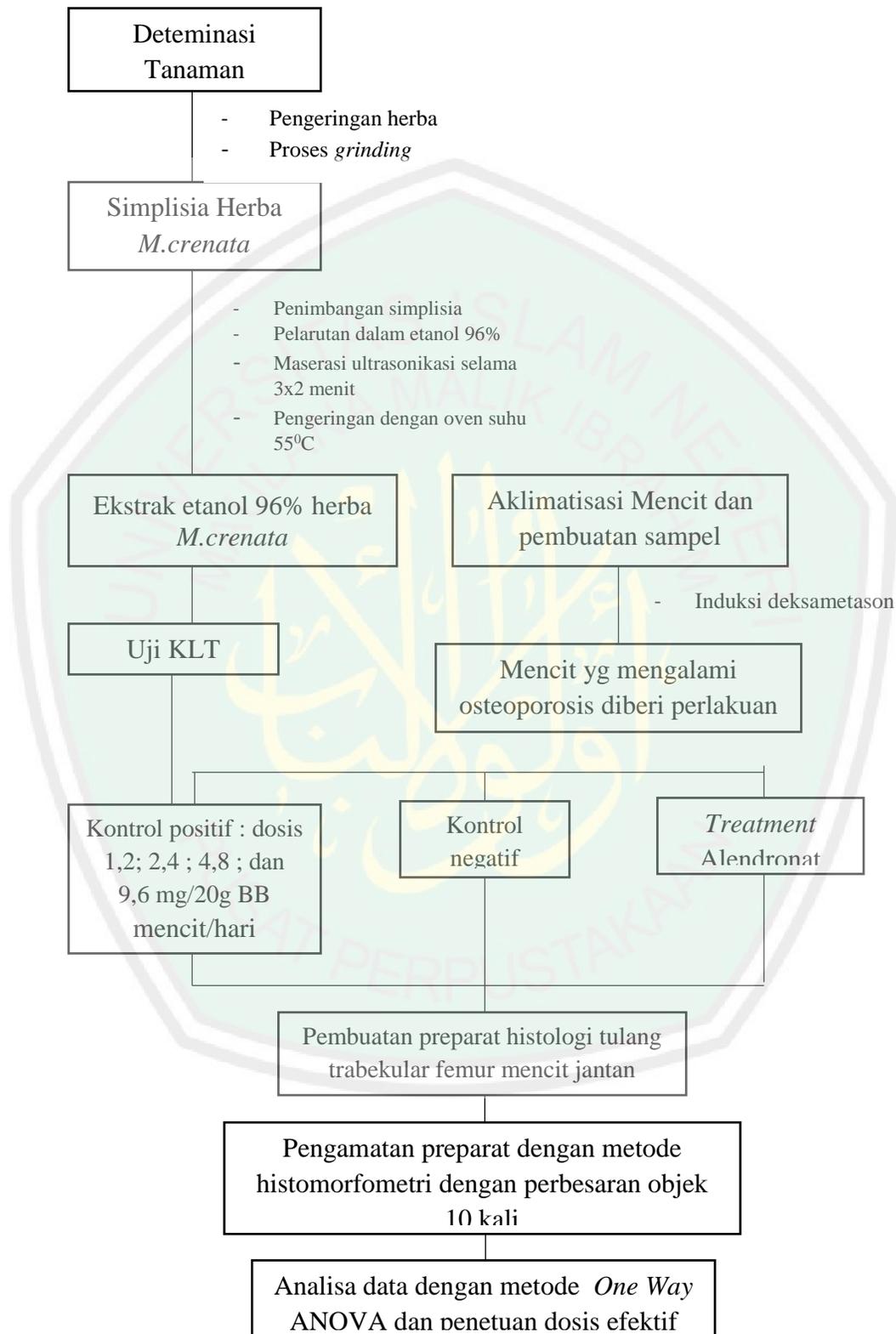
Dosis yang menimbulkan efek terapi pada 50 % individu disebut dosis terapi median atau dosis efektif median (ED₅₀). Dosis letal median (LD₅₀) ialah dosis yang menimbulkan kematian pada 50 % individu, sedangkan TD₅₀ ialah dosis toksik 50 %. Dalam studi farmakodinamik di laboratorium, indeks terapi suatu obat dinyatakan dalam rasio berikut :

$$\text{Indek terapi} = \frac{TD_{50}}{ED_{50}} \text{ atau } \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$$

Tahapan penentuan indeks terapi :

1. Tahapan penentuan nilai rerata dari hasil pengukuran ketebalan tulang trabekular femur
2. Setelah diperoleh data, data diklasifikasikan berdasarkan dosis yang diberikan, hewan coba. Kemudian ditentukan nilai ED₅₀ dan LD₅₀ , Metode analisa data yang digunakan berupa analisa data Probit, kemudian dapat ditentukan nilai indeksterapi.

4.9 Alur Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman

Herba *M.crenata* yang digunakan pada penelitian diambil dan dipanen dari persawahan dari daerah Benowo, Kota Surabaya, Jawa Timur pada bulan September 2017, dan diidentifikasi di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Identifikasi tumbuhan merupakan suatu cara agar dapat memastikann bahwa tumbuhan tersebut benar sesuai dengan jenis dan familinya, metode yang digunakan dengan menggunakan kunci determinasi dimana setiap tumbuhan akan digolongkan secara bertahap dari bangsa, suku, marga atau jenis dan seterusnya. Determinasi dilakukan untuk memastikan dari jenis tanaman yang digunakan telah sesuai dan menghindari adanya kesalahan penggunaan tanaman yang memiliki ciri-ciri morfologi yang sama dengan spesies lain (Abidin, 2006; Zulkifli, 2009). Hasil identifikasi herba *M.crenata* sebagai berikut: 1a-17b-18a-1.

Herba yang diperoleh kemudian dibuat dalam bentuk serbuk simplisia, pembuatan serbuk dilakaukan di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur.

Tabel 5.1 Jumlah Herba *M.crenata*

Herba <i>M.crenata</i>	Berat
Herba <i>M.crenata</i> basah	4 kg
Herba <i>M.crenata</i> kering	1,7 kg
Serbuk Herba <i>M.crenata</i> kering	1,7 kg

5.2 Pengukuran Nilai Kadar Air

Pengukuran nilai kadar air adalah uji yang dilaksanakan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam simplisia yang diuji. Semakin kecil nilai kadar air suatu simplisia maka efektifitas penarikan senyawa aktif oleh pelarut semakin tinggi. Kadar air yang aman untuk suatu bahan kering adalah 10-12% dan kadar air yang baik adalah dibawah 10% (BPOM,2000).

Hasil yang didapat dari pengukuran nilai kadar air terhadap simplisia kering herba *M.crenata* menggunakan *moisture content analyzer* adalah sebagaimana yang terdapat pada tabel 5.2. Nilai rerata kadar air yang diperoleh adalah 9,11 % yang mana nilai tersebut menunjukkan bahwa serbuk simplisia herba *M.crenata* memiliki nilai kadar air yang baik yaitu dibawah 10%. Hal ini dikarenakan proses pengeringan yang dilakukan secara optimal, serta penyimpanan serbuk yang disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak terkena sinar matahari langsung.

Tabel 5.2 Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering Herba *M.crenata*

Nama Sampel	Replikasi	Berat Awal	Berat Akhir	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Serbuk kering simplisia herba <i>M.crenata</i>	1	0,509 g	0,466 g	8,45 %	8,6 %
	2	0,506 g	0,464 g	8,30 %	
	3	0,507 g	0,461 g	9,07%	

5.3 Pembuatan Ekstrak

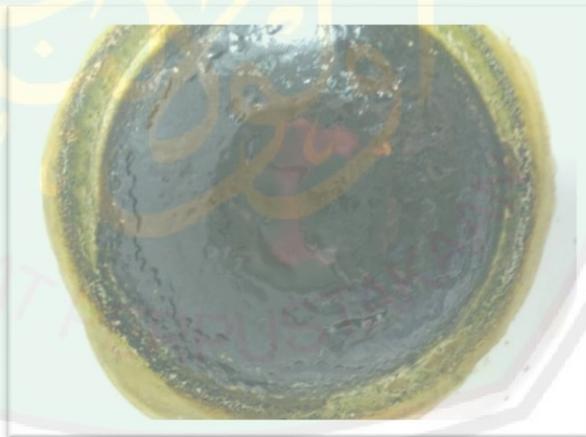
Proses pembuatan ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dilakukan dengan menggunakan metode ultrasonikasi. Pemilihan dalam penggunaan metode ultrasonikasi ini karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu selain

mempercepat proses ekstraksi, metode ini juga merupakan salah satu upaya peningkatan efisiensi hasil ekstrak dari metode-metode konvensional. Pemilihan metode ultrasonik ini bertujuan untuk memperoleh hasil rendemen yang lebih besar dari pada menggunakan metode ekstraksi konvensional.

Proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:16 (b/v). Penggunaan etanol 96% karena pelarut ini merupakan pelarut semi polar dan digunakan terutama dalam pembuatan ekstrak dengan bahan baku sediaan *herbal medicine*, penggunaan dengan perbandingan tersebut juga diperuntukkan untuk mengefisienkan jumlah pelarut dan simplisia yang digunakan (Afrianti *et al.*, 2014). Penggunaan metode ultrasonikasi dengan pelarut etanol 96% dapat meningkatkan dan menyari senyawa metabolit sekunder lebih banyak terutama pada senyawa yang memiliki sifat polar-semipolar dan non polar. Prinsip dalam menggunakan metode ultrasonikasi ini terletak pada proses peyarian senyawa metabolit sekunder pada serbuk simplisia dengan pelarut dimana menggunakan gelombang ultrasonik yang menyebabkan terjadinya kavitasi terbentuknya gelembung mikro karena meningkatnya tekanan, gelembung-gelembung yang tidak stabil akan mudah pecah dan menghasilkan energi dari pecahan tersebut. Efek panas dari energi yang dihasilkan menyebabkan dinding sel mengalami kerusakan sehingga proses difusi dan penyarian senyawa metabolit sekunder lebih mudah terikat oleh pelarut, dengan memanfaatkan metode ini hasil ekstrak yang diperoleh akan jauh lebih banyak dari metode ekstraksi konvensional (Mukhairini, 2014; Sani *et al.*, 2014).

Filtrat yang bercampur dengan pelarut dipisahkan dengan bantuan alat *rotary evaporator*, alat ini menggunakan prinsip pada pemisahan pelarut dengan ekstrak menggunakan prinsip perbedaan titik didih antara pelarut dengan ekstrak dengan adanya bantuan tekanan, putaran dan pemanasan dapat meningkatkan proses dari pemisahan pelrut dengan ekstrak. Selain itu kelebihan dalam penggunaan alat ini yaitu mempercepat proses dan memaksimalkan hasil yang didapat, senyawa yang terdapat dalam pelarut dapat dipisahkan dengan maksimal tanpa senyawa harus ikut rusak akibat pemanasan (Nisa *et al*, 2014).

Filtrate yang diperoleh dari rotary evaporator diuapkan dengan bantuan oven untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang ada, sehingga diperoleh ekstrak yang kental dan tidak mengandung pelarut eetanol 96%.



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Kental Etanol 96% Herba *M.crenata*

Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen berdasarkan perhitungan berat akhir (berat ekstrak) dibagi berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) dikalikan 100%. Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak

ekstrak yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, 2013; Sani, 2014).

Tabel 5.3 Hasil Ekstraksi Herba *M.crenata*

Jumlah Serbuk	Jumlah Ekstrak	Jumlah Pelarut	% Rendemen
921,864 g	26,505 g	14,5 L	2,87 %

5.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dini kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*. Skrining fitokimia yang dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang divisualisasikan dengan menggunakan *TLC Visualizer*. Skrining fitokimia dengan KLT ini berprinsip pada sistem adsorpsi dan partisi dimana sampel akan berpisah berdasarkan kepolaran antara fase diam dan fase geraknya (Dirjen POM, 1979).

Prosedur skrining fitokimia dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu skrining dengan uji reaksi warna tiap golongan diantaranya golongan senyawa alkaloid, triterpenoid, saponin, flavonoid, polifenol dan antrakuinon kemudian dilanjutkan dengan optimasi eluen, skrining dengan eluen dan pengamatan dengan *TLC Visualizer*. Uji skrining yang dilakukan dengan reaksi warna spesifik bertujuan untuk memastikan adanya senyawa golongan yang diduga memiliki aktivitas fitoestrogen, hasil dari uji skrining fitokimia dilihat pada tabel 5.4 sebagai berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji Reaksi Warna Skrining Fitokimia

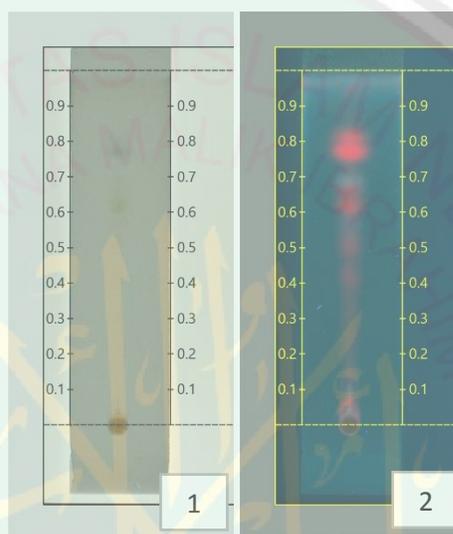
No	Identifikasi Golongan Senyawa	Jenis Uji	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid	Uji mayer	-	Tidak ada endapan putih
		Uji wagner	-	Tidak ada endapan putih
		KLT	-	Tidak ada spot jingga
2	Saponin, Triterpenoid dan Steroid	Uji buih	√	Ada buih stabil
		Uji Lieberman Burchard	√	Warna hijau kehitaman
		Uji Salkowski	-	Tidak ada cincin merah
		KLT	√	Spot ungu
3	Flavonoid	Uji Bate Smith Dan Metclaft	√	Ada cincin merah
		Uji Wilstater	√	Cincin merah
		KLT	√	Spot kuning
4	Polifenol dan tanin	Uji Gelatin	-	Tidak ada endapan putih
		Uji Feri Klorida	√	Hijau kehitaman
		KLT	√	Spot hitam
5	Antrakuinon	Uji Borntrager	-	Tidak adda warna merah
		Uji Modifikasi Borntrager	-	Tidak ada warna merah
		KLT	-	Tidak ada spot ungu

Hasil dari skrining fitokimia dari ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang terdapat pada tabel 5.4 menunjukkan bahwa *M.crenata* mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, flavonoid dan polifenol, hasil uji reaksi warna dan KLT dapat dilihat pada bagan lampiran. Setelah dilakukan optimasi, kemudian dilakukan

skrining fitokimia dengan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 7:3 sebanyak 10 ml. Ekstrak larut kemudian ditotolkan pada plat HPTLC silica gel F₂₅₄ dengan ukuran plat 1,5 x 10 cm menggunakan pipet mikro 2 μ l. Selanjutnya plat dimasukkan kedalam chamber yang berisi eluen yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluen bergerak naik sampai tanda batas. Plat HPTLC yang telah dieluenisasi diangkat guna mencegah rusaknya plot yang muncul. plat HPTLC divisualisasi dengan menggunakan *TLC Visualizer* pada lampu cahaya putih dan lampu *UV* dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, pengamatan pada lampu *UV* ini bertujuan agar dapat mengetahui dan mengidentifikasi spot pemisahan dari golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% herba *M.crenata*. Penggunaan cahaya putih dilakukan agar dapat mengidentifikasi warna yang muncul dari spot pemisahan tersebut. Dilakukan pengamatan dari hasil visualisasi *TLC Visualizer* yang pertama. Selanjutnya plat disemprot (derivatisasi) dengan menggunakan penampak noda H₂SO₄ 10% di lemari asam dan dipanaskan diatas *TLC Heater* dengan suhu 105⁰C selama beberapa menit.

Penggunaan penampakan noda H₂SO₄ 10% karena bersifat reduktor yang dapat memutuskan ikatan rangkap hingga panjang gelombangnya bertambah dan warna noda dapat dilihat. Mekanisme penampakan noda ini dapat disebabkan juga karena gugus OH yang dimiliki H₂SO₄ sehingga berfungsi sebagai ausokrom, dimana ausokrom ini dapat menyebabkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang pada cahaya tampak (Gandjar, 2007).

Setelah dilakukan penyemprotan dan pemanasan plat HPTLC, kemudian dilakukan pengamatan visualisasi kembali dengan *TLC Visualizer* dengan penggunaan lampu cahaya putih dan lampu *UV* hanya pada panjang gelombang 366 nm. Pengamatan dilakukan hanya pada panjang gelombang 366 nm karena alat *TLC Visualizer* sudah teratur demikian sehingga noda/spot yang muncul menjadi lebih jelas.



Keterangan:

1 = Visualisasi Plat KLT pada cahaya putih

2 = Visualisasi Plat KLT lampu UV panjang gelombang 366 nm

Gambar 5.2 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan *TLC Visualizer*

Hasil pengamatan pada visualisasi plat KLT dengan *TLC Visualizer* terdapat beberapa noda tampak yang dapat diamati. Pada visualisasi lampu cahaya putih dan lampu *UV* dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm hasil spot yang diberikan berbeda-beda, dengan demikian digunakan data hasil pengamatan pada plat HPTLC yang telah diderivatisasi, karena hasil yang lebih bagus dan penampakan noda spot jauh lebih jelas dibandingkan yang belum diderivatisasi. Hasil yang diperoleh yaitu

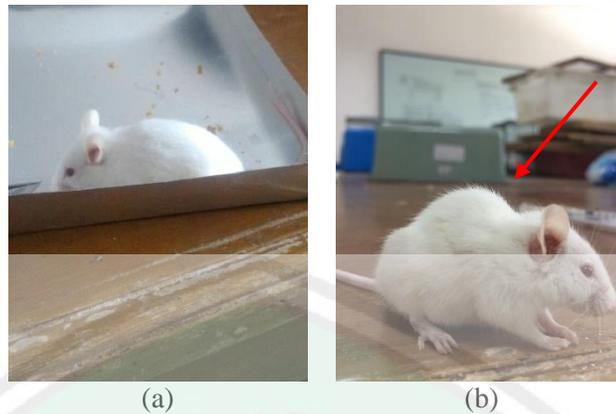
terdapat 8 titik spot warna yang muncul dan dapat diidentifikasi, rincian data tertera pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Rincian Profil KLT Esktrak Etanol 96% Herba *M.crenata*

Ekstrak	No	Rf	Warna	Golongan
Ekstrak	1	0,690	Kuning	Flavonoid
Etanol 96%	2	0,735	Kuning	Flavonoid
herba	3	0,823	Hijau kehitaman	Polifenol
<i>M.crenata</i>	4	0,944	Biru kehitaman	Terpen, Polifenol

5.5 Perlakuan dan Pembuatan Preparat

Jenis penelitian yang digunakan yaitu *in vivo* sehingga menggunakan induksi pada hewan coba, penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) jantan usia 5 bulan dengan kisaran berat badan 20-25 g sebanyak 36 ekor yang tampak sehat secara visual. Mencit yang sehat ditempatkan pada kandang besi berukuran 20x30x20 cm dimana tiap kandang berisi 6 ekor mencit. Perlakuan yang diberikan yaitu dilakukan aklimatisasi selama satu minggu dengan dilakukan pembersihan kandang dan pemberian makan sebanyak 2 kali dalam sehari. Setelah dilakukan aklimatisasi kemudian mencit diinduksi dengan deksametason dengan dosis 0,0029 mg/BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml dalam sekali induksi. Induksi dilakukan selama 4 minggu sampai terdapat tanda-tanda mencit mengalami osteoporosis.



(a) (b)
Gambar 5.3 Mencit (a) Normal, (b) Osteoporosis

Perbedaan dari hasil pemberian deksametson pada mencit normal dan mencit yang mengalami osteoporosis yaitu pada mencit normal warna bulu mencit terlihat lebih cerah dan lebih lebat, bagian tulang punggung (vertebra) tidak terlihat membungkuk, aktif bergerak. Pada mencit yang mengalami osteoporosis warna bulu tampak kusam dan tidak cerah dan bulu tidak lebat, mencit lebih sedikit aktif bergerak dibandingkan yang normal, pada bagian tulang punggung (vertebra) terlihat bengkok dan jalan mencit lebih membungkuk. Hal ini dapat dikatakan bahwa mencit telah mengalami osteoporosis akibat pemberian deksametason, pemberian deksametason dalam jangka panjang dapat menurunkan kepadatan tulang dimana memperpanjang rentan umur osteoklas dan memperlambat osteogenesis, interaksi molekuler pemberian glukokortikoid berupa deksametason menurunkan ikatan estrogen dengan estrogen reseptor. Penghambatan antara estrogen reseptor dengan glukokortikoid terjadi karena pada mekanisme ini memberikan efek untuk pembentukan mRNA sulfotransferase (SULT1E) yang menyebabkan penghambatan pada aktivitas estrogenik sehingga

mengalami defisiensi estrogen, hal ini karena estrogen tidak dapat berikatan dengan estrogen reseptor (Gong *et al*, 2008; Karmakar *et al.*, 2013; Leswati *et al*, 2015).

Setelah semua mencit mengalami osteoporosis, mencit dikelompokkan berdasarkan perilaku uji yang diberikaan, untuk kelompok control negative dan positif disendirikan, kelompok kontrol negative diberikan induksi suspensi CMC-Na sebanyak 0,2 ml, kelompok perlakuan kontrol positif diberikan induksi alendronate dengan dosis 0,026 mg/BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml dalam sekali pemberian. Kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 diberikan dosis masing-masing 1,2; 2,4; 4,8 dan 9,6 mg/BB mencit/hari sebanyak 0,2 ml dalam sekali pemberian selama 4 minggu. Selama pemberian perlakuan terdapat beberapa mencit yang mengalami kematian sehingga hasil akhir yang diperoleh yaitu terdapat 4 ekor mencit yang bertahan hidup dari masing-masing kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan pembedahan pada bagian tulang trabekular femur mencit.

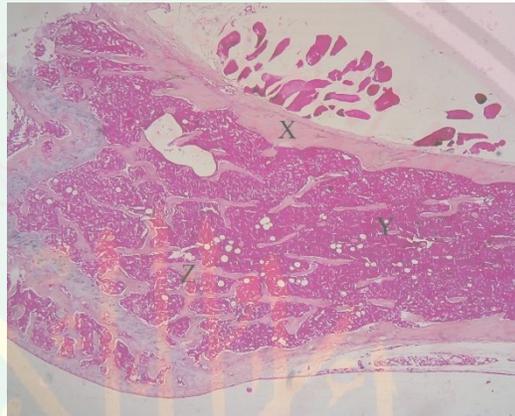
Pembedahan yang dilakukan melalui beberapa tahapan, dimulai dari proses mematikan mencit, pembedahan dan pengawetan tulang trabecular femur. Pada tahapan pertama yaitu mematikan mencit agar bagian jaringan yang diambil lebih mudah dengan bantuan kloroform, selanjutnya tahapan pembedahan yang diambil berupa tulang trabekular femur pada bagian sebelah kanan, hasil jaringan dicuci dengan NaCl 0,9% untuk membersihkan darah yang ada, selanjutna dilakukan pengawetan bagian jaringan tulang dengan memasukkannya kedalam larutan formalin atau formaldehyde 10%, penggunaan larutan formalin ini berguna agar jaringan yang didapat tidak rusak dan tidak cepat mengalami membusuk (Astawan, 2006; Male *et al*,

2018). Prosedur pembedahan yang dilakukan merupakan prosedur standar untuk penelitian secara *in vivo* dengan tahapan prosedur yang dapat meminimalkan kesalahan dan hasil yang buruk. Tulang trabekular femur dibuat dalam bentuk preparat histologi.

Preparat histologi jaringan merupakan metode yang sesuai untuk pengamatan secara histomorfometri, hal ini karena jaringan yang diteliti dapat terlihat dengan jelas. Pada pembuatan preparat histologi terdapat beberapa macam metode, pada penelitian ini menggunakan metode pemblok jaringan dengan metode paraffin. Jaringan yang telah dipotong diblok dengan paraffin sesuai dengan kode jaringan yang diinginkan dan diawetkan dengan bantuan *xylol* dan alkohol beberapa konsentrasi. Penggunaan metode paraffin, karena mudah dalam penggunaan dan pemotongan jaringan terutama dalam pembuatan preparat jaringan permanen (Sari *et al*, 2016).

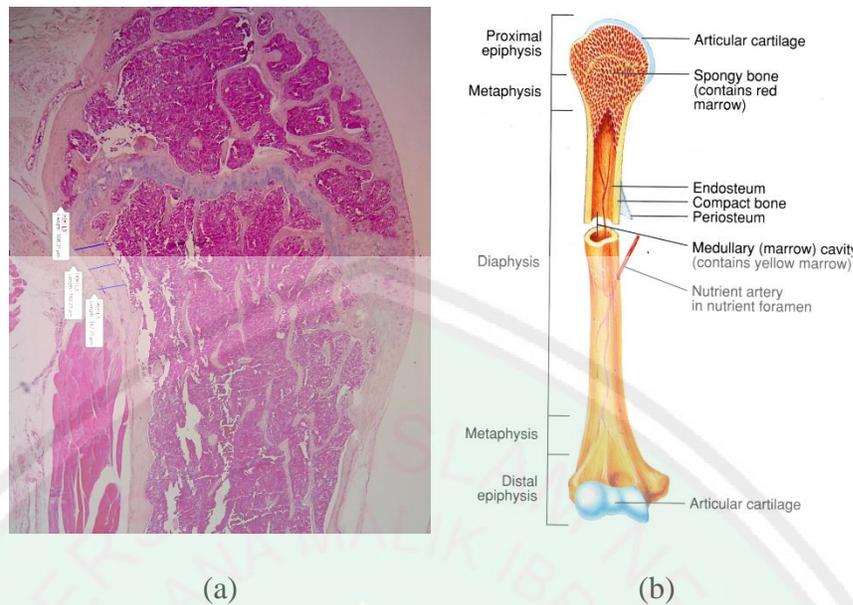
Hasil preparat jaringan yang diperoleh dari metode paraffin tidak mudah rusak namun jaringan yang didapat tidak berwarna sehingga perlu dilakukan pengecatan jaringan, metode yang digunakan yaitu pengecatan *hematoxylin* dan *eosin*. Metode ini dipilih karena merupakan metode yang efektif untuk mengamati bagian jaringan dan hasil yang diperoleh lebih bagus dan lebih detail karena tiap bagian jaringan yang hendak diamati dapat terlihat. Tahapan terakhir berupa perendaman preparat dalam alkohol beberapa konsentrasi untuk membersihkan sisa-sisa pengecatan jaringan (Sari *et al*, 2016).

Hasil preparat yang telah kering kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan menggunakan kamera Optilab dan *software* Optilab. Hasil pemotretan jaringan ditunjukkan pada gambar 5.4, dimana bagian tulang kompak trabekular femur (X), bagian matriks tulang (Y), dan bagian rongga tulang trabecular femur (Z).



Gambar 5.4 Contoh Hasil Preparat Jaringan Tulang Trabekular Femur

Pengukuran ketebalan tulang dilakukan dengan mengukur ketebalan tulang kompak trabecular femur, prosedur pengukuran ketebalan yang dilakukan yaitu dengan mengamati preparat jaringan tulang pada mikroskop cahaya dengan bantuan aplikasi dan kamera Optilab 8 Megapixel. Preparat diamati dengan perbesaran 40x dan 100x penggunaan kedua jenis perbesaran tersebut untuk memastikan bagian tulang yang diamati benar dan dapat memilih bagian tulang yang baik karena terdapat bagian tulang yang rusak akibat proses pemotongan atau pengecatan tulang. Preparat difoto dan data disimpan, selanjutnya bagian pengamatan pengukuran ketebalan tulang pada bagian metafisis yaitu bagian bawah epifis dimana bagian tersebut merupakan bagian yang aktif untuk pertumbuhan tulang.



Gambar 5.5 Pengukuran Ketebalan Tulang Trabekular Femur (a) Sampel Preparat, (b) Struktur Tulang Trabekular Femur

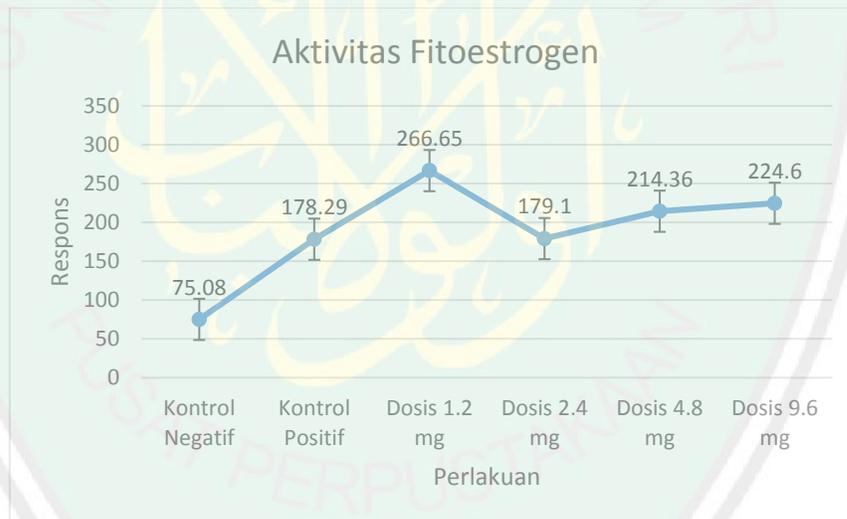
Pengukuran ketebalan tulang pada bagian metafisis, karena bagian tersebut merupakan bagian yang paling aktif dalam melakukan proses pertumbuhan, osteogenesis. Metafisis mempengaruhi dalam pembentukan bentuk struktur tulang kompak ataupun rongga tulang dan merupakan bagian yang mudah diukur dalam melihat tingkat kekukatan ketebalan tulang, bagian ini sering dijadikan sebagai tempat pengukuran ketebalan tulang untuk melihat nilai *T-score* dalam identifikasi osteoporosis. Adanya ketebalan tulang yang tidak merata, sehingga pengukuran dilakukan 3x replikasi pada satu sisi bagian tulang untuk mendapatkan bagian dan nilai yang dapat diidentifikasi (Rizalah *et al.*, 2016; Sankar *et al.*, 2016).

Hasil dari pengukuran histomorfometri rerata total ketebalan tulang dari setiap kelompok uji kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas dari ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* terhadap

peningkatan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan. Hasil pengukuran histomorfometri ketebalan tulang didapat sebagaimana yang terdapat pada tabel 5.6 dan gambar berikut:

Tabel 5.6 Data Rerata Total Ketebalan Tulang tiap Kelompok Uji

Kelompok Uji	Nilai Rerata Total Ketebalan Tulang (μm) \pm SD
Kontrol Negatif	75.08 \pm 2.32
Kontrol Positif	178.29 \pm 2.37
Kelompok Dosis 1 (1,2 mg)	266.65 \pm 1.38
Kelompok Dosis 2 (2,4 mg)	179.1 \pm 2.81
Kelompok Dosis 3 (4,8 mg)	214.36 \pm 4.27
Kelompok Dosis 4 (9,6 mg)	224.6 \pm 3.68



Gambar 5.6 Grafik Pengukuran Ketebalan Tulang (Aktivitas Fitoestrogen)

5.6 Analisa Data Pengukuran Ketebalan Tulang

Analisis data terhadap hasil yang didapat dari pengukuran ketebalan tulang trabekular femur metode histomorfometri dilakukan dengan menggunakan metode

One-Way ANOVA dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan suatu data dinyatakan dalam (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95% dari *software* IBM SPSS Statistic 24. Metode ANOVA digunakan dengan syarat data memiliki nilai uji normalitas dan homogenitas dengan *p-value* > 0,05.

Uji normalitas data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan *Shapiro-Wilk* terhadap hasil pengukuran ketebalan tulang trabekular femur mencit jantan ditunjukkan pada tabel 5.7 sebagai berikut:

Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Signifikansi
Kontrol Negatif	0,262
Kontrol Positif	0,981
Kelompok Dosis 1 (1,2 mg)	0,116
Kelompok Dosis 2 (2,4 mg)	0,612
Kelompok Dosis 3 (4,8 mg)	0,916
Kelompok Dosis 4 (9,6 mg)	0,331

Berdasarkan data pada tabel 5.7 diperoleh nilai signifikansi pada keenam kelompok perlakuan lebih besar dari 0,05 yang berarti bahwa semua distribusi data dari masing-masing kelompok yang didapat adalah normal. Selanjutnya setelah didapat data pada uji normalitas normal, kemudian data yang diperoleh dilanjutkan dengan uji homogenitas variannya dengan *Levene's test*. Hasil uji *Levene's test* dapat dilihat pada tabel 5.8 sebagai berikut:

Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas *Levene's test*

Levene Statistic	Sig.
0,325	0,261

Hasil dari uji homogenitas yang ditunjukkan pada tabel 5.7 menunjukkan bahwa dari semua distribusi data dengan nilai signifikan 0,261. Nilai signifikansi yang didapat lebih besar dari 0,05 yang berarti bahwa data yang didapat memenuhi syarat uji homogenitas yang kemudian dapat diberlakukan analisis perbedaan dengan *One-Way* ANOVA. Hasil uji perbedaan *One-Way* ANOVA dapat dilihat pada tabel 5.9 sebagai berikut:

Tabel 5.9 Hasil Uji *One-Way* ANOVA

	Sum of Squeares	df	Mean Square	F	Sig.
Between groups	74264.471	5	16902,864	1926,433	.000
Within groups	90.186	18	8,774		
Total	74354.657	23			

Hasil uji yang menyatakan perbedaan dengan nilai signifikansi 0,000 sehingga dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari nilai rerata total pengukuran ketebalan tulang trabekular femur antar kelompok uji karena nilai signifikansinya lebih kecil dari 0,05. Selanjtnya dilakukan uji beda nyata terkecil menggunakan uji *Least Significant Difference (LSD)* yang bertujuan untuk mengetahui secara rinci signifikansi perbedaan dari data pengukuran ketebalan tulang trabekular femur tiap kelompok uji

yang didapat. Hasil nilai yang didapat dari pengukuran ketebalan tulang trabekular femur dinyatakan signifikan dengan kelompok lain apabila nilai yang diperoleh memiliki signifikansi $<0,05$. Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.10 sebagai berikut:

Tabel 5.10 Hasil Uji *Least Significant Difference* (LSD)

Kelompok	Positif	Negatif	Dosis 1 (1,2 mg)	Dosis 2 (2,4 mg)	Dosis 3 (4,8 mg)	Dosis 4 (9,6 mg)
Positif		0,000*	0,000*	0,702	0,000*	0,000*
Negatif	0,000*		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Dosis 1 (1,2 mg)	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*	0,000*
Dosis 2 (2,4 mg)	0,702	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*
Dosis 3 (4,8 mg)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		0,000*
Dosis 4 (9,6 mg)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

*Beda signifikan dengan nilai signifikansi $<0,05$

Hasil uji LSD yang terdapat pada tabel 5.10 secara umum menyatakan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok uji dosis 1,2,3,4 dan kontrol positif terhadap kelompok kontrol negatif. Hal ini dinyatakan dengan adanya nilai yang muncul lebih rendah dari 0,05 antara kelompok negatif dengan kelompok yang lain. Pada kelompok perlakuan dosis 2, muncul nilai 0,702 terhadap kontrol positif, namun nilai tersebut masih diatas 0,05 dengan demikian nilai yang diperoleh tidak signifikan. Sehingga dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang diberikan pada kelompok perlakuan dosis 1,2,3 dan 4 memiliki aktivitas dalam meningkatkan

ketebalan tulang trabekular femur, serta kelompok perlakuan positif yang diinduksi dengan alendronate dengan dosis 0,026 mg memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan tulang trabecular femur yang ditinjau dari nilai uji LSD pada kelompok kontrol negatif. Seluruh nilai dosis yang memiliki nilai $<0,05$ kecuali pada dosis perlakuan 2,4 mg sehingga dapat dinyatakan bahwa perlakuan dosis yang diberikan memiliki dosis optimum.

Selanjutnya untuk mengetahui dari nilai dosis optimum yang diberikan dilakukan uji menggunakan uji Probit Analisis yaitu *Chi-Square Test* dari data pengukuran ketebalan tulang trabekular femur. Pemilihan penggunaan uji probit ini karena sampel yang digunakan adalah jaringan biologis yang terdapat banyak sekali faktor yang mempengaruhi dari hasil analisa, factor yang mempengaruhi dapat berupa aktivitas sel, adanya enzim atau adanya protein antar jaringan yang memungkinkan terjadinya rekasi kimiawi. Hasil uji *Chi-Square* dapat dilihat pada tabel 5.11 sebagai berikut:

Tabel 5.11 Hasil Uji *Chi-Square*

		Chi-Square	Df ^b	Sig.
PROBIT	Person Goodness-of-fit test	26,501	1	,000 ^a

*Nilai signifikan $<0,5$, factor heterogenitas digunakan sebagai acuan kalkulasi nilai limit

Hasil Uji *Chi-Square* pada tabel 5.11 menunjukkan bahwa nilai dari data yang diperoleh pada perlakuan tiap kelompok pemberian dosis ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yaitu signifikan karena kurang dari 0,5. Selanjutnya untuk melihat nilai dosis optimum (ED₅₀) dilakukan uji probabilitas yang ditampilkan pada tabel 5.12 sebagai berikut:

Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas Uji *Chi-Square*

Probability	Estimate
0,250	2.066
0,500	1,908
0,750	1,762
0,990	1,451

Hasil nilai Probabilitas Uji *Chi-Square* yang ditunjukkan pada tabel 5.11 yaitu nilai ED₅₀ dan ED₉₉ berturut-turut yaitu 1,908 dan 1,451. Nilai ED₅₀ yang menunjukkan nilai efektif dose yang dapat diberikan yaitu sebesar 1,908 mg sedangkan nilai ED₉₉ yang menunjukkan nilai efektif dose rendah atau letal dose yang dapat menyebabkan overdose sehingga kurang efektif dalam peningkatan efek farmakologis yang diberikan ditunjukkan sebesar 1,451 mg. sehingga dari penelitian ini diperoleh bahwa nilai efektif dose yang diberikan atau ED₅₀ yaitu sebesar 1,908 mg dan letal dose atau ED₉₉ sebesar 1,451 mg.

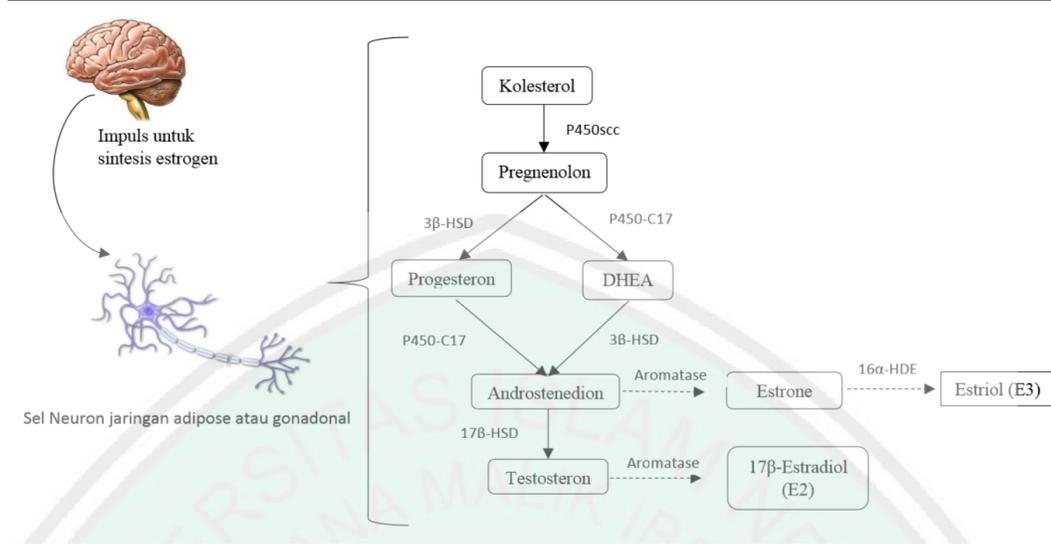
Nilai signifikansi yang bermakna dari keseluruhan kelompok uji menunjukkan bahwa kandungan senyawa fitoestrogen yang diduga terdapat pada ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* memiliki aktivitas farmakologis dalam meningkatkan kepaatan tulang trabekular femur.

5.7 Mekanisme Aktivitas senyawa fitoestrogen ekstrak etanol 96% herba

M.crenata

Estrogen dimiliki pada setiap tubuh manusia dengan konsentrasi yang berbeda-beda sesuai dengan kebutuhan tubuh sendiri. Estrogen berperan penting dalam proses

remodeling tulang dimana baik secara langsung ataupun tidak langsung memberikan efek farmakologis pada pembentukan sel tulang baru. Pada laki-laki estrogen diproduksi dari sistem sintesis lokal oleh jaringan adiposa, gonadonal yang secara spesifik akan bekerja pada tempat tertentu seperti tulang dan berperan penting dalam regulasi sel osteoblast dan osteoklast. Sintesis estrogen secara alami yang terjadi dalam tubuh melibatkan enzim aromatase. Kolesterol yang terdapat dalam tubuh akan dimanfaatkan untuk sintesis estrogen dimana proses sintesis akan merubah kolesterol menjadi pregnenolone dengan bantuan P450_{scc}. Selanjutnya pregnenolone akan dirubah menjadi hormon progesteron dengan bantuan enzim 3 β -hydroxisteroid dehydrogenase (3 β -HSD) dan dehydroepiandrosterone (DHEA) dengan bantuan P450-C17, kedua hormon tersebut akan dirubah menjadi androstenedion kemudian testosteron dengan bantuan 17 β -hydroxisteroid dehydrogenase (17 β -HSD) yang merupakan substansi pembentukan estrogen dalam tubuh oleh bantuan enzim aromatase. Androstenedione akan dirubah menjadi Estrone (E1) sedangkan testosterone akan dirubah oleh bantuan aromatase menjadi 17 β -Estradiol (E2) yang keduanya merupakan hormone estrogen yang diperlukan bagi tubuh, jenis yang ketiga dari hormone estrogen yaitu Estriol (E3) dimana hormone akan diproduksi dengan bantuan enzim 16 α -hydroxilase untuk merubah estrone (Novack, 2007 ; Cui *et al.*, 2013). Skema sintesis estrogen ditunjukkan pada gambar 5.6 sebagai berikut:

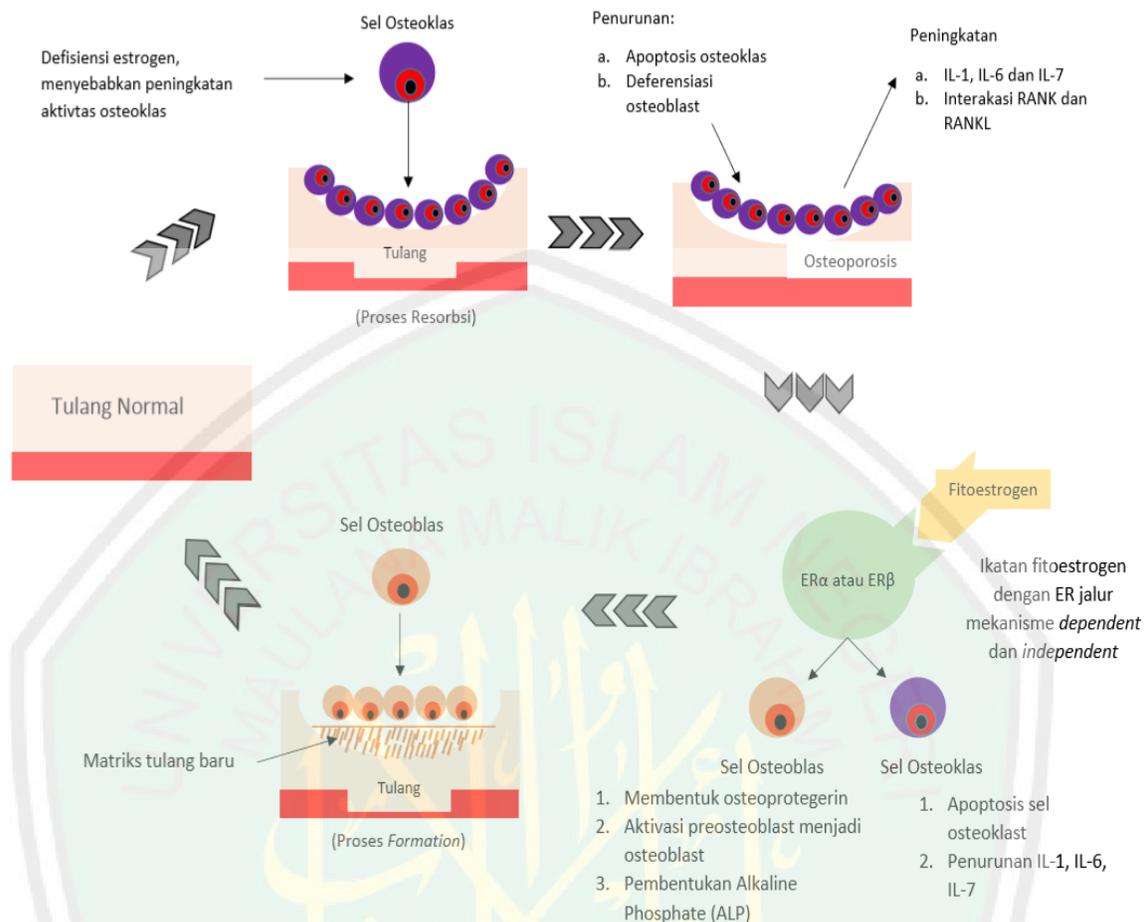


Gambar 5.7 Sintesis Estrogen

Estrone (E1) dan 17β -Estradiol (E2) merupakan jenis estrogen yang terdapat dalam tubuh yang kinerjanya sebagian besar terdapat pada tulang dan berpengaruh dalam proses remodeling tulang. Penggunaan glukokortikoid dalam jangka waktu yang lama akan menghambat ikatan estrogen dengan reseptor melalui mekanisme transkripsi mRNA sulfotransferase (SULTE1) sehingga mengalami defisiensi estrogen yang menyebabkan gangguan dalam proses *remodelling* tulang terutama pada proses deferensiasi osteoblast dan osteoklast. Penggunaan glukokortikoid berpengaruh pada peningkatan deferensiasi osteoklast dan penurunan deferensiasi pada osteoblast. Kurangnya kadar estrogen dalam tubuh terutama pada tulang mengakibatkan tubuh akan menstimulasi sitokin, sehingga terjadi peningkatan interleukin 1, 6 dan 7 (IL-1, IL-6 dan IL-7) dan meningkatkan interaksi antara *receptor activator nuclear factor kappa* β (RANK) dan ligannya, RANKL. Peningkatan interaksi RANK dan RANKL menyebabkan terhambatnya fungsi seluler osteoblast untuk berdiferensiasi dan

meningkatkan aktivasi osteoklas sehingga kondisi tersebut menurunkan kecepatan pembentukan sel tulang baru (Novack, 2007; Gong *et al.*, 2008; Sihombing, 2012).

Senyawa fitoestrogen yang terdapat pada *M.crenata* dikenal memiliki fungsi atau struktur yang sama dengan estrogen dapat mengurangi efek dari defisiensi estrogen. Senyawa yang diduga sebagai fitoestrogen pada herba *M.crenata* terdapat pada golongan senyawa flavonoid, terpenoid dan steroid karena memiliki struktur dasar yang sama dengan estrogen dalam tubuh yaitu 17 β -estradiol. Ikatan antara fitoestrogen dengan reseptor estrogen dapat mengendalikan diferensiasi osteoklas dan mempercepat diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblast. Reseptor estrogen α dan β (ER α dan ER β) terdapat pada sel osteoklas dan osteoblast, fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen melalui beberapa jalur mekanisme yaitu secara langsung (*dependent*) dan tidak langsung (*independent*). Mekanisme ikatan fitoestrogen dengan ER melalui mekanisme *dependent* yang pertama dapat berupa ikatan fitoestrogen dengan ER dan memberikan efek secara langsung terutama pada transkripsi DNA sel osteoblast ataupun osteoklas. Mekanisme *dependent* yang kedua dimana fitoestrogen yang berikatan dengan ER dapat memberikan efek pada transkripsi DNA sel atau efek lain yang mempengaruhi kinerja sel. Mekanisme ER secara *independent* dimana fitoestrogen berikatan dengan reseptor protein lain pada sel yang menyebabkan peningkatan aktivitas *growth factor* yang merupakan aktivator protein kinase, peningkatan protein kinase menyebabkan perubahan pada transkripsi DNA dalam sel osteoblast atau osteoklast (Sihombing, 2012; Cui *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2016).

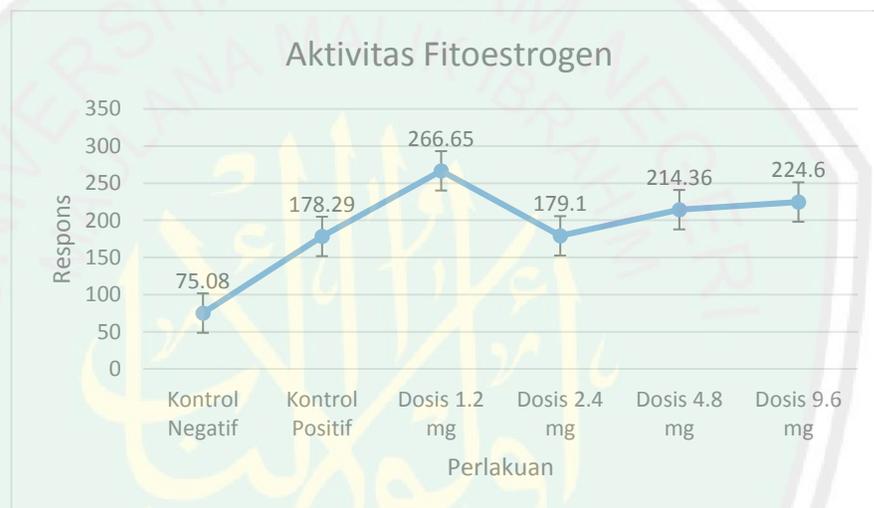


Gambar 5.8 Mekanisme Fitoestrogen pada Remodeling Tulang terutama Proses Deferensiasi Osteoblast dan Osteoklast

Aktivitas fitoestrogen akan menekan proses resorpsi tulang dimana akan menurunkan kadar IL-1, IL-6, IL-7 serta mengatur interaksi RANK dan RANKL akibat dari defisiensi estrogen, secara tidak langsung aktivitas fitoestrogen menyebabkan apoptosis osteoklas yang telah meresorpsi tulang melalui produksi osteoprotegerin (OPG) oleh osteoblast dimana OPG merupakan reseptor *tumor necrosis factor α* (TNF- α) yang penting dalam menghambat diferensiasi dan aktivasi osteoklast. Aktivitas fitoestrogen juga berpengaruh pada percepatan diferensiasi preosteoblast menjadi osteoblast dengan adanya produksi *alkaline phosphate* (ALP), disisi lain aktivitas

fitoestrogen dapat berpengaruh pada peningkatan respon reseptor protein lain melalui jalur mekanisme *dependent-2* salah satunya dengan meningkatkan pengikatan protein kolagen yang penting dalam proses remodeling tulang (Sihombing, 2012; Cui *et al.*, 2013; Sharf *et al.*, 2015).

Hasil respons aktivitas dari senyawa fitoestrogen yang terdapat pada ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* ditunjukkan pada gambar 5.6 sebagai berikut:



Gambar 5.6 Grafik Pengukuran Ketebalan Tulang (Aktivitas Fitoestrogen)

Aktivitas fitoestrogen dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur terutama pada proses diferensiasi sel osteoblast dan osteoklast yang dilihat pada grafik respons menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak yang diberikan, tingkat respons aktivitas semakin menurun, hal ini disebut dengan response non-monotonik dose. Respons non-monotonik dose biasanya disebabkan karena beberapa hal, yang pertama dimana adanya selektivitas reseptor terutama estrogen reseptor pada sel osteoblast yang berikatan dengan senyawa fitoestrogen pada ekstrak etanol 96% herba

M.crenata. Reseptor estrogen pada sel osteoblast secara selektif berikatan dengan fitoestrogen, reseptor yang berperan yaitu ER α dan ER β dimana kedua reseptor ini memberikan efek yang bertolak belakang sebagai system homeostasis sel, pada proses *remodelling* tulang resptor yang lebih dominan dalam berikatan dengan fitoestrogen merupakan ER β sebagai salah satu factor dalam diferensiasi dan aktivasi sel preosteoblas menjadi sel osteoblast pada mekanisme *dependent* (Cui *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2018).

Alasan kedua pada respons non-monotonik dose senyawa fitoestrogen disebabkan karena regulasi resptor yang terdapat pada sel mengalami penurunan, ikatan fitoestrogen dapat terjadi tidak hanya pada reseptor estrogen, melainkan ikatan dengan reseptor lain yang mempengaruhi dalam proses transkripsi DNA oleh sel, pada dosis perlakuan dosis 1,2 mg aktivitas fitoestrogen sangat tinggi berbeda dengan perlakuan dosis 9,6 mg yang semakin rendah. Hal ini dapat terjadi akibat dari hasil transkripsi DNA yang dibuat sel. Respons pada dosis rendah menunjukkan bahwa aktivitas sel menunjukkan tingkat deferensiasi sel lebih besar dengan kadar dosis rendah, sedangkan pada dosis tinggi, respons sel untuk mentranskripsi DNA oleh sel menyebabkan sel mengalami apoptosis. Berdasarkan aktivitas dari efek reseptor estrogen yang saing bertolak belakang antara ER α dan ER β dan juga hasil dari ikatan fitoestrogen dengan resptor steroid lain yang mempengaruhi transkripsi DNA pada sel (Vandenberg *et al.*, 2012; Ma'arif *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil pengamatan aktivitas fitoestrogen dari pengukuran ketebalan tulang trabekular femur menunjukkan bahwa senyawa fitoestrogen yang terdapat pada

ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* seperti asam palmitat, senyawa golongan flavonoid (isoflavon), terpenoid dan saponin dapat meningkatkan ketebalan tulang melalui jalur ikatan reseptor *dependent* dan *independent* yang memeberikan afinitas efek yang berbeda-beda pada proses deferensiasi sel osteoblast dan osteoklast (Cui *et al.*, 2013; Agnis *et al.*, 2016; Ma'arif *et al.*, 2016).

5.8 Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen Ekstrak Etanol 96% herba *M.crenata* dalam Perspektif Islam

Allah SWT menumbuhkan tanaman dalam berbagai jenis yang memiliki manfaat yang baik bagi manusia, terdapat beberpa ayat al-qur'an yang menjelaskan kebesaran Allah SWT dalam menciptakan makhluk hidup baik manusia, tumbuhan hewan dan jin. Terdapat beberapa ayat yang terdapat dalam al-qur'an yang menjelaskan mengenai penciptaan tumbuhan dan manfaatnya bagi manusia (Rahman, 1996). Diantara ayat al-qur'an yang menjelasskan mengenai tanaman terdapat dalam surat Asy-Syu'ara ayat 7

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Asy Syu'ara (26) : 7)

Ayat diatas menjelaskan tentang kuasa Allah SWT yang menciptakan berbagai macam tumbuhan dimuka bumi tidak lain memiliki manfaat yang baik bagi manusia. Tumbuhan banyak memberikan manfaat dari adanya kandungan senyawa hingga pemanfaatan bagian fisik seperti batang, daun dan akar. Hal ini dijelaskan dalam

firman-Nya surat Asy-Syu'araa' ayat 7. Kebenaran tentang firman Allah SWT mengenai “ditumbuhkannya berbagai macam tumbuhan yang baik” dibuktikan pada penelitian ini dimana aktivitas fitoestrogen yang terdapat pada ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan yang diinduksi deksametason melalui jalur aktivasi diferensiasi sel osteoblast dan osteoklast.

Penjelasan arti dan makna yang terdapat pada ayat diatas berhubungan erat mengenai kesadaran dalam memperhatikan ciptaan Allah SWT terutama dengan adanya tumbuhan dimuka bumi, perintah dalam ayat tersebut mendorong manusia dalam meningkatkan ilmu pengetahuan terutama bidang ilmu botani yang selama ini mengandalkan pengamatan bentuk luar seluruh organnya dalam semua fase perkembangannya. Pada ayat diatas menjelaskan untuk memperhatikan ciptaan Allah SWT namun disisi lain juga merupakan perintah pada manusia untuk berfikir dan melakukan penelitian yang lebih mendalam terutama untuk mengetahui manfaat yang baik bagi manusia, penelitian ini membuktikan bahwa kebenaran firman Allah SWT dengan menciptakan tumbuhan yang baik tentunya memiliki manfaat tersendiri karena tumbuhan yang baik paling tidak tumbuh subur dan memiliki manfaat. Keterkaitan ayat diatas dengan penelitian ini dimana berbagai jenis tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT seperti tanaman *M.crenata* memiliki manfaat terutama sebagai bahan baku obat yang memiliki efek farmakologis dalam meningkatkan ketebalan tulang trabecular femur mencit jantan melalui aktivitas sel osteoblast dan osteoklast (Shihab, 2002; Rossidy, 2008).

Memanfaatkan bagian dari tanaman *M.crenata* sebagai bahan makanan secara turun temurun oleh masyarakat daerah Benowo, Surabaya yang diyakini mengandung kahsiat merupakan salah satu bentuk tanda-tanda kekuasaan Allah SWT bagi hamba yang berfikir dan memberikan pandangan yang mendalam akan keiimana kepada Allah SWT bagi seorang mukmin serta menjadi bukti bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT tidaklah sia-sia.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* memiliki aktivitas dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan yang diinduksi deksametason dengan nilai *p-value* 0,000 pada uji *One-Way ANOVA*
2. Dosis efektif dari ekstrak etanol 96% herba *M.crenata* yang dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan yang diinduksi deksametason dari hasil uji LSD dan uji probabilitas *chi-square* menunjukkan bahwa nilai ED₅₀ sebesar 1,908 mg dan ED₉₉ sebesar 1,451 mg.

6.2 Saran

Penelitian dengan *range* dosis yang beragam terutama ekstrak dengan berbagai variasi pelarut perlu dilakukan, dan penelitian baik secara *in vitro* maupun *in silico* agar pemanfaatan *M.crenata* tidak hanya sebatas pada penelitian mengenai aktivitas fitoestrogen sebagai antiosteoporosis, melainkan juga dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan penyakit *degenerative* yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 2006. *Dasar Pengetahuan Ilmu Taksonomi*. Bandung: Angkasa
- Abidin, Z. 2011. Analisa Pengukuran Kadar Larutan Temulawak Menggunakan Metode TLC (Thin Layer Chromatography) . *Skripsi*. Surabaya: Jurusan Teknik Fisika, Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Penerbit Karunika
- Afriantini, L., Rice D.O., Idha K., 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinentesin dalam Ekstrak *Orthosiphon stamineus* Benth. E-Journal Planta Husada. Vol.2, No.1
- Afriastini JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. Di dalam: *de Winter WP, Amoroso VB, editor. Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI
- Agnis, P.A., Mangestuti A., Hening L., 2016. An In Vitro Antiosteoporotic Activity of 96% Ethanol Extract of *Albelmoschus manihot* L. Medik Leaves Using MC3T3-E1 Preosteoblast Cells. *Traditional Medicine Journal*. Vol.21 No.3 pages 116-123
- Amalia, F. 2015. Korelasi Antara Panjang Tulang Humerus dengan Tinggi Badan pada Pria Dewasa Suku Lampung dan Suku Jawa di Desa Sukabumi Kecamatan Talang Padang Kabupaten Tanggamus. *Skripsi*. Bandar Lampung : Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung
- Amran, R. 2011. Penanda CTX dan N-MID *Osteocalcin* pada Perempuan Peri/Post Menopause. Palembang : UNSRI Press
- Andini, D. 2014. Hubungan Lama Menopause dengan Kejadian Disfungsi Seksual pada Wanita Menopause di Posyandu Lansia Wilayah Kerja Puskesmas Panjang Bandar Lampung. *Skripsi*. Bandar Lampung: Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung
- Aryani, B. 2013. Penentuan Faktor dan *Setting* Parameter Optimal untuk Meminimalkan Jumlah Cacat Roti Smeer dengan Desain Eksperimen. *Skripsi*. Yogyakarta: Program Studi Teknik Industri, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Atma Jaya
- Astawan, M. 2006. *Membuat Mie dan Bihun*. Jakarta : Penebar Swadaya

- Badziad A. 2003. *Menopause, Andropause, dan TSH. In: Menopause dan Andropause. Hal 1-39.* Yayasan Bina Pustaka . Jakarta
- Banker, G.S., and Anderson, N.R., 1994, Tablets, in: Lachman, L. Lieberman, H.A., and Kanig, J.L. (eds): *The Theory and Practise of Industrial Pharmacy*, 3rdEd., Marcel Dekker Inc., New York
- Burger,I., Burger,B,V. Albrecht,C.F. Spicies,H.S.C. and Sandor.P.,1998. Triterpenoid saponin From *Bacium gradivlona* Var. Obovatum *Phytochemistry*.49. 2087-2089.
- Cui, J., Yong S., Rena L., 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways During Aging: from Periphery to Brain. *Trends in Molecular Medicine*. Vol. 19, No.3
- Dirjen POM. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan RI : Jakarta
- Dirjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Cetakan Pertama)*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI
- Djalaludin, M.N., 2015. Metode Pemeriksaan Histomorfometri Mendeteksi Perbaikan Matiks Tulang pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Hipogonad setelah Terapi Sulih Testosteron. *Tesis*. Bali : Universitas Udayana
- Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Ghani, L. 2009. Seluk Beluk Manopause. (*Journal*) *Media Peneliti dan Pengembangan Kesehatan. Volume 19 No. 4*. Puslitbang Biomedis dan Farmasi
- Ghozali, I. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang : UNDIP
- Gong,H., Michael J. J., Timothy J. C., Jung H.L., Taira W., *et al.*, 2008. Glucocorticoids Antagonize Estrogens by Glucocorticoid Receptor-Mediated Activation of Estrogen Sulfotransferase. *Research Cancer Articel*. Pennsylvania : Center for Pharmacogenetics and Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh Cancer Institute and Department of Pathology, and 3Department of Pharmacology, University of Pittsburgh, Vol 68, No. 18
- Hadi, Vike Deatartila. 2017. Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Etawa terhadap Jumlah Osteoklast serta Ekspresi TNF- α pada hewan Tikus (*Rattus novergicus*) Ovariektomi. *Skripsi*. Malang : Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

- Hanafiah, K. A., 2004. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada, hlm 5-12
- Harbrone.J.B.,1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Moderen Menaganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua*. Bandung: ITB
- Hutapea,J.R., 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Dan Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan
- Junquiera, and Carneiro. 2010. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies
- Karmakar, S., Yetao J., Akhilesh K. N., 2013. Interaction of Glucocorticoid Receptor (GR) with Estrogen Receptor (ER) _ and Activator Protein 1 (AP1) in Dexamethasone-mediated Interference of ER α Activity. *The Journal Of Biological Chemistry*. Maryland: Division of Therapeutic Proteins, Office of Biotechnology Products, Office of Pharmaceutical Sciences, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda. Vol. 288, No. 33.
- Lachman L., Lieberman, H.A., and Kanig, J.L., 1994, *Teori dan Praktek Farmasi Industri*, diterjemahkan oleh Siti Suyatmi, S., Aisyah, I, Cetakan II, UI Press, Jakarta, 645-654-701
- Laswati, H., 2007. Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodelling Tulang Perempuan Pascamenopause Melalui Peran Reseptor Estrogen dan Sel Osteoblast. (*Disertasi*), Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Laswati, H., Mangestuti A., Retno W., 2015. Efek Pemberian *Spilantes acmella* dan Latihan Fisik terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit yang Diinduksi Deksametason. Surabaya : Universitas Airlangga, Vol. 25 No.1 halaman 43-50.
- Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA. 1996. *Buku Ajar Histologi* (Edisi Kelima). Jakarta: EGC. Halaman :138
- Lenny, Sovia. 2006. *Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Medan, hal 14-18
- Lestari, B., Naisbitt I.H., Ariska D.A., Thoriq Z., Ziana W., *et al.* 2014. Potensi Biji Labu Kuning Sebagai Agen Fitoestrogen Pada Wanita Post Menstrual. *Journal Kesehatan*. Yogyakarta : Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
- Ma'arif, B.Z.A., 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun *Marsilea crenata Presl.* (isolasi ekstrak n-heksana dengan Rf 0,33 pada fase gerak n-heksana : etil asetat {4:1}). (*Skripsi*). Surabaya : Departemen Farmakognosi Dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ; Hal 4-6

- Ma'arif, B., Mangestuti A., Hening L., 2016. Phytochemical Assessment On n-hexane Extract And Fractions Of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS. *Traditional Medicine Journal, Volume 2, Pages 77-85*. Department of Pharmacognocny and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia
- Ma'arif, B., Mangestuti A., Hening L., 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Apllied Pharmaceutical Science*. Vol.8 No.3 pages 55-59
- Male, Y. T., Lina I. L., Netty A. S.. 2018. Analisis Kandungan Formalin pada Mie Basah pada Beberapa Lokasi di Kota Ambon. *Majalah Biam, Jurnal Kementrian Perindustrian*. Vol. 13 No. 2 hal. 5-10
- Mangkoewidjojo, S. 1998. *Pemeliharaan, Pembiakan, Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta : Universitas Indonesia Press
- Moore, K.L. dan Agur, A.M.R. 2002. *Anatomi Klinis Dasar*. Jakarta: Hipokrates
- Moreira, A.C., Ana M.S., Maria S. S., Vilma A. S., 2014. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Portugal : Doctoral Programme in Experimental Biology and Biomedicine, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra. Vol. 143, pages 61-71
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Makasar : Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar
- Mycek, Mary J. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*, edisi 2. Jakarta. Widya Medika: halaman 21-23
- Nisa, G.K., Wahyunanto A.N., Yusuf H., 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. Vol.2, No.1
- Novack, D.V., 2007. Estrogen and Bone: Osteoclast take Center Stage. *Cell Metabolism*. Vol. 9 No.7, pages 254-256
- Priyambodo, S. 2003. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu Seri Agrikat*. Jakarta : Penebar Swadaya, Vol : 6
- Rahman, A.I.D., 1996. *Muamalah Syariah III*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada

- Ramadani, M., 2010. Faktor-Faktor Resiko Osteoporosis dan Upaya Pencegahannya. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. Staf Pengajar PSIKM FK-Unad. Vol.4, No.2
- Rizalah, S.I., Muhammad H., Septa S.W., 2016. Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariectomi. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol. 4, No.1
- Robinson ,T., 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*.Bandung: ITB
- Rossidy, I. 2008. *Fenomena Flora dan Fauna dalam Perspektif Al-Qur'an*. Malang: UIN Press
- Roy J. G., James M. B., Arthur E. S., 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung : Penerbit ITB
- Sani, R.N., Fithri C.N., Ria D.A., Jaya M.M., 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.2, No.2, hal.121-126
- Sankar, U.,, Zachary J.P., Michael J.V., 2016. Micro-computed Tomography Assisted Distal Femur Metaphyseal Blunt Punch Compression for Determining Trabecular Bone Strength in Mice. *Journal of Biomechanics*. Vol. 49. Pages 1233-1237
- Sari, D.P., Umi F., Riezky M.P., 2016. Profil Hands on Activity pada Mata Kuliah Mikrotentik di Prodi Pendidikan Biologi FKIP UNS. *Proceeding Biology Education Conference*. Vol.13, No.1, hal.476-481
- Sharf, H.A., Nermeen M. S., Fatma A. M., Manal A. B., Naglaa F. A., 2018. Role os Some Phytoestrogens in Recovering Bone Loss : Histological Result from Experimental Ovariectomized Rat Models. *Journal of The Arab Society for Medical*. Vol.10 pages 65-75
- Shihab, M.Q., 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Sholihah, N.A., 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) Terhadap Jumlah Osteoklast Tulang Femur Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Menopuse. *Skripsi*. Malang : Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Sihombing, I., Sunny W., Sonny J.R.K., 2012. Peran Estrogen pada Remodeling Tulang. *Jurnal Biomedik*. Vol.4, No.3, hal.18-28
- Snell, R.S. 2012. *Anatomi Klinik untuk Mahasiswa Kedokteran*, Edisi 6. Jakarta: EGC.

- Tiyaningsih, D.A., 2007. Studi Makroskopis, Mikroskopis dan Skrining Fitokimia *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga
- Trevor, R. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB
- Vandenberg, L.N., Theo C., Tyrone B.H., Jerrold J.H., David R.J., *et al.* 2012. Hormones an Endocrine-Distruping Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Response. *Endocrine Journal*. Vol.33 No.3
- Warsono, A.W.D.D. 2013. *Proses Pembelajaran & Penilaian*. Yogyakarta: Graha Cendekia
- Wiyasa, I.W.A., E. Norahmawati, Soehartono. 2008. Pengaruh Isoflavone Genistein dan Daidzein Ekstrak Tokbi (*Pueraria lobata*) Strain Kangean Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas *Rattus novergicus* Wistar Hipoestrogenik. *Jurnal Kesehatan*. Malang : Fakultas Kedokteran Universtas Brawijaya
- Yoshiki Y.K. dan Okobo K.,1998. Relationship Between Cemical Structure and Biologica Activities of Triterpenoid Saponin from Soybean (*Review*) *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62. 2291-2292.
- Zulkifli. 2009. Eksplorasi dan Studi Keragaman Garcinia L. Berasarkan Sumber Kunci Determinasi Bagi Perkuliahan Botani Tumbuhan Tinggi. *Jurnal Biologi Indonesia*. Vol.9(2): 52-65.



LAMPIRAN-LAMPIRAN

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman *M.crenata*

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telpon/Fax (0341) 593396

KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 368 / 102.7 / 2017
Sifat : Biasa
Perihal : Determinasi Tanaman Semanggi Air

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : BURHAN MA'ARIF Z. A., M.Farm.,Apt.
NIDT : 19900221 201701011 124
Instansi : JURUSAN FARMASI, FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman semanggi air

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi : Pteridophyta (paku-pakuan)
Kelas : Pteridopsida
Ordo : Salviniales
Famili : Marsileaceae
Genus : Marsilea
Spesies : *Marsilea crenata* Presl
Sinonim : *Marsilea quadrifolia* Bl. ; *M. minuta* L.
Indonesia : Semanggi, semanggan, paku tapak itik. Jawa : Semanggi

Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1

2. Morfologi : Habitus ; Semak, menjalar, panjang \pm 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang \pm 2 cm, lebar \pm 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, lepas/berdiri sendiri, kelopak dua, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serabut, putih kotor.
3. Nama Simplicia : *Marsilea crenatae folium* / Daun semanggi air.
4. Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol
5. Penggunaan : Penelitian
6. Daftar Pustaka :
 - Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/> salam, Diakses 14 Februari 2007
 - Anonim, <http://www.plantamor.com/semanggi>, diakses 11 Desember 2010
 - Steenis, CGGJ Van Dr, *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita, Jakarta
 - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johnny Ria. 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 05 Oktober 2017

Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.

NIP. 19611102 199103 1 003

Lampiran 2. Etik Prosedural Penelitian

	<p style="text-align: center;">FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN</p> <p style="text-align: center;">Gedung Klinik UMMI It 2 Jalan Gajayana No. 50, Dinoyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
	<p style="text-align: center;">KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 020/EC/KEPK-FKIK/2018</p>

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul	Aktifitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 96% Daun <i>Marsilea crenata Presl.</i> Dan <i>Chrysophyllum cainito</i> L. Terhadap Jumlah Sel Osteoblast dan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit
Sub Judul	Aktifitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 96% Daun <i>Marsilea crenata Presl.</i> Dan <i>Chrysophyllum cainito</i> L. Terhadap Jumlah Sel Osteoblast dan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit
Peneliti	Burhan Ma'arif Z.A., M. Farm., Apt. Kurniawan Hidayat Perdana Putra Miftah Saiful Arifin Izza Nailia Shirvi Firsta Roisatul Islamiyah
Unit / Lembaga	Program Studi farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	Laboratorium Biomed Jurusan Farmasi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Mengetahui,
Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Malang, 07 SEP 2018
Ketua



Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, SpB. SpBP-RE(K)
NIP. 201612011515

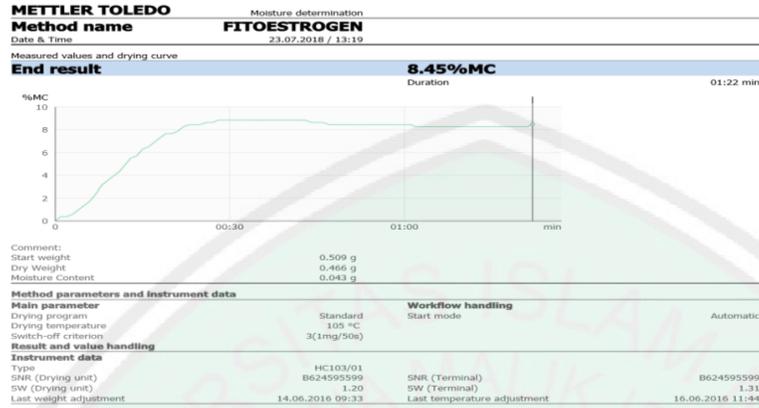
dr. Avin Ainur F, MBIomed
NIP. 198002032009122002

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 3. Hasil Uji *Moisture Content* Serbuk Simplisia Herba *M.crenata*

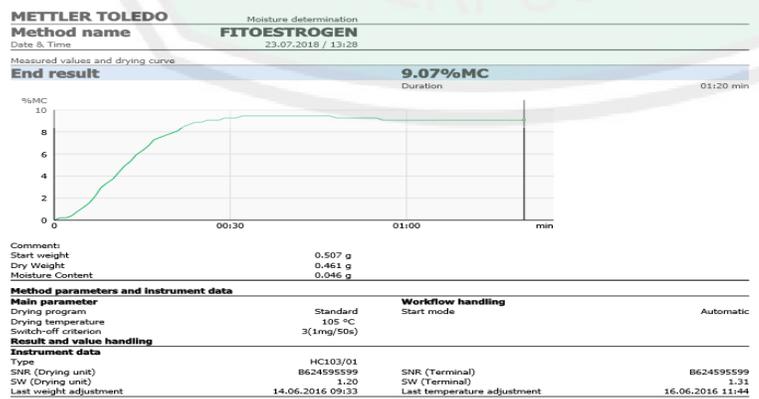
a. Replikasi 1



b. Replikasi 2



c. Replikasi 3



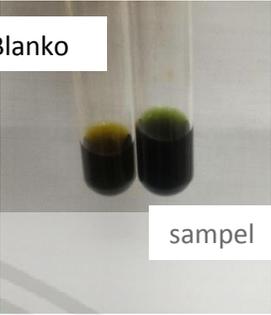
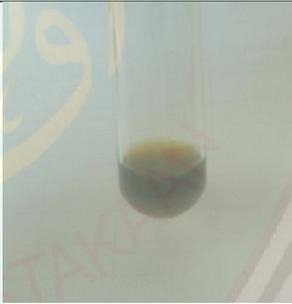
d. Rerata nilai kadar air serbuk simplisia herba *M.crenata*

Nama Sampel	Replikasi	Berat Awal	Berat Akhir	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Serbuk kering simplisia herba <i>M.crenata</i>	1	0,509 g	0,466 g	8,45 %	8,6 %
	2	0,506 g	0,464 g	8,30 %	
	3	0,507 g	0,461 g	9,07%	



Lampiran 4. Hasil Skrining Fitokimia “Uji Reaksi Warna”

No	Identifikasi golongan senyawa	Jenis Uji	Hasil	Gambar	Ket.
1	Alkaloid	Uji Mayer	-		(-) endapan
		Uji Wagner	-		(-) endapan
		KLT	-		(-) spot jingga
2	Saponin, triterpenoid dan steroid	Uji Buih	√		(+) Buih

		Uji Lieberman Burchard	√		(+) hijau kehitaman
		Uji Salkowski	-	-	(-) cincin merah
		KLT	√		(+) ungu
3	Flavonoid	Uji Bate Smith dan Metclaft	√		(+) cincin merah
		Uji Wilstater	√		(+) cincin merah

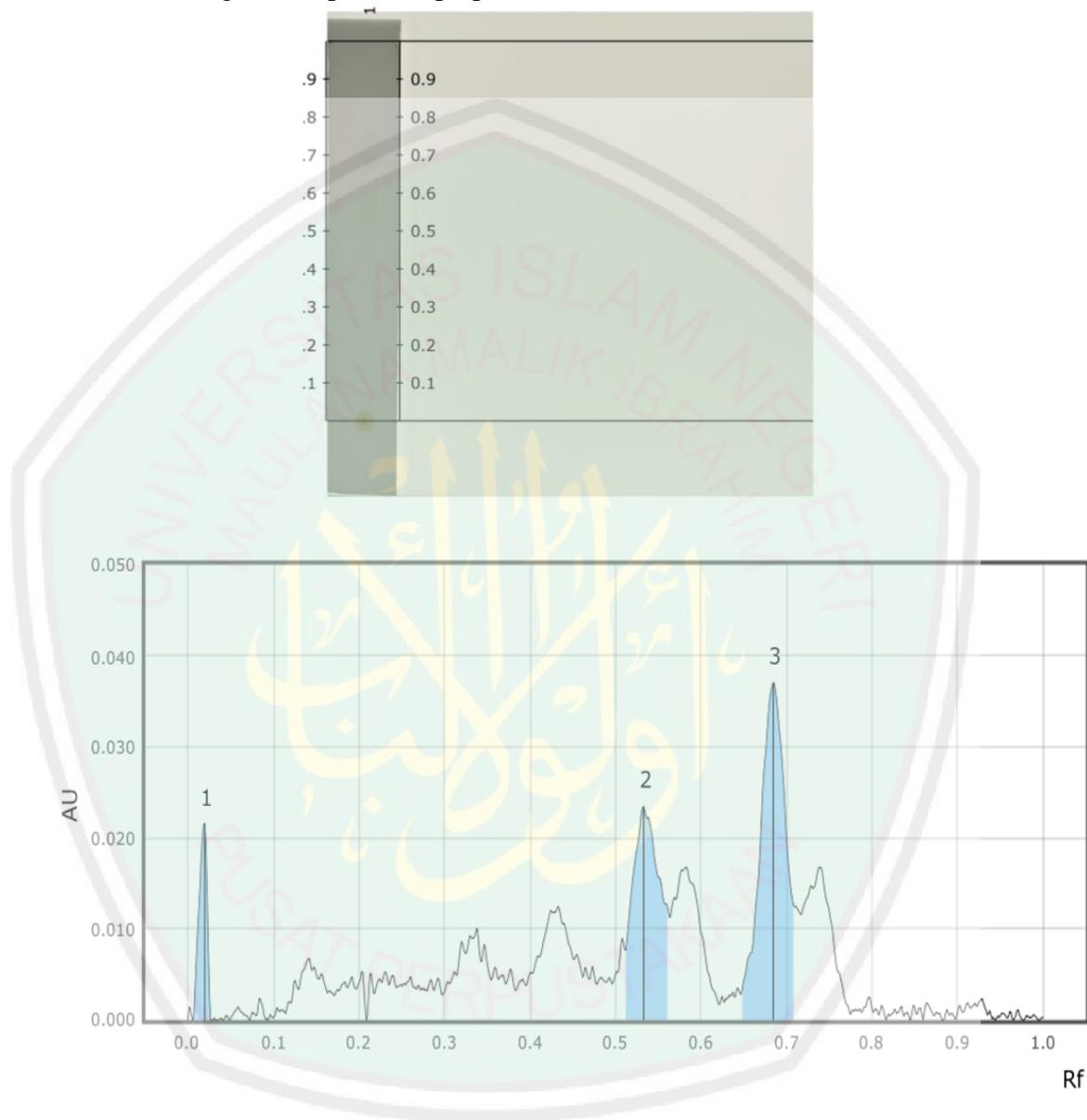
		KLT	√		(+) spot kuning
4	Polifenol dan Tanin	Uji Gelatin	-		(-) endapan putih
		Uji Feri Klorida	√		(+) hijau kehitaman
		KLT	√		(+) spot hitam

					
5	Antrakuinon	Uji Borntrager	-		(-) merah
		Uji Modifikasi Borntrager	-		(-) merah
		KLT	-	-	(-) spot ungu

Lampiran 5. Hasil TLC Visualizer Ekstrak herba *M.crenata*

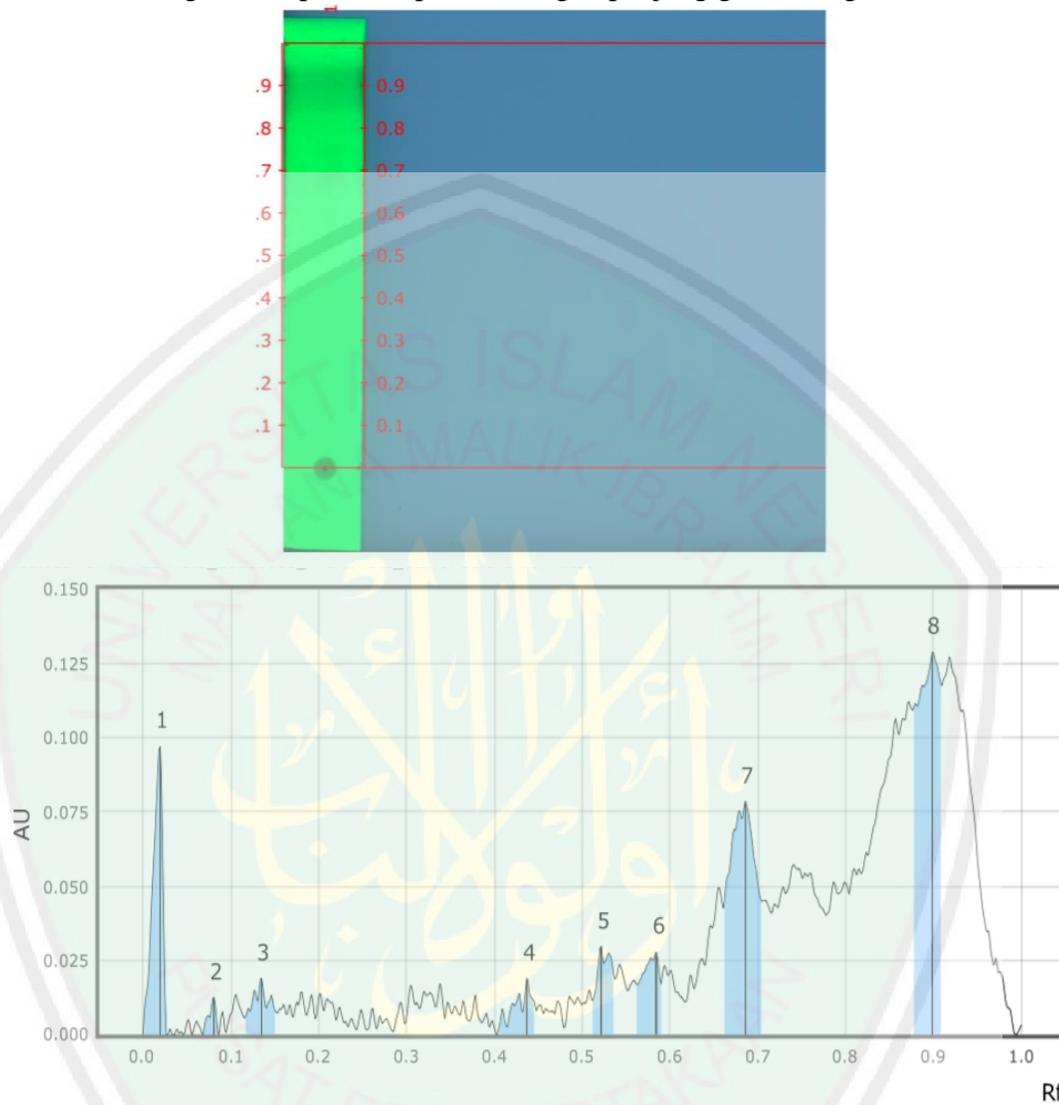
A. Hasil TLC Visualizer sebelum penyemprotan H₂SO₄ 10%

1. Pengamatan pada lampu putih



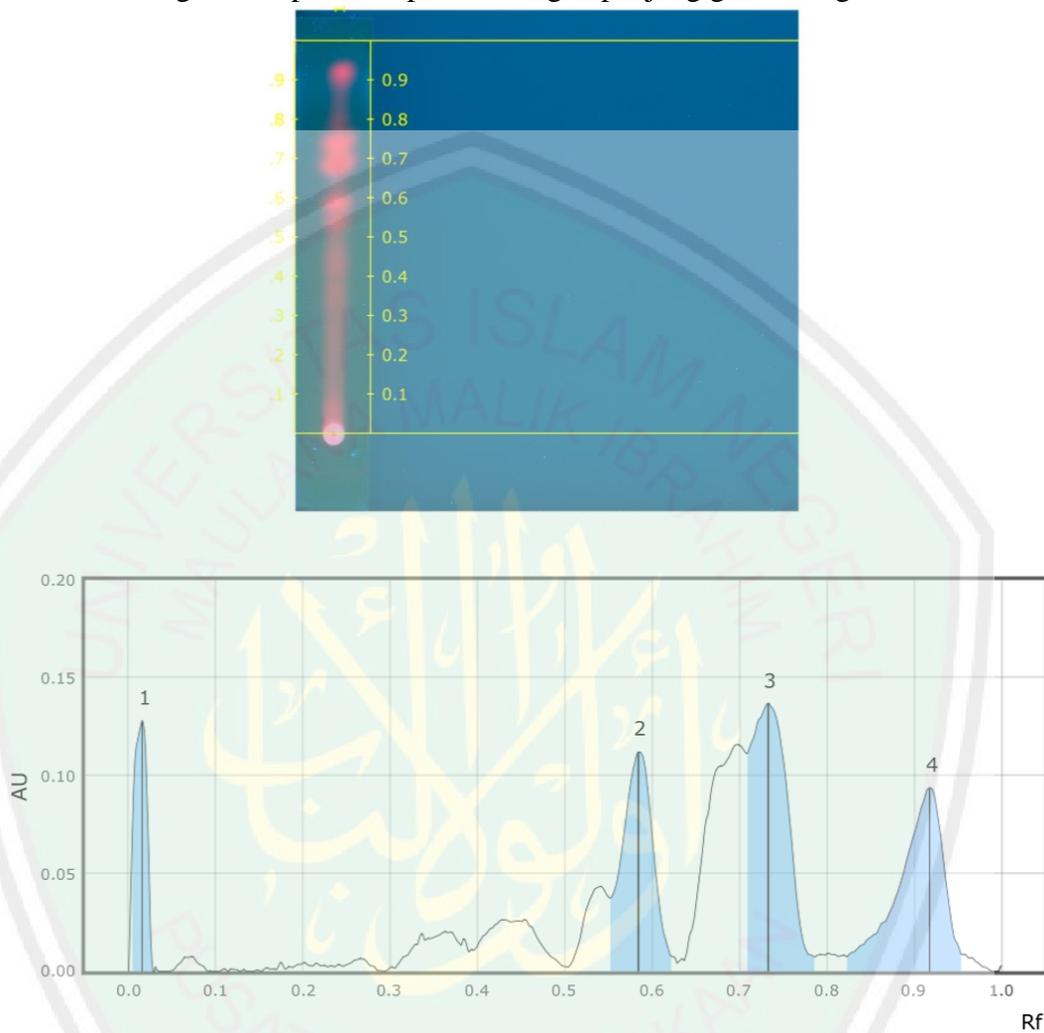
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.006	0.0000	0.020	0.0216	26.29	0.026	0.0000	0.00024	10.01	No	
2	0.512	0.0077	0.533	0.0234	28.55	0.562	0.0118	0.00086	36.17	No	
3	0.647	0.0029	0.684	0.0370	45.16	0.709	0.0124	0.00127	53.82	No	

2. Pengamatan pada lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.020	0.0970	23.55	0.026	0.0000	0.00125	12.36	No	
2	0.068	0.0000	0.081	0.0124	3.00	0.086	0.0000	0.00011	1.11	No	
3	0.115	0.0056	0.135	0.0190	4.61	0.153	0.0072	0.00042	4.17	No	
4	0.403	0.0000	0.437	0.0189	4.59	0.448	0.0081	0.00042	4.18	No	
5	0.512	0.0114	0.522	0.0297	7.20	0.537	0.0189	0.00058	5.70	No	
6	0.562	0.0168	0.584	0.0277	6.72	0.590	0.0172	0.00062	6.14	No	
7	0.661	0.0426	0.686	0.0786	19.09	0.704	0.0450	0.00274	27.07	No	
8	0.876	0.1093	0.898	0.1287	31.24	0.910	0.1176	0.00397	39.25	No	

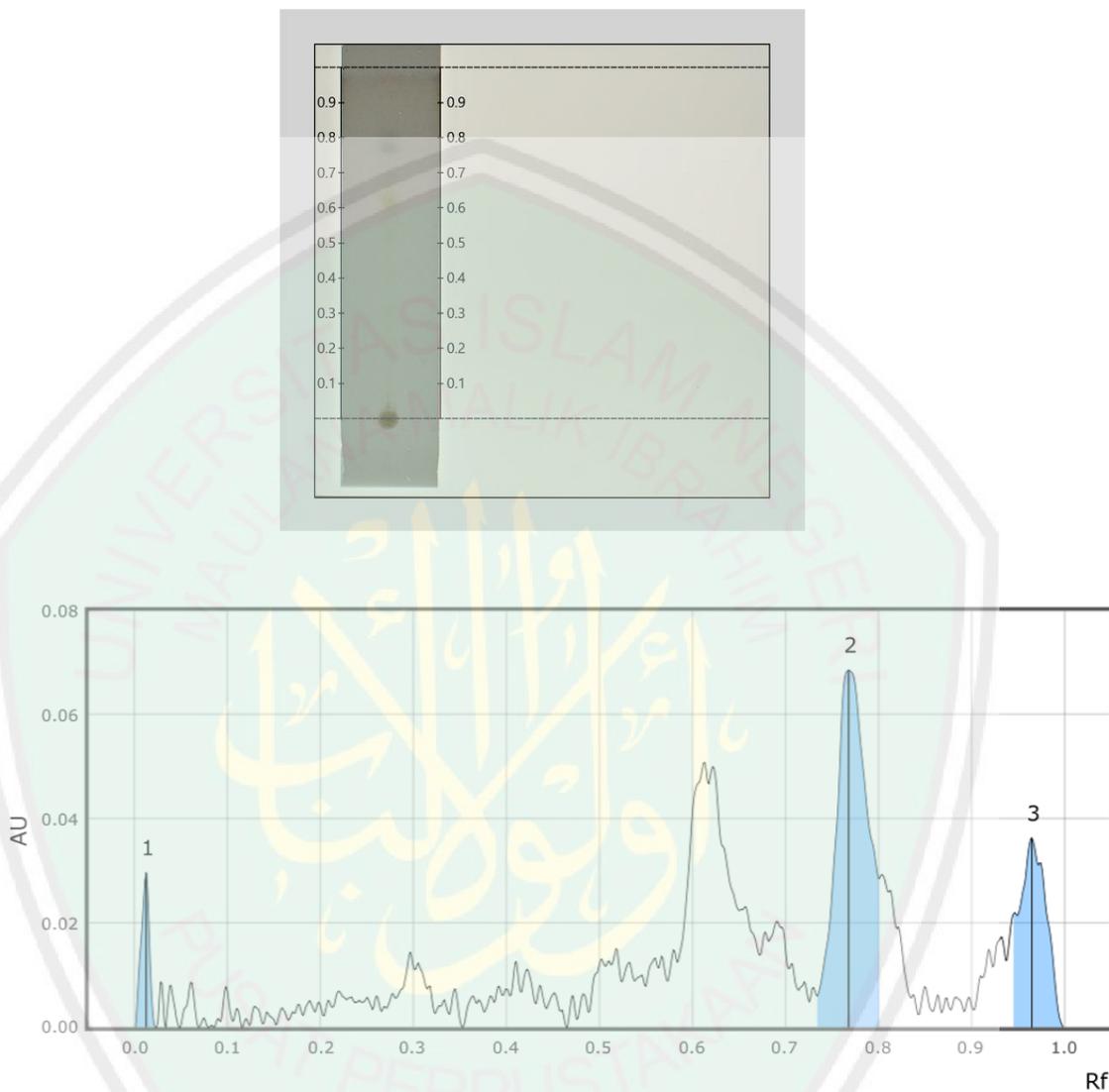
3. Pengamatan pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.015	0.1283	27.23	0.028	0.0000	0.00231	12.05	No	
2	0.552	0.0374	0.584	0.1121	23.80	0.623	0.0074	0.00458	23.84	No	
3	0.708	0.1114	0.733	0.1369	29.07	0.786	0.0074	0.00679	35.40	No	
4	0.823	0.0074	0.918	0.0938	19.90	0.955	0.0085	0.00551	28.71	No	

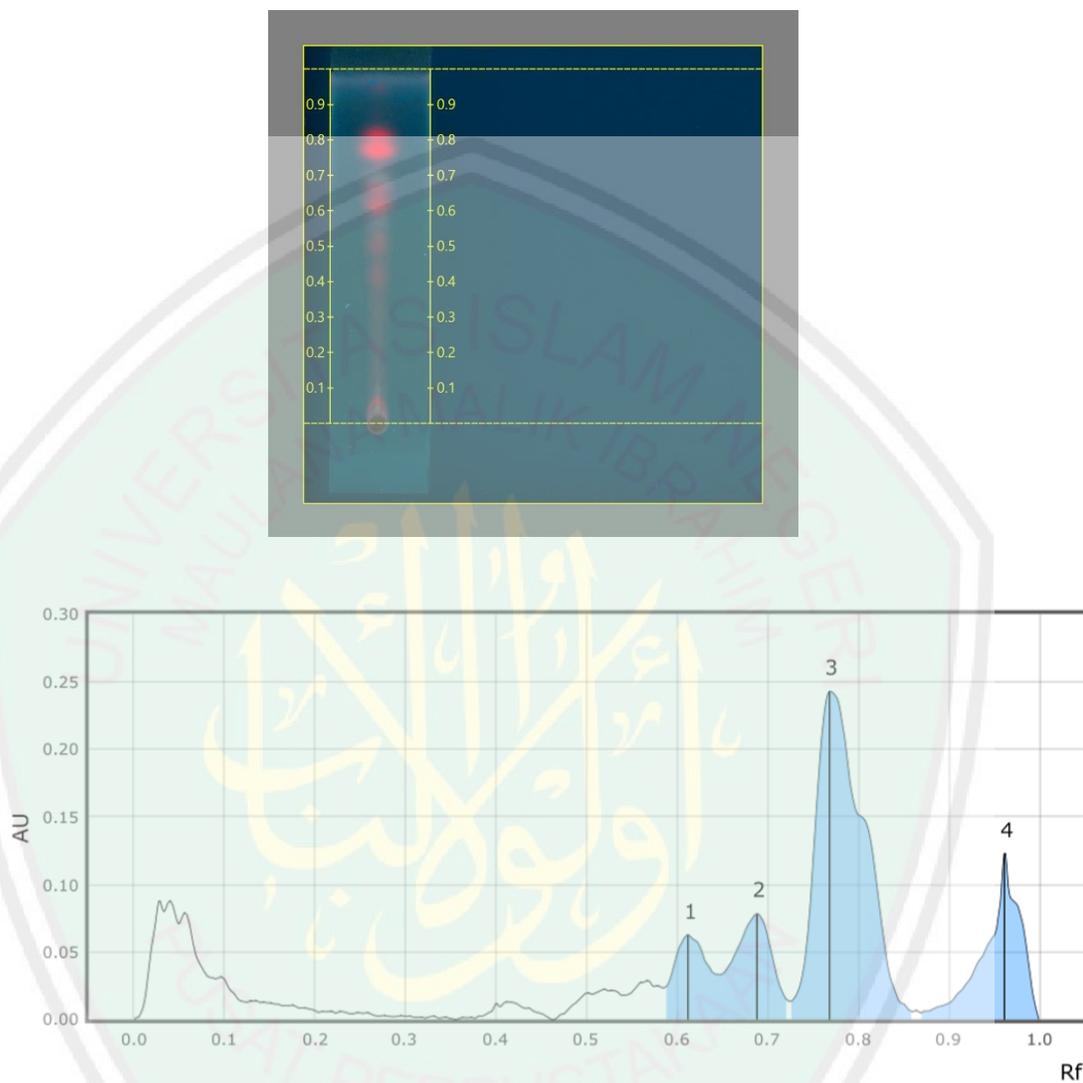
B. Hasil *TLC Visualizer* setelah penyemprotan H_2SO_4 10%

1. Pengamatan pada lampu putih



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.001	0.0000	0.012	0.0297	22.02	0.022	0.0000	0.00030	7.05	No	
2	0.735	0.0060	0.768	0.0686	50.95	0.801	0.0285	0.00274	64.16	No	
3	0.944	0.0212	0.965	0.0364	27.03	0.999	0.0000	0.00123	28.79	No	

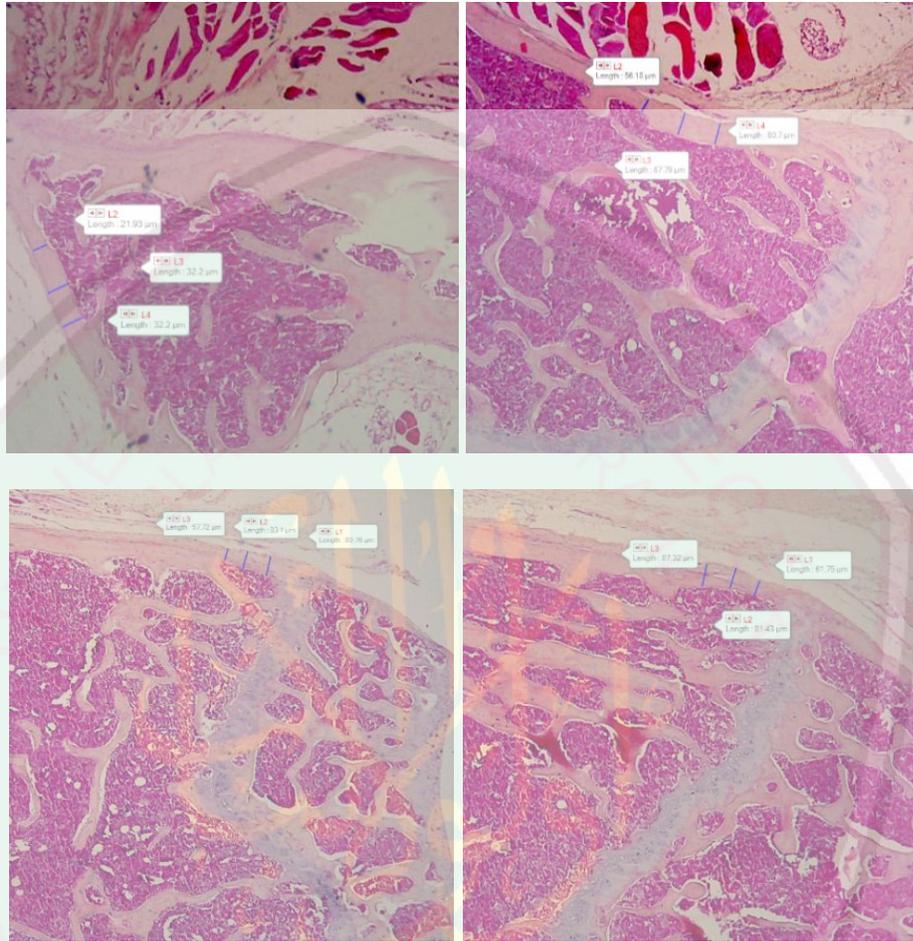
2. Pengamatan pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm



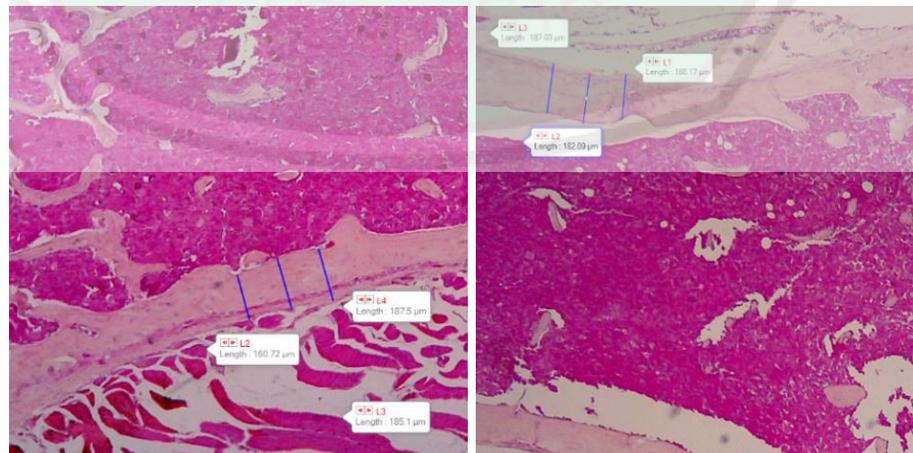
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.585	0.0233	0.612	0.0624	12.33	0.646	0.0332	0.00277	10.22	No	
2	0.647	0.0330	0.688	0.0782	15.45	0.723	0.0137	0.00383	14.12	No	
3	0.725	0.0134	0.768	0.2427	47.95	0.860	0.0061	0.01517	55.90	No	
4	0.870	0.0050	0.961	0.1228	24.27	0.999	0.0001	0.00537	19.77	No	

Lampiran 6. Hasil Pembacaan Histomorfometri dengan Perbesaran 100x

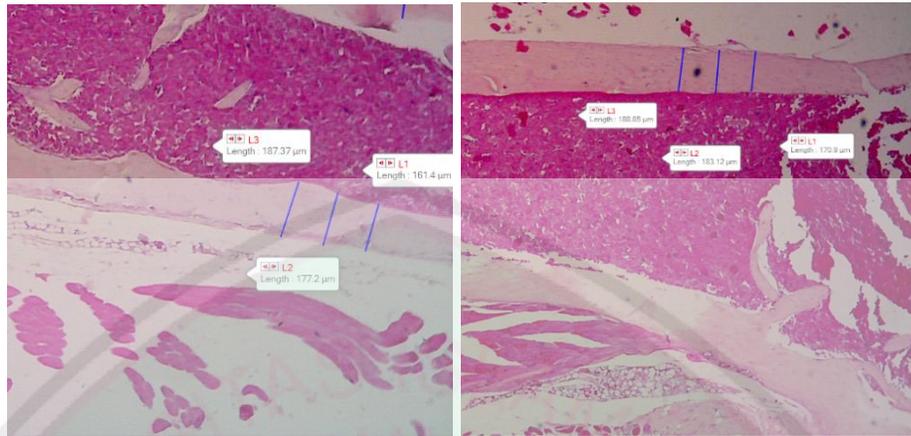
Kelompok: Kontrol Negatif



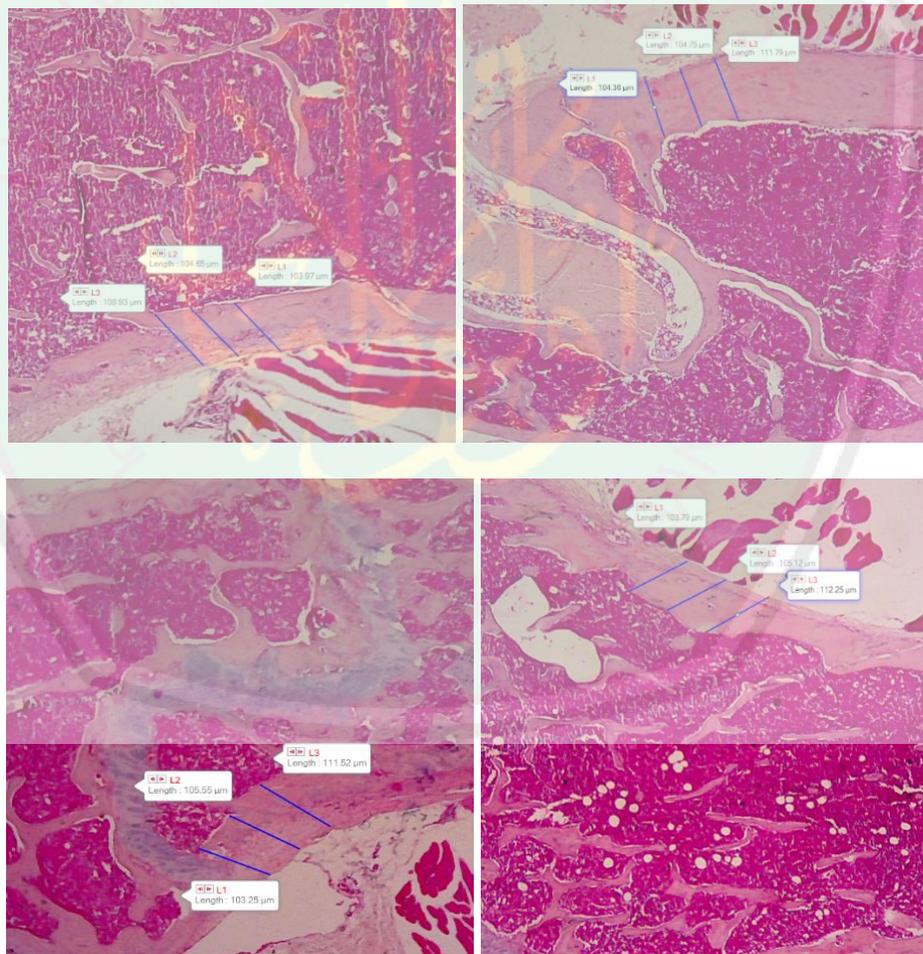
Kelompok: Kontrol Positif



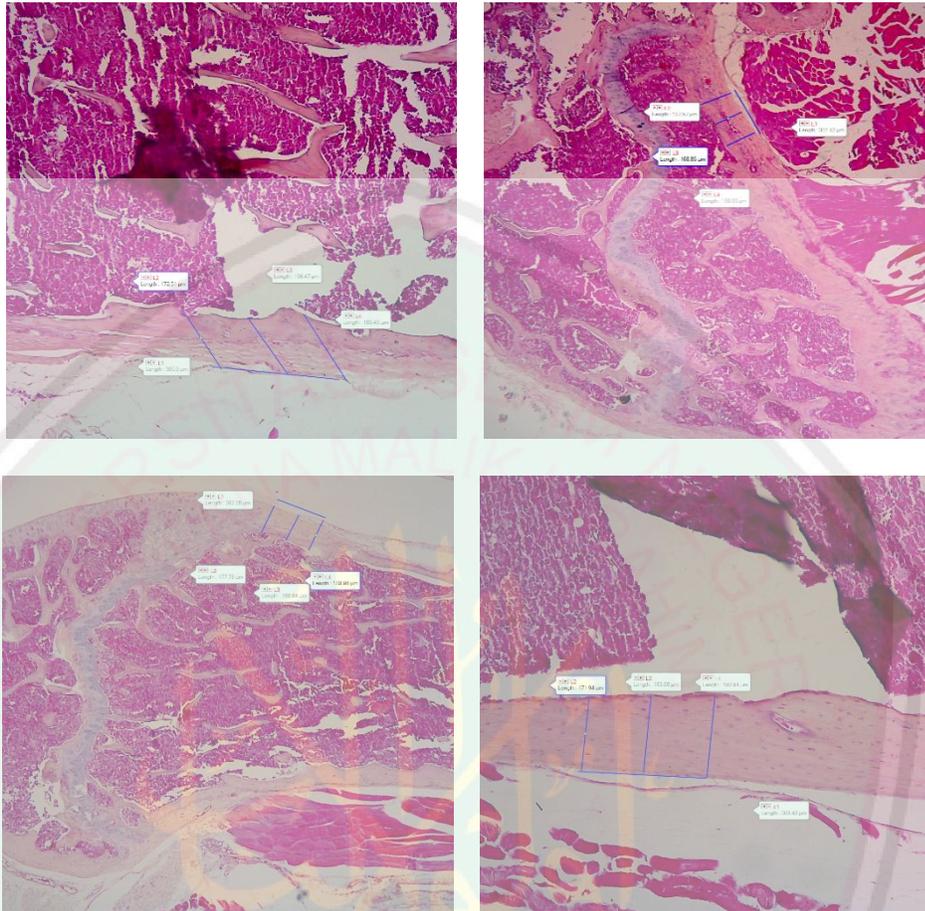
Kelompok: Kontrol positif



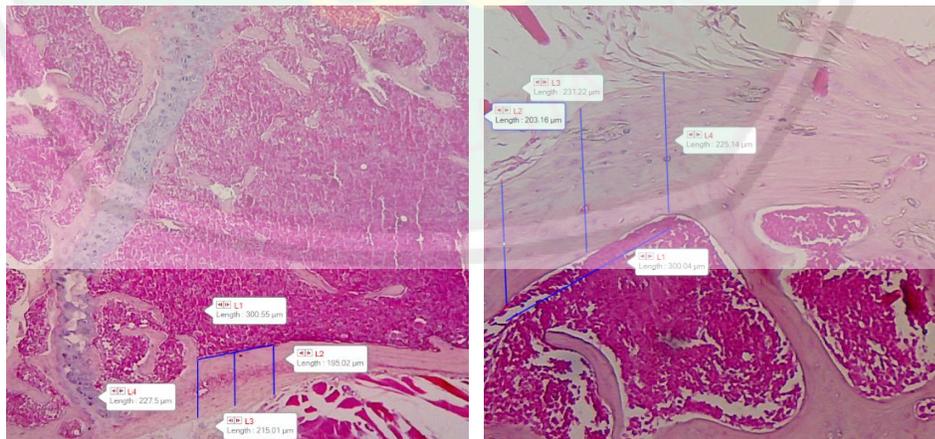
Kelompok: Dosis 1,2 mg



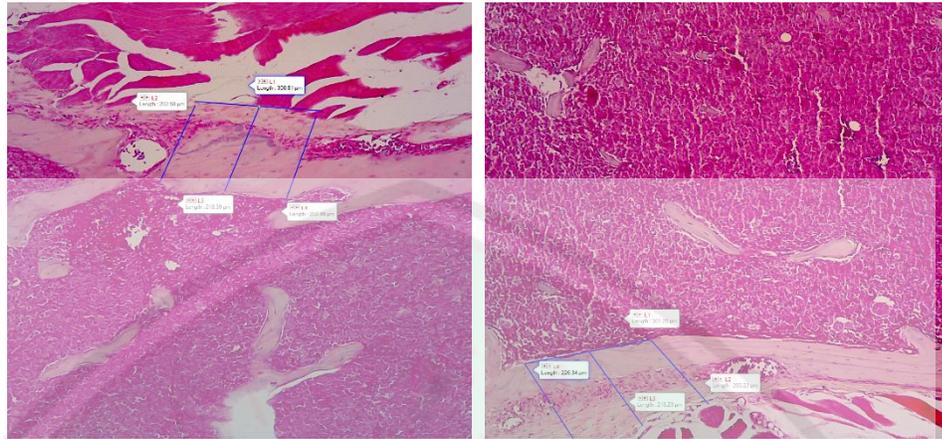
Kelompok: Dosis 2,4 mg



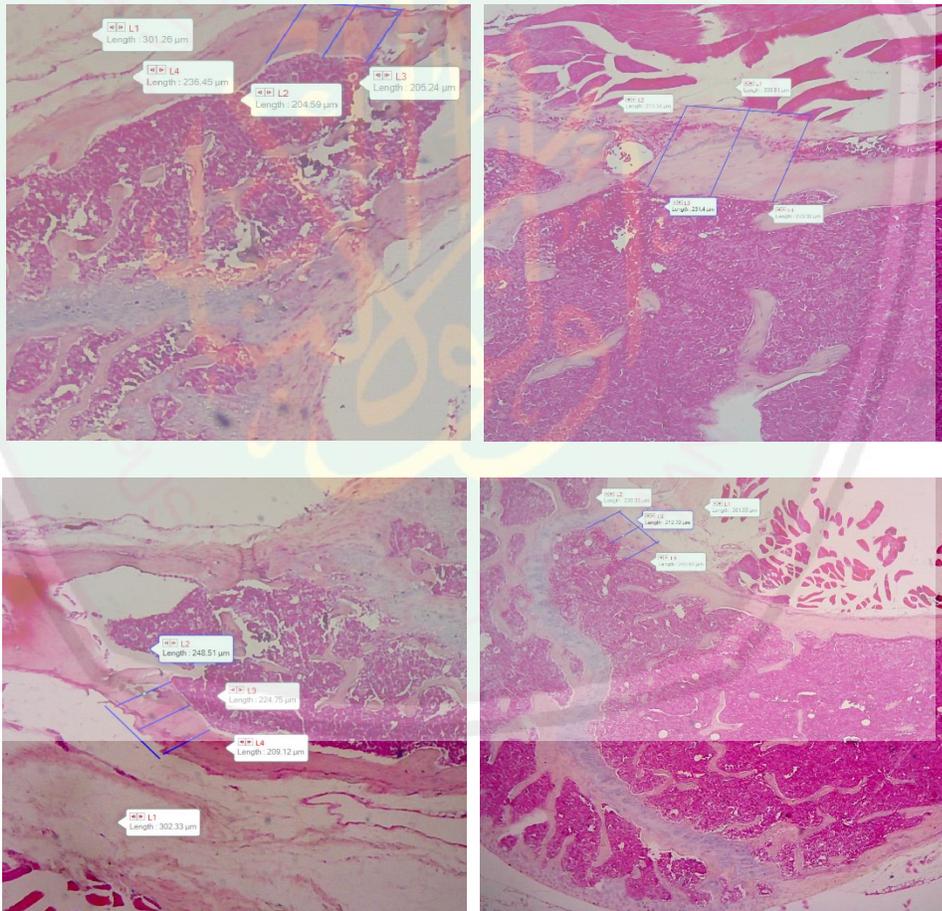
Kelompok: Dosis 4,8 mg



Kelompok: Dosis 4,8 mg



Kelompok: Dosis 9,6 mg



Lampiran 7. Data Hasil Pengukuran Kepadatan Tulang Trabekular Femur Mencit Jantan

Pengukuran Histologi Tulang Trabekular Femur Ekstrak Etanol 96% *M.crenata*

No	K-				K+				Dosis 1 (1.2 mg/ml)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Spot 1	54.83	56.18	57.72	61.75	160.72	168.17	161.40	170.90	259.92	260.89	258.12	259.47
Spot 2	80.51	80.07	83.10	81.43	185.10	182.09	177.20	183.12	261.63	261.88	263.87	262.80
Spot 3	80.51	87.79	89.76	87.32	187.50	187.03	187.37	188.85	272.33	279.47	278.79	280.64
Total	215.85	224.04	230.58	230.50	533.32	537.29	525.97	542.87	793.88	802.24	800.78	802.91
Rata-rata	71.95	74.68	76.86	76.83	177.77	179.10	175.32	180.96	264.63	267.41	266.93	267.64
R.Total	75.08				178.29				266.65			
nilai SD	2.32				2.37				1.38			

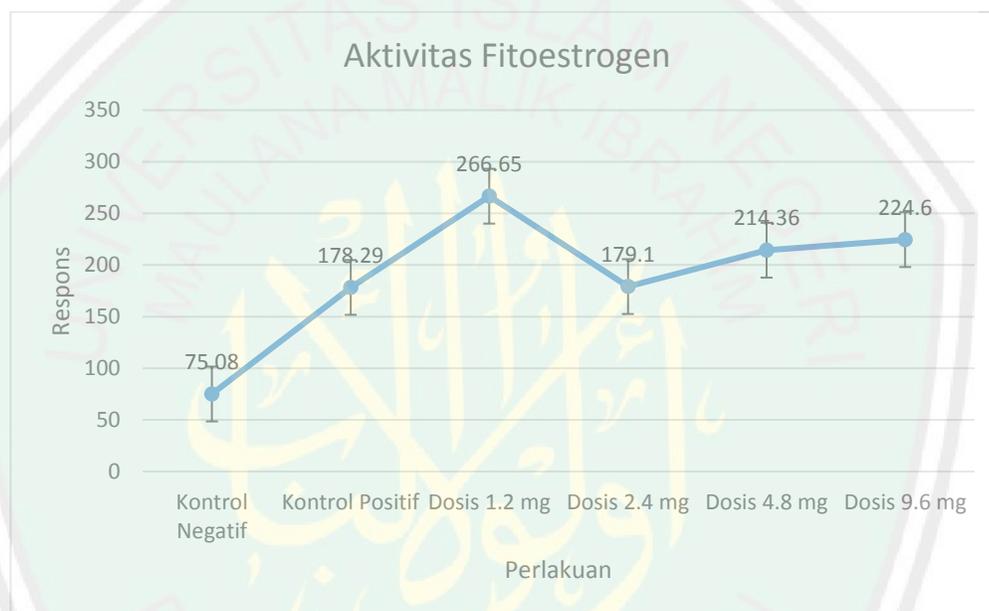
No	Dosis 2 (2.4 mg/ml)				Dosis 3 (4.8 mg/ml)				Dosis 4 (9.6 mg/ml)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Spot 1	166.47	168.86	168.84	171.94	195.02	203.16	202.68	203.22	211.50	213.34	209.12	212.72
Spot 2	172.51	180.03	177.78	183.88	215.01	225.14	208.46	216.23	213.09	223.38	224.75	230.33
Spot 3	189.45	187.57	188.96	192.94	227.50	231.22	218.39	226.34	236.45	231.40	248.51	240.64
Total	528.43	536.46	535.58	548.76	637.53	659.52	629.53	645.79	661.04	683.69	668.12	682.38
Rata-rata	176.14	178.82	178.53	182.92	212.51	219.84	209.84	215.26	220.35	227.90	222.71	227.46
R.Total	179.10				214.36				224.60			
nilai SD	2.81				4.27				3.68			

Ket.

- K- : Kelompok Kontrol Negatif
 K+ : Kelompok Kontrol positif
 Dosis : Variasi Dosis
 R1-4 : Replikasi Mencit
 Spot 1-3 : Area Pengukuran
 R.Total : Rata-rata Total
 nilai SD : Nilai Standar Deviasi

No	Nama	Nilai Rerata \pm SD
1	Kontrol Negatif	75.08 \pm 2.32
2	Kontrol Positif	178.29 \pm 2.37
3	Dosis 1.2 mg	266.65 \pm 1.38
4	Dosis 2.4 mg	179.1 \pm 2.81
5	Dosis 4.8 mg	214.36 \pm 4.27
6	Dosis 9.6 mg	224.6 \pm 3.68

Grafik Pengukuran Rerata Ketebalan Tulang



Lampiran 8. Hasil Analisa Data

A. Uji Normalitas

		Tests of Normality					
Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil	Kelompok Negatif	.274	4	.	.860	4	.262
	Kelompok Positif	.164	4	.	.995	4	.981
	Dosis 1.2 mg	.330	4	.	.808	4	.116
	Dosis 2.4 mg	.290	4	.	.933	4	.612
	Dosis 4.8 mg	.168	4	.	.982	4	.916
	Dosis 9.6 mg	.281	4	.	.878	4	.331

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Hasil			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.430	5	18	.261

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

ANOVA

Hasil		Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	(Combined)	84514.319	5	16902.864	1926.433
	Linear Term	33730.565	1	33730.565	3844.299
	Deviation	50783.754	4	12695.938	1446.966
Within Groups		157.935	18	8.774	
Total		84672.254	23		

Sig.

Between Groups	(Combined)	.000
	Linear Term	.000
	Contrast	.000
	Deviation	.000
Within Groups		
Total		

D. Uji Least Significant Different (LSD)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Negatif	Kelompok Positif	-103.20750*	2.09454	.000	-107.6080	-98.8070
	Dosis 1.2 mg	-191.57250*	2.09454	.000	-195.9730	-187.1720
	Dosis 2.4 mg	-104.02250*	2.09454	.000	-108.4230	-99.6220
	Dosis 4.8 mg	-139.28250*	2.09454	.000	-143.6830	-134.8820
	Dosis 9.6 mg	-149.52500*	2.09454	.000	-153.9255	-145.1245
Kelompok Positif	Kelompok Negatif	103.20750*	2.09454	.000	98.8070	107.6080
	Dosis 1.2 mg	-88.36500*	2.09454	.000	-92.7655	-83.9645
	Dosis 2.4 mg	-.81500	2.09454	.702	-5.2155	3.5855
	Dosis 4.8 mg	-36.07500*	2.09454	.000	-40.4755	-31.6745
	Dosis 9.6 mg	-46.31750*	2.09454	.000	-50.7180	-41.9170
Dosis 1.2 mg	Kelompok Negatif	191.57250*	2.09454	.000	187.1720	195.9730
	Kelompok Positif	88.36500*	2.09454	.000	83.9645	92.7655

	Dosis 2.4 mg	87.55000*	2.09454	.000	83.1495	91.9505
	Dosis 4.8 mg	52.29000*	2.09454	.000	47.8895	56.6905
	Dosis 9.6 mg	42.04750*	2.09454	.000	37.6470	46.4480
Dosis 2.4 mg	Kelompok Negatif	104.02250*	2.09454	.000	99.6220	108.4230
	Kelompok Positif	.81500	2.09454	.702	-3.5855	5.2155
	Dosis 1.2 mg	-87.55000*	2.09454	.000	-91.9505	-83.1495
	Dosis 4.8 mg	-35.26000*	2.09454	.000	-39.6605	-30.8595
	Dosis 9.6 mg	-45.50250*	2.09454	.000	-49.9030	-41.1020
Dosis 4.8 mg	Kelompok Negatif	139.28250*	2.09454	.000	134.8820	143.6830
	Kelompok Positif	36.07500*	2.09454	.000	31.6745	40.4755
	Dosis 1.2 mg	-52.29000*	2.09454	.000	-56.6905	-47.8895
	Dosis 2.4 mg	35.26000*	2.09454	.000	30.8595	39.6605
	Dosis 9.6 mg	-10.24250*	2.09454	.000	-14.6430	-5.8420
Dosis 9.6 mg	Kelompok Negatif	149.52500*	2.09454	.000	145.1245	153.9255
	Kelompok Positif	46.31750*	2.09454	.000	41.9170	50.7180
	Dosis 1.2 mg	-42.04750*	2.09454	.000	-46.4480	-37.6470
	Dosis 2.4 mg	45.50250*	2.09454	.000	41.1020	49.9030
	Dosis 4.8 mg	10.24250*	2.09454	.000	5.8420	14.6430

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

E. Uji Analisa Probit (ED_{50})

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	26.501	1	.000 ^a

a. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a .010	2.511	.	.	.400	.	.
.020	2.431	.	.	.386	.	.
.030	2.382	.	.	.377	.	.
.040	2.346	.	.	.370	.	.
.050	2.317	.	.	.365	.	.
.060	2.292	.	.	.360	.	.
.070	2.271	.	.	.356	.	.
.080	2.252	.	.	.353	.	.
.090	2.235	.	.	.349	.	.
.100	2.220	.	.	.346	.	.
.150	2.156	.	.	.334	.	.
.200	2.107	.	.	.324	.	.
.250	2.066	.	.	.315	.	.
.300	2.030	.	.	.308	.	.
.350	1.997	.	.	.300	.	.
.400	1.966	.	.	.294	.	.
.450	1.937	.	.	.287	.	.
.500	1.908	.	.	.281	.	.
.550	1.880	.	.	.274	.	.
.600	1.852	.	.	.268	.	.
.650	1.824	.	.	.261	.	.
.700	1.794	.	.	.254	.	.

.750	1.762	.	.	.246	.	.
.800	1.728	.	.	.238	.	.
.850	1.689	.	.	.228	.	.
.900	1.641	.	.	.215	.	.
.910	1.629	.	.	.212	.	.
.920	1.617	.	.	.209	.	.
.930	1.604	.	.	.205	.	.
.940	1.589	.	.	.201	.	.
.950	1.572	.	.	.196	.	.
.960	1.552	.	.	.191	.	.
.970	1.529	.	.	.184	.	.
.980	1.498	.	.	.176	.	.
.990	1.451	.	.	.162	.	.

- a. A heterogeneity factor is used.
b. Logarithm base = 10.

Lampiran 8. Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian



(1)

Proses pengeringan herba
M.crenata



(2)

Proses grinding simplisia
menjadi serbuk halus
herba *M.crenata*



(3)

Penimbangan simplisia
herba *M.crenata*



(4)

Proses Ultrasonikasi herba
M.crenata



(5)

Proses penyaringan filtrat
dan residu herba
M.crenata



(6)

Proses pemisahan pelarut
dari ekstrak dengan
rotary evaporator



(7)

Proses pengeringan
ekstrak herba *M.crenata*



(8)

Proses penimbangan
ekstrak herba *M.crenata*



(9)

Proses Skringing
Fitokimia



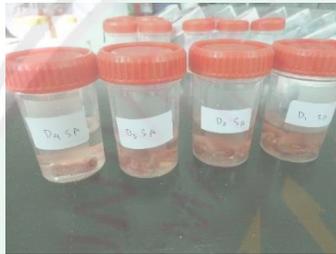
(10)
Proses Aklimatisasi mencit jantan



(11)
Proses pemberian perlakuan (induksi) pada mencit jantan



(12)
Proses pembedahan mencit jantan, dan pengambilan tulang femur



(13)
Proses pengawetan tulang dengan formalin 10%



(14)
Proses pembuatan preparat: pemotongan tulang



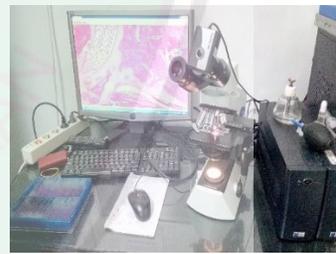
(15)
Proses pembuatan preparat: pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)



(16)
Proses pembuatan preparat: pengeringan preparat



(17)
Preparat histologi tulang yang telah jadi



(18)
Pengamatan preparat histologi tulang trabekular femur

Lampiran 9. Perhitungan Rendemen dan Dosis

A. Perhitungan Rendemen

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{jumlah ekstrak}}{\text{jumlah serbuk}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{26,505 \text{ g}}{921,864 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,87 \% \end{aligned}$$

B. Dosis induksi deksametason

$$\text{Dosis deksametason untuk manusia (70kg)} = 1,125 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Dosis deksametason untuk mencit (20g)} = 1,125 \times 0,0026$$

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

$$\text{Induksi untuk 30 hari jadi,} = 0,0029 \text{ mg} \times 30$$

$$= 0,0087 \text{ mg}$$

C. Dosis induksi Alendronat

$$\text{Dosis alendronat untuk manusia (70kg)} = 10\text{mg/hari (Ferguson, 2004)}$$

$$\text{Dosis alendronat untuk mencit (20g)} = 10\text{mg} \times 0,0026$$

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

$$\text{Induksi untuk 30 hari, jadi} = 0,026 \times 30$$

$$= 0,78 \text{ mg}$$

Dosis acuan yang digunakan paa penelitian laswati (2007) sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Dosis pada manusia 70 kg} &= 70/50 \times 0,66 \text{ gram} \\ &= 0,93 \text{ gram} = 930 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit dengan berat 20 g} &= 930 \text{ mg} \times 0,0026 \\ &= 2,4 \text{ mg}/20\text{g BB mencit} \end{aligned}$$

D. Dosis induksi Kelompok 1 (dosis 1,2 mg/BB mencit)

$$\begin{aligned} \text{Dosis 1} &= 1,2 \text{ mg}/20\text{g BB} \\ &= 5 \times 1,2\text{mg} \times 28 = 168 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka esktrak yang ditimbang sebanyak 168 mg

E. Dosis induksi Kelompok 2 (dosis 2,4 mg/BB mencit)

$$\begin{aligned} \text{Dosis 2} &= 2,4 \text{ mg}/20\text{g BB} \\ &= 5 \times 2,4 \text{ mg} \times 28 = 336 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 336 mg

F. Dosis induksi Kelompok 3 (dosis 4,8 mg/BB mencit)

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3} &= 4,8 \text{ mg}/20\text{g BB} \\ &= 5 \times 4,8\text{mg} \times 28 = 672 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 672 mg

G. Dosis induksi Kelompok 4 (dosis 9,6 mg/BB mencit)

Dosis 4 = 9,6 mg/20g BB

$$= 5 \times 9,6\text{mg} \times 28 = 1344 \text{ mg}$$

Maka ekstrak yang ditimbang sebanyak 1,344 mg

Jadi, jumlah ekstrak yang diperlukan untuk induksi yaitu sebanyak 2,520 mg

F. Dosis effective (ED₅₀) sebesar 1,908 mg/BB mencit

Konversi dosis pada manusia (70kg) = 1,908 mg x 387,9

$$= 740,1132 \text{ mg} = 0,74 \text{ gr}$$