

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Marsilea crenata* Presl.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT**

SKRIPSI

Oleh :
IZZA NAILIA SHIRVI
NIM. 14670020



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

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Marsilea crenata* Presl.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOBLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT**

SKRIPSI

Oleh:
IZZA NAILIA SHIRVI
NIM. 146700200

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 DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Marsilea crenata* Presl.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOBLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT**

SKRIPSI

Oleh :

**IZZA NAILIA SHIRVI
NIM. 14670020**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal 14 November 2018**

Pembimbing I

Pembimbing II



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

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



**Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi**



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

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Marsilea crenata* Presl.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT**

SKRIPSI

Oleh :

**IZZA NAILIA SHIRVI
NIM. 14670020**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Telah Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)
Tanggal : 14 November 2018**

Ketua Penguji : Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.

NIP. 19800203 200912 2 003

Anggota Penguji : 1. Burhan Ma'arif ZA., M. Farm., Apt.

NIP.19900221 20170101 1 124

2. Fidia Rizkiah Inayatilah, S. TT., M. Keb.

NIP. 19850720 200912 1 003

3. Abdul Hakim, M. P.I., M. Farm., Apt.

NIP. 19761214 200912 1 002

Reeh
(.....)

Burhan
(.....)

Fidia
(.....)

Abdul
(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Farmasi**



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

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan penuh rasa syukur kepada Allah ‘Azza wa Jalla, lantaran *qudrah* dan *iradah*Nya telah selesailah penulisan skripsi ini. Karya tulis sederhana namun penuh perjuangan serta tangisan pada setiap prosesnya.

Karya tulis sederhana ini, saya persembahkan untuk diri saya sendiri:

Terimakasih telah kuat,

Terimakasih telah sabar,

Terimakasih telah berjuang,

Beribu maaf atas kesusahan, keluhan, masalah serta kesedihan yang selalu hadir. Tetap tersenyum, cintai semua orang, tetap semangat karena perjuangan masih panjang.

Terimakasih juga untuk kedua orang tua, keluarga, sahabat, teman-teman dan seluruh orang terdekat yang turut andil membantu mendoakan, memberikan semangat, motivasi dan dorongan agar segera menyelesaikan skripsi ini sehingga memperoleh gelar Sarjana Farmasi. Semoga Allah membalas segala kebaikan kalian dengan sebaik- baiknya balasan. Aamiin.

Izza Nailia Shirvi / 14670020

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Izza Nailia Shirvi

NIM : 14670020

Program Studi : Farmasi

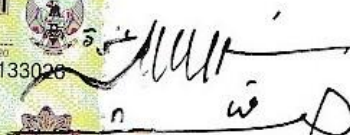
Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata*
Presl. Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang
Trabekular Vertebra Mencti

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

Malang, November 2018
Yang membuat pernyataan,




Izza Nailia Shirvi
14670020

MOTTO

"وَلَمْ أَكُنْ بِدُعَائِكَ رَبِّ شَقِيًّا"

“..dan aku belum pernah kecewa dalam berdoa kepadaMu, duhai Tuhanku”

إذا العزم إشتد
والجهد إمتد
والفؤاد بالله إتحد
فالنجاح وحسن الختام لن ترد

Jika ada kemauan yang keras
Dan usaha yang panjang
Serta hati menyatu dengan Tuhan,
Maka kesuksesan dan akhir yang baik tidak akan terhindarkan

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, lantaran *qudrah* dan *iradah* Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi penelitian ini. Penulisan skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam jenjang perkuliahan Sarjana Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu- Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari hambatan dan kesulitan. Namun, berkat bimbingan, bantuan, nasihat serta kerjasama dari banyak pihak, khususnya dosen pembimbing segala hambatan tersebut akhirnya dapat diatasi dengan baik.

Tak ada gading yang tak retak, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik serta saran yang membangunlah yang penulis harapkan dari para pembaca di masa mendatang. Selanjutnya, dalam penulisan skripsi ini, penulis mendapat banyak sekali bantuan dari segala pihak. Sehingga dalam kesempatan kali ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar- besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Bapak Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp.B., Sp.BP-RE selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Roihatul Mutiah, M.Kes, Apt., selaku Kajur Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Bapak Burhan Ma'arif, S. Farm., Apt., M. Farm. selaku pembimbing utama yang dengan sabar memberikan ilmu, pengarahan, bimbingan, nasehat, waktu, tenaga, dan petunjuk selama penyusunan proposal skripsi.
5. Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt. selaku konsultan yang membantu penulis dalam menyempurnakan skripsi.
6. Ibu Fidiah Rizkiah Inayatillah, S.TT., M. Keb. selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan evaluasi dan saran dalam penulisan skripsi.
7. Bapak Abdul Hakim, M.Pi, Apt. selaku dosen penguji agama yang telah banyak memberikan evaluasi dan saran dalam penyusunan skripsi ini khususnya di bidang keislaman.
8. Seluruh dosen di Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada saya.
9. Kedua orang tua tercinta, Abuyah Mohammad As'ad Amin dan Umi Nurul Qalbi yang telah menjadi orang tua terhebat dan selalu memberikan curahan kasih sayang, doa, ridlo, nasehat, dukungan moral maupun materil. Tidak ada apapun di dunia ini yang dapat membalas semua kebaikan, cinta, dan kasih sayang yang telah kalian berikan kepada anakmu, semoga Allah selalu memberikan perlindungan dan cinta kasih kepada Abuyah dan Umi.
10. Nenek tercinta, Maryam Muchtar yang selalu memberikan do'a dan semangat, serta menjadi panutan bagi saya.
11. Mochammad Ilham Firdaus yang senantiasa tulus menyumbangkan do'a dan semangat serta motivasi untuk segera menyelesaikan skripsi.
12. Adik tersayang Mochammad Faiq Rasikhan dan Qanita Azmilla yang telah memberikan doa dan semangat.
13. Teman Farmasi angkatan 2014 "Platinum Generation" yang selalu kompak dalam suka maupun duka serta selalu memberikan ilmu dan bertukar pikiran dengan penulis.

14. Teman seperjuangan Yeni, Lulu', Sari, Maya, Linda, Rany, Firman, Luthfi, Reyhan, Rosmina yang juga turut serta memberi semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
15. Teman satu tim proyek anak didik Bapak Burhan Firsta, Reyhan, Kia, Miftah dan Putra.
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama ini.

Akhir kata, semoga segala bantuan dan do'a di balik penulisan skripsi ini menjadi berkah serta mendapat ganjaran oleh Allah SWT.

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------|
| HALAMAN JUDUL | |
| HALAMAN PENGAJUAN | |
| HALAMAN PERSETUJUAN | |
| HALAMAN PENGESAHAN | |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | |
| HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN | |
| MOTTO | |
| KATA PENGANTAR..... | i |
| DAFTAR ISI..... | iv |
| DAFTAR GAMBAR..... | vii |
| DAFTAR TABEL | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN | ix |
| DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN | x |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 7 |
| 1.3 Tujuan..... | 7 |
| 1.4 Manfaat..... | 7 |
| 1.4.1 Manfaat Teoritis | 7 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis | 8 |
| 1.5 Batasan Masalah | 8 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 10 |
| 2.1 Tinjauan tentang Tumbuhan Menurut Prespektif Islam..... | 10 |
| 2.2 Tinjauan tentang <i>Marsilea Crenata</i> Persl..... | 11 |
| 2.2.1 Klasifikasi | 11 |
| 2.2.2 Kandungan dan Manfaat | 12 |
| 2.3 Tinjauan tentang Ekstraksi | 14 |
| 2.3.1 Metode Ekstraksi Menggunakan <i>Ultrasound Assited Extraction</i> | 14 |
| 2.3.2 Ekstrak..... | 14 |
| 2.4 Tinjauan tentang Tulang | 15 |
| 2.4.1 <i>Remodelling</i> Tulang | 15 |
| 2.4.2 Komponen Penyusun Tulang | 17 |
| 2.5 Tinjauan tentang Osteoporosis | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1 Definisi | 19 |
| 2.5.2 Faktor Resiko Osteoporosis | 20 |
| 2.5.3 Klasifikasi | 21 |
| 2.5.4 Diagnosis dan Patofisiologi | 23 |
| 2.6 Tinjauan tentang Estrogen dan Defisiensi Estrogen | 23 |
| 2.7 Tinjauan tentang Fitoestrogen | 25 |
| 2.7.1 Mekanisme Kerja | 27 |
| 2.8 Tinjauan tentang Histomorfometri Tulang pada Osteoporosis | 28 |
| 2.9 Tinjauan tentang Osteoporosis pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) | 29 |
| 2.10 Tinjauan tentang ANOVA | 30 |
| BAB III KERANGKA KONSEPTUAL | 32 |
| 3.1 Bagan Kerangka Konseptual | 32 |
| 3.2 Uraian Kerangka Konseptual | 33 |
| 3.3 Hipotesis | 34 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 35 |
| 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian | 35 |
| 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian | 35 |
| 4.3.1 Sampel Tanaman | 36 |
| 4.3.2 Sampel Hewan Coba | 36 |
| 4.4 Variabel Penelitian | 38 |
| 4.4.1 Variabel Bebas | 38 |
| 4.4.2 Variabel Terikat | 38 |
| 4.4.3 Variabel Kontrol | 38 |
| 4.5 Definisi Operasional | 38 |
| 4.6 Alat dan Bahan Penelitian | 39 |
| 4.6.1 Alat Penelitian | 39 |
| 4.6.2 Bahan Penelitian | 40 |
| 4.7 Prosedur Penelitian | 40 |
| 4.7.1 Penyiapan Bahan Tanaman | 40 |
| 4.7.2 Ekstraksi Daun <i>M.crenata</i> dengan Ultrasonik | 40 |
| 4.7.3 Uji Aktivitas Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas | 41 |
| 4.8 Analisis Data | 45 |
| 4.9 Skema Prosedur Kerja | 48 |
| BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | 49 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.1 | Determinasi Tanaman..... | 49 |
| 5.2 | Preparasi Sampel Daun <i>Marsilea crenata</i> Presl. | 50 |
| 5.3 | Uji Kadar Air..... | 52 |
| 5.4 | Ekstraksi Serbuk Simplisia <i>M. crenata</i> dengan Pelarut Etanol 96% | 53 |
| 5.5 | <i>Thin Layer Chromatography Visualizer</i> | 55 |
| 5.6 | Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M. crenata</i> | 59 |
| | 5.6.1 Penginduksian Osteoporosis menggunakan Deksamaetason..... | 61 |
| | 5.6.2 Pembuatan Preparat Histologi Tulang Trabekular Vertebra Mencit... 62 | |
| | 5.6.3 Pemeriksaan Histomorfometri Tulang Trabekular Vertebra Mencit .. 63 | |
| 5.7 | Analisis Data..... | 65 |
| 5.8 | Mekanisme Kerja Senyawa Fitoestrogen | 72 |
| | BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN | 77 |
| 6.1 | Kesimpulan..... | 77 |
| 6.2 | Saran | 77 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 78 |
| | LAMPIRAN | 86 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 <i>Marsilea crenata</i> Presl..... | 12 |
| Gambar 2.2 Struktur Kimia | 13 |
| Gambar 2.3 Skema proses remodeling tulang. | 17 |
| Gambar 2.4 Sel Tulang (ob : osteoblas; oc : osteoklas) | 18 |
| Gambar 2.5 Efek estrogen dan sitokin..... | 25 |
| Gambar 3.1 Bagan Kerangka konseptual | 32 |
| Gambar 5.1 Daun Semanggi yang sudah dikeringkan | 51 |
| Gambar 5.2 Daun Semanggi yang sudah digiling | 51 |
| Gambar 5.3 Ekstrak kental etanol 96% daun <i>M.crenata</i> | 55 |
| Gambar 5.4 Hasil Uji TLC Visualizer pada <i>M. crenata</i> | 58 |
| Gambar 5.5 Hasil mencit dalam keadaan normal dan keadaan osteoporosis..... | 62 |
| Gambar 5.6 Grafik Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit . | 64 |
| Gambar 5.7 Sel osteoblas (X)..... | 65 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 5.1 Hasil Uji Kadar air serbuk simplisia daun <i>M. crenata</i> | 53 |
| Tabel 5.2 Perhitungan rendemen ekstrak kental etanol 96% daun <i>M. crenata</i> | 55 |
| Tabel 5.3 Hasil uji TLC Visualizer | 58 |
| Tabel 5.4 Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk..... | 66 |
| Tabel 5.5 P- value uji homogenitas Levene's statistic | 66 |
| Tabel 5.6 P- value ANOVA one- way | 67 |
| Tabel 5.7 Hasil Uji LSD..... | 68 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1 Hasil determinasi tanaman <i>Marsilea crenata</i> Presl..... | 86 |
| Lampiran 2 Surat Keterangan Laik Etik | 87 |
| Lampiran 3 Hasil TLC Visualizer | 88 |
| Lampiran 4 Gambar Preparat Histologi Tulang Trabekular Vertebra Mencit | 90 |
| Lampiran 5 Hasil Perhitungan Jumlah Sel Osteoblas | 91 |
| Lampiran 6 Hasil Analisis Perhitungan Jumlah Sel Osteoblas | 92 |
| Lampiran 7 Dokumentasi dan Alat- alat Penelitian | 97 |



DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

| | |
|--------------------|--|
| $^{\circ}$ | : Derajat |
| % | : Persen |
| < | : Kurang dari |
| > | : Lebih dari |
| \geq | : Lebih dari sama dengan |
| α | : Alfa |
| β | : Beta |
| A° | : Angstrom |
| C | : <i>Celcius</i> |
| mg | : Miligram |
| nm | : Nanometer |
| μl | : Mikroliter |
| BB | : Berat badan |
| g | : Gram |
| mL | : Mililiter |
| K (+) | : Kontrol Positif |
| K (-) | : Kontrol Negatif |
| PI | : Perlakuan I |
| PII | : Perlakuan II |
| PIII | : Perlakuan III |
| PIV | : Perlakuan IV |
| IOF | : <i>International Osteoporosis Foundation</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| ED ₅₀ | : <i>Effective Dose 50</i> |
| TSH | : <i>Terapi Sulih Hormon</i> |
| UAE | : <i>Ultrasound Assisted Extraction</i> |
| GC-MS | : <i>Gass Chromatography- Mass Spectrophotometry</i> |
| RUNX | : <i>Run-Related Transcription Factor 2</i> |
| OSX | : <i>Osterix</i> |
| FGF | : <i>Fibroblast Grow Factor</i> |
| BMPs | : <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> |
| UPT | : <i>Unit Pelaksana Teknis</i> |
| UV | : <i>Ultra Violet</i> |
| TLC | : <i>Thin Layer Chromatography</i> |
| HPTLC | : <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> |
| H ₂ SO ₄ | : <i>Asam Sulfat</i> |
| RANK | : <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $k\beta$</i> |
| RANKL | : <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $k\beta$ Ligand</i> |
| OPG | : <i>Osteoprotegerin</i> |
| TNF | : <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| TGF | : <i>Transforming Growth Factor</i> |
| IL | : <i>Interleukin</i> |
| ER | : <i>Estrogen Receptor</i> |
| HE | : <i>Hematoksilin Eosin</i> |

ABSTRAK

Shirvi, Izza Nailia. 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% daun *Marsilea crenata* Presl. Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit. Skripsi. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Burhan Ma'arif, M. Farm., Apt.; Pembimbing II : Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.

Senyawa dari tumbuhan berkhasiat serupa estrogen alami dikenal dengan istilah fitoestrogen dapat diperoleh dari tumbuhan semanggi (*Marsilea crenata*). Senyawa fitoestrogen mampu menggantikan peran estrogen dalam berikatan langsung dengan reseptor estrogen dalam proses *remodeling* tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit yang diinduksi deksametason. Penelitian dilakukan pada 36 ekor mencit jantan sehat usia 5-6 bulan dikelompokkan secara random menjadi 6 kelompok. Kelompok kontrol positif dengan pemberian suspensi alendronat 0.026 mg/20gBB, kelompok kontrol negatif dengan pemberian suspensi CMC- Na, kelompok pemberian ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* dengan empat variasi dosis yaitu 1.2 mg, 2.4 mg, 4.8 mg dan 9.6 mg/ 20 g BB mencit per hari. Perlakuan pada setiap kelompok ini dilakukan selama 28 hari setelah mencit mengalami osteoporosis. Pengamatan terhadap peningkatan jumlah sel steoblas tulang trabekular vertebra mencit secara histomorfometri dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra scara signifikan dengan dosis efektif (ED_{50}) sebesar 2.878 mg/20 g BB mencit sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* memiliki aktivitas antiosteoporosis ditunjukkan dengan peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit.

Kata Kunci : *Marsilea crenata*, fitoestrogen, sel osteoblas

ABSTRACT

Shirvi, Izza Nailia. 2018. Activity of 96% Ethanol Extract of *Marsilea crenata* Presl. In Increasing The Number of Vertebral Trabecular Osteoblast Cell in Mice. Bachelor Thesis. Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine and Health Sciences, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Ist Adviser : Burhan Ma'arif, M. Farm., Apt.; IInd Adviser : Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.;

The compounds derived from plants that have a similar properties to natural estrogen were known by phytoestrogens can be obtained from *Marsilea crenata*. Phytoestrogen can be replaced the role of estrogen to bind directly with estrogen receptor for bone remodelling process. This study conducted to determine the activity of 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* leaves to increase the number of vertebral trabecular bone osteoblasts induced by dexamethasone. The study was conducted on 36 healthy male mice aged 5-6 months randomly grouped into 6 groups. Positive control group with alendronate 0.026 mg / 20 g BB suspension, negative control group with CMC-Na suspension, group giving 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* leaves with four dose variations they were 1.2 mg, 2.4 mg, 4.8 mg and 9.6 mg / 20 g BB mice per day. Each treatment of these groups had been done for 28 days after mice had an osteoporosis. The increasing of vertebrae trabecular osteoblast number of male mice was observed using optical microscope with 100x zoom in after Histomorphometry and Hematoxylin and Eosin (HE) staining process. The result showed that the 96% ethanol extract of leaves of *Marsilea crenata* can significantly increase the number of vertebral trabecular bone osteoblasts with effective doses (ED50) of 2,878 mg / 20 g BB mice so it can be concluded that the 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* has an antiosteoporosis activity which showed with an increasing the number of vertebral trabecular bone osteoblasts in mice.

Keywords: *Marsilea crenata*, phytoestrogens, osteoblast cells

ملخص

صربي، عزة نبيلة. ٢٠١٨. نشاط مستخرجة الإيثانول % ٩٦ من ورقة مرسيليا كريناتا (*Marsilea crenata*) على زيادة عدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية للذكور الفئران. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحي بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول : برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني : الدكتورة رائحة المطيعة، الماجستير.

الكلمات الرئيسية : ورقة مرسيليا كريناتا، فتوستروجنس، خلايا بانية العظم

المركبات من النباتات التي لها مشابهة لهرمون الأستروجين الطبيعي معروفة بفتوأستروجين وتمكن أن تحصل عليها من مرسيليا كريناتا. فتوأستروجين قادرة على إستبدال دور هرمون الأستروجين في الإربطبات المباشرة بمستقبلات الأستروجين لإعادت تشكيل العظام. التهدف من هذه الدراسة لتحديد النشاط بمستخرجة الإيثانول % ٩٦ من ورقة مرسيليا كريناتا لزيادة عدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية المستحثة بواسطة الديكساميثازون. أجريت هذه الدراسة على ستة و ثلاثون فئران ذكورية سليمة تتراوح أعمارهم بين خمسة أشهر تم تجميعها عشوائيا في ست مجموعات. أعطيت المجموعة الضابطة الإيجابية بتعليق أليندرونات ٦٢٠٠٠ /ملغم/ ٢٠ غم وزن الجسم من الفئران. وأعطيت المجموعة الضابطة السالبة بتعليق سي إمسي-ن ا، أعطيت المجموعة المستخلصة بأربعة تغيرات في الجرعة هي ١,٢ ملغم، ٢,٤ ملغم، ٤,٨ ملغم، ٩,٦ ملغم/ عشرون وزن الجسم من الفئران في اليوم. ثم أجريت هذه الدراسة لمدة أربعة أسابيع بعد إصابة المشاشة العظام في الفئران. مراقبة الزيادة في عدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية بواسطة هستومورفوميترى مع التلون هيماتوكسيلين إيوسين. ثم ملاحظ الزيادة العدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية باستخدام المجهر بتوسيع مائة مرات. وأظهرت النتائج بأنوفا أن مستخلص الإيثانول % ٩٦ من ورقة مرسيليا كريناتا زادت العدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية الفئران بشكل كبير مع جرعة فعالة ٢,٨٧٨ ملغم كل عشرين غم وزن الجنس من الفئران. فلذلك أن مستخلص الإيثانول % ٩٦ من ورقة مرسيليا كريناتا له نشاط لمضادة هشاشة العظام بإشارة زيادة عدد الخلايا البانية في عظمية التريبقية الفقارية للذكور الفئران.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit degeneratif yang menjadi salah satu masalah terbesar di dunia saat ini (Kemenkes RI, 2015). Osteoporosis menjadi ancaman bagi kehidupan manusia. Data statistik pada tahun 2009 menyebutkan bahwa terdapat 200 juta penderita osteoporosis di seluruh dunia. Tahun 2050, diperkirakan 6,3 juta manusia akan mengalami patah tulang panggul setiap tahun di seluruh dunia yang lebih dari setengahnya terdapat di Asia (Tandra, 2009). Data terbaru yang dikeluarkan oleh *International Osteoporosis Foundation* (IOF) menyatakan bahwa akan terjadi peningkatan signifikan mengenai jumlah jiwa yang mengalami osteoporosis yang mana penderitanya kebanyakan adalah wanita dengan usia di atas 50 tahun (Syam *et al.*, 2014) yang artinya bahwa prevalensi kasus osteoporosis pada wanita sangat tinggi, padahal kasus osteoporosis pada kaum laki- laki juga bisa saja terjadi. Menurut Laswati (2015), diketahui satu dari delapan laki- laki usia lebih dari 50 tahun memiliki risiko fraktur akibat osteoporosis. Bahkan laki- laki dengan kasus fraktur proksimal femur memiliki potensi morbiditas dan mortalitas dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan kasus yang terjadi pada wanita. Oleh karena itu, osteoporosis menjadi problem yang memerlukan perhatian khusus seiring dengan meningkatnya angka kematian yang disebabkan oleh *silent killer disease* ini terutama di negara- negara berkembang, termasuk Indonesia.

Defisiensi estrogen merupakan salah satu faktor penting terjadinya ketidakseimbangan proses remodeling tulang yang berperan dalam proses peningkatan resorpsi tulang yang dapat menimbulkan terjadinya osteoporosis (Dipiro *et al.*, 2008). Kecepatan resorpsi dan deposisi tulang baru untuk menggantikan yang hilang dipengaruhi oleh sirkulasi kadar estrogen. Pada saat kadar estrogen rendah, kemampuan pembentukan tulang akan menurun dan sedangkan resorpsi tulang akan meningkat (Groff, 2000). Pilihan pertama pencegahan dan pengobatan ketidakseimbangan resorpsi dan formasi tulang saat ini adalah Terapi Sulih Hormon (TSH) estrogen. Namun penggunaan TSH estrogen sintetik dapat menimbulkan efek samping yang potensial seperti *coronary event, venous thromboebolism, stroke*, kanker payudara, demensia serta endometrium (Bjarnason, 2005; Constantine, 2005; Speroff, 2004; Lee *et al.*, 2013). Kesenjangan ini harus diupayakan penanganannya melalui penemuan senyawa atau tumbuhan yang berkhasiat serupa estrogen alami, cukup aman pemakaiannya, terjangkau oleh masyarakat banyak dan relatif dapat dikonsumsi dalam jangka waktu lama. Senyawa- senyawa serupa estrogen alami tersebut dapat diperoleh dari tumbuh- tumbuhan yang disebut kelompok fitoestrogen (Adlercreutz *et al.*, 1998; Mazur, 1998; Adlercreutz *et al.*, 2005).

Fitoestrogen merupakan senyawa dari tanaman yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen. Disamping mudah didapat dan tidak memiliki efek samping, senyawa golongan fitoestrogen juga dilaporkan mempunyai khasiat untuk meningkatkan massa tulang (Cos *et al.*, 2003; Ososki dan Kennelly, 2003; Villiers, 2009; Yang *et al.*, 2012), sehingga

merupakan alternatif pengobatan yang potensial untuk pencegahan osteoporosis akibat defisiensi estrogen (Yang *et al.*, 2012).

Al Qur'an telah menjelaskan bahwa alam diciptakan bagi manusia dengan berbagai macam tumbuhan berkhasiat obat, seperti alam Indonesia yang sebenarnya merupakan sumber tanaman obat di dunia (Wijayakusuma, 2000). Sebagaimana yang telah dituliskan dalam Al Qur'an pada Surat Asy- Syu'ara ayat 7 yang berbunyi :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh- tumbuhan yang baik?”.

Kalimat *ilaa* pada ayat “*Awalam yaraww ila al ardhi*” yang artinya “*apakah mereka tidak memperhatikan bumi*” memiliki makna *batas akhir*. Makna batas akhir dimaksudkan bahwa ayat tersebut mengajak manusia untuk memikirkan ciptaan Allah yang ada di bumi misalnya aneka tanah, tumbuhan, dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuhan- tumbuhannya (Shihab, 2002). Sesungguhnya pada tumbuh- tumbuhan terdapat bukti bagi orang- orang yang berakal atas kekuasaan penciptanya (Al Maraaghi, 2000). Berdasarkan ayat tersebut, dapat dipahami bahwa terdapat perintah kepada manusia yang berakal untuk melakukan penelitian, eksplorasi, dan pemanfaatan ciptaan Allah terutama tentang tumbuh- tumbuhan agar dapat semakin memahami kebesaran dan kekuasaan Allah SWT dalam menciptakan berbagai jenis tumbuhan dengan macam- macam manfaatnya seperti tumbuhan yang bermanfaat sebagai obat,

karena pada dasarnya semua penyakit berasal dari Allah maka yang dapat menyembuhkan juga Allah semata. Akan tetapi untuk mencapai kesembuhan tersebut tentunya dengan usaha yang maksimal. Sesungguhnya Allah menurunkan penyakit, maka bersamaan dengan itu Allah juga menurunkan obatnya.

Semanggi atau *Marsilea crenata* Presl. (*M. crenata*) merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki khasiat obat. Tumbuhan yang terkenal di Surabaya Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat ini, diketahui memiliki kandungan fitoestrogen (Yacoeb *et al.*, 2010; Laswati, 2011). Kandungan fitoestrogen pada daun *M. crenata* telah diuji melalui teknik *Radio Immunoassay* (RIA) dan menunjukkan konsentrasi yang cukup tinggi. Hasil uji *in vivo* dilakukan pada mencit betina juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat menghambat terjadinya osteoporosis dengan mekanisme peningkatan *remodeling* tulang pada tahap pembentukan tulang (Laswati, 2011). Penelitian lain juga telah dilakukan secara *in silico* yang menyatakan bahwa senyawa- senyawa pada daun *M. crenata* diketahui memiliki afinitas yang tinggi terhadap *estrogen receptor* β (ER- β), sedangkan pada pengujian *in vitro* terhadap sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana dan fraksi hasil pemisahan daun *M. crenata* dapat meningkatkan proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas MC3T3-E1 (Ma'arif, 2015).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, maka penting dilakukan penelitian mengenai aktivitas ekstrak etanol 96 % daun *M. crenata* Presl. terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit yang telah diinduksi deksametason sebagai penginduksi osteoporosis.

Penggunaan deksametason sebagai induktor osteoporosis dikarenakan ia merupakan obat golongan glukokortikoid yang dengan penggunaan dalam dosis tinggi dan jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis osteoblas. Apoptosis pada osteoblas merupakan penyebab osteoporosis sekunder melalui jalur hiperparatiroid sekunder hingga terjadi *bone loss*. Mekanisme *bone loss* pada pengobatan glukokortikoid jangka lama terjadi akibat penurunan pembentukan tulang (formasi) tulang dan meningkatnya resorpsi tulang. Sehingga pemberian deksametason jangka lama dianggap efektif dalam menginduksi terjadinya osteoporosis pada mencit jantan. Sedangkan penggunaan mencit sebagai hewan coba dikarenakan mencit memiliki kedekatan fisiologis yang besar dengan hewan mamalia lainnya. Selain itu juga karena mencit mudah dalam penanganan, siklus hidup pendek, pengadaan hewan ini pun tidak sulit. Pemilihan mencit berjenis kelamin jantan dilakukan untuk menghindari terjadinya pengaruh fluktuatif hormon estrogen yang dimiliki oleh mencit betina, karena mencit jantan diketahui memiliki estrogen dengan jumlah atau kadar yang sedikit. Oleh karena itu, pemilihan mencit berkelamin jantan dianggap efektif untuk penelitian ini.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96 % dengan instrumen *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Ekstrak yang didapat kemudian diujikan secara *in vivo* pada mencit diinduksi deksametason untuk diamati aktivitas fitoestrogen terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas pada mencit tersebut. Pengukuran jumlah sel osteoblas dilakukan dengan menggunakan metode histomorfometri. Histomorfometri tulang merupakan metode yang dalam kemampuannya dipergunakan untuk menilai kualitas tulang dan untuk

mengevaluasi efek pengobatan terhadap mineralisasi tulang dan mikroarsitektur tulang (Chavassieux, 2000).

Penelitian ini dilakukan sebagai bentuk usaha penulis untuk mengamalkan ayat Qur'an yang memerintahkan manusia untuk beramal saleh kepada sesama umat manusia. Sebagaimana yang telah disebutkan dalam Surat An Nahl Ayat 97:

مَنْ عَمِلَ صَالِحًا مِّنْ ذَكَرٍ أَوْ أُنْثَىٰ وَهُوَ مُؤْمِنٌ فَلَنُحْيِيَنَّهٗ حَيَاةً طَيِّبَةً وَلَنَجْزِيَنَّهُمْ أَجْرَهُمْ بِأَحْسَنِ مَا كَانُوا يَعْمَلُونَ

Yang artinya : “Barang siapa mengerjakan amal saleh, baik laki-laki maupun perempuan dalam keadaan beriman, maka pasti akan Kami berikan kepadanya kehidupan yang baik dan akan Kami beri balasan dengan pahala yang lebih baik dari apa yang telah mereka kerjakan”

Penderita osteoporosis akibat defisiensi hormon estrogen diharapkan dapat terbantu dengan adanya penelitian mengenai aktivitas ekstrak etanol 96% *M. crenata* ini, sehingga dapat mengurangi angka resiko osteoporosis dan angka harapan hidup penderita osteoporosis pun juga ikut meningkat. Selain itu, berdasarkan surat Asy Syu'ara ayat 7 juga telah diperintahkan untuk melakukan penelitian, eksplorasi, dan pemanfaatan ciptaan Allah terutama tentang tumbuh-tumbuhan agar dapat semakin memahami kebesaran dan kekuasaan Allah SWT. Penelitian lanjut mengenai produk jadi sebagai antiosteoporosis berbahan baku daun *M. crenata* juga dapat dilakukan untuk mengembangkan penelitian ini di masa mendatang.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol 96 % daun *M. crenata* mempunyai aktivitas dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason?
2. Berapakah ED₅₀ dari ekstrak etanol 96 % daun *M. crenata* untuk meningkatkan jumlah sel osteoblas pada mencit diinduksi deksametason?

1.3 Tujuan

Adapun dilakukannya penelitian ini bertujuan agar:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96 % daun *M. crenata* pada mencit diinduksi deksametason dalam meningkatkan jumlah sel osteoblasnya.
2. Mengetahui ED₅₀ dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit diinduksi deksametason.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Memperoleh informasi mengenai aktivitas ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit.

2. Mengetahui ED₅₀ pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan peluang untuk mengembangkan pengobatan alternatif yang potensial dalam mengatasi osteoporosis akibat defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause.
2. Memberikan peluang untuk penelitian selanjutnya dalam mengembangkan ekstrak *M. crenata* menjadi produk jadi untuk mendampingi obat- obatan konvensional yang telah beredar di masyarakat luas dan bahkan menekan penggunaan obat- obatan konvensional dengan efek samping yang minim.
3. Meningkatkan pemanfaatan budidaya tanaman *M. crenata* dengan budidaya lebih lanjut sehingga dapat membantu perekonomian petani *M. crenata*.

1.5 Batasan Masalah

1. Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun yang berwarna hijau muda dari tumbuhan semanggi dan bentuk yang digunakan untuk penelitian adalah berupa ekstrak menggunakan pelarut etanol 96%.

2. Hewan uji yang digunakan merupakan mencit jantan dengan usia 5- 6 bulan dengan berat badan sekitar 20-35 gram yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
3. Parameter yang diuji ialah peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit jantan yang diinduksi deksametason.
4. Peningkatan jumlah sel osteoblas diamati melalui histomorfometri pada tulang trabekula vertebra mencit jantan diinduksi deksametason dengan menggunakan mikroskop cahaya
5. Sel yang diamati adalah sel osteoblas pada bagian tulang trabekular vertebra mencit.
6. Variasi dosis ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang diberikan ialah 1,2 mg/20 g berat badan mencit per hari, 2,4 mg/20 g berat badan mencit per hari, dan 4,8 mg/20 g berat badan mencit per hari, 9,6 mg/20 g berat badan mencit per hari.
7. Pemberian masing- masing variasi dosis dilakukan pada tiap kelompok perlakuan selama 28 hari setelah mencit diinduksi deksametason selama 28 hari (Manolagas, 2000).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tumbuhan Menurut Prespektif Islam

Manusia dan tumbuh- tumbuhan sangat erat kaitannya dalam kehidupan. Pada dasarnya banyak sekali manfaat yang dapat diperoleh oleh manusia dari tumbuh- tumbuhan namun masih banyak pula tumbuh- tumbuhan yang ada di sekitar kita yang belum diketahui manfaatnya. Keberadaan tumbuh- tumbuhan di sekitar kita merupakan berkah serta nikmat yang sangat luas yang diberikan oleh Allah SWT. Firman Allah SWT dalam Al Qur'an :

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا وَعِنَبًا وَقَضْبًا وَرَيْثُونًا وَنَخْلًا وَحَدَائِقَ غُلْبًا وَفَاكِهَةً وَأَبًّا مَتَاعًا لَكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ

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 binatang ternakmu" (QS. 'Abasa (80) : 27-32).

Ayat di atas menjelaskan tentang besarnya kuasa Allah SWT dalam menciptakan tumbuh- tumbuhan seperti bij- bijian, sayur- sayuran, buah- buahan serta rumput yang bisa menjadi bahan makanan, obat bagi manusia dan ternak yang ada di muka bumi. Setiap unsur makanan tersebut memiliki khasiat unik bagi tubuh manusia yang bisa diteliti dalam kehidupan serta kandungan yang dimiliki oleh tumbuh- tumbuhan yang dapat dipelajari lebih dalam untuk mencerahkan dan memberi pandangan terhadap keajaiban dari tumbuhan- tumbuhan yang telah disebutkan dalam ayat tersebut (Imani, 2005).

Al Qur'an yang salah satu fungsinya sebagai kitab sains telah menggariskan tentang beragam manfaat yang bisa diambil oleh manusia dari berbagai macam tumbuh- tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT. Pada dasarnya semua penyakit berasal dari Allah, maka yang dapat menyembuhkan juga Allah semata. Akan tetapi untuk mencapai kesembuhan tersebut tentunya dengan usaha yang maksimal. Sesungguhnya Allah menurunkan penyakit, maka bersamaan dengan itu Allah juga menurunkan obatnya. Sebagaimana sabda Rasulullah SAW yang artinya “*Usamah bin Syarik berkata, “Di waktu saya bersama Nabi Muhammad SAW., datanglah beberapa orang badui, lalu mereka bertanya, “Ya Rasulullah, apakah kami mesti berobat?” Jawab beliau, “Ya, wahai hamba Allah, berobatlah kamu, karena Allah tidak mengadakan penyakit melainkan Dia adakan obatnya, kesuali satu penyakit”. Tanya mereka, “Penyakit apa itu?” Beliau menjawab, “Tua”.* (HR. Ahmad).

2.2 Tinjauan tentang *Marsilea Crenata* Persl.

2.2.1 Klasifikasi

Divisi: Pteridophyta

Kelas : Filiciaceae

Bangsa : Salviniaceae

Suku : Marsileaceae

Marga : *Marsilea*

Jenis : *Marsilea crenata* Presl.

Nama Umum : Semanggi

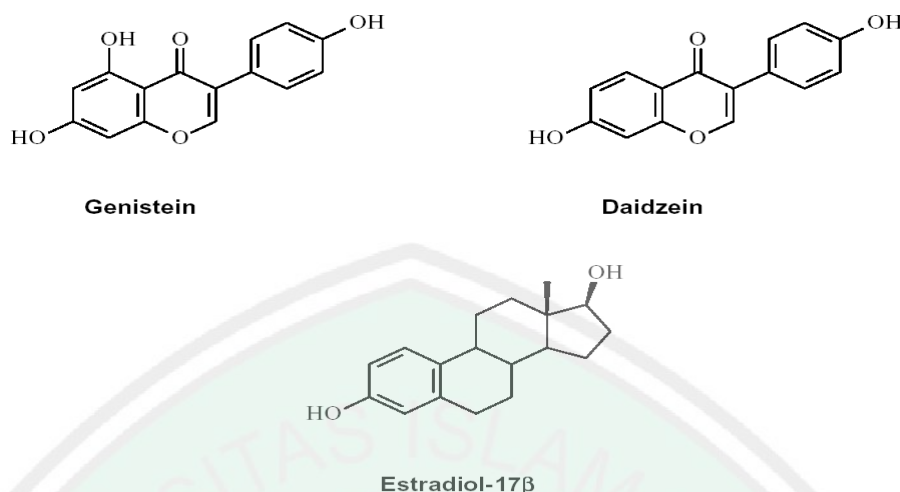
Nama Daerah : Semanggi (Jawa) (Afristiani, 2003).



Gambar 2.1 Marsilea crenata Presl. (Ma'arif, 2016)

2.2.2 Kandungan dan Manfaat

Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap *M. crenata*, yang menunjukkan bahwa *M. crenata* mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, steroid, polifenol, serta senyawa antioksidan (Nurjanah *et al.*, 2012; Yacoeb *et al.*, 2010). Kandungan utama pada daun semanggi ialah isoflavon. Isoflavon merupakan zat aktif pada daun semanggi yang memiliki khasiat seperti hormon estrogen atau dikenal dengan istilah fitoestrogen. Isoflavon yang terkandung dalam daun *M. crenata* adalah ganistein dan daidzein. Isoflavon secara luas digunakan oleh manusia sebagai pengobatan pada wanita pascamenopause yang diketahui tidak memiliki efek samping. Isoflavon akan mengikat reseptor estrogen di dalam tubuh apabila dikonsumsi. Ikatan antara isoflavon dengan reseptor estrogen ini mampu mengurangi gejala klinis akibat osteoporosis serta mampu meningkatkan kualitas tulang sehingga osteoporosis dapat dihindarkan (Kumar, 2009 dalam Titisari *et al.*, 2016). Berikut struktur kimia yang dimiliki oleh isoflavon sehingga mampu mengikat reseptor estrogen.



Gambar 2.2 Struktur Kimia Senyawa Isoflavon yaitu Genistein dan Daidzein serta reseptor estrogen yaitu estradiol- 17 β (Helsinki, 2001).

Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* telah diuji melalui teknik *Radio Immunoassay* (RIA) dan menunjukkan konsentrasi *estrogen like substance* yang terdeteksi cukup tinggi. Hasil uji *in vivo* pada mencit jantan juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat menghambat terjadinya osteoporosis dengan mekanisme peningkatan *remodelling* tulang pada tahap pembentukan tulang (Laswati, 2011). Penelitian lain juga telah dilakukan secara *in silico* senyawa- senyawa pada daun *M. crenata* diketahui memiliki afinitas yang tinggi terhadap *estrogen receptor* β (ER- β), sedangkan pada pengujian *in vitro* terhadap sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana dan fraksi hasil pemisahan daun *M. crenata* dapat meningkatkan proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas MC3T3-E1 (Ma'arif, 2015).

Penelitian lain dengan analisis *Gas Chromatography- Mass Spectrometry* (GC-MS) menunjukkan daun *M. crenata* mengandung beberapa jenis senyawa yang dapat meningkatkan proses pembentukan tulang dengan mekanisme induksi

faktor transkripsi proses pembentukan tulang seperti *run-related transcription factor 2* (RUNX) dan osterix (OSX) pada sel osteoblas (Ma'arif *et al.*, 2016).

2.3 Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi suatu tanaman obat adalah pemisahan secara kimia atau fisika suatu bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan yaitu tanaman obat (Depkes RI, 2000). Ekstraksi adalah suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan. Adapun cairan penyari yang biasa digunakan antara lain air, etanol dan campuran air etanol (Depkes RI, 2000).

2.3.1 Metode Ekstraksi Menggunakan *Ultrasound Assited Extraction*

Ultrasound Assisted Extraction merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel pada sampel dapat meningkatkan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi (Mukhriani, 2014).

2.3.2 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah

ditetapkan (Depkes RI, 2000). Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan dengan cara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan utama obat sedikit mungkin terkena panas (Depkes RI, 2000).

2.4 Tinjauan tentang Tulang

Tulang merupakan salah satu jaringan terkeras di dalam tubuh manusia. Tulang juga merupakan bagian tubuh yang memiliki fungsi utama sebagai pembentuk rangka dan alat gerak tubuh, pelindung organ- organ internal, serta penyimpanan mineral (kalsium- fosfat). Proses pembentukan tulang disebut dengan osifikasi. Proses osifikasi terjadi pada masa perkembangan fetus (prenatal) dan setelah individu lahir (postnatal). Jaringan tulang bersifat dinamis karena secara konstan mengalami pembaharuan yang dikenal dengan proses remodeling tulang (Hill *and* Orth, 1998; Fernandez *et al.*,2006).

2.4.1 Remodelling Tulang

Remodeling tulang merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan penyerapan tulang yang diikuti dengan pembentukan tulang baru. Remodeling tulang ditujukan untuk pengaturan homeostatis kalsium, memperbaiki jaringan yang rusak akibat pergerakan fisik, kerusakan minor karena faktor stres dan pembentukan kerangka pada masa pertumbuhan (Hill *and* Orth, 1998; Fernandez *et al.*,2006).

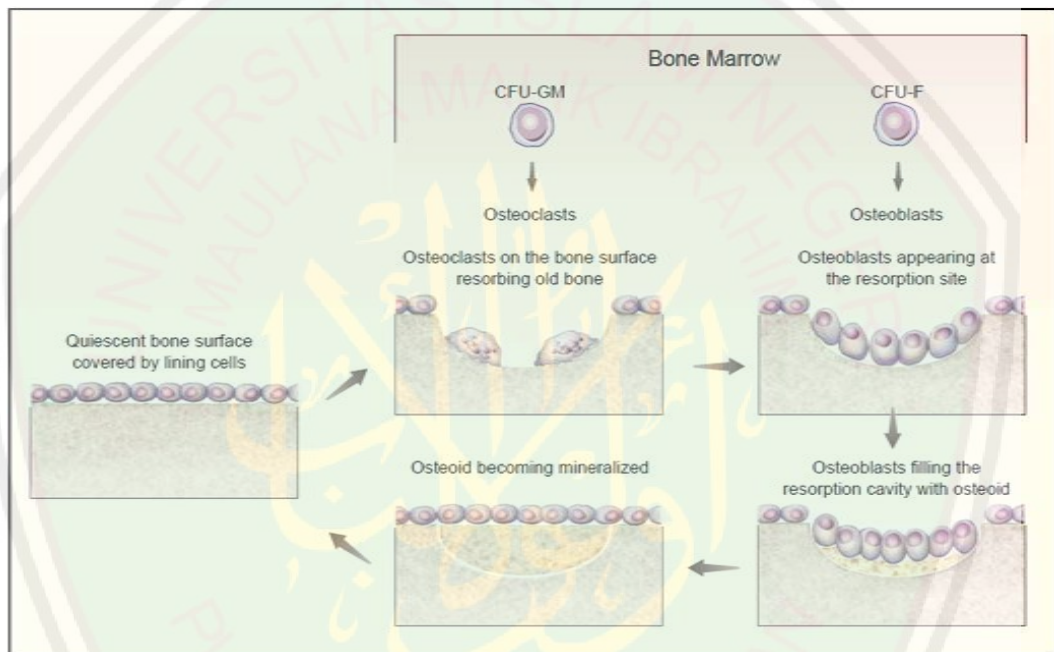
Remodeling adalah proses dimana terjadi turn-over dari tulang yang memungkinkan pemeliharaan bentuk, kualitas dan jumlah kerangka. Proses ini

ditandai oleh aktivasi yang terkoordinasi dari osteoklas dan osteoblas, yang terjadi dalam unit multiseluler tulang (bone multicellular units/BMUs) dimana terjadi peristiwa aktivasi proses resorpsi dan formasi yang berurutan dan terus menerus (Stevenson, 2007).

Pada proses pembentukan tulang, osteoblast mulai bekerja. Untuk diferensiasi dan maturasi osteoblas membutuhkan faktor pertumbuhan lokal, seperti *Fibroblast Grow Factor* (FGF), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) dan Wnt protein. Selain itu, juga dibutuhkan faktor transkripsi, yaitu core binding factor-1 atau *Runx2* atau *Osterix* (Osx). Prekursor osteoblas ini akan berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk preosteoblas dan kemudian akan menjadi osteoblas matur. Osteoblas selalu tampak melapisi matrik tulang (osteoid) yang diproduksinya sebelum dikalsifikasi, proses kalsifikasi ini membutuhkan waktu 10 hari (Roland, 2008).

Setelah pertumbuhan terhenti dan puncak massa tulang sudah tercapai, maka proses pembentukan tulang akan dilanjutkan pada permukaan endosteal. Tulang mengalami proses resorpsi dan formasi secara terus menerus yang disebut sebagai remodeling tulang. Proses remodeling tulang merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi tulang oleh osteoklas dan diikuti oleh formasi tulang oleh osteoblas. Proses remodeling diawali dengan pengaktifan osteoklas oleh sitokin tertentu. Osteoklas akan meninggalkan rongga yang disebut lakuna howship pada tulang trabekular atau rongga kerucut (cutting cone) pada tulang kortikal. Setelah resorpsi selesai, maka osteoblas akan melakukan formasi tulang pada rongga yang ditinggalkan

osteoklas dengan membentuk matriks tulang yang di sebut osteoid, yang dilanjutkan dengan mineralisasi primer dalam waktu singkat kemudian dilanjutkan dengan mineralisasi sekunder dalam waktu yang lebih lama dan proses yang lebih lambat sehingga tulang menjadi keras (Setiyohadi, 2006; Rosen, 2011; Roland, 2008; Setiyohadi, 2010).



Gambar 2.3 Skema proses remodeling tulang. Dalam siklus ini, aktivitas yang konstan dalam diferensiasi osteoblas dan osteoklas dari sel-sel progenitornya merupakan tahap esensial dalam menjaga keseimbangan antara resorpsi tulang lama dan formasi tulang baru. (Sumber: Epstein, 1995)

2.4.2 Komponen Penyusun Tulang

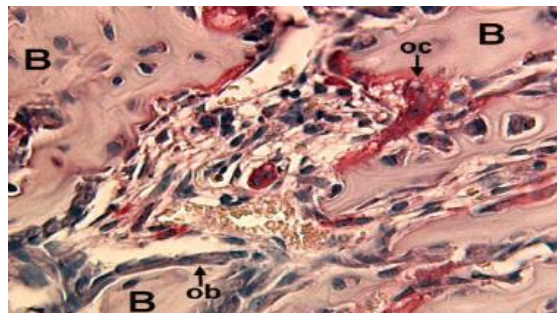
Terdapat dua tipe tulang dalam tubuh, yaitu *cortical* dan *trabecular*. Tulang korteks adalah tulang yang padat dan rapat yang merupakan bagian terluar dari tulang. Sedangkan tulang trabekular merupakan bagian dalam tulang yang berongga. Tulang manusia terdiri atas 80% tulang kortikular dan 20% tulang trabekular. Tulang kortikal dan tulang trabekular terbuat dari sel-sel yang sama dan elemen matriks yang sama, tetapi ada perbedaan struktural dan fungsional.

Perbedaan struktural utama secara kuantitatif adalah 80% sampai 90% dari volume tulang kortikal adalah kalsifikasi, sedangkan hanya 15% sampai 25% dari volume trabekular adalah kalsifikasi (sisanya adalah sumsum tulang, pembuluh darah, dan jaringan ikat). Fungsi utama tulang kortikal berfungsi sebagai mekanik (alat gerak) dan pelindung, sedangkan tulang trabekular sebagai fungsi metabolik dan juga berperan dalam proses biomekanik tulang, terutama tulang belakang (Setiyohadi, 2006) .

Tulang merupakan bagian dinamis yang selalu berubah dan mengalami pembaruan. Sel- sel utama yang berperan dalam tulang adalah (Fernandez *et al.*, 2006):

a. Sel Osteoklas

Sel osteoklas (sel pemecah tulang) adalah sel terpenting pada resorpsi tulang yang berasal dari sel induk sumsum tulang (penghasil makrofag-monosit). Osteoklas merusak matriks tulang, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks, menurunkan pH7 menjadi pH4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan merusak matriks sel sehingga protease keluar. Osteoklas memiliki reseptor yaitu *RANK-ligand* (RANK-L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis.



Gambar 2.4 Sel Tulang (ob : osteoblas; oc : osteoklas)

b. Sel Osteoblas

Sel osteoblas adalah sel pembentuk tulang. Osteoblas bekerja membentuk dan mensekresikan kolagen dan non kolagen organik (komponen matriks tulang) Osteoblas berasal dari jalur sel mesenkim stoma sumsum tulang. Osteoblas memproduksi osteoid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral, terpisah dari matriks yang telah mengalami mineralisasi. Osteoblas berfungsi mensintesis dan mensekresi matriks organik tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi. Osteoblas mengandung retikulum endoplasmik, membran golgi dan mitokondria. Osteoblas memiliki reseptor estrogen, sitokin, paratiroid hormon, *Insulin Growth Factor* (IGF), dan vitamin D3.

2.5 Tinjauan tentang Osteoporosis

2.5.1 Definisi

Osteoporosis adalah suatu kondisi berkurangnya massa tulang secara nyata yang berakibat pada rendahnya kepadatan (densitas) tulang. Orang-orang acap kali tidak tahu bahwa mereka menderita osteoporosis sampai ketika tulang mereka sedemikian lemah, regangan tubuh yang mendadak, persinggungan, ataupun jatuh menyebabkan patah tulang. Karena itu, tak berlebihan jika penyakit ini disebut silent disease (penyakit diam-diam) (Cosman, 2009).

Osteoporosis merupakan suatu kondisi dimana kepadatan tulang mulai berkurang (tulang keropos) atau skor $T < -2.5$ SD di bawah rata-rata DMT dewasa muda. Osteoporosis menyebabkan berkurangnya jumlah jaringan tulang

dan tidak normalnya struktur atau bentuk mikroskopis tulang. Kuantitas dan kualitas tulang tersebut lemah dan mudah patah, bahkan ketika mengalami trauma ringan. Osteoporosis disebut dengan *silent disease* atau penyakit yang tidak menimbulkan gejala-gejala, tetapi hanya akibat-akibat seperti patah tulang dan rasa sakit kronis yang menyertainya, kelainan bentuk dan kelumpuhan (Cosman, 2009).

2.5.2 Faktor Resiko Osteoporosis

Faktor lain yang ikut berperan terhadap kehilangan massa tulang pada orang tua adalah faktor genetik dan lingkungan (merokok, alkohol, obat-obatan, imobilisasi lama). Risiko fraktur yang juga harus diperhatikan adalah risiko terjatuh lebih tinggi pada orang tua lebih dibandingkan pada orang muda (Setiyohadi, 2006).

Penyebab spesifik osteoporosis tidak diketahui, tetapi terdapat faktor-faktor risiko utama yang mempengaruhi terjadinya osteoporosis. Genetik, nutrisi, pilihan gaya hidup, dan aktivitas fisik mempengaruhi puncak masa tulang (Orwoll, 2002; Guido, 2009; Szulc, 2011).

Adapun faktor risiko pada kasus osteoporosis adalah (Szulc, 2011) :

- a) Keturunan, ada orang yang secara keturunan memiliki tulang-tulang yang lebih rapuh dibanding orang lain. Faktor keturunan atau genetik berperan dalam penentuan masa tulang. Jika ada salah satu anggota keluarga menderita osteoporosis, kemungkinan keturunannya untuk menderita osteoporosis mencapai lebih dari 50 persen.

- b) Usia, secara progresif, tulang akan meningkat kepadatannya sampai maksimal sekitar usia 34 tahun. Setelah itu, kepadatan tulang akan berkurang secara perlahan. Karena itu, kepadatan tulang harus dijaga sejak masih muda agar pada saat tua tidak menderita osteoporosis.
- c) Jenis kelamin, wanita lebih rentan terkena osteoporosis daripada pria, karena pengaruh hormon estrogen yang menurun sejak usia 35 tahun. Selain itu pada usia sekitar 45 tahun, wanita juga mengalami menopause, dimana hormone estrogen makin banyak yang hilang. Padahal, hormon estrogen itulah yang membantu penyerapan nutrisi, termasuk kalsium, yang dibutuhkan tulang.
- d) Ras, wanita Asia lebih mudah terkena osteoporosis dibanding wanita Afrika. Itu disebabkan secara umum konsumsi kalsium wanita Asia sangat rendah, karena sekitar 90 persen mengalami intoleransi laktosa dan menghindari produk hewani. Perbedaan yang mudah dan paling tampak adalah wanita Asia yang berwajah dan berkulit oriental, itulah yang akan lebih mudah terkena osteoporosis. Sedang ras Negroid, mempunyai kepadatan tulang lebih tinggi dibanding ras lainnya sehingga ras Negroid berpeluang lebih kecil untuk menderita osteoporosis dibandingkan ras lainnya.

2.5.3 Klasifikasi

a. Osteoporosis Primer

Terjadi pada wanita pascamenopause dan pada wanita usia lanjut. Pada wanita biasanya disebabkan oleh pengaruh hormonal yang tidak seefektif biasanya. Hormon estrogen yang berfungsi melindungi tulang dalam tubuh malah

berkurang jumlahnya. Osteoporosis pada wanita biasanya disebut *osteoporosis postmenopausal*. Sementara itu, pada pria osteoporosis yang terjadi adalah *osteoporosis senilis*. Osteoporosis ini terjadi akibat berkurangnya kalsium akibat penuaan usia. *Osteoporosis senilis* juga bisa terjadi pada wanita. Jadi, wanita usia lanjut bisa terkena *osteoporosis senilis* maupun *postmenopausal*. Pada kenyataannya, jumlah penderita osteoporosis wanita lebih banyak daripada pria (Tjahjadi, 2002).

b. Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder biasanya disebabkan oleh penyakit tertentu, gangguan hormonal dan juga kesalahan pada gaya hidup seperti konsumsi alkohol secara berlebihan, kafein, rokok, dan kurangnya aktivitas fisik. Berbeda dengan osteoporosis primer yang terjadi karena faktor usia, osteoporosis sekunder bisa terjadi pada usia muda. Osteoporosis sekunder dapat diakibatkan oleh kelainan endokrin, efek samping obat-obatan, imobilisasi, kelainan gastrointestinal, penyakit ginjal dan proses keganasan seperti mieloma multipel dan akibat pemberian glukokortikoid jangka lama (Tjahjadi, 2002).

Osteoporosis dapat terjadi pada penggunaan glukokortikoid dalam jangka yang lama. Sekitar 30-50% pasien dengan terapi glukokortikoid yang berlebihan akan terjadi keropos tulang. Meskipun dosis harian glukokortikoid telah digunakan untuk menilai risiko kehilangan massa tulang, kumulatif dosis kumulatif (dalam gram/ tahun) lebih prediktif untuk tujuan ini. Pasien dengan dosis kumulatif tinggi (> 30 g prednison per tahun), memiliki insiden osteoporosis yang sangat tinggi (78%) dan patah tulang (53%) (Setiyohadi, 2006).

2.5.4 Diagnosis dan Patofisiologi

Penderita osteoporosis yang mengalami patah tulang, diagnosis ditegakkan pada gejala, pemeriksaan fisik, dan *rontgen* tulang. Pemeriksaan yang dapat dilakukan adalah pemeriksaan radiologi, radioisotop, *Magnetic Resonance Imaging* (MRI), serta pemeriksaan dengan densitometer (untuk mengetahui kepadatan tulang) (Junaidi, 2009).

Dalam proses pembentukan tulang, hal yang sangat penting adalah koordinasi yang baik antara osteoklas, osteoblas, dan sel-sel endotel. Selama sistem ini berada dalam keseimbangan, formasi dan resorpsi tulang akan selalu seimbang. Pada usia reproduksi, di mana fungsi ovarium masih baik, terdapat keseimbangan antara proses formasi tulang (osteoblas) dan laju proses resorpsi tulang (osteoklas) sehingga tidak timbul pengeroposan tulang. Osteoporosis terjadi akibat adanya gangguan keseimbangan antara proses resorpsi tulang dan formasi tulang, dimana secara seluler disebabkan oleh karena jumlah dan aktivitas sel osteoklas (sel resorpsi tulang) melebihi dari jumlah dan aktivitas sel osteoblas (sel formasi tulang). Keadaan ini mengakibatkan penurunan massa tulang (*National Osteoporosis Foundation*, 2010).

2.6 Tinjauan tentang Estrogen dan Defisiensi Estrogen

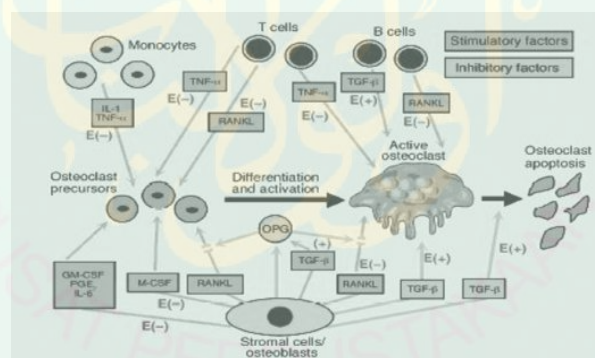
Estrogen merupakan hormon kelamin utama pada wanita. Hormon ini berperan dalam diferensiasi sel, jaringan reproduksi, perlindungan terhadap osteoporosis, dan sebagai hormon kardioprotektif yang beraksi dengan meningkatkan kadar HDL dan menurunkan LDL (Ikawati, 2008). Aksi biologis

hormon estrogen diperantarai oleh reseptor estrogen, yang termasuk dalam golongan reseptor inti (Bell, 2003).

Estrogen merupakan regulator pertumbuhan dan homeostasis tulang yang penting. Estrogen memegang peran yang sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas sel osteoblas maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut. Efek tak langsung estrogen terhadap tulang berhubungan dengan homeostasis kalsium yang meliputi absorpsi kalsium di usus, modulasi $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D, ekskresi kalsium di ginjal dan sekresi hormon paratiroid (Setiyohadi, 2006). Dalam keadaan normal estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti: *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang. Di lain pihak estrogen meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor b* (TGF- β), yang merupakan satu-satunya faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat lubang tulang yang telah diserap oleh sel osteoklas. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen, untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin seperti tersebut diatas, sekalipun secara tidak langsung maupun secara langsung juga berpengaruh pada sel osteoklas (Waters *et al.*, 1999).

Efek biologis dari estrogen diperantarai oleh reseptor yang dimiliki oleh sel osteoblasik diantaranya: *estrogen receptor-related receptor a* (ERRa), reseptor estrogen a, b (ERa, ERb). Sub tipe reseptor inilah yang melakukan pengaturan

homeostasis tulang dan berperan akan terjadinya osteoporosis. Dalam percobaan binatang, defisiensi estrogen akan menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis yang meningkat dan berlanjut dengan kehilangan tulang. Hal ini dapat dicegah dengan pemberian estrogen. Dengan defisiensi estrogen ini akan terjadi peningkatan produksi IL-1, IL-6, dan TNF- α yang selanjutnya akan diproduksi M-CSF dan RANK-L. Selanjutnya RANK-L menginduksi aktivitas JNK1 dan *osteoclastogenic activator protein-1*, faktor transkripsi c-Fos dan c-Jun. Estrogen juga merangsang ekspresi dari OPG dan TGF- β oleh sel osteoblas dan sel stroma, yang selanjutnya berfungsi menghambat penyerapan tulang dan mempercepat serta merangsang apoptosis sel osteoklas (Bell, 2003).



Gambar 2.5 Efek estrogen dan sitokin terhadap pengaturan pembentukan osteoklas, aktivitas, dan proses apoptosisnya. Efek estrogen sebagai stimulasi ditandai E(+), sedangkan efek inhibisi dengan tanda E(-) (Bell, 2003).

2.7 Tinjauan tentang Fitoestrogen

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

estrogen (Baziad, 2003). Selanjutnya menurut Jefferson *et al.*, 2002, fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat- obatan hormonal pengganti (Achdiat, 2003).

Beberapa kelompok fitoestrogen pada tumbuhan antara lain isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang bersifat estrogenik seperti flavon, *chalcones*, diterpenoid, triterpenoid, *coumarins* dan *acyclics* (Achdiat, 2003).

Khasiat estrogenik terjadi karena *phytoestrogens* juga memiliki 2 gugus – OH/Hidroksil yang berjarak 11,0-11,5 AO pada intinya, sama persis dengan inti estrogen sendiri. Para peneliti sepakat bahwa jarak 11 AO dan gugus –OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yakni memiliki afinitas untuk menduduki reseptor estrogen. Efek estrogenik akan muncul bila berikatan dengan reseptor estrogen tersebut. Namun ternyata afinitas fitoestrogen terhadap reseptor estrogen sangat rendah bila dibandingkan dengan estrogen dan diperlukan jumlah yang besar fitoestrogen untuk memperoleh efek yang memadai seperti estrogen. Fitoestrogen bersifat estrogenik terhadap metabolisme tulang, arteria koronaria, metabolisme lipoprotein, dan otak, tetapi bersifat antiestrogenik terhadap endometrium dan glandula mammae (Baziad, 2003; Cosman, 2009).

2.7.1 Mekanisme Kerja

Cara kerja fitoestrogen meniru (mimic) aktivitas hormon estrogen dalam tubuh. Estrogen adalah hormon yang berfungsi sebagai molekul sinyal. Prosesnya dimulai dari masuknya molekul estrogen melalui darah ke dalam sel dari bermacam-macam jaringan target estrogen. Di dalam sel, molekul estrogen mencari reseptor estrogen (RE) untuk berintegrasi. RE mengandung tempat spesifik (*specific site*) dimana hanya estrogen atau molekul lain yang berhubungan erat seperti fitoestrogen dapat mengikatnya. Sekali berada intraseluler, molekul estrogen mengikat reseptor protein dan membentuk suatu ikatan *ligand-hormone receptor complex* (ligand adalah molekul yang mengikat protein pada tempat spesifik). Peristiwa ini dimungkinkan karena molekul estrogen dan reseptornya mempunyai bentuk sama untuk berikatan ibarat kunci yang sesuai dengan lubangnya. Ikatan tersebut memicu proses seluler yang spesifik, “menghidupkan” gen spesifik. Gen ini akan memicu pembentukan protein untuk metabolisme sel. Salah satu responnya yaitu perkembangan uterus untuk persiapan terjadinya kehamilan atau pencegahan kehilangan massa tulang (Baziad, 2003; Cosman, 2009).

Sifat fitoestrogen adalah paradoxal, artinya mempunyai efek estrogenik dan antiestrogenik (antagonis dengan estrogen) yang tergantung lokasi dari RE. Misalnya pada kanker payudara fitoestrogen berperan antagonis sedangkan pada liver dan sistem kardiovaskuler bersifat estrogenik. Dalam keadaan dimana terdapat kadar estrogen tinggi, fitoestrogen walaupun daya ikatnya sangat lemah (1/500-1/1000) dibandingkan dengan estradiol, akan tetap mengikat RE dan

berupaya mengadakan blocking terhadap molekul estrogen yang lebih kuat. Contoh pada isoflavon dapat bersifat antiestrogenik (antagonis) sehingga dapat menghilangkan keluhan premenstruel syndrom pada wanita usia muda, dapat mengurangi pembesaran mioma uterus, mengurangi keluhan akibat endometriosis dan dapat digunakan untuk pengobatan hiperplasia endometrium (Baziad, 2003). Sebaliknya dalam keadaan defisiensi estrogen seperti yang terjadi pada menopause, fitoestrogen dominan dan mengikat RE yang kosong. Inilah yang disebut efek estrogenik. Diduga aktivitas fitoestrogen seperti ini merupakan efek protektif terhadap kanker yang berhubungan dengan hormon, penyakit kardiovaskuler dan bermanfaat untuk mengatasi keluhan menopause (Cosman, 2009).

2.8 Tinjauan tentang Histomorfometri Tulang pada Osteoporosis

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 (Chassiveux, 2000).

Kerapuhan tulang dapat merupakan hasil dari (Raisz, 2005):

- a. Kegagalan untuk menghasilkan massa kerangka yang optimal dan kekuatan selama pertumbuhan

- b. Resorpsi tulang yang berlebihan mengakibatkan penurunan massa tulang dan kerusakan mikroarsitektur tulang dan
- c. Respon formasi yang memadai untuk meningkatkan resorpsi selama remodeling tulang.

Untuk memahami bagaimana resorpsi tulang berlebihan yang mengakibatkan terjadinya kerapuhan tulang, maka perlu memahami proses remodeling tulang yang merupakan kegiatan utama dari sel tulang kerangka dewasa. Remodeling tulang dapat terjadi baik pada permukaan tulang trabekular yang tidak teratur maupun dalam tulang kortikal, proses dimulai dengan aktivasi prekursor hematopoietik menjadi osteoklas, yang biasanya membutuhkan interaksi dengan sel-sel dari osteoblastik. Karena penyerapan dan pembalikan fase remodeling tulang yang pendek dan waktu yang dibutuhkan untuk penggantian osteoblastik tulang panjang, setiap peningkatan dalam tingkat remodeling tulang akan berakibat pada hilangnya massa tulang. Resorpsi yang berlebihan juga dapat menyebabkan hilangnya struktur trabekular, sehingga tidak ada template untuk pembentukan tulang (Raisz, 2005).

2.9 Tinjauan tentang Osteoporosis pada Mencit (*Mus musculus*)

Secara mikroskopik pada hewan muda penderita osteoporosis berat, pada zona hipertropik dibagian fisis menjadi lebih sempit, bahkan tidak terlihat, pertumbuhan tulang kemudian terhenti dan bagian fisis ditempati oleh lempeng tulang. Jumlah dan ukuran trabekula menurun, sehingga tulang di bagian tersebut mudah mengalami fraktur. Keberadaan osteoblas dan osteoklas yang aktivitasnya

abnormal sangat tergantung pada penyebab osteoporosis. Penyerapan intrakorteks pada tulang panjang oleh osteoklas terjadi disepanjang saluran vaskuler sejajar dengan aksis memanjang tulang. Penyerapan tulang di bagian intrakorteks mempunyai risiko besar karena dengan hilangnya korteks tulang maka mempengaruhi kepadatan tulang menjadi lebih buruk dibanding dengan kehilangan tulang trabekula dalam jumlah yang sama (Anderson, 1996).

2.10 Tinjauan tentang ANOVA

ANOVA adalah suatu metode untuk menguji hipotesis kesamaan rata-rata dari tiga atau lebih populasi. ANOVA adalah suatu metode yang cukup komprehensif untuk mendeteksi perbedaan kelompok pada variabel terikat tunggal (Field, 2009). ANOVA digunakan untuk mengidentifikasi perbedaan yang berarti antara kelompok perlakuan pada penelitian eksperimental dengan satu variabel terikat dan satu atau lebih variabel bebas. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut (Dahlan, 2014):

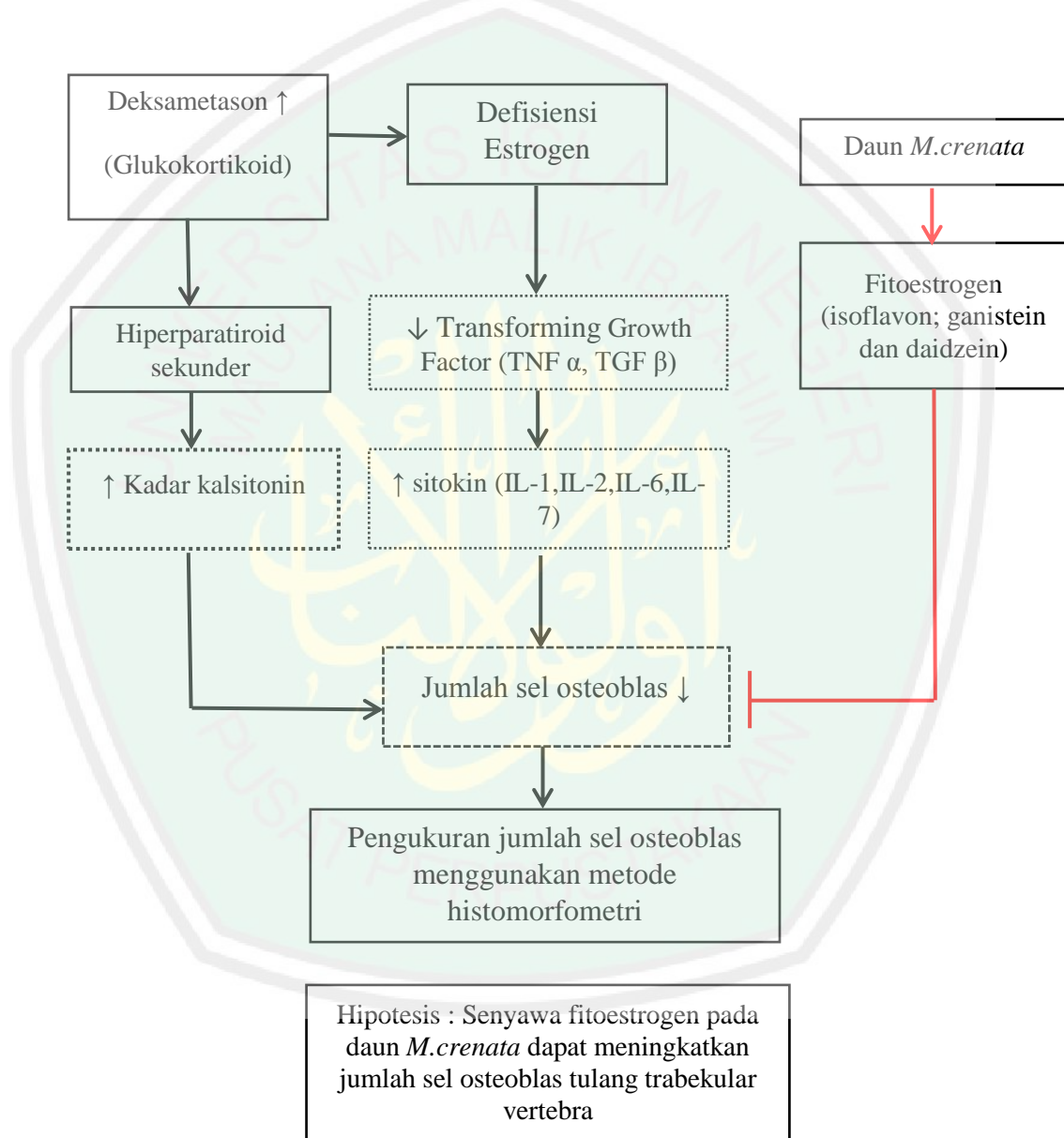
1. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi suatu data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, digunakan mean dan standar deviasi 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 50 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 dengan 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 LSD (*Least Significance Different*).
4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Namun bila *P value* $>0,05$ berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan kata lain hipotesis tersebut ditolak.

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka konseptual

Keterangan :

- : Alur Memicu
- : Parameter yang diuji
- : Alur Menghambat
- : Parameter yang tidak di uji

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan penelitian yang lebih spesifik yakni mengenai peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang vertebra trabekular oleh ekstrak etanol 96 % daun *M. crenata* Presl. pada mencit jantan yang diinduksi deksametason. Deksametason merupakan obat golongan glukokortikoid. Sedangkan penggunaan glukokortikoid dalam dosis tinggi dan jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis osteoblas yang kemudian menjadi penyebab osteoporosis sekunder melalui jalur hiperparatiroid sekunder. Mekanisme *bone loss* pada pengobatan glukokortikoid jangka lama terjadi akibat penurunan formasi tulang dan meningkatnya resorpsi tulang. Sehingga pemberian deksametason jangka lama dianggap efektif dalam menginduksi terjadinya osteoporosis pada mencit jantan. Penelitian ini dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 % dengan ultrasonifikasi. Ekstrak yang didapat kemudian diujikan secara *in vivo* pada mencit diinduksi deksametason untuk diamati aktivitas fitoestrogen terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas pada mencit tersebut. Pengukuran jumlah sel osteoblas dilakukan dengan menggunakan metode histomorfometri. Histomorfometri tulang merupakan alat yang dalam kemampuannya dipergunakan untuk menilai kualitas tulang dan untuk mengevaluasi efek pengobatan terhadap mineralisasi tulang dan mikroarsitektur tulang (Chavassieux, 2000).

3.3 Hipotesis

Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit diinduksi deksametason.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *true experiment post-test only control group design*. Sampel hewan coba mencit diinduksi deksametason sehingga mengalami osteoporosis yang ditandai dengan membungkuknya tulang vertebra mencit. Diberi berbagai perlakuan pada masing- masing kelompok. Terdapat enam kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol positif dengan pemberian suspensi alendronat (K +), kontrol negatif (K -) hanya induksi deksametason dan pemberian suspensi CMC-Na kemudian kelompok perlakuan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan variasi dosis 1,2 mg/20 g BB mencit (PI), 2,4 mg/20 g BB mencit (PII), 4,8 mg/20 g BB mencit (PIII) dan 9,6 mg/20 g BB mencit (PIV). Analisis data dengan menggunakan ANOVA untuk mengetahui dosis efektif ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas pada trabekular vertebra mencit.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari 2018 hingga bulan April 2018. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Departemen Biologi Farmasi Jurusan Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Biomed Jurusan Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim dan pembuatan serta

pembacaan preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Sampel

4.3.1 Sampel Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *M. crenata* yang ditanam di daerah Kecamatan Benowo, Surabaya, Jawa Timur.

4.3.2 Sampel Hewan Coba

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan. Jenis mencit yang digunakan ialah mencit (*Mus musculus*). Beberapa kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ialah berjenis kelamin jantan, dengan usia sekitar 5- 6 bulan, dalam keadaan sehat yang ditandai dengan bergerak aktif, dengan berat badan rata- rata 20- 35 gram dan tidak memiliki kelainan anatomi. Sedangkan kriteria eksklusi penelitian ini, antara lain mencit yang mati pada saat masa pemberian perlakuan dan atau mencit yang sakit. Adapun jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus replikasi dari Steel dan Torrie (Hanafiah, 2004).

$$(tr - 1) (r - 1) \geq 15 \quad tr = treatment$$

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15 \dots\dots\dots r \geq 4 \quad r = replication$$

Berdasarkan rumus diatas maka ditentukan $tr = 6$ dan diperoleh replikasi sebanyak ≥ 4 ekor. Namun, untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian mencit maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 6, sehingga jumlah seluruh sampel penelitian menjadi 36 mencit. Menurut Lameshow *et al.* (1990), untuk

menghindari kemungkinan hewan coba mati, dengan $(f) = 10\%$ maka jumlah replikasi dikalikan $1/(1-f)$ sehingga $1/(1-0,1) \times 4 = 4,44 \approx 5$, dengan pertimbangan bahwa distribusi normal minimal tercapai pada sampel dengan jumlah 30, maka pada penelitian ini masing- masing kelompok diberi tambahan masing- masing 2 ekor pada setiap kelompok. Hewan uji mencit ini diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Populasi yang digunakan berjumlah 36 ekor mencit dengan 6 perlakuan masing- masing kelompok sebagai berikut :

1. (K -) : Kontrol negatif (induksi deksametason + suspensi CMC-Na)
2. (K +) : Kontrol positif (induksi deksametason + suspensi Na alendronat)
3. (PI) : Kelompok perlakuan I (induksi deksametason + ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 1,2 mg/20 gram berat badan mencit/ hari)
4. (PII) : Kelompok perlakuan II (induksi deksametason + ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 2,4 mg/20 g berat badan mencit/ hari)
5. (PIII) : Kelompok perlakuan III (induksi *dexamtehasone* + ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 4,8 mg/20 g berat badan mencit/ hari dengan penambahan latihan fisik)
6. (PIV) : Kelompok perlakuan IV (induksi *dexamtehasone* + ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 9,6 mg/20 g berat badan mencit/ hari).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang diberikan dengan 4 variasi dosis yang telah ditentukan yakni 1,2 mg/20 g mencit/ hari, 2,4 mg/20 g mencit/ hari, 4,8 mg/20 g mencit/ hari, 9,6 mg/20 g mencit/ hari.

4.4.2 Variabel Terikat

Adapun variabel terikat pada penelitian ini ialah jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit jantan diinduksi deksametason.

4.4.3 Variabel Kontrol

Jenis mencit (*Mus musculus*), jenis kelamin mencit (jantan), umur mencit 5- 6 bulan, berat badan rata-rata 20-35 gram, jenis makanan dan minuman, kesehatan mencit, perawatan mencit dan sanitasi kandang, temperatur dan kelembaban kandang, waktu pemberian makan dan minum.

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* : Ekstrak daun *M. crenata* yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE).
2. Variasi dosis yang diberikan yaitu 1,2 mg/20 g mencit per hari, 2,4 mg/20 g mencit per hari dan 4,8 mg/20 g mencit per hari dan 9,6 mg/20 g mencit per hari secara oral dengan menggunakan sonde.

3. Kontrol negatif : kelompok kontrol mencit yang tidak diberikan perlakuan sampel (ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*).
4. Kontrol positif : kelompok kontrol mencit yang diberikan suspensi alendronat.
5. Tulang trabekular vertebra yang diambil pada bagian thorax ruas ke 10-12, bagian yang diamati yaitu daerah trabekular pada bagian tulang vertebra.
6. Peningkatan jumlah sel osteoblas diukur menggunakan metode histomorfometri. Tulang trabekular vertebra diambil dan dilakukan pengecatan menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE) hingga kemudian pembacaan preparat tulang. Pembacaan hasil dilakukan dengan histopatologis menggunakan bantuan mikroskop yang telah terkalibrasi dengan perbesaran 1000x.
7. Sel osteoblas yang diamati berbentuk kuboid atau pipih dengan inti di tengah berwarna merah atau ungu. Ukuran sel lebih kecil dari sel osteoklas.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini ialah plat KLT, silika gel F₂₅₄, alat ekstraksi dengan merk *SONICA*, *rotary evaporator*, peralatan gelas (labu ukur, *beaker glass*, pipet, gelas ukur, erlenmeyer, spatula, batang pengaduk, cawan, corong gelas), sendok tanduk, aluminium foil, kertas saring, timbangan

analitik, mikroskop Olympus, komputer, software *opti lab*, sonde, timbangan analitik.

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan- bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun *M. crenata*, etanol 96%, aquades, deksametason, alendronat, CMC Na 0,5%, asam asetat, kloroform, asam klorida, asam formiat 10%, *paraffin*, gliserin, formalin 10%, harris hematoksilin, cat pembanding eosin, xylol, ammonia air, asam nitrat.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penyiapan Bahan Tanaman

1. Daun semanggi dikumpulkan dan disortasi kering.
2. Dicuci bersih dengan air mengalir.
3. Diangin- anginkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung pada pukul 07.00 sampai dengan pukul 10.00 wib.
4. Setelah dikeringkan, kemudian digiling
5. Diperoleh serbuk simplisia kering daun *M. crenata*.
6. Disimpan di tempat terlindung dari cahaya dan tertutup rapat untuk mencegah terjadinya kerusakan pada serbuk dan penurunan mutu.

4.7.2 Ekstraksi Daun *M.crenata* dengan Ultrasonik

1. Ditimbang simplisia daun *M. crenata* sebanyak 30 g.
2. Ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml.
3. Dilakukan pengadukan hingga terlihat homogen dengan pelarut.

4. Dilakukan ekstraksi dengan ultrasonik selama 2 menit dengan replikasi sebanyak 3 kali.
5. Disaring dengan menggunakan kertas saring *whattman*.
6. Filtrat dikumpulkan di sebuah wadah erlenmeyer khusus dan diberi label.
7. Diuapkan pelarut etanol nya menggunakan *rotary evaporator* dengan temperatur 50° C dengan kecepatan 70rpm.
8. Ekstrak kental hasil penguapan dengan *rotary evaporator* dimasukkan ke dalam oven dengan pengaturan suhu 55° C hingga kering.
9. Ekstrak kering disimpan di wadah kedap udara agar terhindar dari kontaminasi yang dapat merusak mutu ekstrak.

4.7.3 Uji Aktivitas Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra

a. Prosedur Pembuatan Larutan Uji

1. Pembuatan Suspensi Deksametason sebagai Penginduksi Osteoporosis

Perhitungan dosis :

Dosis deksametason untuk manusia (70 kg) = 1,125 mg/ hari (Laswati, 2015)

Dosis deksametason untuk mencit (20 g)

= 1,125 mg x 0,0026 (faktor konversi manusia-mencit)

= 0,0029 mg/20 g mencit/ hari

Dosis dan cara pemakaian :

Suspensi deksametason diberikan dengan volume 0,3 ml/20 g BB mencit/ hari per oral selama 28 hari (setiap 0,12 ml suspensi mengandung 0,0029 mg deksametason).

Cara pembuatan suspensi deksametason :

- a. CMC-Na 0,5% ditimbang sebanyak 2,5 g
- b. (a) didispersikan merata dalam air panas sebanyak 50 ml. Dibiarkan hingga mengembang kurang lebih selama 15 menit, kemudian digerus hingga terbentuk mucilago.
- c. Tablet deksametason dengan kekuatan 0,5 mg digerus sebanyak 5 Tablet, ditimbang sesuai dengan dosis yang diperlukan.
- d. (b) + (c) diaduk hingga homogen
- e. Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas, kocok sampai menjadi suspensi yang homogen.

2. Suspensi alendronat

Perhitungan dosis:

Dosis alendronat untuk manusia (70 kg) = 10 mg/ hari (Laswati dkk, 2015)

Dosis alendronat untuk mencit (20 g)

$$= 10 \times 0,0026 \text{ (faktor konversi manusia- mencit)}$$

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

Dosis dan cara pemakaian:

Suspensi alendronat diberikan dengan volume 0,38 ml/20 g BB mencit per hari per oral selama 28 hari (setiap 0,38 ml suspensi mengandung 0,026 mg alendronat)

Cara pembuatan :

- a. CMC-Na 0,5% ditimbang sebanyak 2,5 g
- b. (a) didispersikan merata dalam air panas sebanyak 50 ml. Dibiarkan hingga mengembang kurang lebih selama 15 menit, kemudian digerus hingga terbentuk mucilago.
- c. Tablet alendronat dengan kekuatan 0,5 mg digerus sebanyak 1 Tablet, ditimbang sesuai dengan dosis yang diperlukan.
- d. (b) + (c) diaduk hingga homogen
- e. Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas, kocok sampai menjadi suspensi yang homogen.

3. **Suspensi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata***

Perhitungan dosis mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Laswati (2007), yaitu dosis ekstrak etanol daun semanggi pada manusia 50 kg = 0,66 gram, sehingga :

Dosis untuk manusia 70 kg = $70/50 \times 0,66 \text{ gram} = 930 \text{ mg}$

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

Pada penelitian ini diberi perlakuan ekstrak dengan empat variasi dosis yang berbeda yaitu 1,2 mg/20 BB mencit/ hari, 2,4 mg/20 BB mencit/ hari, 4,8

mg/20 BB mencit/ hari dan 9,6/20 BB mencit/ hari untuk dapat mengetahui dosis efektif (ED_{50}) dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*.

Cara pembuatan :

- a. CMC-Na 0,5% ditimbang sebanyak 2,5 g
- b. (a) didispersikan merata dalam air panas sebanyak 50 ml. Dibiarkan hingga mengembang kurang lebih selama 15 menit, kemudian digerus hingga terbentuk mucilago.
- c. Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* ditimbang sesuai dengan empat dosis yang diperlukan (1,2 mg, 2,4 mg, 4,8 mg, 9,6 mg).
- d. (b) + (c) diaduk hingga homogen
- e. Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas, kocok sampai menjadi suspensi yang homogen.

b. Prosedur Penyiapan Hewan Coba

Mencit jantan yang akan digunakan, dilakukan adaptasi lingkungan selama satu minggu dalam kandang kawat berukuran 29 (p) x 11 (l) x 12 (t) cm, dengan penutup dan diberi alas serbuk gergaji, suhu dan kelembaban lingkungan dikontrol sehingga membiasakan mencit hidup dalam lingkungan dan perlakuan baru serta membatasi pengaruh lingkungan. Setiap hari mencit diberi makan dan minum secukupnya dengan pengamatan umum yaitu mencit yang tampak sakit tidak disertakan dalam penelitian. Tanda-tanda mencit sakit adalah aktivitas berkurang, banyak diam, serta bulu kusam (Hubrecht and Kirkwood, 2010).

c. Prosedur Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat vertebra dilakukan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Tahapan pembuatan preparat histopatologis adalah fiksasi dan pencucian, dekalsifikasi, dehidrasi dan *clearing*, infiltrasi, pembuatan blok parafin (*embedding*), pengirisan tipis, pewarnaan dan penutupan sediaan.

d. Pengamatan Histopatologi Tulang Trabekular Vertebra Mencit Jantan Diinduksi Deksametason

Pengamatan dilakukan dengan mikroskop *Olympus* dengan perbesaran 1000 kali. Mikroskop dihubungkan dengan komputer yang dapat diamati menggunakan *software opti lab* agar nampak jelas gambar yang diamati oleh mikroskop.

e. Pemeriksaan Histomorfometri Tulang

Hasil uji aktivitas dilakukan dengan cara pemeriksaan histomorfometri tulang. Pemeriksaan histomorfometri tulang yang dilakukan pada penelitian ini adalah peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diukur secara mikroskopi setelah pemberian kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan dengan berbagai ekstrak daun *M. crenata*.

4.8 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit jantan dilakukan analisis secara statistik menggunakan SPSS dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-

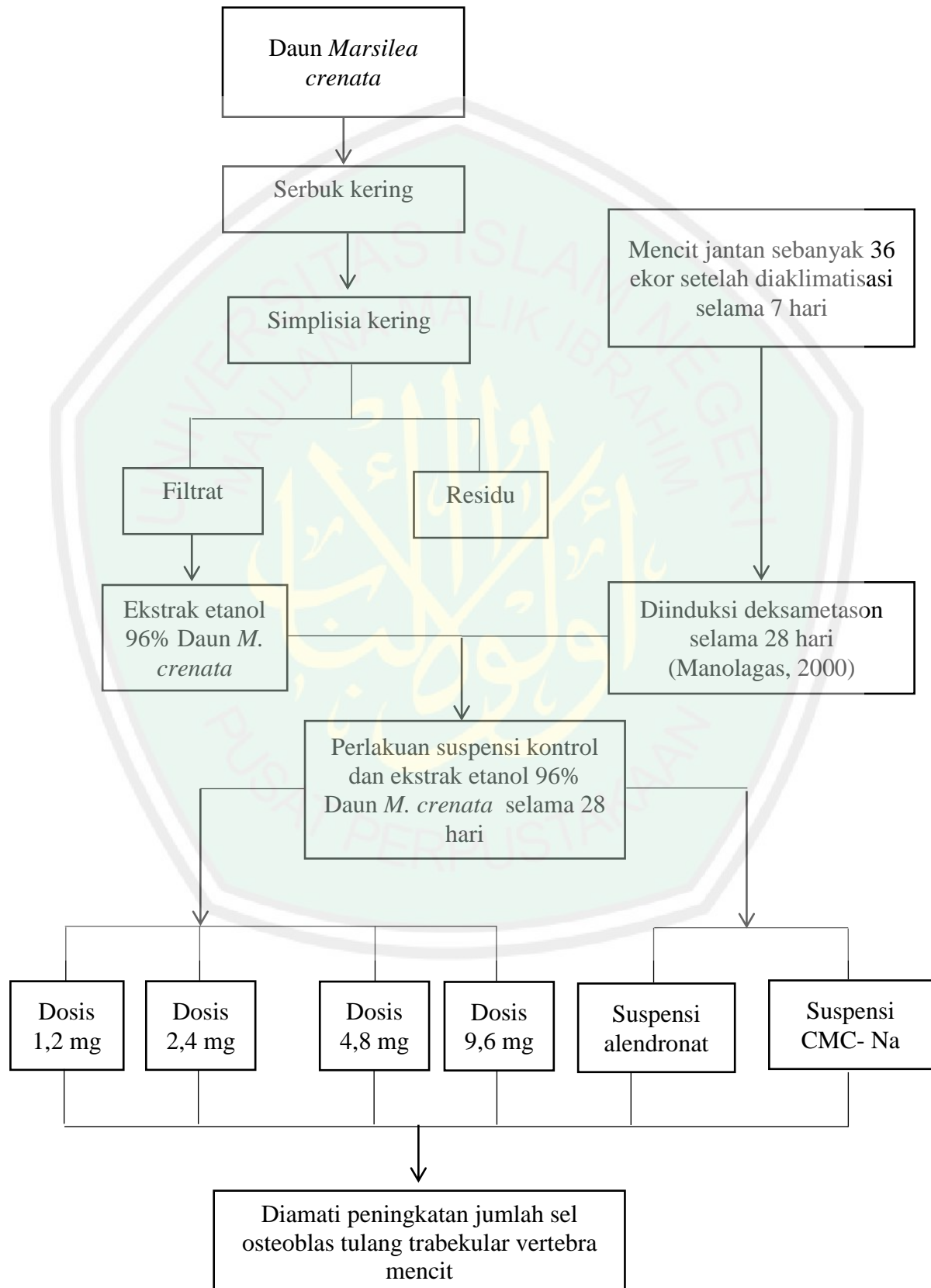
langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut (Dahlan, 2014):

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 suatu data. Untuk penyajian datayang terdistribusi normal, 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 50 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 dengan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbedasignifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikasi, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau lebih dikenal dengan uji LSD (*Least Significance Different*).
4. Uji LSD dilakukan utuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Namun bila P

value >0,05 berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan kata lain hipotesis tersebut ditolak.



4.9 Skema Prosedur Kerja



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi merupakan pengklasifikasian makhluk hidup berdasarkan ciri-ciri baik morfologi maupun anatominya (Steenis, 2008). Determinasi dari suatu tanaman bertujuan untuk mengetahui keaslian identitas dari tanaman, apakah tanaman tersebut benar-benar tanaman yang diinginkan. Determinasi tanaman penting dilakukan karena dengan diketahuinya keaslian identitas dari suatu tanaman maka dapat dijadikan acuan untuk kebenaran pada suatu sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian dan untuk meminimalisir kesalahan dalam penelitian. Apabila terjadi kesalahan tumbuhan yang digunakan, maka perbedaan kandungan juga tidak dapat dihindari sehingga kemungkinan efek terapeutik yang diharapkan tidak sesuai.

Semanggi (*Marsilea crenata* Presl) adalah tanaman yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini berasal dari daerah Benowo kota Surabaya Jawa Timur. Determinasi tanaman *M.crenata* dilakukan di UPT Matera Medika Batu Malang untuk memastikan kebenaran dari sampel tanaman yang digunakan. Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di UPT Matera Medika Batu Malang menunjukkan bahwa sampel tanaman semanggi (*Marsilea crenata* Presl) yang digunakan adalah benar sehingga sampel dapat digunakan dalam penelitian. Adapun angka determinasi dari tanaman semanggi ini adalah 1a- 17b- 18a- 1 sehingga diperoleh spesies *Marsilea crenata* Presl.

5.2 Preparasi Sampel Daun *Marsilea crenata* Presl.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Marsilea crenata* atau yang dikenal dengan nama lokal daun semanggi. Sampel daun semanggi ini diperoleh dari Kecamatan Benowo Surabaya. Daun semanggi merupakan jenis daun majemuk dimana dalam satu tangkai terdapat tiga kelopak daun. Daunnya berwarna hijau, namun bagian atas daun berwarna lebih tua dibandingkan dengan warna daun pada bagian bawah.

Daun diperoleh dalam keadaan segar, lalu dilakukan sortasi. Sortasi merupakan kegiatan memisahkan produk yang sudah bersih menjadi beberapa fraksi mutu dapat berdasarkan warna, bentuk, berat jenis, dan tekstur. Setelah dilakukan sortasi, kemudian dicuci bersih dengan air mengalir supaya kotoran-kotoran tanah yang masih menempel pada daun dan tangkai dapat hilang. Kemudian daun yang telah dicuci dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung di pagi hari mulai pukul 07.00 hingga pukul 10.00 WIB. Hal ini dilakukan agar daun yang sudah bersih dapat kering secara sempurna serta kadar air yang terkandung di dalam daun dapat menurun sehingga pertumbuhan kapang serta kerusakan pada simplisia dapat dicegah. Namun begitu, meskipun daun sudah kering, warna daun tetap diamati agar tidak berubah menjadi kuning sehingga dikhawatirkan kandungan yang terdapat di dalamnya berkurang atau bahkan hilang.



Gambar 5.1 Daun Semanggi yang sudah dikeringkan

Langkah selanjutnya ialah penggilingan daun yang sudah kering menjadi serbuk simplisia. Penggilingan dilakukan untuk memudahkan dalam proses ekstraksi. Hal ini disebabkan karena semakin kecil ukuran serbuk, maka semakin luas pula permukaan serbuk sehingga memudahkan kontak antara pelarut dengan bahan. Selanjutnya serbuk simplisia disimpan di dalam wadah khusus yang kering dan tidak lembab untuk menghindari tumbuhnya kapang yang dapat menyebabkan rusaknya simplisia. Selain itu, serbuk simplisia juga disimpan di tempat yang terhindar dari sinar matahari langsung agar tidak terkena radiasi sinar UV dan menyebabkan rusaknya simplisia.



Gambar 5.2 Daun Semanggi yang sudah digiling

5.3 Uji Kadar Air

Serbuk simplisia yang sudah halus, diuji kadar airnya untuk mempermudah proses ekstraksi karena kandungan air yang sudah berkurang dapat memudahkan dalam penarikan senyawa aktif oleh pelarut. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan instrumen *Moisture Content Analyzer* (Mettler Toledo HC 103). Dibandingkan dengan oven, instrumen ini mampu memberikan hasil yang presisi. Instrumen *Moisture Analyzer* ini memanfaatkan sinar infra merah atau halogen untuk memberikan sumber panas sehingga sampel dapat menguapkan air yang dikandungnya dan menjadi kering. Kadar air total bahan dapat ditentukan dengan adanya pemanasan intensif dengan menggunakan metode pengeringan adsorpsi (Kenkel, 2003).

Pengukuran kadar air dengan menggunakan *Moisture Analyzer* membutuhkan waktu yang sangat cepat, yaitu hanya sekitar 3-15 menit/ sampel. Pengukuran akan segera berhenti setelah sampel mengalami penurunan berat lebih rendah dari 1 mg per 90s. Dengan waktu yang singkat, tentunya hal ini membantu untuk mempersingkat waktu pengujian. (Kumalasari, 2012).

Mula- mula serbuk ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam wadah sampel. Kemudian, ditutup dan ditunggu hingga kurang lebih 5 menit. Prinsip kerja dari *Moisture content Analyzer* tersebut ialah sampel dipanaskan pada suhu tertentu sehingga kandungan lembab yang dimiliki dapat menguap. Penguapan tersebut akan menyebabkan massa sampel berkurang sampai proses penguapan selesai dengan ditandai tidak adanya perubahan terdapat penimbangan massa simplisia atau serbuk sampel yang ditimbang.

Pengujian kadar air serbuk simplisia daun *M. crenata* diperoleh data sebagai berikut :

Tabel 5.1 Hasil Uji Kadar air serbuk simplisia daun *M. crenata*

| No. | Sampel | Berat Awal | Berat Akhir | % MC |
|------------|------------|------------|-------------|-------|
| 1. | Sampel I | 0,509 g | 0,466 g | 8,45% |
| 2. | Sampel II | 0,506 g | 0,464 g | 8,30% |
| 3. | Sampel III | 0,507 g | 0,461 g | 9,07% |
| Rata- rata | | 0,507 g | 0,464 g | 8,60% |

Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh nilai rerata sebesar 8,60 %. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air yang terdapat pada serbuk simplisia daun *M. crenata* memenuhi standar karena kandungan kadar airnya kurang dari 10 %. Sedangkan menurut literatur peraturan kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor 12 tahun 2014 tentang persyaratan mutu obat tradisional yang menyatakan bahwa kadar air yang diperbolehkan pada suatu simplisia yaitu = 10% (BPOM, 2014). Pengukuran kadar air yang kurang dari 10% pada simplisia dapat meminimalisir tumbuhnya jamur dan kapang serta dapat menghasilkan daya tahan penyimpanan dan mutu tetap baik. Selain itu, apabila kadar air yang terkandung dalam suatu serbuk simplisia lebih dari 10%.

5.4 Ekstraksi Serbuk Simplisia *M. crenata* dengan Pelarut Etanol 96%

Proses ekstraksi dilakukan setelah serbuk simplisia diuji nilai kadar airnya. Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi dengan menggunakan

bantuan instrumen *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dimana metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel pada sampel dapat meningkatkan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi (Mukhriani, 2014).

Serbuk simplisia daun *M. crenata* diletakkan di dalam *beaker glass* sebanyak 30 gram dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 500 ml. Namun dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dengan tujuan agar zat-zat atau senyawa-senyawa yang terdapat di dalam serbuk simplisia dapat ditarik seluruhnya. Pengulangan sebanyak tiga kali ini dibagi menjadi 200 ml pelarut etanol 96 %, 150 ml pelarut etanol 96 % dan 150 ml pelarut etanol 96 %. Pemilihan pelarut etanol 96 % didasarkan pada sifatnya yang dapat menarik beberapa senyawa semi polar dengan baik. Pemilihan konsentrasi sebesar 96 % dikarenakan sifat kepolarannya yang lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi lainnya, selain itu pelarut etanol memiliki kemampuan menyari dengan polaritas yang lebar mulai dari senyawa non polar sampai senyawa polar.

Berdasarkan proses ekstraksi yang telah dilakukan, diperoleh filtrat yang diduga mengandung senyawa-senyawa aktif. Filtrat yang diperoleh disimpan di wadah yang telah bersih. Selanjutnya, filtrat yang telah disimpan, diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator*. Hal ini dilakukan untuk memperoleh ekstrak kental yang bebas dari pelarut. Setelah diuapkan, ekstrak dipindah ke

wadah lain untuk kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50° C agar ekstrak menjadi kering dan benar- benar terbebas dari pelarut. Adapun rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi ini dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Perhitungan rendemen ekstrak kental etanol 96% daun M. crenata

| Berat Serbuk (gram) | Berat Ekstrak (gram) | % Rendemen |
|---------------------|----------------------|------------|
| 30,0069 | 3,3445 | 11,1458 |

Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, 2013).



Gambar 5.3 Ekstrak kental etanol 96% daun M.crenata

5.5 *Thin Layer Chromatography Visualizer*

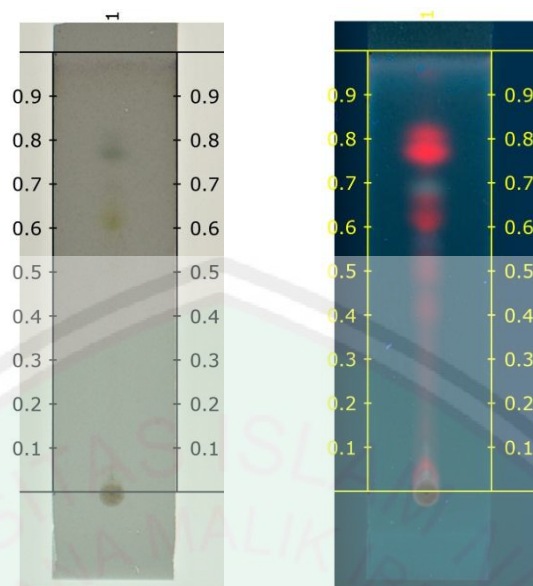
Kandungan fitoestrogen yang terdapat dalam senyawa flavonoid daun *M. crenata* dapat diidentifikasi menggunakan *Thin Layer Chromatography* atau dikenal dengan istilah TLC. Uji TLC ini memiliki prinsip memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Adapun fase diam yang digunakan adalah plat HPTLC dan menggunakan fase gerak campuran n-heksana dan etil asetat. Sebelum dilakukan uji menggunakan

HPTLC, dilakukan optimasi pelarut agar dapat memperoleh hasil yang optimal menggunakan plat silika gel F254.

Mula- mula, 10 mg ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang sudah kering diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 10 ml. Kemudian setelah larut, ditotolkan pada dua plat TLC dan masing- masing plat dimasukkan ke dalam dua chamber yang telah berisi pelarut n- heksana dan etil asetat yang telah dijenuhkan terlebih dahulu sebelumnya dengan perbandingan pelarut n- heksana : etil asetat (7:3) dan pada chamber kedua (6:4). Selanjutnya, ditunggu sampai pelarut naik hingga tanda batas pada plat. Setelah selesai, diangin- anginkan terlebih dahulu supaya noda tampak lebih jelas ketika diamati dengan visualizer. Sebelum dilakukan pengamatan dengan menggunakan visualizer, terlebih dahulu diamati dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm yang mana akan memudahkan noda tampak lebih jelas. Berdasarkan hasil yang muncul, diketahui bahwa plat yang dieluasi dengan menggunakan pelarut n- heksana : etil asetat (7:3) memberikan hasil yang lebih optimal ditandai dengan spot noda tampak lebih jelas dibandingkan plat yang dieluasi dengan pelarut n- heksana : etil asetat (6:4).

Selanjutnya dilakukan uji TLC visualizer pada plat HPTLC. Mula- mula ekstrak kering etanol 96% daun *M. crenata* ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan menggunakan pelarut yang sesuai yaitu etanol 96%. Setelah larut, ditotolkan sebanyak 2 µl pada plat HPTLC. Kemudian plat HPTLC yang telah ditotolkan ekstrak dimasukkan ke dalam chamber yang telah berisi fase gerak n- heksana : etil asetat dengan perbandingan (7:3) yang sudah dijenuhkan terlebih

dahulu sebelumnya. Sehingga akan terjadi proses adsorpsi antara fase gerak dengan fase diam dan akan naik ke atas hingga mencapai tanda batas. Setelah mencapai tanda batas, plat HPTLC dikeluarkan dari chamber untuk kemudian diamati spot- spot yang muncul dengan menggunakan bantuan instrumen visualizer dan selanjutnya diderivatisasi. Adapun tujuan dilakukannya derivatisasi agar noda atau spot yang terbentuk dapat tampak lebih jelas. Derivatisasi dilakukan dengan menyemprotkan cairan H_2SO_4 dengan konsentrasi 10% (*anisaldehyde*), ammonia dan pewarna dragendroff. Penggunaan *anisaldehyde* ini ditujukan sebagai penampak noda dari senyawa golongan terpenoid, sedangkan ammonia sebagai penampak noda senyawa golongan flavonoid dan dragendroff untuk senyawa golongan alkaloid. Penyemprotan dilakukan di dalam lemari asam. Selanjutnya, plat HPTLC yang telah disemprotkan H_2SO_4 10% dipanaskan pada suhu 105^0 C agar dapat mengoksidasi pelarut organik yang dapat mengganggu hasil (Sudjadi, 2007). Setelah dipanaskan, diamati menggunakan instrumen visualizer dan diperoleh hasil sebagai berikut :



Gambar 5.4 Hasil Uji TLC Visualizer pada *M. crenata* dengan pelarut etanol 96% sesudah diderivatisasi pada sinar putih dan sinar UV 366 nm.

Pengamatan yang dilakukan secara visual menggunakan sinar putih menunjukkan adanya noda berwarna kuning, hijau, hitam kebiruan dan ungu pada plat HPTLC. Penjelasan lebih detail sebagai berikut.

Tabel 5.3 Hasil uji TLC Visualizer ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan perhitungan R_f nya

| Sampel | Warna | R_f | Senyawa |
|---|---------------|-------|---------------------|
| Ekstrak Etanol 96% daun <i>Marsilea crenata</i> | Ungu kebiruan | 0,612 | Flavonoid |
| | Kuning | 0,688 | Alkaloid, Polifenol |
| | Ungu | 0,768 | Polifenol |
| | Ungu | 0,961 | Terpenoid |

5.6 Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit

Osteoporosis merupakan suatu kondisi berkurangnya massa tulang secara nyata yang berakibat pada rendahnya kepadatan (densitas) tulang. Selain itu, pada keadaan osteoporosis terdapat kerusakan mikroarsitektur tulang yang juga sangat mempengaruhi pada proses remodeling tulang. Proses remodeling tulang merupakan serangkaian proses terbentuknya tulang dimana terdapat sel osteoblas yang bertugas dalam proses pembentukan tulang dan sel osteoklas yang bertugas dalam proses penyerapan tulang. Namun, pada keadaan osteoporosis terjadi ketidakseimbangan proses remodeling tulang yang mana sel osteoklas lebih banyak sehingga proses penyerapan tulang lebih dominan dibandingkan dengan proses pembentukannya atau juga dapat dikatakan terjadi abnormalitas turn over dalam proses remodeling tulang (Meeta, 2013).

Terdapat beberapa faktor yang sangat berperan penting dalam proses remodeling tulang, diantaranya ialah hormon estrogen, sitokin, *growth factors* dan *Receptor Activator of Nuclear Factor κ Ligand* (RANKL)- *Receptor Activator of Nuclear Factor κ Osteoprotegerin* (OPG) (Kawiyana, 2009). Faktor-faktor tersebut yang akan menjadi acuan mekanisme yang terjadi pada terapi osteoporosis menggunakan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* oleh peneliti.

Pengujian aktivitas ekstrak etanol 96% terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra dilakukan terhadap mencit jantan diinduksi deksametason sebagai model osteoporosis. Pemilihan hewan coba mencit jantan

didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Laswati tahun 2015, yang menggunakan mencit jantan sebagai model osteoporosis untuk mengetahui efek pemberian *Spilanthes acmella* terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang femur mencit. Penggunaan hewan coba mencit berkelamin jantan disebabkan karena apabila menggunakan mencit betina dikhawatirkan terpengaruh oleh fluktuasi hormon estrogen yang dimiliki oleh hewan betina. Sehingga dapat mempengaruhi proses remodeling tulang dan mempengaruhi hasil yang akan diperoleh.

Mencit yang telah diinduksi deksametason selama 28 hari selanjutnya dikelompokkan sesuai dengan kelompok perlakuan. Adapun kelompok perlakuan sebanyak enam kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok dengan kontrol positif dengan pemberian suspensi alendronat dengan dosis 0,026 mg/20 g BB mencit per hari sebanyak 0,38 ml suspensi per oral. Perlakuan kedua merupakan kelompok kontrol negatif dengan pemberian suspensi CMC-Na. Kemudian, perlakuan selanjutnya yaitu perlakuan dengan pemberian ekstrak daun *M. crenata* dengan dosis 1.2 mg / 20g BB mencit. Kelompok perlakuan selanjutnya yang keempat, pemberian ekstrak daun *M. crenata* sebanyak 2.4 mg/ 20g BB mencit. Perlakuan ekstrak *M. crenata* pada kelompok selanjutnya yaitu dengan dosis sebesar 4.8 mg/20g BB mencit. Kelompok perlakuan terakhir, dengan pemberian ekstrak daun *M. crenata* sebesar 9.6 mg/20 g BB mencit.

Pengujian aktivitas ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* ini dimulai dengan proses penginduksian deksametason pada mencit jantan dengan usia sekitar 5 bulan dan berat badan kurang lebih 20 g selama 28 hari. Berikut

penjelasan mengenai proses penginduksian osteoporosis menggunakan deksametason.

5.6.1 Penginduksian Osteoporosis menggunakan Deksamaetason

Penggunaan deksametason sebagai induktor osteoporosis didasarkan pada literatur (Manolagas, 2000 dalam Noor 2014) yang menyatakan bahwa penggunaan deksametason (glukokortikoid) selama kurang lebih 3 sampai 4 minggu (28 hari) pada mencit setara dengan 3-4 tahun pada manusia. Padahal menurut Kemenkes RI (2015) penggunaan obat deksametason selama 3- 6 bulan dapat menghambat proses pertumbuhan tulang khususnya pada sel osteoblas. Sehingga mencit yang diberikan glukokortikoid selama kurang lebih 28 hari dapat dipastikan mengalami osteoporosis.

Mencit yang telah diaklimatisasi selama kurang lebih satu minggu, dikelompokkan sesuai dengan kelompok perlakuan. Masing- masing kelompok perlakuan diletakkan dalam satu kandang. Satu kandang terdiri dari 5-6 ekor mencit. Setiap hari dilakukan penginduksian mencit dengan deksametason menggunakan sonde. Dosis deksametason yang digunakan sebesar 0,0029 mg/ 20 g BB mencit. Setiap harinya diinduksi dengan volume 0,12 ml selama 28 hari.

Glukokortikoid adalah agonis estrogen yang memiliki struktur steroid yang sama, dan dapat mengikat reseptor estrogen (ER) dan menyebabkan kekurangan estrogen oleh produksi mRNA sulfotransferase (Gong *et al.*, 2008). Oleh karena itu, menggunakan glukokortikoid untuk terapi jangka panjang dapat menyebabkan penghambatan proses pembentukan tulang (Gong *et al.*, 2008, Dipiro *et al.*, 2014). Mencit dalam keadaan osteoporosis ditandai dengan

terbentuknya kifosis pada tulang belakangnya sehingga bentuk tulang akan semakin bengkok dan mencit terlihat bungkuk. menurut Fernandez (2006), selain itu mencit yang sudah mengalami osteoporosis memiliki warna bulu yang tampak lebih kusam dibandingkan dalam keadaan normal serta ketika berjalan terlihat membungkuk. Kondisi ini dapat menjadi indikator terjadinya penurunan massa tulang. Berikut gambar mencit yang telah mengalami osteoporosis secara visual.



(a) (b)
Gambar 5.5 (a) mencit dalam keadaan normal tidak terdapat kifosis pada tulang belakang. (b) mencit dalam keadaan osteoporosis terdapat pembungkukan pada bagian tulang belakang

5.6.2 Pembuatan Preparat Histologi Tulang Trabekular Vertebra Mencit

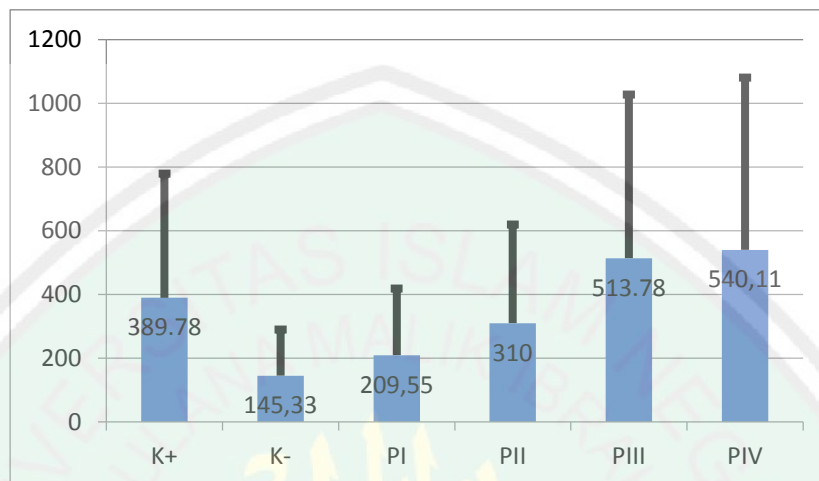
Hewan coba pada seluruh kelompok perlakuan yang telah mengalami osteoporosis pada hari ke 28 selanjutnya akan disiapkan untuk diberi perlakuan pembedahan. Pembedahan ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang pada hari ke 29. Pada saat pembedahan, mencit dibius dengan menggunakan kloroform. Mencit diletakkan di dalam toples berisikan kapas yang sudah dibasahi dengan kloroform. Selanjutnya, mencit dibedah dengan meletakkannya di atas sterofom dibantu dengan jarum yang dikaitkan pada bagian tertentu agar memudahkan proses pembedahan. Kemudian tulang trabekular vertebra diambil dengan cara dipotong dan dibersihkan dari sisa daging

yang menempel menggunakan alat- alat steril seperti pinset, gunting dan klep. Tulang trabekular yang sudah bersih direndam pada larutan NaCl 0,9 % steril untuk membersihkan sisa- sisa darah yang terdapat pada sampel tulang trabekular vertebra. Tulang yang sudah bersih, dimasukkan ke dalam wadah yang telah berisi larutan formaldehid 10% dan diberi label pada masing- masing wadah sesuai dengan kelompok perlakuannya. Pemberian formaldehid ini bertujuan supaya tulang dapat awet hingga dilakukan proses pembuatan preparat histologi.

Pembuatan preparat histologi dilakukan oleh ahli di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan metode pewarnaan HE.

5.6.3 Pemeriksaan Histomorfometri Tulang Trabekular Vertebra Mencit

Pemeriksaan histomorfometri dilakukan untuk mengamati jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit. Sehingga dapat diketahui adanya perbedaan atau peningkatan jumlah sel osteoblas antar kelompok perlakuan. Preparat tulang trabekular vertebra mencit diambil secara membujur dan diamati pada bagian metafisis. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* dan diambil gambarnya menggunakan software *optilab*. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan perbesaran 40x dan 100x. Penghitungan sel osteoblas ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Laswati (2015) yang juga menghitung jumlah sel osteoblas pada mencit jantan. Berikut tabel data rerata jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra setelah diamati menggunakan mikroskop.

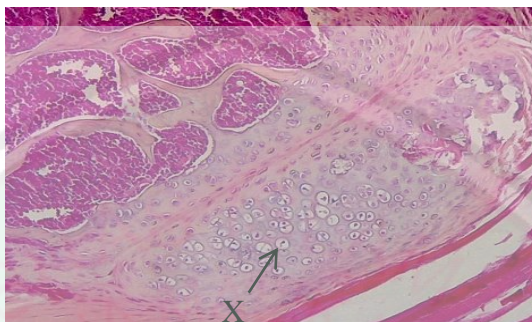


Gambar 5.6 Grafik Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan kontrol positif dan keempat perlakuan ekstrak etanol 96% memiliki jumlah sel osteoblas yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Sehingga dapat diketahui bahwa terapi dengan ekstrak dan kontrol positif dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra.

Preparat histologi yang diamati sebelumnya dicat menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). Pembuatan preparat histologi dilakukan oleh ahli di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Adapun sel osteoblas berbentuk kuboid atau gepeng atau pipih tergantung keadaannya. Apabila dalam keadaan mensintesis matriks tulang, osteoblas akan berbentuk kuboid mempunyai sitoplasma yang sifatnya basofilik. Sedangkan apabila sedang dalam keadaan tidak mensintesis matriks tulang, osteoblas akan berbentuk pipih atau gepeng dengan sifat basofiliknya yang

berkurang.osteoblas diketahui memiliki nukleus bulat dan besar dengan kromatin halus yang merata. Adapun sel osteoblas (X) dapat dilihat gambar sebagai berikut.



Gambar 5.7 Sel osteoblas (X) pada preparat histologi tulang trabekular vertebra menceit yang diamati menggunakan mikroskop Olympus dengan perbesaran 100x

5.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan setelah memperoleh hasil perhitungan jumlah sel osteoblas yang terdapat pada tulang trabekular vertebra menceit menggunakan mikroskop. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan metode ANOVA *one way* dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan 95% dari software IBM SPSS Statistic 24. Adapun uji *one way* ANOVA dapat digunakan apabila seluruh data yang dimiliki telah memenuhi syarat- syarat uji parametrik yaitu nilai uji normalitas dan homogenitas *p-value* > 0,05.

Uji normalitas jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra menggunakan *Shapiro-wilk*. Berikut hasil uji normalitas pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk

| Kelompok | <i>P- value Shapiro- Wilk</i> | Ketreangan |
|----------|-----------------------------------|------------|
| K (+) | 0,485 | Normal |
| K (-) | 0,658 | |
| PI | 0,478 | |
| PII | 0,632 | |
| PIII | 0,596 | |
| PIV | 0,478 | |

Berdasarkan hasil yang terdapat pada tabel 5.4 dapat diketahui bahwa *p value* dari keenam kelompok perlakuan $> 0,05$ sehingga dapat dinyatakan data dari keenam kelompok perlakuan terdistribusi normal. Selanjutnya setelah data dinyatakan terdistribusi secara normal, dilakukan uji homogenitas pada keenam kelompok perlakuan. Berikut hasil uji homogenitas dari keenam kelompok perlakuan.

Tabel 5.5 *P- value uji homogenitas Levene's statistic*

| Kelompok Perlakuan | <i>P- value Levene's statistic</i> | Keterangan |
|-----------------------|--|------------|
| K (+) | 0,139 | Homogen |
| K (-) | | |
| PI | | |
| PII | | |
| PIII | | |

| | | |
|------|--|--|
| PIII | | |
| PIV | | |

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa *p-value* dari keenam kelompok perlakuan lebih dari 0,05, sehingga data dapat dinyatakan homogen. Tahapan analisis data selanjutnya yaitu uji perbedaan dengan menggunakan *one way* ANOVA. Adapun hasil uji ANOVA sebagai berikut.

Tabel 5.6 *P-value* ANOVA *one-way*

| Kelompok Perlakuan | <i>P-value</i> ANOVA <i>one-way</i> | Keterangan |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------|
| K (+) | 0,000 | Berbeda signifikan |
| K (-) | | |
| PI | | |
| PII | | |
| PIII | | |
| PIV | | |

Berdasarkan uji *one way* ANOVA yang telah dilakukan, diperoleh hasil seperti pada tabel 5.6 yaitu *p-value* sebesar 0,000 yang mana nilainya lebih kecil dari 0,05. Sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan signifikan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra antar kelompok analisis data selanjutnya yaitu uji *Least Significant Difference* (LSD). Adapun interpretasi data pada uji LSD ini adalah apabila *p-value* antar kelompok perlakuan nilainya < 0,05 maka antar kelompok perlakuan tersebut dinyatakan berbeda signifikan.

Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.7, adapun hasil secara lengkap dapat dilihat di lampiran.

Tabel 5. 7 Hasil Uji LSD Jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit

| Kelompok | Kontrol | Kontrol | Dosis | Dosis | Dosis | Dosis |
|----------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | Positif | Negatif | 1,2 mg | 2,4 mg | 4,8 mg | 9,6 mg |
| K (+) | | BS* | BS* | - | BS* | BS* |
| K (-) | BS* | | - | BS* | BS* | BS* |
| PI | BS* | - | | - | BS* | BS* |
| PII | - | BS* | - | | BS* | BS* |
| PIII | BS* | BS* | BS* | BS* | | - |
| PIV | BS* | BS* | BS* | BS* | - | |

*BS = Berbeda Signifikan

Berdasarkan hasil uji LSD yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dengan variasi empat dosis yang berbeda. Penjelasan mengenai masing masing uji pada setiap kelompok perlakuan dapat diketahui sebagai berikut .

a. Hasil Uji LSD antara kelompok perlakuan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan kelompok kontrol positif dan negatif

Pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* pada mencit dalam bentuk sediaan suspensi dengan empat variasi dosis yang berbeda yaitu, 1,2 mg/20 g BB mencit, 2,4 mg/20 g BB mencit, 4,8 mg/20 g BB mencit dan 9,6 mg/20 g BB mencit. Perlakuan ini dimaksudkan sebagai terapi herbal untuk

mencit yang telah diinduksi deksametason. Terapi menggunakan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* masing- masing kelompok dilakukan selama 28 hari.

- **Hasil Uji LSD kelompok terapi pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan kelompok kontrol negatif**

Uji LSD dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit pada kelompok perlakuan pertama (PI) tidak dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit karena tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini dapat diketahui dari *p value* nya yang lebih besar dari 0,05 yaitu 0,203. Sedangkan kelompok perlakuan lainnya berbeda signifikan ditandai dengan nilai *p value* yang kurang dari 0,05. Kelompok PII, PIII dan PIV ketiganya diketahui memiliki *p value* masing- masing sebesar 0,005, 0,000 dan 0,000 dinyatakan mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit karena berbeda signifikan dengan kelompok K (-).

- **Hasil Uji LSD kelompok terapi pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan kelompok kontrol positif**

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dengan ditandai nilai *p value* yang tidak lebih dari 0,05 antara kelompok PI, PIII dan PIV dengan kelompok kontrol positif. Masing- masing *p value* yang dimiliki oleh ketiga kelompok perlakuan tersebut secara berurutan yaitu 0,003, 0,023, 0,008. Sedangkan pada kelompok perlakuan kedua (PII) memiliki nilai *p value* sebesar

0,12 yang mana lebih besar dari 0,05 sehingga dapat dinyatakan bahwa kelompok PII tidak berbeda signifikan dengan kelompok K (+).

Berdasarkan hasil uji LSD yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kelompok PI ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* tidak memberikan efek farmakologis sehingga tidak dapat digunakan sebagai terapi pada pasien osteoporosis. Sedangkan pada kelompok PII, PIII dan PIV dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit. Dari ketiga pemberian ekstrak tersebut, diketahui PIV dengan dosis sebesar 9,6 dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas yang paling maksimal. Hal ini diketahui dari jumlah rerata sel osteoblas pada mencit dengan kelompok perlakuan keempat yang sangat baik yaitu sebesar 540,11. Sehingga pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 9,6 mg dapat diketahui mampu memberikan efek farmakologis lebih baik dari golongan bifosfonat yaitu alendronat yang dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif.

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

Kelompok kontrol positif maupun kontrol negatif diberikan kepada mencit secara oral dalam bentuk suspensi. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif yang ditandai dengan nilai *p value* tidak lebih besar dari 0,05 yaitu sebesar 0,000.

Kontrol positif menggunakan salah satu golongan bifosfonat yang telah lazim digunakan untuk terapi osteoporosis yaitu alendronat. Obat ini diketahui

dapat menghambat osteoklas sehingga dikenal dengan istilah obat anti-resorpsi (Dipiro *et al.*, 2014).

Alendronat diketahui mampu mengikat mineral tulang dan menghambat osteoklas yang telah dewasa (Bronner *et al.*, 2007). Namun pada penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat memberikan efek yang lebih optimal dibandingkan alendronat. Hal ini dibuktikan oleh peningkatan jumlah sel osteoblas pada mencit dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang lebih besar dibandingkan dengan jumlah sel osteoblas pada pemberian suspensi alendronat. Hal ini diduga karena kandungan senyawa fitoestrogen pada ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki mekanisme mirip dengan hormon estrogen yang mengikat langsung reseptor estrogen. Sehingga selain menekan proses terjadinya resorpsi tulang, namun juga menstimulasi sitokin- sitokin pro osteoblas sehingga proses formasi tulang akan meningkat. Berdasarkan perbedaan mekanisme kerjanya, diketahui alendronat menghambat osteoporosis hanya mampu dengan mengikat mineral tulang dan menghambat sel osteoklas yang telah dewasa saja sedangkan fitoestrogen selain menekan diferensiasi osteoklas namun juga meningkatkan jumlah sel osteoblas sehingga formasi tulang meningkat dan memberikan efek lebih baik dalam terapi osteoporosis.

5.8 Mekanisme Kerja Senyawa Fitoestrogen Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* dalam Meningkatkan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit

Efek farmakologis yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* diduga merupakan khasiat estrogenik fitoestrogen dari tumbuhan *M. crenata*. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa fitoestrogen merupakan substansi derivat dari tumbuhan yang memiliki struktur atau fungsi yang sama dengan hormon estrogen yang diproduksi oleh tubuh. Senyawa fitoestrogen pada tumbuhan *M. crenata* mampu menggantikan estrogen untuk berikatan secara langsung dengan reseptor estrogen. Hal ini dikarenakan fitoestrogen memiliki 2 gugus -OH atau hidroksil yang berjarak 1,0- 11,5 Å^o sehingga dapat menggantikan estrogen untuk mengikat reseptor estrogen (Benassayag, 2002; Urasopon *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* ini mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit jantan yang telah diinduksi deksametason sebagai penginduksi osteoporosis. Estrogen dalam keadaan normal akan berikatan dengan *Estrogen Receptor Alpha* (ER- α) dan juga dengan *Estrogen Receptor Beta* (ER- β) untuk menuju sel osteoblas di dalam sitosol. Ikatan antara estrogen dengan ER- α dan ER- β ini akan menyebabkan terjadinya penurunan sitokin- sitokin pro-osteoklas seperti *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan menghambat interaksi RANK-RANKL dengan menstimulasi sel stroma yang kemudian menghasilkan OPG

(Osteoprotegrin). OPG merupakan reseptor TNF yang penting dalam menghambat diferensiasi dan aktivitas osteoklas. Sehingga, secara tidak langsung, peran estrogen dapat menekan pembentukan sel osteoklas sehingga aktivitas penyerapan tulang oleh osteoklas juga akan menurun (Bell, 2003; Bezerra, 2005). Sebaliknya, *growth factor* pro-osteoblas akan mengalami peningkatan akibat ikatan antara estrogen dengan ER- α dan ER- β ini. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) ini akan meningkat sekresinya yang mana berperan dalam menarik osteoblas untuk menutupi lubang yang timbul akibat penyerapan yang dilakukan oleh osteoklas dan akan menyebabkan terjadinya peningkatan apoptosis dari sel osteoklas. Secara tidak langsung, estrogen juga mempengaruhi osteoklas yaitu melalui TGF- β untuk menginduksi osteoklas agar lebih cepat mengalami apoptosis (Kawiyana, 2009; Meeta, 2013).

Selain itu, aktivitas antiosteoporosis yang lebih baik dari alendronat ini diduga disebabkan oleh kandungan fitoestrogen yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang juga bertindak sebagai fitotestosteron. Hal ini dikarenakan karena memiliki struktur dengan inti steroid yang sama dengan estrogen. Defisiensi estrogen sebanding dengan defisiensi testosteron, karena testosteron merupakan salah satu hormon androgen yang dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 untuk menghasilkan 17- β - estradiol dan berfungsi sebagai prekursor estrogen (Reid, 1996).

Pemberian glukokortikoid jangka panjang telah terbukti menyebabkan hipogonadisme yang berdampak pada menurunnya jumlah testosteron. Sedangkan penurunan testosteron mengakibatkan terganggunya pembentukan tulang

sebagaimana terjadinya penurunan kadar estrogen dalam tubuh. Karena testosteron juga memiliki peran penting dalam pembentukan tulang sebagaimana peran estrogen. Testosteron dapat berikatan langsung dengan hormon androgen untuk pertumbuhan tulang dan mempertahankan kepadatan tulang (Sinnesael, 2011), sehingga kandungan fitotestosteron pada daun *M. crenata* dapat memenuhi perannya dalam menggantikan estrogen atau testosteron dalam mengembalikan homeostasis tulang.

Penelitian serupa dilakukan oleh Laswati (2007) yang menyatakan bahwa pemberian daun semanggi mampu menghambat ketidakseimbangan remodeling tulang melalui peran reseptor estrogen dari sel osteoblas yang juga dilakukan pada mencit. Sehingga dapat mendukung penelitian ini, dimana ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit.

Penelitian ini telah membuktikan bahwa Allah telah menciptakan segala sesuatu tidak sia-sia. Allah menciptakan berbagai macam tumbuhan di muka bumi untuk manusia dengan manfaat dan khasiat yang sangat besar. Sebagaimana firman-Nya dalam surat Ali 'Imran ayat 190-191 :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۗ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, serta silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda- tanda bagi orang yang berakal, (yaitu) orang- orang yang mengingat Allah dalam keadaan berdiri atau duduk atau berbaring seraya berkata: “Ya Rabb kami, tiadalah Engkau ciptakan ini dengan sia- sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”

Sehingga kita sebagai makhlukNya yang paling sempurna hendaknya merenungi manfaat- manfaat dari tumbuhan yang telah Allah ciptakan. Hal ini semata supaya semakin bertambah keyakinan kita bahwa Allah lah satu- satunya Rabb yang patut disembah, Dialah yang telah menciptakan seluruh alam semesta tanpa sia- sia, sehingga hendaknya kita meningkatkan kecintaan kita kepadaNya, mengokohkan keimanan padaNya serta memantapkan keyakinan tentang keesaanNya.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan juga telah diketahui bahwa terdapat dosis yang mampu secara efektif meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang yang telah terkena osteoporosis sehingga dapat melakukan fungsinya secara optimal. Hal ini sangat sesuai dengan firman Allah dalam surat al- Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya : Sesungguhnya kami telah menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.

Menurut Shihab (2002), Allah telah menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah. Sehingga dalam hal ini, ukuran yang sesuai merupakan dosis yang efektif yang tidak berlebihan yaitu dosis ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* pada perlakuan ke sebesar 2,878 mg. Dosis efektif merupakan suatu dosis yang dapat memberikan efek terapeutik pada 50% dari seluruh hewan percobaan. Perhitungan *Effective Dose 50* (ED₅₀) ini diperoleh dari perhitungan menggunakan *probit analyze* pada program SPSS. Sehingga dapat

diketahui bahwa ED_{50} dari ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* adalah sebesar 2,878mg dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit. Selain itu, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa dosis 9,6 mg/ 20 g BB mencit mampu memberikan efek yang paling optimal dengan ditunjukkannya peningkatan jumlah sel osteoblas yang paling tinggi.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan beberapa variasi kelompok perlakuan dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit. Dosis 1,2 mg ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* tidak mampu memberikan efek terapi karena tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif. Sedangkan dosis ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* sebesar 9,6 mg mampu memberikan hasil yang paling optimal karena mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit yang paling besar.
2. Diperoleh ED₅₀ sebesar 2,878 mg ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang artinya dosis tersebut mampu memberikan efek terapeutik terhadap 50% dari jumlah keseluruhan hewan coba.

6.2 Saran

1. Penelitian lanjutan mengenai ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* sangat perlu dilakukan, supaya dapat mendukung penelitian ini. Seperti halnya parameter- parameter di tingkat molekuler yang bisa menunjukkan adanya khasiat atau efek terapeutik yang dimiliki oleh ekstrak etanol tanaman semanggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Achdiat, C. M. 2003. Fitoestrogen Untuk Wanita Menopause. <http://www.situs.kesrepro.info/aging/jul/2003/ag01.html> (diakses pada tanggal 19 Januari 2018).
- Adlercreutz, H., 1998, Epidemiology of Phytoestrogens, *Bailliere's Clinical Endocrinology Metabolism*, 12, 605–623.
- Adlercreutz H. 2005. Phytoestrogen. In (Lauritzen C, Studd J ed). *Current Management of the Menopause*. 1st London: Taylor & Francis. 271-80.
- Afristiani, J. J., 2003. *Marsilea crenata* Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, Editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor :LIPI.
- Al Maraaghi, A.M., 2000. *Terjemahan Tafsir al- Maraghi*. Semarang : CV Toha Putra Semarang.
- Anderson, J.J.B. 1996. Calcium, Phosphorus And Human Bone Development. *Jurnal Nutr*. 126: 1153S - 1158S.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 4 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. <https://asrot.pom.go.id/> (diakses pada tanggal 27 September 2018; 16:52)
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Cetakan pertama. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. hlm. 177-185,196-205.
- Bell, N. H. 2003. RANK Ligand And The Regulation Of Skletal Remodeling. *J Clin Invest*; (111):1120-22.
- Benassayag, C., Perrot-Appianat, M and Ferre, F. 2002. Phytoestrogen as Modulators of Steroid Action in Targe Cells, *Journal Chromatogr*. 777: 233-248.
- Bezerra, M.C, Carvalho, J.F. 2005. *RANK, RANKL and Osteoprotegerin In Arthritic Bone Loss*. [serial online]. Prokopowitsch AS, Pereira RMR
- Bjarnason, N.H, Christiansen, C. 2005. Osteoporosis. In (Lauritzen C, Studd J ed). *Current Management of the Menopause*. 1st London: Taylor & Francis. 139-47.

- Bronner, F., Carson, M.C.F. 2007. *Bone and Osteoarthritis*. Vol 4. Library of Congress Control, London.
- Chavassieux, P. M., Arlot, M. E., Roux, J. P., Portero, N., Daifotis, A., Yates, A.J. Handy, N. A. T., Malice, Marie-Pierre., Freedhom, D., Meunier, P. J. 2000 Effects of Alendronate on Bone Quality and Remodeling in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: A *Histomorphometric Analysis of Transiliac Biopsies*. Volume 15, Issue 4, Pages 754–762.
- Cos, P., Bruyne, T. D., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., Vlietinck, A. J. 2003. A Review : Phytoestrogen Recent Developments.
- Cosman, F. 2009. *Osteoporosis: Panduan Lengkap agar Tulang Anda Tetap Sehat*. Solo: Bintang Pustaka.
- Constantine, G. D., Pickar, J. H. 2005. Estrogens in Postmenopausal Women : Recent Insights. *Elsevier : Pharmacology*. Vol 3. Page 626-634.
- Dahlan, M.S. 2014. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat dan Multivariat*. Jakarta: Salemba Medika.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Obat Tradisional. Jakarta.17, 31-32.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman Pengendalian Osteoporosis. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 1142/MENKES/SK/XII/2008:3-4*.
- Dipiro, J. T., Robert, L. T., Gary, C. Y., Barbara G. W. L., Michael, L. 2008. *Pharmacotherapy (A Pathophysiologic Approach)*, 7th Edition. United Stated : McGraw-Hill Companies, Inc.
- Dipiro J.T., Talbert R.L, Yee G.C., Matzke G.R, Wells B.G., and Possey L.M. 2014. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach, 9th Ed.*, New York: Mc Graw Hill
- Epstein FH. Bone marrow, cytokines, and bone remodelling. *N Engl J Med* [serial online]. 1995 Feb 2 [cited 2010 Jan 9]; 332(5):305-11. Available from: URL: <http://content.nejm.org/cgi/reprint/332/5/305.pdf>
- Fernandez, I., M.A.A. Gracia, M.C. Pingarron, and L.B. Jerez. 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med, Oral Patol, Cir, Bucal*. 11:E151-157.

- Field, A. 2009. *Discovering Statistic Using SPSS* 3rd Edition, Sage Publicatins Ltd., London.
- Groff, J. L. and Gropper S. S. 2000. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. United State: Wadsworth Thomson Learning.
- Guido G., Scaglione, M., Fabbri, L., Ceglia, M. J. 2009. The “osteoporosis disease”. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. Vol. 6(2):114-6.
- Gong, Haibiao, Michael, J., Jarzynka., Timothy, J. C, Jung, H. L., Taira, W., Bin Zhang, Jie Gao,¹ Wen-Chao Song, Donald B. DeFranco,³ Shi-Yuan Cheng and Wen Xie. Glucocorticoids Antagonize Estrogens by Glucocorticoid Receptor-Mediated Activation of Estrogen Sulfotransferase. *Research Cancer Article* 2008; 68 (18):7386-7393.
- Hanafiah, K. A. 2004. *Research Design, Teory and Application*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Helsinki, N. 2001. *Effects of Genistein and Daidzein on Arterial Tone and Blood Pressure In Rats*. University of Helsinki, Haartmaninkatu.
- Hill, P.A., A. Tumbler, and M.C. Meikle. 1997. Multiple Extracellular Signals Promote Osteoblast Survival And Apoptosis. *Endocrinology* 138:3849-3858.
- Hill, P.A. and M. Orth. 1998. Bone remodelling. *British Journal of Orthodontic* 25:101-107.
- Hubrecht, R. and Kirkwood, J. 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory Animals* 8th Edition. Wiley Blackwell.
- Ikawati, Z. 2008. *Pengantar Farmakologi Molekuler*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Imani, A. K. F. 2005. *Nur Al Qur'an, Tafsir Nurul Qur'an*. Jakarta: Al Huda.
- Junaidi I. 2009. *Osteoporosis Pengenalan Pencegahan Serta Pengobatan Penyakit Osteoporosis dan Penyakit Tulang Lain Yang Mirip*. Jakarta : PT Bhuana Ilmu Populer; Hal 2, 7-8, 9, 36-3.
- Kawiyana, I.K.S. 2009. Crosslink Telopeptida C-Terminal sebagai Penanda Aktivitas Sel Osteoklas pada Osteoporosis Pascamenopause Defisiensi Estrogen. *J Peny Dalam*. 10;2. 79-84.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. *Data dan Kondisi Penyakit Osteoporosis di Indonesia*. In : www.depkes.go.id diambil pada tanggal 31/01/2018.
- Kenkel, J. 2003. *Analytical Chemistry for Technicians*. CRC Press, LLC.
- Kumalasari H. 2012. Validasi Metoda Pengukuran Kadar Air Bubuk Perisa Menggunakan Moisture Analyzer Halogen HB43-S, sebagai Alternatif Metoda Oven dan Karl Fischer. Skripsi. Bogor.
- Lemeshow, S, Hosmer D.W., Klar J., Lwanga S.K. 1990. *Adequacy Of Sample Size In Health Studies*. Edisi terjemahan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Laswati, H., 2007. Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodelling Tulang Perempuan Pascamenopause Melalui Peran Reseptor Estrogen Sel Osteoblast. [Disertasi]. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47. No 2. Page 112-117.
- Laswati, H., Mangestuti, A., Retno, W., 2015. Efek Pemberian *Spilanthus acmella* dan Latihan Fisik terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit yang Diinduksi Deksametason. *Media Litbangkes*. Vol. 25 No. 1.
- Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H., Chen, C-P., Wang, P-H. 2013. Hormone therapy for postmenopausal women And unanswered issue. *Elsevier : Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol 2. Page 13-17.
- Ma'arif, B. 2015. Aktivitas Ekstrak n-Heksana dan Fraksi Hasil Pemisahan Daun *Marsilea crenata* Presl. terhadap Diferensiasi Sel Preosteoblas MC3T3-E1 melalui Pengukuran Alkaline phosphatase In vitro. [Tesis]. Universitas Airlangga.
- Ma'arif, B., Mangestuti, A., Hening., L. 2016. Phytochemical Assesment on N-hexane Extract and Fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves through GC-MS. *Traditional Medicine Journal*. Vol 21 No. 2.
- Malole, M.B.M., Pramono, C.S.U. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor : PAU Pangan dan Gizi, IPB.

- Manolagas, S. C. 2000. Birth and Death of Bone Cells Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 21(2). 115-37.
- Mazur W. 1998. Phytoestrogens in Food. In (Adlercreutz ed.) Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism: Phytoestrogens, Bailliere Tindall, London; 12 (4): 72940.
- Meeta. 2013. *Postmenopause Osteoporosis Basic and Clinical Concepts*. Jaypee Brothers Medical Publishers. New Delhi 2. 20-22
- Moriwaki, K, T. Shiroishi, H. Yonekawa. 1994. *Genetic in Wild Mice. Its Application to Biomedical Research*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press. Karger.
- Mukhriani, 2014. Ekstraksi, Pemisahan senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Fakultas Ilmu Kesehatan Alaudin Makassar. Vol VII no. 2.
- National Osteoporosis Foundation. 2010. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation.
- Noor, Zairin. 2014. *Buku Ajar : Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Jakarta: Saleba Medika.
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1. No 3. Page 152-158.
- Orwoll ES, Bliziotes M. 2002. *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management*. Humana Press.
- Ososki, A. L., Kennelly, E. J. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research*. Vol 17. Page 845-869.
- Raisz, L. G. 2005. Pathogenesis of Osteoporosis : Concepts, Conflicts, and Prospects. Published in *J Clin Invest*. Vol. 115(12). p. : 3318-3325.
- Reid IR, Wattie DJ, Evans MC, Stapleton JP. 1996. Testosterone Therapy In Glucocorticoid-Treated Men. *Arch Intern Med*. 156:1173-7.
- Roeshadi, D. 1997. Deteksi Dini Osteoporosis pada Wanita Pra dan Pascamenopause. Disertasi. Surabaya : Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

- Roland, B R. 2008. Chapter 1: Anatomy And Ultrasturcture Of Bone Histologenesis, Growth And Remodelling. In: Arnold A. editor. Disease of bone and mineral metabilisme.
- Rosen C. 2011. Chapter 11: The Epidemiology And Pathogenesis Of Osteoporosis. In: Arnold A. editor. Disease of Bone and Mineral Metabilisme.
- Seidel V. Initial and ulkextraction. In: Sarker SD, Latif Z & Gray Al, editors. *Natural product Isolation*, 2nd ed. Totowa (Ney Jersey). Humana Press Inc. 2006. hal. 31-5.
- Setiyohadi, B. 2006. *Osteoporosis. Dalam: Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Jilid II, Edisi IV*, Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1259-73.
- Setiyohadi, B. 2010. Peran Osteoblas Pada Remodeling Tulang. Dalam: Kumpulan Makalah Temu Ilmiah Reumatologi; 32-7.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al Mishbah : Pesan, Kesan, dan Keserasian Al Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sinnesael, M., Steven, B., Frank, C., Evelien, G., Dirk, V. 2011. Testosterone and The Male Skeleton : A Dual Mode of Action. *Journal of Osteoporosis*. Vol 12.
- Smith , J. B. , Soesanto, M. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). h. 30 – 32 , 43-44, 54,57.
- Speroff, L. 2004. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*. 6th. Ed. Amerika Serikat: Lippincott Williams & Wilkins, p. 48-50; 67-68; 71-78; 879-880.
- Stenis, C.G.G.J. 2008. *Flora Untuk Sekolah di Indonesia*. Jakarta : PT. Pradnya Paramita.
- Stevenson J.C and Marsh M.S. 2007. *An Atlas Of Osteoporosis*. Third Edition. Informa UK Ltd.
- Sudjadi. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Syam, Y., Djarot, N., Haryanto, S. 2014. Fraktur Akibat Osteoporosis. *Jurnal e-Clinic*. Vol. 2. No 2.
- Szulc P, Bouxsein M.L. 2002. Overview of Osteoporosis. Epidemiology and Clinical Management. Vertebral Fracture Initiative Resource Document.

- Tandra, H. 2009. *Osteoporosis Mengenal, Mengatasi dan Mencegah Tulang Keropos*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Titisari, N., Fauzi, A., Adyana, A., Trisnuwati P. 2016. The Effect of Water Clover *Marsilea crenata* Extract Against Estrogen, Progesterone and Uterine Histology on Rat (*Rattus Norvegicus*). *International Journal of PharmTech Research*. Vol. 9 (6) pp 165-171.
- Tjahjadi V. 2002. *Buku Kesehatan Praktis Mengenal Mencegah Mengatasi Silent Killer Osteoporosis*. Jakarta : Pustaka Widyamara: Hal ; 2,3,4, 98-100, 146.
- Urasopon, N., Hamada, Y., Asaoka, K. dan Pongmali U. 2008. Isoflavon Content of Rodent Diets and Its Estrogenic Effect on Vaginal Cornification in *Pueraria mirifica* Treated Rats. *Science Asia* 34: 371–376.
- Villiers, T. J. 2009. Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. Elsevier : *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol 23. Page 7385.
- Warsono, L B., Windi, A., Bambang, S. A. 2013. Ekstraksi *Cashew Nut Shell Liquid* (CNSL) dari Kulit Biji Mete dengan Menggunakan Metode Pengepresan. *Jurnal Teknosains Pangan*. Vol 2 (2).
- Waters, K.M., Rickard, D.J., Gebhart, J.B. 1999. Potential Roles of Estrogen Reseptor- α and - β in the Regulation of Human Osteoblast Functions and Gene Expression. The menopause at the millenium. *The Proceeding of the 9th International Menopause Society World Congress on Menopause*. October 17-21; Yokohama, Japan.
- Wijayakusuma, H.M. 2000. *Ramuan Tradisional untuk Peengobatan Darah Tinggi*. Jakarta: Swadaya.
- Wiyasa I. W.A, Norahmawati, E, Soehartono. 2008. Pengaruh Isoflavon Genistein dan Deidzein Ekstrak Tokbi (*Pueraria lobata*) Strain Kangean terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas *Rattus novergicus* Wistar Hipoestrogenik. *Maj Obstet Ginekol Indones*. Vol. 32 no 3.
- Yacoeb, A.M., Nurjanah., Arifin, M., Sulistiono, W., Kristiono, S.S. 2010. Deskripsi Histologis dan Perubahan Komposisi Kimia Daun dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* XII(2):81-95.

Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology. Vol 51. Page 229-235.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil determinasi tanaman *Marsilea crenata* Presl.


PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/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 | : <i>Marsilea crenata</i> Presl |
| Sinonim | : <i>Marsilea quadrifolia</i> Bl. ; <i>M. minuta</i> L. |

Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi

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

2. Morfologi : Habitus : Semak, menjalar, panjang ± 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang ± 2 cm, lebar ± 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 Simplisia : *Marsilea crenata* 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 Riza 1991, *Inventory Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

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

Batun, 05 Oktober 2017
 Kepala UPT Materia Medica Batu

 Dr. Husni R.M., Drs., Apt., M.Kes.
 NRP 196314102 199103 1 003

Lampiran 2 Surat Keterangan Laik Etik

| | |
|---|---|
|  | FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN 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 |
| | KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 020/EC/KEPK-FKIK/2018 |

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

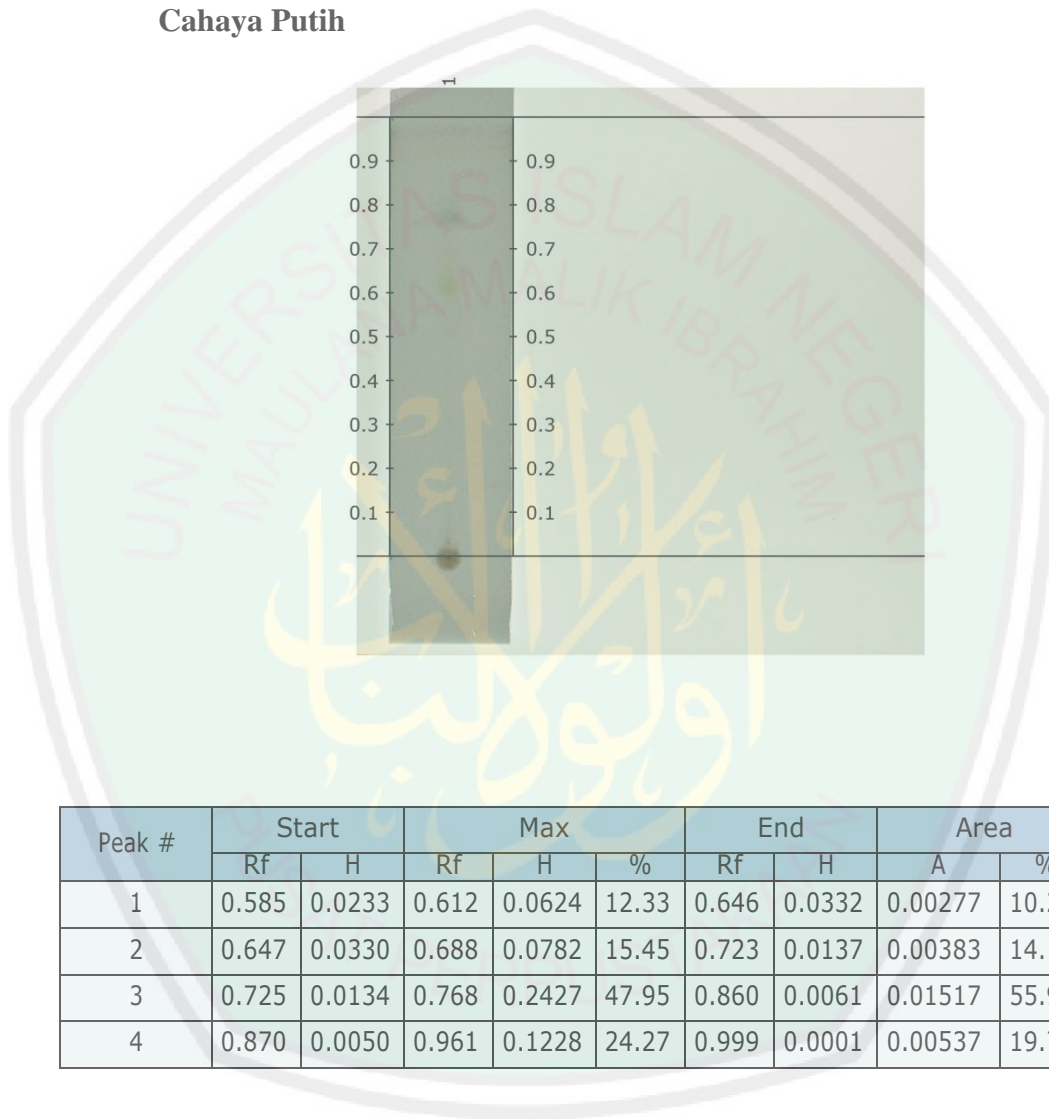
dr. Avin Ainur F, MBiomed
NIP. 19800203 200912 2 002

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).

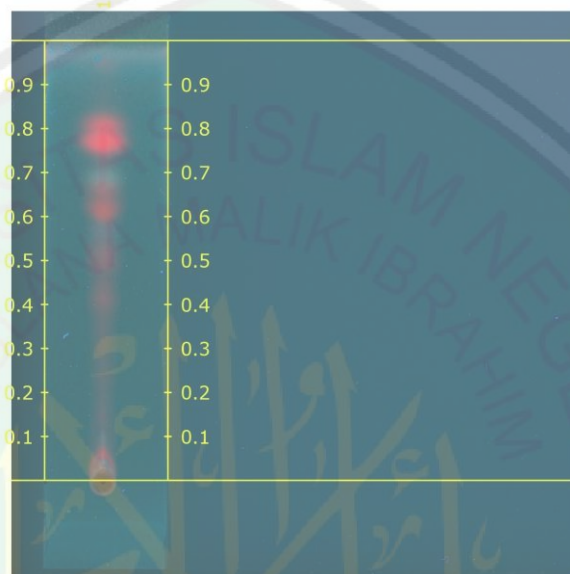
Lampiran 3 Hasil TLC Visualizer Kandungan Senyawa Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata*

1. Hasil TLC Visualizer Ekstrak Etanol 96% Daun *M. Crenata* Pada Cahaya Putih



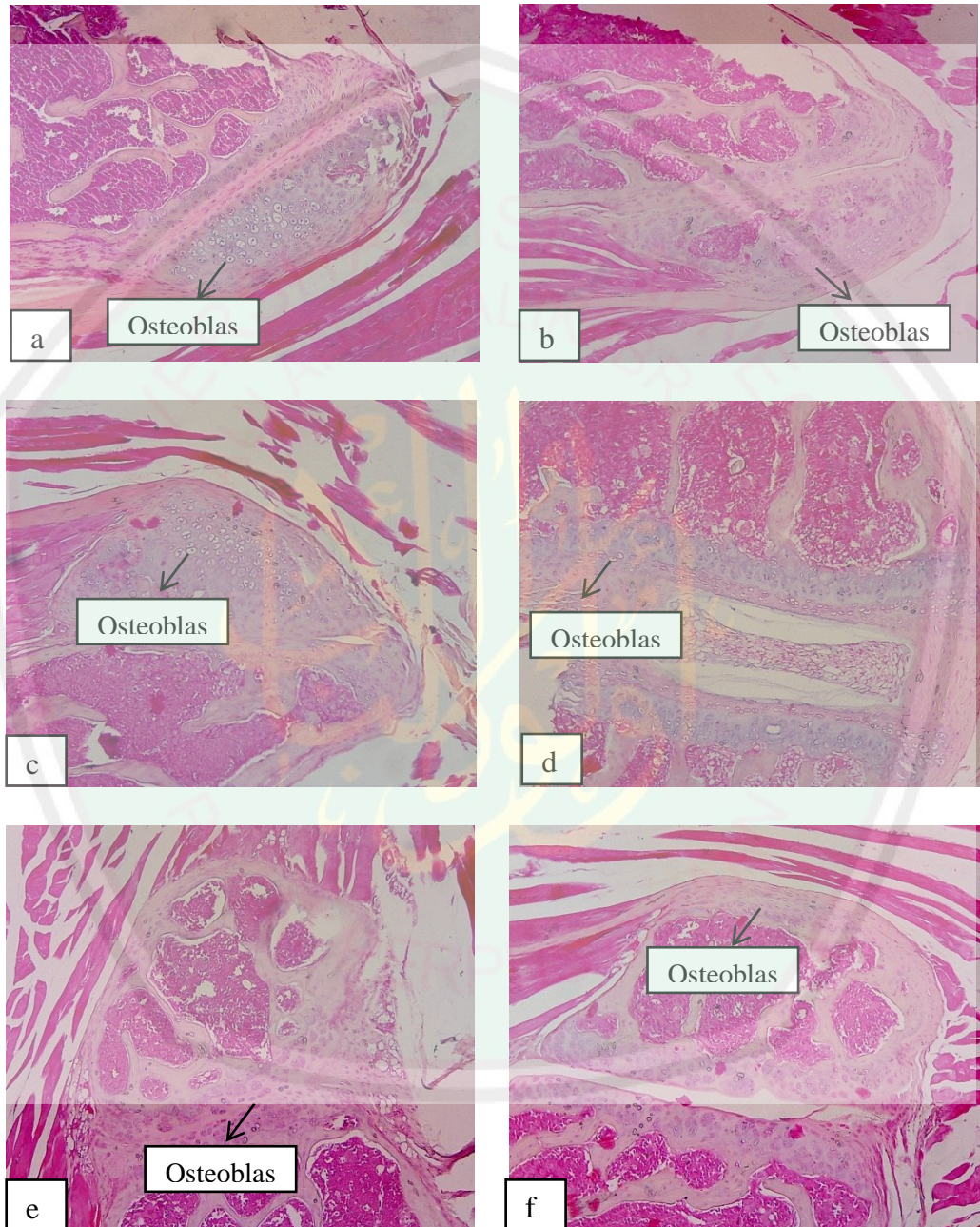
| Peak # | Start | | Max | | | End | | Area | | Manual peak |
|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|---------|-------|-------------|
| | Rf | H | Rf | H | % | Rf | H | A | % | |
| 1 | 0.585 | 0.0233 | 0.612 | 0.0624 | 12.33 | 0.646 | 0.0332 | 0.00277 | 10.22 | No |
| 2 | 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 |

2. Hasil TLC Visualizer Ekstrak Etanol 96% Daun *M. Crenata* Pada Cahaya UV 366 nm



| Peak # | Start | | Max | | | End | | Area | | Manual peak |
|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|---------|-------|-------------|
| | 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 |

Lampiran 4 Gambar Preparat Histologi Tulang Trabekular Vertebra Mencit



- a : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit PI
 b : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit PII
 c : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit PIII
 d : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit PIV
 e : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit K (+)
 f : Gambar preparat histologi tulang trabekular vertebra mencit K (-)

Lampiran 5 Hasil Perhitungan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit

| Replikasi | Kelompok 1 | | | Kelompok 2 | | | Kelompok 3 | | | Kelompok 4 | | |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 464,00 | 376,00 | 441,00 | 130,00 | 135,00 | 136,00 | 290,00 | 202,00 | 146,00 | 309,00 | 363,00 | 262,00 |
| 2 | 382,00 | 378,00 | 438,00 | 191,00 | 108,00 | 164,00 | 253,00 | 189,00 | 181,00 | 328,00 | 341,00 | 274,00 |
| 3 | 354,00 | 304,00 | 371,00 | 145,00 | 156,00 | 143,00 | 282,00 | 183,00 | 160,00 | 327,00 | 360,00 | 226,00 |
| Total | 1200,00 | 1058,00 | 1250,00 | 466,00 | 399,00 | 443,00 | 825,00 | 574,00 | 487,00 | 964,00 | 1064,00 | 762,00 |
| Rata-rata | 400,00 | 352,67 | 416,67 | 155,33 | 133,00 | 147,67 | 275,00 | 191,33 | 162,33 | 321,33 | 354,67 | 254,00 |
| Rata-rata total | 389,78 | | | 145,33 | | | 209,56 | | | 310,00 | | |

Keterangan:

- Kelompok 1 Kontrol positif dengan terapi alendronat
- Kelompok 2 Kontrol negatif dengan CMC-Na
- Kelompok 3 Terapi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* 1.2 mg
- Kelompok 4 Terapi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* 2.4 mg
- Kelompok 5 Terapi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* 4.8 mg
- Kelompok 6 Terapi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* 9.6 mg

| Kelompok 5 | | | Kelompok 6 | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 473,00 | 500,00 | 601,00 | 660,00 | 493,00 | 512,00 |
| 411,00 | 540,00 | 600,00 | 630,00 | 444,00 | 400,00 |
| 414,00 | 555,00 | 530,00 | 626,00 | 470,00 | 626,00 |
| 1298,00 | 1595,00 | 1731,00 | 1916,00 | 1407,00 | 1538,00 |
| 432,67 | 531,67 | 577,00 | 638,67 | 469,00 | 512,67 |
| 513,78 | | | 540,11 | | |

Lampiran 6 Hasil Analisis Data Perhitungan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

| Kelompok Perlakuan | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | Df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Jumlah Sel | | | | | | |
| Kontrol Positif | ,288 | 3 | . | ,929 | 3 | ,485 |
| Kontrol Negatif | ,248 | 3 | . | ,968 | 3 | ,658 |
| Perlakuan I | ,289 | 3 | . | ,927 | 3 | ,478 |
| Perlakuan II | ,254 | 3 | . | ,963 | 3 | ,632 |
| Perlakuan III | ,262 | 3 | . | ,956 | 3 | ,596 |
| Perlakuan IV | ,289 | 3 | . | ,927 | 3 | ,478 |

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

| Jumlah Sel | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------|------------------|-----|-----|------|
| | 2,077 | 5 | 12 | ,139 |

3. Uji One-Way ANOVA

ANOVA

Jumlah Sel

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 383252,744 | 5 | 76650,549 | 22,442 | ,000 |
| Within Groups | 40986,666 | 12 | 3415,556 | | |
| Total | 424239,410 | 17 | | | |

4. Uji Beda Nyata Tunggal (LSD)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel

LSD

(I) Kelompok

| Perlakuan | (J) Kelompok Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol Positif | Kontrol Negatif | 244,44667* | 47,71831 | ,000 | 140,4774 | 348,4159 |
| | Perlakuan I | 180,22667* | 47,71831 | ,003 | 76,2574 | 284,1959 |
| | Perlakuan II | 79,78000 | 47,71831 | ,120 | -24,1893 | 183,7493 |
| | Perlakuan III | -124,00000* | 47,71831 | ,023 | -227,9693 | -20,0307 |
| | Perlakuan IV | -150,33333* | 47,71831 | ,008 | -254,3026 | -46,3641 |
| Kontrol Negatif | Kontrol Positif | -244,44667* | 47,71831 | ,000 | -348,4159 | -140,4774 |
| | Perlakuan I | -64,22000 | 47,71831 | ,203 | -168,1893 | 39,7493 |
| | Perlakuan II | -164,66667* | 47,71831 | ,005 | -268,6359 | -60,6974 |
| | Perlakuan III | -368,44667* | 47,71831 | ,000 | -472,4159 | -264,4774 |

| | | | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|------------|----------|-----------|-----------|
| | Perlakuan IV | -394,78000* | 47,71831 | ,000 | -498,7493 | -290,8107 |
| Perlakuan I | Kontrol Positif | -180,22667* | 47,71831 | ,003 | -284,1959 | -76,2574 |
| | Kontrol Negatif | 64,22000 | 47,71831 | ,203 | -39,7493 | 168,1893 |
| | Perlakuan II | -100,44667 | 47,71831 | ,057 | -204,4159 | 3,5226 |
| | Perlakuan III | -304,22667* | 47,71831 | ,000 | -408,1959 | -200,2574 |
| | Perlakuan IV | -330,56000* | 47,71831 | ,000 | -434,5293 | -226,5907 |
| | Perlakuan II | Kontrol Positif | -79,78000 | 47,71831 | ,120 | -183,7493 |
| Kontrol Negatif | | 164,66667* | 47,71831 | ,005 | 60,6974 | 268,6359 |
| Perlakuan I | | 100,44667 | 47,71831 | ,057 | -3,5226 | 204,4159 |
| Perlakuan III | | -203,78000* | 47,71831 | ,001 | -307,7493 | -99,8107 |
| Perlakuan IV | | -230,11333* | 47,71831 | ,000 | -334,0826 | -126,1441 |
| Perlakuan III | | Kontrol Positif | 124,00000* | 47,71831 | ,023 | 20,0307 |
| | Kontrol Negatif | 368,44667* | 47,71831 | ,000 | 264,4774 | 472,4159 |
| | Perlakuan I | 304,22667* | 47,71831 | ,000 | 200,2574 | 408,1959 |
| | Perlakuan II | 203,78000* | 47,71831 | ,001 | 99,8107 | 307,7493 |
| | Perlakuan IV | -26,33333 | 47,71831 | ,591 | -130,3026 | 77,6359 |
| | Perlakuan IV | Kontrol Positif | 150,33333* | 47,71831 | ,008 | 46,3641 |
| Kontrol Negatif | | 394,78000* | 47,71831 | ,000 | 290,8107 | 498,7493 |
| Perlakuan I | | 330,56000* | 47,71831 | ,000 | 226,5907 | 434,5293 |
| Perlakuan II | | 230,11333* | 47,71831 | ,000 | 126,1441 | 334,0826 |
| Perlakuan III | | 26,33333 | 47,71831 | ,591 | -77,6359 | 130,3026 |

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

5. Uji Probit (ED₅₀)

Confidence Limits

| | 95% Confidence Limits for Dosis | | | | 95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a | | |
|--------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|---|-------------|-------------|
| | Probability | Estimate | Lower Bound | Upper Bound | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT | ,010 | 1,246 | 1,009 | 1,459 | ,096 | ,004 | ,164 |
| | ,020 | 1,375 | 1,132 | 1,589 | ,138 | ,054 | ,201 |
| | ,030 | 1,463 | 1,217 | 1,678 | ,165 | ,085 | ,225 |
| | ,040 | 1,533 | 1,286 | 1,749 | ,186 | ,109 | ,243 |
| | ,050 | 1,592 | 1,344 | 1,808 | ,202 | ,129 | ,257 |
| | ,060 | 1,645 | 1,396 | 1,861 | ,216 | ,145 | ,270 |
| | ,070 | 1,692 | 1,444 | 1,908 | ,228 | ,159 | ,281 |
| | ,080 | 1,736 | 1,487 | 1,951 | ,240 | ,172 | ,290 |
| | ,090 | 1,777 | 1,528 | 1,991 | ,250 | ,184 | ,299 |
| | ,100 | 1,815 | 1,566 | 2,029 | ,259 | ,195 | ,307 |
| | ,150 | 1,982 | 1,735 | 2,194 | ,297 | ,239 | ,341 |
| | ,200 | 2,126 | 1,882 | 2,336 | ,328 | ,275 | ,368 |
| | ,250 | 2,258 | 2,018 | 2,465 | ,354 | ,305 | ,392 |
| | ,300 | 2,383 | 2,147 | 2,587 | ,377 | ,332 | ,413 |
| | ,350 | 2,505 | 2,273 | 2,707 | ,399 | ,357 | ,433 |
| | ,400 | 2,627 | 2,399 | 2,827 | ,420 | ,380 | ,451 |
| | ,450 | 2,751 | 2,527 | 2,949 | ,439 | ,403 | ,470 |
| | ,500 | 2,878 | 2,658 | 3,076 | ,459 | ,425 | ,488 |
| | ,550 | 3,011 | 2,795 | 3,209 | ,479 | ,446 | ,506 |
| | ,600 | 3,153 | 2,940 | 3,353 | ,499 | ,468 | ,525 |
| | ,650 | 3,306 | 3,095 | 3,511 | ,519 | ,491 | ,545 |

| | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|------|------|------|
| ,700 | 3,476 | 3,264 | 3,688 | ,541 | ,514 | ,567 |
| ,750 | 3,669 | 3,453 | 3,894 | ,565 | ,538 | ,590 |
| ,800 | 3,896 | 3,672 | 4,142 | ,591 | ,565 | ,617 |
| ,850 | 4,179 | 3,937 | 4,460 | ,621 | ,595 | ,649 |
| ,900 | 4,564 | 4,287 | 4,908 | ,659 | ,632 | ,691 |
| ,910 | 4,663 | 4,374 | 5,025 | ,669 | ,641 | ,701 |
| ,920 | 4,772 | 4,470 | 5,155 | ,679 | ,650 | ,712 |
| ,930 | 4,895 | 4,578 | 5,303 | ,690 | ,661 | ,725 |
| ,940 | 5,036 | 4,701 | 5,475 | ,702 | ,672 | ,738 |
| ,950 | 5,202 | 4,843 | 5,678 | ,716 | ,685 | ,754 |
| ,960 | 5,404 | 5,015 | 5,928 | ,733 | ,700 | ,773 |
| ,970 | 5,663 | 5,234 | 6,253 | ,753 | ,719 | ,796 |
| ,980 | 6,026 | 5,537 | 6,715 | ,780 | ,743 | ,827 |
| ,990 | 6,648 | 6,045 | 7,519 | ,823 | ,781 | ,876 |

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 7 Dokumentasi dan Alat- alat Penelitian



(1)
Proses pengeringan herba
M.crenata



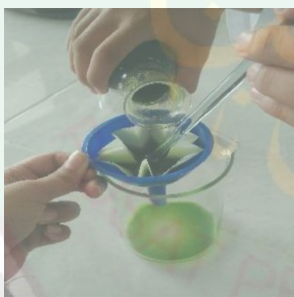
(2)
Proses grinding simplisia menjadi serbuk
halus herba *M.crenata*



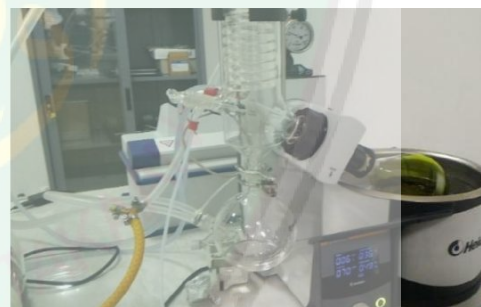
(3)
Penimbangan simplisia herba
M.crenata



(4)
Proses ekstraksi *M. crenata*
menggunakan UAE



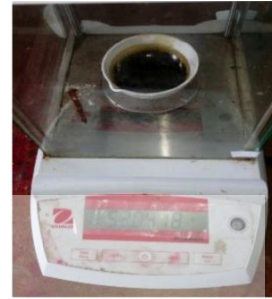
(5)
Proses penyaringan filtrate dan residu
ekstrak *M. crenata*



(6)
Proses pemisahan pelarut dari ekstrak
dengan *rotary evaporator*



(7)
Proses pengovenan ekstrak *M. crenata*



(8)
Proses penimbangan ekstrak
herba *M. crenata*



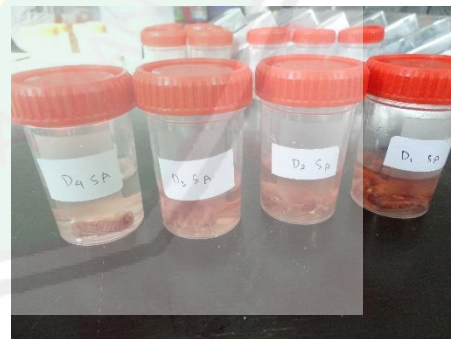
(9)
Proses Aklimatisasi mencit jantan



(10)
Proses pemberian perlakuan pada
mencit jantan



(11)
Proses pembedahan mencit jantan
dan pengambilan tulang trabekular
vertebra



(12)
Proses pengawetan tulang dengan
Formalin 10 %



(13)

Proses pembuatan preparat:



(14)

Proses pembuatan preparat:



(15)

Proses pembuatan preparat:



(16)

Preparat histologi tulang yang telah jadi



(17)

Pengamatan preparat histologi tulang trabecular vertebra