

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Chrysophyllum cainito* L.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT JANTAN**

SKRIPSI

Oleh:
FIRSTA ROISATUL ISLAMIYAH
NIM. 14670022



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

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Chrysophyllum cainito* L.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT JANTAN**

SKRIPSI

Oleh:
FIRSTA ROISATUL ISLAMIYAH
NIM. 14670022

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 *Chrysophyllum cainito* L.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT JANTAN**

SKRIPSI

Oleh:

**FIRSTA ROISATUL ISLAMIYAH
NIM. 14670022**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal 7 November 2018**

Pembimbing I,



Burhan Ma'arif Z.A., M. Farm., Apt.
NIP. 19900221 201801 1 001

Pembimbing II,



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 *Chrysophyllum cainito* L.
TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL OSTEOLAS TULANG
TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT JANTAN**

SKRIPSI

Oleh:
FIRSTA ROISATUL ISLAMIYAH
NIM. 14670022

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)
Tanggal: 7 November 2018

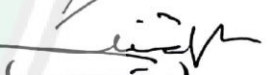
Ketua Penguji : Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.
NIP. 19800203 200912 2 003


(.....)

Anggota Penguji : 1. Burhan Ma'arif Z.A., M. Farm., Apt.
NIP. 19900221 201801 1 001


(.....)

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


(.....)

3. Abdul Hakim, M. P.I., M. Farm., Apt.
NIP. 19761214 200912 1 002


(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi




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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Firsta Roisatul Islamiyah

NIM : 14670022

Program studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *Chrysophyllum Cainito* L.
terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular
Vertebra Mencit Jantan

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 hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 November 2018

Yang membuat pernyataan,



Firsta Roisatul Islamiyah

NIM. 1467002

MOTTO

اعمل لدنياك كأنك تعيش أبداً، و اعمل لآخرتك كأنك تموت غداً

“Bekerjalah untuk duniamu seakan-akan engkau hidup selamanya. Beramallah untuk akhiratmu seakan-akan engkau akan mati besok”



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'aalamiin

Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah ﷻ beserta shalawat dan salam kepada nabi Muhammad ﷺ sehingga bisa terselesaikannya skripsi ini.

Disertai rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan tulisan karya sederhana ini kepada orang-orang yang selalu membantu penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Teruntuk orangtua, abah ibu yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan dari segala aspek. Kepada *Phytoestrogen Research Team* (Reyhan, Putra, Miftah, Kia, Izza) terimakasih telah melalui suka duka dalam penelitian ini bersama dengan sabar tanpa ada kata menyerah. Kepada sahabat-sahabat “Apple” yang telah membantu pengerjaan skripsi ini dan selalu mendoakan terutama Tri Aprillia Kusuma Wardani, Fatimah Fau`zul Rosyada, dan Muhammad Khoirur Rijal. Kepada para warga khayangan, Nimas, Irma, Elsy dan Aniqoh yang selalu membantu dan menemani perjuangan penulis dari awal perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini.

“Jazakumullah khairan wa ahsanal jaza”

KATA PENGANTAR



Segala puji bagi Allah SWT, karena atas rahmat, hidayah serta karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Ekstrak etanol 96% Daun *Chrysophyllum cainito* L. terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit Jantan” dengan sebaik-baiknya sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada program studi Farmasi jenjang Strata-1 Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa Allah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW, keluarga, sahabat dan ahlinya yang telah membimbing umat menuju kebahagiaan dunia dan akhirat.

Penulis menyadari adanya banyak keterbatasan yaang penulis miliki, sehingga ada banyak pihak yang telah memberikan bantuan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini. Maka dari itu dengan segenap kerendahan hari patutlah penulis menyampaikan doa dan mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Bapak Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp.B., Sp.BP-RE (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.
3. Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt selaku Ketua Jurusan sekaligus pembimbing II yang telah banyak memberikan saran, arahan, serta

4. bimbingan kepada penulis dengan penuh kesabaran dan Abdul Hakim, M. P.I., M. Farm., Apt selaku Sekretaris Jurusan sekaligus penguji agama.
5. Bapak Burhan Ma`arif Z.A., M. Farm., Apt. selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan banyak waktu untuk membimbing, motivasi, mengarahkan, serta memberikan banyak ilmu baru, kemudahan dan kepercayaan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
6. Ibu dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed yang telah memberikan banyak ilmu dan pengetahuan baru kepada penulis yang sangat membantu dalam penyelesaian skripsi.
7. Para Dosen Pengajar dan staf administrasi di Jurusan Farmasi yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama berada di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Keluarga tercinta, Abah M. Sya`roni dan Ibu Sutarlin, serta Adik Syahrul Hikam Agatha dan Adik Ahmad Yazid Ni`am Octriasa atas segala dukungan moral maupun materil, semangat, kasih sayang dan doa yang selalu diberikan kepada penulis. Semua keluarga besar penulis yang selalu mendoakan dan mendukung sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
9. Teman-teman Farmasi angkatan 2014 (Platinum Generation) atas dukungan, motivasi, kebersamaan, dan semua kenangan yang indah selama ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan selama masa penelitian dan penyusunan tugas akhir.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan penulis dalam penelitian ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi penyempurnaan penelitian ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak.

Malang, 13 November 2018

Penulis

Firsa Roisatul Islamiyah



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
HALAMAN PERNYATAAN	
MOTTO	
HALAMAN PERSEMBAHAN	
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
ABSTRAK	x
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.5. Batasan Masalah	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Tumbuhan dalam Perspektif Islam	8
2.2. Tinjauan Tanaman Kenitu.....	12
2.2.1. Klasifikasi Tanaman.....	12
2.2.2. Deskripsi.....	12
2.2.3. Kandungan Kimia dan Kegunaan	14
2.3. Tinjauan Ekstrak dan Metode Ekstraksi	15
2.3.1. Metode Ekstraksi.....	15
2.4. Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	16
2.5. Tinjauan tentang Tulang	17
2.5.1. Struktur Tulang	17
2.5.2. Sel Tulang	18
2.5.3. Remodeling Tulang	20
2.6. Tinjauan Osteoporosis	22
2.6.1. Definisi	22
2.6.2. Klasifikasi Osteoporosis.....	23
2.6.3. Faktor Risiko	25
2.6.4. Patofisiologi Osteoporosis	27
2.7. Tinjauan Androgen	28
2.8. Tinjauan Testosteron.....	30
2.9. Tinjauan Estrogen	31
2.10. Tinjauan Fitoestrogen.....	32
2.10.1 Contoh Fitoestrogen	33

2.10.2 Mekanisme Kerja	34
2.11. Histomorfometri	35
2.12. Uji ANOVA	38
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	40
3.1. Bagan Kerangka Konseptual	40
3.2. Uraian Kerangka Konseptual	41
3.3. Hipotesis Penelitian	42
BAB IV METODE PENELITIAN	43
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	43
4.1.1. Jenis Penelitian	43
4.1.2. Rancangan Penelitian	43
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian	43
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian	44
4.3.1. Populasi	44
4.3.2. Sampel	44
4.3.3. Sampel Hewan Coba	44
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	45
4.4.1. Variabel Penelitian	45
4.4.2. Definisi Operasional	45
4.5. Alat dan Bahan Penelitian	46
4.5.1. Instrumen Penelitian	46
4.5.2. Bahan Penelitian	46
4.6. Prosedur Penelitian	47
4.6.1. Penyiapan Simplisia <i>C. cainito</i>	47
4.6.2. Prosedur Ekstraksi	47
4.6.3. Uji Aktivitas Ekstrak 96% Daun <i>C. cainito</i> terhadap Peningkatan... Jumlah Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra	48
4.7. Analisis Data	56
4.8. Skema Rancangan Penelitian	57
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	58
5.1. Penyiapan Serbuk Simplisia	58
5.2. Pengukuran Kadar Air Serbuk Daun <i>C. cainito</i>	59
5.3. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun <i>C. cainito</i>	60
5.4. Hasil Skrining Fitokimia	62
5.5. Penginduksian Osteoporosis	66
5.6. Uji Efek Antiosteoporosis	69
5.7. Analisis Data	72
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	82
6.1. Kesimpulan	82
6.2. Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN – LAMPIRAN	91

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan	49
Tabel 5.1 Hasil penentuan kadar air serbuk simplisia daun <i>C. cainito</i>	60
Tabel 5.2 Rincian profil KLT ekstrak etanol 96% daun <i>C. cainito</i>	65
Tabel 5.3 Data rerata jumlah osteoblas tiap kelompok	70
Tabel 5.4 <i>P-value</i> uji normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	73
Tabel 5.5 <i>P-value</i> uji homogenitas varian <i>Levene's test</i>	74
Tabel 5.6 <i>P-value</i> ANOVA <i>one-way</i>	74
Tabel 5.7 Hasil uji LSD	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun <i>C. cainito</i>	13
Gambar 2.2 Sel osteoblas	19
Gambar 2.3 Sel osteosit.....	2020
Gambar 2.4 Sel osteoklas	20
Gambar 2.5 Proses Remodeling Tulang.....	22
Gambar 2.6 Struktur hormon steroid dan reseptor	29
Gambar 2.7 Jalur biosintesis steroid	31
Gambar 2.8 Struktur 17β -estradiol dan fitoestrogen.....	34
Gambar 3.1 Bagan kerangka koseptual.....	40
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Simplisia Kering Daun <i>C. cainito</i>	92
Lampiran 2: Data Jumlah Sel Osteoblas Tiap Kelompok.....	94
Lampiran 3: Hasil Analisis Data.....	95
Lampiran 4: Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian.....	99
Lampiran 5: Perhitungan.....	102
Lampiran 6: Surat Keterangan <i>Ethical clearance</i>	103
Lampiran 7: Determinasi Tanaman.....	104

DAFTAR SINGKATAN

CYP	: Enzim Sitokrom P
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
HE	: Hematoksilin dan Eosin
IL1	: Interleukin 1
IL6	: Interleukin 6
IL7	: Interleukin 7
IL11	: Interleukin 11
IOF	: <i>International Osteoporosis Foundation</i>
LDL	: <i>Low Density Lipid</i>
LH	: <i>Lutenising Hormone</i>
OPG	: Osteoprotegerin
PTH	: <i>Parathyroid Hormone</i>
RANK	: <i>Recseptor Activator of NuclearFactor-$k\beta$</i>
RANKL	: <i>Reseptor Activator of Nuclear Factor-$k\beta$ Ligand</i>
TGF α	: <i>Transforming Growth Factor α</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>

ABSTRAK

Islamiyah, Firsta Roisatul. 2018. **Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra Mencit Jantan**. Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Pembimbing I : Burhan Ma`arif Z. A., M. Farm., Apt.

Pembimbing II : Dr. Roihatul Muti`ah, M. Kes., Apt.

Osteoporosis akibat pemakaian glukokortikoid jangka panjang menjadi penyebab terjadinya osteoporosis sekunder dimana kondisi ini banyak dialami oleh pria daripada wanita yang berusia dibawah 55 tahun. Telah banyak bukti klinik tentang peran fitoestrogen dalam pengobatan osteoporosis untuk kondisi pascamenopause. *Chrysophyllum cainito* L. atau Kenitu merupakan salah satu tanaman Indonesia yang mengandung senyawa fitoestrogen, yaitu senyawa dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur atau fungsi dengan hormon estrogen. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek anti-osteoporosis ekstrak etanol 96% daun *Chrysophyllum cainito* L., dengan melihat adanya peningkatan jumlah sel osteoblast tulang trabekular vertebra mencit jantan yang diinduksi dexamethason. Pada penelitian ini, 30 ekor mencit jantan dikelompokkan secara *random* menjadi 6 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok yang diberi perlakuan menggunakan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan variasi dosis 2,4,8, dan 16 mg/20gBB mencit/hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah sel osteoblas paling sedikit terdapat pada kelompok kontrol negatif yaitu 114,67 buah dan jumlah terbanyak adalah kelompok perlakuan ekstrak dengan dosis 16 mg yaitu sebanyak 340,67 buah. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* memiliki aktivitas anti-osteoporosis yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah osteoblas yang signifikan pada semua kelompok setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol 96% *C. cainito* dan diperoleh nilai ED50 sebesar 9.5 mg / 20gBB mencit / hari.

Kata kunci: Daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.), fitoestrogen, osteoporosis, osteoblas

ABSTRACT

Islamiyah, Firsta Roisatul. 2018. **Activity Of 96% Ethanol Extract Of *Chrysophyllum Cainito* L. Leaves to Increase The Number Of Osteoblast Cells in Trabekular Vertebra Bone Male Mice**. Thesis. Department of Pharmacy Faculty of Medical and Health Science, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang.

Advisor I : Burhan Ma`arif Z. A., M. Farm., Apt.

Advisor II : Dr. Roihatul Muti`ah, M. Kes., Apt.

Osteoporosis due to glucocorticoid long term use can cause secondary osteoporosis. This condition may happen in men more than women less than 55 years of age. There has been a lot of clinical evidence about the role of phytoestrogens in the treatment of osteoporosis for postmenopausal conditions. *Chrysophyllum cainito* L. or known to the public as Kenitu is one of Indonesian plants that phytoestrogen compounds or the compounds from plants that have similar structures or functions to estrogen hormone. This study was conducted to analyze the anti-osteoporosis effect of 96% ethanol extract of *Chrysophyllum cainito* L. leaves to see an increase the number of osteoblast vertebral trabecular bone of male mice induced by dexamethasone. This study using 30 healthy male mice were randomly divided into 6 groups, there are negative control, positive control and treatment groups or the group that was treated using *C. cainito* leaves 96% ethanol extract suspension with dose variation 2,4,8, and 16 mg / 20gBB mice / day. The results of this study showed that the lowest number of osteoblast cell was 114, 67 pieces in negative control group and the highest number was 340,67 pieces in extract treatment with 16 mg of dose. So, this study can be concluded that *C. cainito* 96% ethanol extract has an anti-osteoporotic activity showed by there were a significant increase in the number of osteoblasts in the trabecular vertebrae bone male mice in all groups after being treated using *C. cainito* 96% ethanol extract and the ED₅₀ values is 9.5 mg / 20 gBB of mice / day.

Keywords: Kenitu leaves (*Chrysophyllum cainito* L.), phytoestrogen, osteoporosis, osteoblast

مستخلص البحث

الإسلامية، فرستا رئيسة. 2018. نشاط مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم *Chrysophyllum cainito* L. على زيادة عدد الخلايا بانية العظم (*Osteoblas*) في أنسجة غضروفية لذكور الفئران. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج.

المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير.
المشرف الثاني: د. رائحة المطيعة، الماجستير.

هشاشة العظام بسبب استخدام السكرية على المدى الطويل أدت إلى هشاشة العظام الثانوية التي أصابت الرجال أكثر من النساء دون سن 55. وقد أجري كثير من الأبحاث حول دور الفيتواستروجينات في علاج هشاشة العظام بعد سن الشيخوخة. كريزوفيلوم كينيتو أو ما يعرفه المجتمع بكينيتو هي نبات إندونيسية تختوي على مركبة الفيتواستروجينات، وهي مركبة من النباتات التي لديها بنية مماثلة أو وظيفة مع هرمون الاستروجين. وقد أجري هذا البحث لأجل معرفة الآثار المترتبة من مضادة هشاشة العظام بمستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو، ومقايستها هي زيادة عدد الخلايا بانية العظم في أنسجة غضروفية لذكور الفئران التي تم إعطاء بديكساميثازون لها. وإجراء هذا البحث، باستخدام 30 الفئران الذكور الصحي وقسمت عشوائيا إلى 6 مجموعات؛ مجموعة التحكم السلبي ومجموعة التحكم الإيجابي ومجموعة المعالج أو الفئران التي تلقت العلاج باستخدام تعليق الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو مع تنوع التركيزات في الجرعة 2 و 4 و 8 و 16 ملغ/20 غيب لكل الفئران يوميا. أظهرت نتائج هذا البحث أن هناك عدد الخلايا بانية العظم كان أقلها في مجموعة التحكم السلبي وهي 114,67 قطعة وأما أكثرها هي مجموعة المعالج أو الفئران التي تلقت العلاج باستخدام تعليق بجرعة 16 ملغ وهي 340,67 قطعة. إذا، يمكن استنتاج من هذا البحث أن تعليق الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو يملك مضادة هشاشة العظام التي أشارت إليها الزيادة في عدد الخلايا بانية العظم معنويا في جميع المجموعات بعد معالجته باستخدام تعليق الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو وحصلت على قيمة ED50 ك 9.5 ملغ/9.5 غيب لكل الفئران يوميا.

الكلمات الرئيسية: ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.)، والفيتواستروجينات، وهشاشة العظام، الخلايا بانية العظم (*Osteoblas*)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Osteoporosis merupakan suatu kondisi yang didefinisikan dengan hilangnya massa tulang yang membuat tulang melemah secara mekanis sehingga cenderung terjadi patah tulang. Osteoporosis disebut juga "*silent disease*" karena penderita tidak merasakan gejala hingga terjadi patah tulang (Nikose *et al.*, 2015). Hasil penelitian dari Puslitbang Gizi DepKes RI pada tahun 2005 di 16 wilayah di Indonesia menunjukkan angka prevalensi osteopenia 41,7%, sedangkan osteoporosis 10,3%. Prevalensi osteopenia dan osteoporosis pada laki-laki yang berusia kurang dari 55 tahun cenderung lebih tinggi daripada perempuan (Depkes RI, 2008). Pada laki-laki 40% kasus osteoporosis adalah osteoporosis sekunder. Tiga penyebab terbanyak adalah akibat pemakaian glukokortikoid jangka panjang, *hipogonadisme* dan asupan alkohol yang berlebihan. Faktor risiko lain osteoporosis sekunder adalah merokok, penyakit kronik (rematoid arthritis, gagal ginjal kronik) dan faktor genetik (Audran, 2010).

Rekomendasi penanganan osteoporosis sekunder akibat pemberian glukokortikoid jangka panjang meliputi modifikasi faktor risiko, pencegahan kejadian jatuh, latihan fisik teratur, suplemen vitamin D, penggantian steroid gonadal, terapi bisfosfonat atau *calcitonin*, PTH 1-34 dan pemeriksaan ulang *Bone Mineral Density* (BMD) (American College of Rheumatology, 2001). Penanganan ini sering menemui banyak kendala mengingat harga obat yang mahal dan masih tingginya efek samping. Karena kendala-kendala tersebut, peneliti mencoba

mencari alternatif untuk menangani permasalahan osteoporosis pada pria yaitu dengan menggunakan fitoestrogen karena telah banyak dilaporkan efek antiosteoporosis yang diuji secara in vivo menggunakan fitoestrogen pada mencit betina. Sejauh ini belum pernah dilaporkan uji aktivitas antiosteoporosis dari ekstrak etanol 96% daun *Chrysophyllum cainito* L. pada hewan coba jantan sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan.

Fitoestrogen merupakan golongan senyawa berasal dari tumbuhan yang memiliki struktur mirip estrogen atau dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen (Cos *et al.*, 2003). Selain mudah didapat dan tidak memiliki efek samping, senyawa golongan fitoestrogen juga dilaporkan mempunyai khasiat untuk meningkatkan massa tulang sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan osteoporosis yang potensial (Yang *et al.*, 2012). Contoh senyawa fitoestrogen adalah flavonoid dan terpenoid. Salah satu golongan flavonoid yang memiliki efek estrogenik dan dapat digunakan sebagai antiosteoporosis adalah isoflavon (Samruan, 2014). Terpenoid juga telah dilaporkan memiliki beberapa aktivitas yang terhubung dalam jalur estrogenik karena variasi struktur yang berasal dari unit isoprena sederhana. Salah satu penyakit yang terhubung dalam jalur estrogenik adalah osteoporosis (Kiyama, 2017). Tanaman yang mengandung flavonoid dan terpenoid adalah *Chrysophyllum cainito* L. atau tanaman kenitu.

Pada umumnya *C. cainito* dipercaya dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Infus daun yang kaya akan tanin dipercaya oleh masyarakat Kuba di Miami sebagai obat kanker (Ningsih *et al.*, 2016). Infus daun juga dapat

digunakan untuk pengobatan diabetes dan rematik persendian (Das *et al.*, 2010). Ekstrak metanol serta fraksi dari daun *C. cainito* juga telah diteliti dapat menjadi agen antihipersensitivitas dan antiinflamasi pada mencit yang diinduksi karageenan (Meira *et al.*, 2014). Selain itu, telah dilakukan pula penelitian oleh Utaminingtyas (2017) dan Mustofa (2018) mengenai efek antiosteoporosis dari ekstrak etanol 70% dan etil asetat daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan tulang traberkular vertebra mencit betina yang diinduksi deksametason dengan parameter yang digunakan adalah peningkatan ketebalan tulang. Penelitian tersebut yang menunjukkan hasil positif bahwa kedua ekstrak tersebut memiliki aktivitas antiosteoporosis. Senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam daun *C. cainito* adalah alkaloid, flavonoid, fenol, sterol, dan triterpenoid (Koffi *et al.*, 2009).

Penelitian ini dilakukan dalam usaha penemuan obat baru untuk pengobatan osteoporosis dimana prevalensi penyakit ini setiap tahunnya terjadi peningkatan. Usaha penemuan obat baru dari tanaman merupakan salah satu contoh implementasi ayat Al Qur'an dan Hadist. Allah SWT telah menjelaskan dalam Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara' Ayat 7 bahwa Allah memperingatkan akan keagungan dan kekuasaan-Nya, jika manusia melihat dengan hati dan mata niscaya akan mengetahui bahwa Allah yang berhak disembah, Allah yang Maha Kuasa atas segala sesuatu (Al-Qurthubi, 2008).

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

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

Serta hadist yang diriwayatkan oleh Muslim, bahwa Rasulullah saw bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّوَجَلَّ

Artinya: “Setiap penyakit ada obatnya, jika obat itu sesuai dengan penyakitnya, akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jalla”

Penelitian ini dilakukan sesuai dengan petunjuk yang terdapat dalam firman Allah dan hadits Rosulallah yang menegaskan bahwa di dalam tumbuhan yang tumbuh di bumi terdapat “sifat yang baik”, hal ini bila dihubungkan dengan maksud hadits riwayat Muslim diatas maka “sifat yang baik” dapat diartikan sebagai sumber atau bahan pengobatan untuk mengobati penyakit, karena semua penyakit pasti ada obatnya.

Salah satu metode yang sering digunakan untuk untuk menilai kualitas tulang dan untuk mengevaluasi efek pengobatan terhadap mineralisasi tulang dan mikroarsitektur tulang adalah histomorfometri. Selain itu, histomorfometri dipergunakan untuk penilaian kuantitatif dari perubahan terkait pengobatan di beberapa indeks remodeling tulang di tingkat sel dan jaringan (Chavassieux *et al.*, 2000) sehingga dapat digunakan untuk mengamati kenaikan jumlah sel osteoblas pada mencit setelah diberi perlakuan.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menggali manfaat lain dari daun *C. cainito* dalam bidang kesehatan dan melengkapi data ilmiah mengenai aktivitas daun *C. cainito* sebagai agen antiosteoporosis. Adanya kandungan flavonoid dan terpenoid pada daun *C. cainito* dapat menjadi landasan untuk dilakukannya penelitian mengenai aktivitas antiosteoporosis dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang diukur dari peningkatan jumlah sel osteoblas pada

mencit jantan yang diinduksi deksametason, sehingga dapat diperoleh data-data ilmiah yang bermanfaat pada penggunaannya sebagai tanaman obat. Pada penelitian ini digunakan hewan coba berupa mencit jantan karena prevalensi osteoporosis sekunder yaitu jenis osteoporosis yang disebabkan karena penggunaan obat golongan kortikosteroid jangka panjang pada pria lebih tinggi daripada wanita sehingga dapat digunakan mencit jantan karena induksi osteoporosis pada penelitian ini menggunakan deksametason (Migliaccio, 2009). Deksametason merupakan salah satu obat golongan kortikosteroid . Konsumsi obat golongan ini dalam waktu panjang dapat meningkatkan resorpsi tulang dan memicu terjadinya osteoporosis (Mazziotti *et al.*, 2006). Kortikosteroid dapat menghambat kerja osteoblas, sehingga penurunan formasi tulang akan terjadi. Dengan terjadinya peningkatan kerja osteoklas dan penurunan kerja dari osteoblas, maka akan terjadi osteoporosis (Lane, 1999 dalam Wardhana, 2012). Oleh karena itu digunakan parameter peningkatan jumlah sel osteoblas pada mencit jantan yang telah diinduksi deksametason dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu kelompok yang diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan berbagai dosis, kelompok kontrol positif yang diterapi menggunakan natrium alendronat serta kontrol negatif atau kelompok yang tidak diberi perlakuan.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* mempunyai aktivitas dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason?
2. Berapa ED_{50} ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi ekstrak etanol 96% dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit jantan yang diinduksi deksametason
2. Mengetahui ED_{50} ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason

1.4. Manfaat Penelitian

1. Mengembangkan pengobatan alternatif yang potensial dalam mengatasi penyakit degeneratif akibat defisiensi estrogen, seperti osteoporosis.
2. Meningkatkan pemanfaatan *C. cainito* akan meningkatkan nilai ekonomi *C. cainito*.

3. Menambah referensi dan kekayaan intelektual bagi akademisi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim.

1.5. Batasan Masalah

Pada penelitian ini masalah dibatasi hanya pada permasalahan berikut untuk mencegah kemungkinan masalah meluas

1. Bagian tumbuhan *C. cainito* yang diuji aktivitasnya adalah bagian daun.
2. Uji yang dilakukan yaitu uji aktivitas antiosteoporosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit yang diinduksi deksametason dan penentuan ED₅₀ ekstrak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup sekaligus sumber daya alam yang sangat banyak jumlah maupun jenisnya. Secara geografis, Indonesia terdiri atas dataran rendah, dataran tinggi, dan pegunungan dengan puncak yang menjulang tinggi. Karena keadaan inilah, Indonesia memiliki keanekaragaman tanaman yang tinggi. Selain itu, secara astronomi, Indonesia memiliki iklim tropis dengan curah hujan tinggi sehingga memungkinkan memiliki tanaman yang subur dengan berbagai tanaman yang tumbuh di atasnya. Sebagaimana firman Allah dalam QS. Al Imran ayat 190-191 sebagai berikut bahwa Allah menciptakan segala sesuatu tidaklah sia-sia, salah satu ciptaan-Nya yaitu tumbuhan yang hidup di Indonesia.

إِن فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ
الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ

السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: 190. "Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal", 191. "(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka" (QS. Ali Imran/3:190-191)

Pada QS. Ali Imran ayat 190-191, Allah SWT memerintahkan kita untuk melihat dan merenung pada tanda-tanda ke-Tuhanan. Karena tanda-tanda tersebut tidak mungkin ada kecuali diciptakan oleh Yang Maha Hidup, Yang Maha Suci, Maha Kaya dan tidak membutuhkan apapun yang ada di alam semesta. Dengan menyakini hal tersebut maka keimanan mereka bersandarkan atas keyakinan yang benar. Inilah salah satu fungsi akal yang diberikan kepada seluruh manusia, yaitu agar mereka dapat menggunakan akal tersebut untuk merenungi tanda-tanda yang telah diberikan oleh Allah SWT (Al-Qurthubi, 2008).

Allah menciptakan langit, bumi, dan seisinya tidak ada yang sia-sia termasuk penciptaan tanaman. Segala jenis tanaman ada manfaatnya dan hendaklah dimanfaatkan sebaik-baiknya dan dicari manfaatnya. Sebagai makhluk yang berakal, sudah seharusnya manusia berpikir serta terus memuji segala kekuasaan Allah atas segala hal yang diciptakan-Nya. Salah satu contoh pemanfaatan tanaman adalah tanaman dimanfaatkan sebagai obat sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW dalam hadis yang diriwayatkan oleh Ibnu Majah dibawah ini

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: Allah tidak menciptakan penyakit tanpa menciptakan pula obat untuknya (HR. Ibnu Majah).

Hadis tersebut menyebutkan bahwa Allah maha adil. Allah menciptakan penyakit beserta obatnya. Hal ini dapat menjadi keyakinan bagi manusia untuk terus mencari obat-obatan tersebut yang telah Allah sediakan di alam seperti obat-

obatan yang berasal dari tumbuhan. Bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan pun beragam ditunjukkan pada QS. Al Fath ayat 29 berikut :

مُحَمَّدٌ رَسُولُ اللَّهِ ۚ وَالَّذِينَ مَعَهُ أَشِدَّاءُ عَلَى الْكُفَّارِ رُحَمَاءُ بَيْنَهُمْ ۖ تَرَاهُمْ رُكَّعًا
 سُجَّدًا يَبْتَغُونَ فَضْلًا مِّنَ اللَّهِ وَرِضْوَانًا ۖ سِيمَاهُمْ فِي وُجُوهِهِمْ مِّنْ أَثَرِ السُّجُودِ ۚ
 ذَٰلِكَ مَثَلُهُمْ فِي التَّوْرَةِ ۚ وَمَثَلُهُمْ فِي الْإِنْجِيلِ كَزَرْعٍ أَخْرَجَ شَطْأَهُ فَآزَرَهُ
 فَاسْتَغْلَظَ فَاسْتَوَىٰ عَلَىٰ سُوقِهِ يُعْجِبُ الزُّرَّاعَ لِيَغِيظَ بِهِمُ الْكُفَّارَ ۗ وَعَدَ اللَّهُ
 الَّذِينَ ءَامَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ مِنْهُمْ مَغْفِرَةً وَأَجْرًا عَظِيمًا

Artinya: “Muhammad itu adalah utusan Allah dan orang-orang yang bersama dengan dia adalah keras terhadap orang-orang kafir, tetapi berkasih sayang sesama mereka. Kamu lihat mereka ruku' dan sujud mencari karunia Allah dan keridhaan-Nya, tanda-tanda mereka tampak pada muka mereka dari bekas sujud. Demikianlah sifat-sifat mereka dalam Taurat dan sifat-sifat mereka dalam Injil, yaitu seperti tanaman yang mengeluarkan tunasnya maka tunas itu menjadikan tanaman itu kuat lalu menjadi besarlah dia dan tegak lurus di atas pokoknya; tanaman itu menyenangkan hati penanam-penanamnya karena Allah hendak menjengkelkan hati orang-orang kafir (dengan kekuatan orang-orang mukmin). Allah menjanjikan kepada orang-orang yang beriman dan mengerjakan amal yang saleh di antara mereka ampunan dan pahala yang besar” (QS. Al Fath/48:29).

Pada QS. Al Fath ayat 29 dijelaskan bahwa Nabi Muhammad SAW adalah utusan Allah dan orang-orang yang bersamanya mengikuti agamanya sangat keras terhadap orang kafir. Mereka (orang-orang yang bersama nabi Muhammad) ialah orang-orang yang memiliki sifat seperti tanaman yang mengeluarkan batang dan dahannya menjadi banyak dan menjadi kuat lalu ia menjadi kuat dan tegak lurus diatas pokoknya dalam keadaan indah dipandang yang menyenangkan hati penanam-penanamnya. Karena Allah bermaksud

menjengkelkan hati orang kafir dengan banyaknya orang mukmin dan penampilan yang menawan (Alusy, 2011).

Pada ayat tersebut diterangkan bahwa salah satu kebesaran Allah adalah Allah menciptakan tanaman yang mengeluarkan tunas maka tunas itu menjadikan tanaman itu kuat dan menjadi besar, tegak lurus di atas pokoknya serta agar tanaman itu menyenangkan hati penanam-penanamnya. Tanaman tersebut dapat menyenangkan hati penanamnya dengan cara indah dipandang dan banyak manfaatnya. Allah menciptakan pohon yang kokoh yang terlihat dengan jelas bagian daun, akar, dan batang. Dimana setiap bagian tersebut dapat dieksplorasi manfaatnya karena kembali pada QS. Ali Imran ayat 190-192 bahwa Allah menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia. Allah juga menjadikan orang mukmin pengikut nabi Muhammad seperti pohon tersebut diharapkan orang-orang mukmin juga dapat menggali manfaat dari tumbuhan-tumbuhan tersebut sehingga didapatkan ilmu-ilmu baru yang bermanfaat untuk semua orang.

2.2. Tinjauan Tanaman Kenitu

2.2.1. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tumbuhan kenitu adalah sebagai berikut

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Trachebionta
Divisi	: Magnoliophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dileniidae
Ordo	: Ebenales
Family	: Sapotaceae
Genus	: <i>Chrysophyllum</i> L.
Spesies	: <i>Chrysophyllum cainito</i> L.

(United States Departement of Agliculture, 2003)

2.2.2. Deskripsi

Tanaman kenitu atau *C. cainito* merupakan tumbuhan berkayu yang memiliki akar tunggal, kulit batangnya berwarna abu-abu gelap hingga keputihan dan banyak bagian pohon yang mengeluarkan getah. Tanaman kenitu memiliki bunga berwarna kekuningan hingga putih lembayung yang terletak di ketiak daun. Bunga kecil-kecil bertangkai panjang dengan kelopak berjumlah 5 berbentuk bulat, mahkota tabung, bercuping 5 dengan panjang hingga 4 mm (Das *et al.*, 2010).

Tanaman kenitu atau *C.cainito* berbuah pada musim kemarau setelah berumur 5-6 tahun. Buah kenitu berbentuk bulat dengan diameter 5-10 cm, kulit buah berwarna coklat keunguan, hijau kekuningan hingga putih licin dan mengkilat. Kulit agak tebal, liat, banyak mengandung lateks dan tak dapat dimakan. Daging buah putih atau keunguan, lembut dan banyak mengandung sari buah, manis, membungkus endokarp berwarna putih yang terdiri dari 4-11 ruang yang bentuknya mirip bintang jika dipotong melintang bulat, warna hijau keputih-putihan. Bijinya 3-10 butir, pipih agak bulat telur, panjang sekitar 1 cm berwarna coklat muda sampai hitam keunguan dan keras berkilap (Zulaikhah, 2015).

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



Gambar 2.1 Daun *C. cainito*
(Sumber: Koffi *et al.*, 2009)

2.2.3. Kandungan Kimia dan Kegunaan

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

Bagian pohon kenitu yang berkhasiat obat adalah kulit kayu, getah, buah, biji, dan daunnya. Buah kenitu segar yang dikonsumsi dapat mengurangi peradangan pada tengorokan dan paru-paru. Buah setengah masak digunakan untuk mengobati gangguan usus, namun bila berlebihan dapat menyebabkan sembelit. Sedangkan infus kulit buah kaya akan zat tanin yang dapat digunakan untuk tonik, stimulan, obat diare, disentri, menghentikan pendarahan, radang dan obat gonorrhoe. Biji kenitu yang rasanya pahit dimanfaatkan sebagai obat penurun panas, tonik dan diuretik dengan cara ditumbuk. Getah pohon kenitu di Brazil dimanfaatkan untuk mengobati abses, sedangkan di tempat lain digunakan sebagai diuretik, obat penurun panas dan obat untuk disentri (Morton, 1987). Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada 12 ekstrak buah yang dapat dimakan menunjukkan sembilan buah memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, diantaranya yaitu: buah kenitu menghasilkan senyawa antioksidan antosianin, dan sianidin-3-O- β -glukopiranosida (Einbond *et al.*, 2004) sehingga digunakan sebagai ramuan tradisional antidiabetes oleh suku Aboude-Mandeki. Ekstrak daun kenitu mengandung alkaloid, sterol atau triterpenoid yang berperan dalam menurunkan kadar glukosa dengan mekanisme antioksidan (Koffi *et al.*, 2009).

2.3. Tinjauan Ekstrak dan Metode Ekstraksi

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan memerlukan cara yang khusus dan spesifik untuk menariknya agar diperoleh senyawa yang lebih murni. Cara penarikan senyawa khusus dan spesifik tersebut dinamakan ekstraksi. Ekstraksi adalah kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut dalam pelarut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Hasil dari ekstraksi adalah terbentuknya sediaan ekstrak yang dapat berupa serbuk kering, kental, dan cair. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia bisa diperoleh dengan kadar yang tinggi sehingga mempermudah dalam hal penentuan dosis khasiatnya (Depkes RI, 2000). Metode ekstraksi yang sering digunakan untuk menarik senyawa aktif adalah metode konvensional seperti maserasi dan ekstraksi menggunakan bantuan gelombang ultrasonik.

2.3.1. Metode Ekstraksi

Salah satu metode ekstraksi konvensional yang sering digunakan adalah maserasi. Maserasi adalah proses mengekstraksi simplisia dengan cara merendamnya menggunakan pelarut yang sesuai dan wadah yang tertutup pada suhu kamar dengan dilakukan pengadukan sesekali secara konstan untuk meningkatkan kecepatan ekstraksi. Pada prosedur maserasi, terdapat istilah remaserasi, yakni setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, ditambahkan pelarut lalu dilanjutkan maserasi berikutnya, dan seterusnya. Hal ini memakan waktu yang cukup lama bisa beberapa hari bahkan beberapa minggu. Kelemahan lain adalah ekstraksi yang tidak optimal bila ada senyawa yang kurang larut dalam

suhu kamar. Namun, itu menjadi salah satu kelebihan maserasi, yakni tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas karena dilakukan pada suhu kamar (Depkes RI, 2000).

Saat ini telah dikembangkan teknik baru untuk ekstraksi padat-cair suatu produk yaitu dengan menggunakan bantuan gelombang ultrasonik. Teknik ini dikenal dengan sonokimia yaitu pemanfaatan efek gelombang ultrasonik untuk mempengaruhi perubahan-perubahan yang terjadi pada proses (Fuadi, 2012). Ultrasonik bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi. Salah satu kelebihan metode ekstraksi ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi, dibandingkan dengan ekstraksi termal atau ekstraksi konvensional, metode ultrasonik ini lebih aman, lebih singkat, dan meningkatkan jumlah rendemen kasar. Ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak yang tidak tahan panas, sehingga cocok untuk diterapkan pada ekstraksi senyawa bioaktif tidak tahan panas (Handayani *et al.*, 2016).

2.4. Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Prinsip KLT yaitu perpindahan analit pada fase diam karena pengaruh fase gerak. Proses ini biasa disebut elusi. Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin

sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya (Gritter *et al.*, 1991). Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Rohman, 2007).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna cara yang paling sederhana adalah dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluorosensi jika disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dengan pemanasan (Gritter *et al.*, 1991).

2.5. Tinjauan tentang Tulang

2.5.1. Struktur Tulang

Secara garis besar tulang dikenal ada dua tipe yaitu tulang korteks (kompak) dan tulang trabekular (berongga = spongy = cancelous). Bagian luar dari tulang merupakan tulang padat yang disebut korteks tulang dan bagian dalamnya adalah tulang trabekular yang tersusun seperti bunga karang (Bunckwalter *et al.*, 1995).

Tulang korteks merupakan bagian terbesar (80%) penyusun kerangka, mempunyai fungsi mekanik, modulus elastisitas yang tinggi dan mampu menahan

tekanan mekanik berupa beban tekukan dan puntiran yang berat. Tulang korteks terdiri dari lapisan padat kolagen yang mengalami mineralisasi, tersusun konsentris sejajar dengan permukaan tulang. Tulang korteks terdapat pada tulang panjang dan vertebra. Tulang spongiosa atau cancellous atau trabekular mempunyai elastisitasnya lebih kecil dari tulang korteks, mengalami proses resorpsi lebih cepat dibandingkan dengan tulang korteks. Tulang spongiosa terdapat pada daerah metafisis dan epifisis tulang panjang serta pada bagian dalam tulang pendek (Bunckwalter *et al.*, 1995).

Korteks tulang tersusun seperti osteon atau sistem *havers*, yaitu lapisan konsentris terdiri dari kanal dengan panjang > 2 mm dan lebar 2 mm dimana didalamnya terdapat osteosit dan pembuluh darah untuk nutrisi. Trabekular tulang tersusunan lamelar dan terdapat pembuluh darah yang berhubungan dengan sumsum tulang. Bagian trabekular tulang tulang rentan terhadap pengeroposan tulang (Rachman, 2006).

2.5.2. Sel Tulang

1. *Osteoprogenitor cell* (sel osteoprogenitor)

Sel osteoprogenitor berasal dari mesenkim yang merupakan jaringan penghubung yang masih bersifat embrional, oleh karena itu osteoprogenitor masih memiliki kemampuan untuk mitosis, dengan demikian sel ini berfungsi sebagai sumber sel baru dari osteoblas dan osteoklas (Bord *et al.*, 2001).

2. Osteoblas

Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari sel progenitor. Sel ini bertanggung jawab pada pembentukan dan proses mineralisasi tulang.

Osteoblas membangun tulang dengan membentuk kolagen tipe 1 dan proteoglikan sebagai matriks tulang atau jaringan osteoid melalui suatu proses yang disebut osifikasi. Pembentukan osteoblas dimulai dari prekursor sel stroma menjadi preosteoblas yang kemudian berkembang menjadi osteoblas yang dapat diaktifkan sehingga akhirnya dapat membentuk osteosit. Ketika sedang aktif menghasilkan jaringan osteoid, osteoblas akan mensekresikan sejumlah besar fosfatase alkali, yang memegang peranan penting dalam mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang (Erickson *et al.*, 1992).



Gambar 2.2 Sel osteoblas
(Anonim, 2017)

3. Osteosit

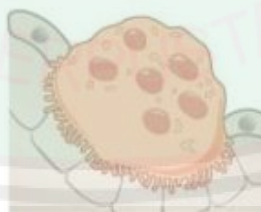
Osteosit memiliki satu inti, jumlah organela bervariasi. Jaringan sel ini menjangkau permukaan luar dan dalam tulang, membuat tulang menjadi sensitif terhadap pengaruh tekanan, mengontrol pergerakan ion serta mineralisasi tulang. Osteosit berasal dari osteoblas yang pada akhir proses mineralisasi terhimpit oleh ekstraselular matriks, berperan dalam pemeliharaan massa dan struktur tulang (Bord *et al.*, 2001).



Gambar 2.3 Sel osteosit
(Anonim, 2017)

4. Osteoklas

Osteoklas adalah sel-sel besar berinti banyak yang memungkinkan mineral dan matriks tulang dapat diabsorpsi. Tidak seperti osteoblas dan osteosit, osteoklas mengikis tulang. Sel-sel ini menghasilkan enzim-enzim proteolitik yang memecahkan matriks dan beberapa asam yang melarutkan mineral tulang, sehingga kalsium dan fosfat terlepas ke dalam aliran darah (Sylvia dan Lorraine, 1995). Osteoklas ini bersifat mirip dengan sel fagositik lainnya dan berperan aktif dalam proses resorpsi tulang. Osteoklas merupakan sel fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus (10-20 nuklei) dengan ukuran besar dan berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Marcus *et al.*, 1996).



Gambar 2.4 Sel osteoklas
(Anonim, 2017)

2.5.3. Remodeling Tulang

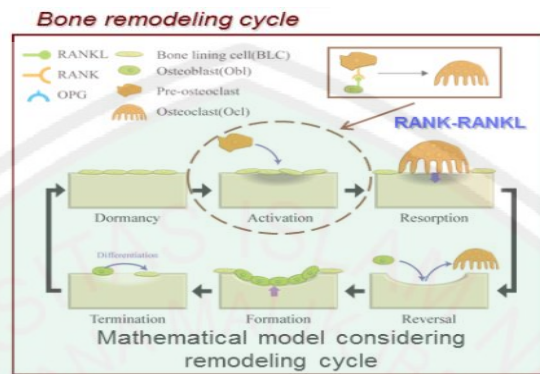
Proses remodeling meliputi dua aktivitas yaitu: proses pembongkaran tulang (*bone resorption*) yang diikuti oleh proses pembentukan tulang baru (*bone formation*), proses yang pertama dikenal sebagai aktivitas osteoklas sedang yang

kedua dikenal sebagai aktivitas osteoblas (Murray, 2003). Proses remodeling melibatkan dua sel utama yaitu osteoblas dan osteoklas, dan kedua sel tersebut berasal dari sumsum tulang (*bone marrow*) (Manolagas, 2000).

Monologas (1995) dalam Mahmudati (2011) menyatakan bahwa proses remodeling tulang merupakan suatu siklus yang meliputi tahapan yang kompleks yaitu:

1. Tahap aktivasi (*activation phase*) adalah tahap interaksi antara prekursor osteoblas dan osteoklas, kemudian terjadi proses diferensiasi, migrasi, dan fusi *multinucleated osteoclast* dan osteoklas yang terbentuk kemudian akan melekat pada permukaan matrik tulang dan akan dimulai tahap berikutnya yaitu tahap resorpsi.
2. Tahap resorpsi (*resorption phase*) adalah tahap pada waktu osteoklas akan mendegradasi seluruh komponen matriks tulang termasuk kolagen. Setelah terjadi resorpsi maka osteoklas akan membentuk lekukan atau cekungan tidak teratur yang biasa disebut lakuna howship pada tulang trabekular dan saluran haversian pada tulang kortikal.
3. Tahap reversal (*reversal phase*), adalah tahap pada waktu permukaan tulang sementara tidak didapatkan adanya sel kecuali beberapa sel *mononuclear* yakni makrofag, kemudian akan terjadi degradasi kolagen lebih lanjut dan terjadi deposisi proteoglikan untuk membentuk *command line* yang akan melepaskan faktor pertumbuhan untuk dimulainya tahap formasi.
4. Tahap formasi (*formation phase*), adalah tahap pada waktu terjadi proliferasi dan diferensiasi prekursor osteoblas yang dilanjutkan dengan pembentukan matrik

tulang yang baru dan akan mengalami mineralisasi. Tahap formasi akan berakhir ketika defek (cekungan) yang dibentuk oleh osteoklas telah diisi.



Gambar 2.5 Proses Remodeling Tulang
(Takenaka, 2011)

2.6. Tinjauan Osteoporosis

2.6.1. Definisi

Hilangnya sejumlah massa tulang akibat bertambahnya umur merupakan keadaan fisiologik yang disebut sebagai osteopenia. Sedangkan osteoporosis merupakan osteopenia yang telah melewati ambang batas untuk terjadi fraktur (*Fracture threshold*). Keadaan ini memiliki karakteristik berupa menurunnya massa tulang dengan jumlah jaringan tulang yang mengisi tulang berkurang, tetapi struktur tulang sendiri masih normal (Silalahi, 2012).

Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan massa tulang, kemunduran mikroarsitektur tulang, dan peningkatan fragilitas tulang, sehingga resiko fraktur menjadi lebih besar. Pengurangan massa tulang tersebut dapat terjadi sebagai akibat ketidakseimbangan antara resorpsi dan formasi tulang (Matthew *et al.*, 2016). Insiden osteoporosis meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi usia lanjut

(Sennang *et al.*, 2006). Fraktur osteoporotik dapat mempengaruhi tulang rangka mana saja kecuali kepala. Fraktur sering terjadi di bagian distal lengan bawah (*Colles' fracture*), vertebra thorakalis, vertebra lumbalis, dan bagian proksimal femur (Kleerekoper and Avioli, 1993).

2.6.2. Klasifikasi Osteoporosis

Osteoporosis dapat dibagi dalam dua golongan besar menurut penyebabnya, yaitu osteoporosis primer dan osteoporosis sekunder (Silalahi, 2012).

2.6.2.1. Osteoporosis Primer

Osteoporosis primer adalah osteoporosis yang penyebabnya tidak diketahui. Osteoporosis primer dibagi lagi menjadi dua, yaitu :

1. Tipe 1 (*Postmenopausal Osteoporosis*)

Penurunan hormon estrogen secara alamiah terjadi pada usia masa klimakterium (40 tahun) dan menimbulkan gangguan haid yang semula teratur menjadi tidak teratur. Memasuki masa pascamenopause, gejala yang paling menonjol adalah berdebar, pelupa, nyeri tulang belakang, rasa lemah, lesu, dan osteoporosis. Khususnya pada wanita, kejadian osteoporosis diperberat dengan menurunnya dan atau hilangnya hormon estrogen pada usia lanjut (Anggraini, 2008). Pada tipe ini, akan terjadi osteoporosis spinal (trabekular) yang berakibat terjadinya fraktur vertebra. Sedangkan dengan meningkatnya umur, selain ditemukan fraktur spinal maka akan sering pula ditemukan osteoporosis pada tulang panjang (kortikal) yang akan berakibat pada terjadinya fraktur femur (*Hip fracture*) (Silalahi, 2012).

2. Tipe 2 (*Senile Osteoporosis*)

Tipe 2 ini banyak ditemui pada usia di atas 70 tahun dan dua kali lebih banyak pada wanita dibanding laki-laki pada umur yang sama. Kelainan pertulangan terjadi pada bagian kortek maupun di bagian trabikula. Tipe ini sering dikaitkan dengan patah tulang kering dekat sendi lutut, tulang lengan atas dekat sendi bahu, dan patah tulang paha dekat sendi panggul. Osteoporosis jenis ini terjadi karena gangguan pemanfaatan vitamin D oleh tubuh, misalnya karena keadaan kebal terhadap vitamin D (vit. D resisten) atau kekurangan dalam pembentukan vitamin D (sintesis vit. D) dan bisa juga disebabkan karena kurangnya sel-sel perangsang pembentukan vitamin D (vit. D reseptor) (Ramadani, 2010).

2.6.2.2. Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder adalah osteoporosis yang diketahui penyebabnya seperti penyakit endokrin antara lain akromegali, sindrom Cushing, hiperparatiroidisme, diabetes mellitus tipe 1. Penyebab lain adalah proses keganasan seperti mieloma multipel dan akibat pemberian kortikosteroid golongan glukokortikoid jangka panjang atau kemoterapi dan radiasi terapi. Osteoporosis sekunder lebih jarang ditemukan, hanya 5% dari seluruh osteoporosis. Osteoporosis sekunder terdapat pada 20-35% wanita dan 40-55% pria, dengan gejalanya berupa fraktur pada vertebra dua atau lebih. Osteoporosis akibat glukokortikoid merupakan penyebab terbanyak osteoporosis sekunder dan nomor tiga setelah postmenopause dan usia lanjut (Ramadani, 2010).

2.6.3. Faktor Risiko

Osteoporosis dapat menyerang setiap orang dengan faktor risiko yang berbeda. Berikut ini faktor risiko osteoporosis yang tidak dapat dikendalikan:

1. Jenis kelamin

Jenis kelamin merupakan salah satu faktor risiko terjadinya osteoporosis. Wanita secara signifikan memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjadinya osteoporosis. Pada osteoporosis primer, perbandingan antara wanita dan pria adalah 5 : 1. Pria memiliki prevalensi yang lebih tinggi untuk terjadinya osteoporosis sekunder, yaitu sekitar 40-60%, karena akibat dari hipogonadisme, konsumsi alkohol, atau pemakaian kortikosteroid yang berlebihan (Migliaccio, 2009).

2. Usia

Semua bagian tubuh berubah seiring dengan bertambahnya usia, begitu juga dengan rangka tubuh. Mulai dari lahir sampai kira-kira usia 30 tahun, jaringan tulang yang dibuat lebih banyak daripada yang hilang. Tetapi setelah usia 30 tahun situasi berbalik, yaitu jaringan tulang yang hilang lebih banyak daripada yang dibuat (Lane (1999) dalam Wardhana, 2012).

3. Menopause

Wanita yang memasuki masa menopause akan terjadi fungsi ovarium yang menurun sehingga produksi hormon estrogen dan progesteron juga menurun. Ketika tingkat estrogen menurun, siklus remodeling tulang berubah dan pengurangan jaringan tulang akan dimulai. Salah satu fungsi estrogen adalah mempertahankan tingkat remodeling tulang yang normal. Tingkat resorpsi tulang

akan menjadi lebih tinggi daripada formasi tulang, yang mengakibatkan berkurangnya massa tulang. Sangat berpengaruh terhadap kondisi ini adalah tulang trabekular karena tingkat *turnover* yang tinggi dan tulang ini sangat rentan terhadap defisiensi estrogen. Tulang trabekular akan menjadi tipis dan akhirnya berlubang atau terlepas dari jaringan sekitarnya. Ketika cukup banyak tulang yang terlepas, tulang trabekular akan melemah (Lane (1999) dalam Wardhana, 2012).

4. Penggunaan kortikosteroid jangka panjang

Kortikosteroid banyak digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit, terutama penyakit autoimun, namun kortikosteroid yang digunakan dalam jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya osteoporosis sekunder dan fraktur osteoporotik. Kortikosteroid dapat menginduksi terjadinya osteoporosis bila dikonsumsi lebih dari 7,5 mg per hari selama lebih dari 3 bulan (Jehle, 2003).

Kortikosteroid akan menyebabkan gangguan absorpsi kalsium di usus, dan peningkatan ekskresi kalsium pada ginjal, sehingga akan terjadi hipokalsemia. Selain berdampak pada absorpsi kalsium dan ekskresi kalsium, kortikosteroid juga akan menyebabkan penekanan terhadap hormon gonadotropin, sehingga produksi estrogen akan menurun dan akhirnya akan terjadi peningkatan kerja osteoklas. Kortikosteroid juga akan menghambat kerja osteoblas, sehingga penurunan formasi tulang akan terjadi. Dengan terjadinya peningkatan kerja osteoklas dan penurunan kerja dari osteoblas, maka akan terjadi osteoporosis yang progresif (Lane (1999) dalam Wardhana, 2012).

2.6.4. Patofisiologi Osteoporosis

Pada keadaan normal, tulang mengalami pembentukan dan absorpsi pada suatu tingkat yang konstan, kecuali pada masa pertumbuhan kanak-kanak dimana lebih banyak terjadi pembentukan daripada absorpsi tulang. Proses-proses ini penting untuk fungsi normal tulang. Keadaan ini membuat tulang dapat berespons terhadap tekanan yang meningkat dan untuk mencegah terjadinya patah tulang. Bentuk tulang dapat disesuaikan dalam menanggung kekuatan mekanis yang semakin meningkat. Perubahan tersebut juga membantu mempertahankan kekuatan tulang pada proses penuaan. Matriks organik yang sudah tua berdegenerasi, sehingga membuat tulang relatif menjadi lebih lemah dan rapuh. Pembentukan tulang yang baru memerlukan matriks organik yang baru, sehingga memberi tambahan kekuatan pada tulang (Sylvia dan Lorraine, 1995).

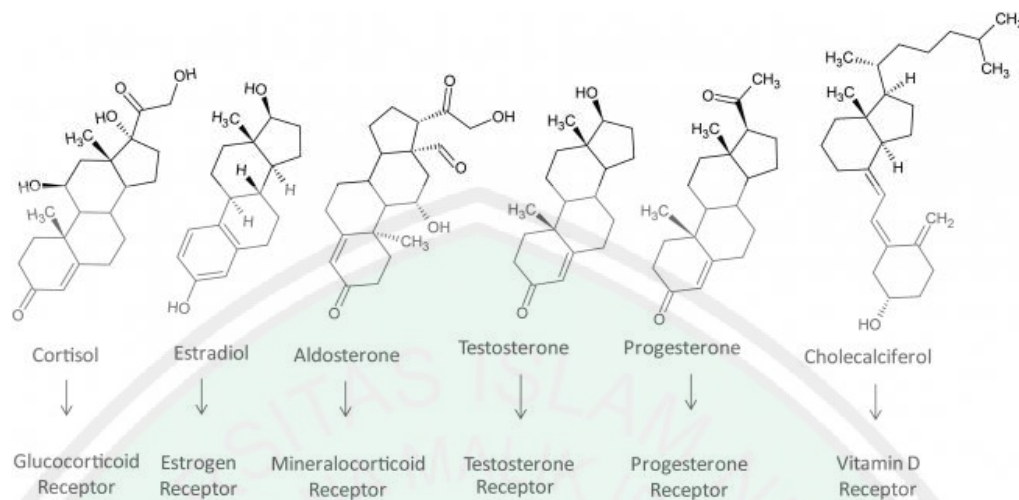
Hormon estrogen juga merupakan salah satu hal yang mempengaruhi pertumbuhan tulang. Pada percobaan dengan menggunakan hewan, defisiensi estrogen menyebabkan peningkatan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan massa tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen, terjadi pembentukan tulang kembali dan didapatkan penurunan produksi dari IL-1, IL-6 dan TNF- α , begitu juga selanjutnya akan terjadi penurunan produksi RANK-Ligan (RANK-L). Di sisi lain estrogen akan merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor*- β) pada sel osteoblas dan sel stroma, yang lebih lanjut akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel osteoklas sehingga osteoporosis tidak terjadi (Bell, 2003).

Pada proses diferensiasi dan aktivasi, estrogen menekan ekspresi RANK-L dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK (Bell, 2003). Begitu juga secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti : IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α dan IL-7. Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- β , yang selanjutnya TGF- β ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Oursler, 2003).

Proses remodeling tulang merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi atau penyerapan tulang oleh osteoklas dan diikuti oleh formasi atau pembentukan tulang atau osteoblas. Keseimbangan proses ini mulai terganggu setelah mencapai umur 40 tahun, yaitu kegiatan proses penyerapan lebih tinggi daripada pembentukan, sehingga massa tulang akan mulai menurun. Proses ini akan berlangsung terus-menerus, sehingga lama-kelamaan tulang mengalami gangguan metabolisme mineral dan arsitektur tulang yang pada akhirnya akan timbul osteoporosis (Sambo *et al.*, 2009).

2.7 Tinjauan Androgen

Hormon steroid diklasifikasikan ke dalam lima kelompok berdasarkan reseptor yang mengikat. Kelima kelompok tersebut adalah androgen (testosteron), glukokortikoid (kortisol), estrogen (estradiol), mineralokortikoid (aldosteron), dan progesteron yang ditunjukkan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur hormon steroid dan reseptor (Kalra and Ishmael, 2014)

Androgen merupakan hormon yang ditemukan di testis dan korteks adrenal. Tiga androgen penting untuk fungsi reproduksi pria adalah testosteron, dehidrotestosteron, dan estradiol. Bila dipandang dari jumlahnya, maka testosteron merupakan androgen yang paling banyak dalam sirkulasi. Hampir 95% testosteron dihasilkan oleh sel Leydig (sel interstitial) di testis, sisanya berasal dari adrenal. Di samping testosteron, testis juga mensekresi sejumlah kecil androgen poten, yaitu dehidrotestosteron dan androgen lemah, dehidroepiandrosteron (DHEA) dan androstenedion. LH merangsang sel Leydig untuk menghasilkan testosteron (Sudharma, 2012).

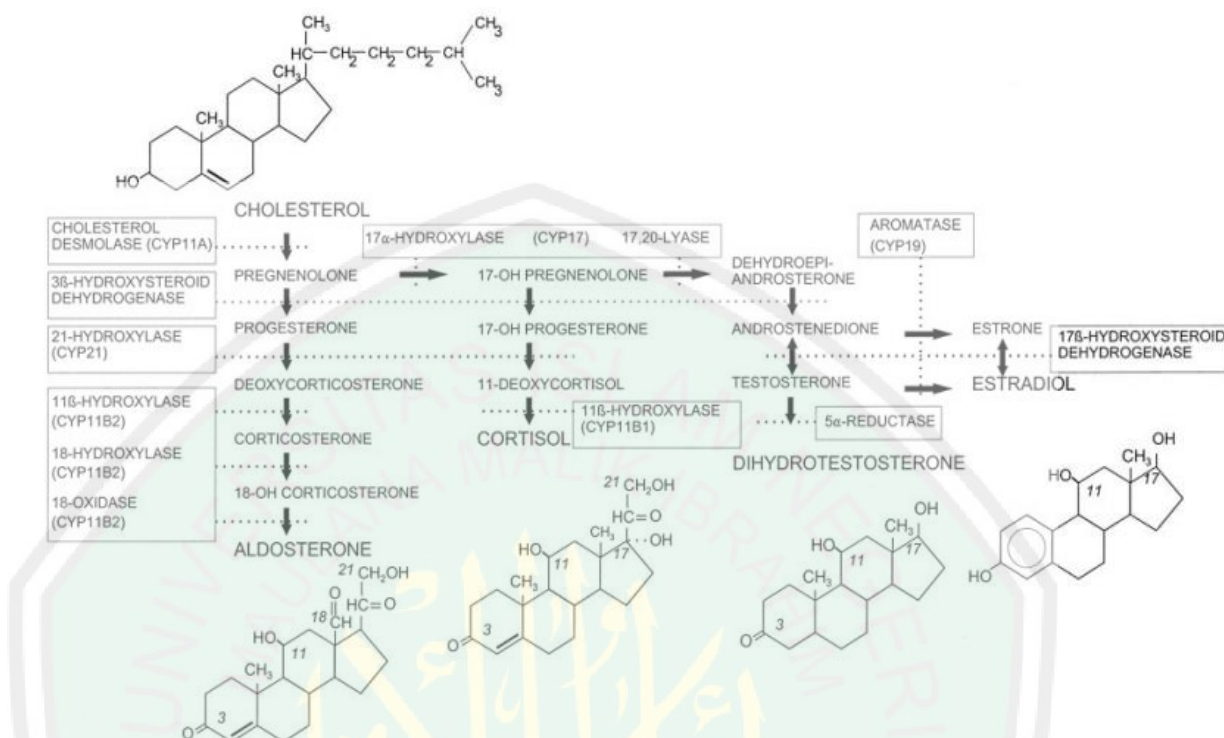
Proses sekresi androgen dimulai dengan hipotalamus mensintesis *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dan mensekresikannya ke dalam darah portal hipotalamo-hipofisis. Setelah mencapai hipofisis anterior, GnRH akan terikat pada gonadotrof dan merangsang pelepasan *luteinizing hormone* (LH) maupun FSH (dalam derajat yang lebih ringan) ke dalam sirkulasi. LH akan berikatan pada reseptor-reseptor spesifik membran dalam sel Leydig. Ikatan ini

menyebabkan aktivasi siklase adenilil dan pembentukan cAMP dan *messenger* lain yang akhirnya menyebabkan sekresi androgen (Sudharma, 2012).

2.8 Tinjauan Testosteron

Testosteron merupakan salah satu hormon androgen yang dibentuk oleh sel interstitial Leydig yang terletak pada interstitial antara tubulus seminiferus. Sintesis testosteron dimulai dengan sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) oleh hipotalamus. Hormon ini selanjutnya merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk menyekresikan dua hormon lain yang disebut hormon-hormon gonadotropin, yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) (Guyton, 1995). *Luteinizing Hormone* disekresikan oleh kelenjar hipofisis bagian anterior. Berperan dalam stimulasi sel-sel Leydig untuk memproduksi testosteron, juga berperan dihasilkannya estradiol. *Follicle Stimulating Hormone* merangsang pertumbuhan testis dan mempertinggi produksi protein pengikat androgen (ABP) oleh sel Sertoli. Peningkatan ABP ini akan menyebabkan tingginya konsentrasi testosteron (Junquiera *et al.*, 2007).

Didalam testis dan adrenal, androgen dapat disintesis dari kolesterol atau langsung dari asetil koenzim A. Kolesterol sebagai bahan dasar untuk biosintesis testosteron tersebut berasal dari plasma darah dalam bentuk LDL dan sebagian lainnya disintesis dalam sel leydig. Jalur sintesis testosteron adalah melalui pregnenolon kemudian diubah menjadi 17-OH-pregnenolon, berubah lagi menjadi dehidroepiandrosteron yang diubah menjadi androstenediol dan akhirnya tersintesis testosteron. Mekanisme secara rinci ditunjukkan pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Jalur biosintesis steroid. Jalur untuk sintesis progesteron dan mineralokortikoid (aldosteron), glukokortikoid (kortisol), androgen (testosteron dan dihidrotestosteron), dan estrogen (estradiol) disusun dari kiri ke kanan. Aktivitas enzimatik yang mengkatalisis setiap biokonversi ditulis dalam kotak. Untuk kegiatan yang dimediasi oleh sitokrom spesifik P450, nama sistematis enzim ("CYP" diikuti oleh angka) tercantum dalam tanda kurung. CYP11B2 dan CYP17 memiliki beberapa aktivitas. Struktur planar kolesterol, aldosteron, kortisol, dihidrotestosteron, dan estradiol ditempatkan di dekat label yang sesuai (Antal, 2009).

2.9 Tinjauan Estrogen

Estrogen merupakan hormon golongan steroid yang memiliki banyak fungsi yakni untuk pertumbuhan dan diferensiasi dan fungsi lain di beberapa jaringan dan merupakan faktor penting dalam pemeliharaan kesehatan tulang. Estrogen yang terdapat secara alamiah adalah 17β -estradiol, estron dan estriol, dimana 17β -estradiol adalah yang paling dominan (Enmark *et al.*, 1997).

Estrogen mempengaruhi proses pembongkaran tulang dengan cara menghambat pematangan osteoklas sehingga bisa menghambat resorpsi tulang. Pada 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 beta* (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).

Secara *in silico*, efek estrogenik diperoleh dari hasil ikatan estradiol dan estrogen reseptor melalui ikatan hidrogen dengan residu asam amino asam glutamat 353A (Glu 353A) dan histidin 524A (His524A) yang berada pada sisi aktif reseptor estrogen (Susilo, 2012).

2.10 Tinjauan Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan zat yang terdapat pada tumbuhan dan memiliki struktur kimia atau fungsi yang menyerupai estrogen (Bustamam, 2008). Contoh-

contoh fitoestrogen adalah isoflavon, kumestan, flavonoid, lignin, dan terpenoid (Cos *et al.*, 2003).

2.10.1 Contoh Fitoestrogen

Pada umumnya, senyawa-senyawa fitoestrogen yang telah diteliti aktivitasnya adalah.

1. Isoflavon

Isoflavon terdiri dari Genestein dan daidzein. Genestein dibentuk dari *biochanin A* dan dimetabolisme menjadi *p-etilfenil estrogen* inaktif, sedangkan daidzein dibentuk dari formoninetin oleh enzim hidrolitik bakteri di lumen usus dan dimetabolisme menjadi *equol* dan *o-desmetilangolesin* (O-DMA). Isoflavon terutama ditemukan pada kacang kedelai, buncis, dan kacang panjang.

2. Lignan

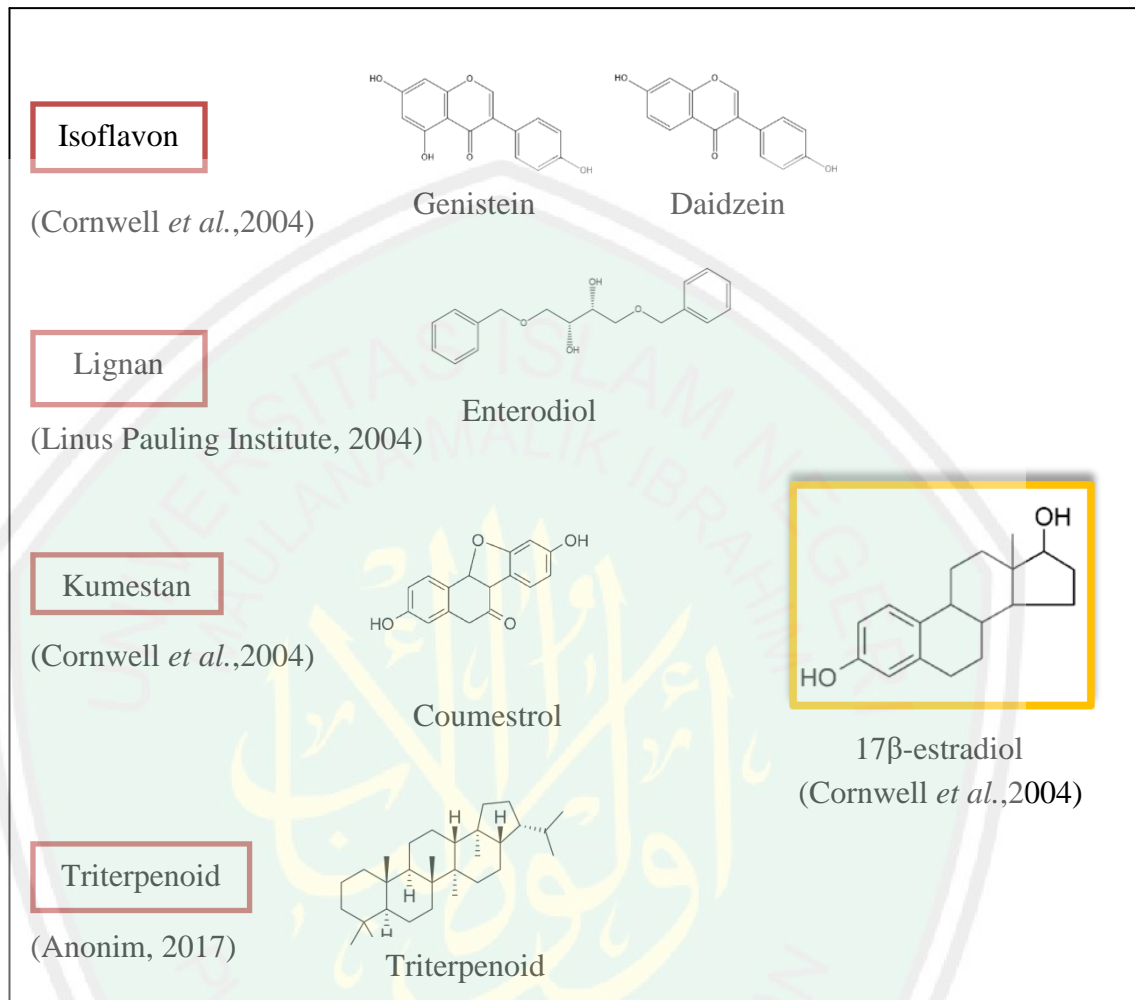
Lignin dimetabolisme oleh mikroflora usus menjadi enterodiol dan enterolakton. Lignin banyak terdapat pada padi, sereal, bawang putih, brokoli, wortel, jeruk, dan apel.

3. Kumestan

Kumestan banyak ditemukan pada kecambah, kacang-kacangan, dan biji bunga matahari.

4. Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder turunan terpenoid yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena (2-metilbuta-1,3-diene) yaitu kerangka karbon yang dibangun oleh enam satuan C₅ dan diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yaitu skualena (Widiyati, 2006).



Gambar 2.8 Struktur 17β estradiol dan fitoestrogen

2.10.2 Mekanisme Kerja

Secara umum, fitoestrogen bekerja sebagai *selective estrogen receptor modulators* (SERMs), yaitu mampu memberikan efek estrogenik dan atau efek antiestrogenik. Pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium, dan prostat, fitoestrogen bekerja sebagai anti estrogen dan aktivitas estrogeniknya bekerja nyata pada tulang (Pawitan, 2002). Fitoestrogen berikatan dengan kedua reseptor estrogen, baik itu reseptor alfa maupun reseptor beta (Poulsen and Kruger, 2008).

2.11 Histomorfometri

Histomorfometri tulang adalah metode yang 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 (Chavassieux *et al.*, 2000). Berdasarkan penelitian Silalahi (2012), prosedur histomorfometri pada kaki tikus adalah sebagai berikut.

1. Fiksasi

Ketika sebuah jaringan diambil dari kondisi hidup, maka beberapa perubahan akan muncul dalam selnya. Bakteri akan mulai bermultiplikasi dan menghancurkan jaringan tersebut. Selain itu dapat juga terjadi proses *autolysis* yaitu hancurnya sel oleh enzim yang terdapat dalam sel tersebut. Fiksasi dimaksudkan untuk mencegah dekomposisi dari jaringan dan membunuh bakteri yang dapat menyebabkan jaringan tulang membusuk. Fiksasi ini dilakukan dengan menggunakan buffer formalin, yaitu formaldehid 4 % dalam buffer normal pada temperatur ruang (Yuehuei dan Martin, 2003).

2. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan kalsium dan mineral dari jaringan tulang. Tanpa proses dekalsifikasi, akan sangat sulit melakukan *sectioning* dengan mikrotom. Dekalsifikasi dilakukan dengan menggunakan asam yang akan bereaksi dengan kalsium tulang membentuk garam kalsium yang larut, atau agen pengkelat yang mengkompleks ion kalsium. Salah satu agen pengkelat

yang sering digunakan untuk dekalsifikasi adalah EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) dengan konsentrasi hingga 14%. Spesimen dimasukan dalam larutan EDTA lalu distirer dengan kecepatan tertentu atau pengocokkan manual secara periodik dapat meningkatkan kecepatan dekalsifikasi (Yuehuei dan Martin, 2003).

3. Dehidrasi dan *Clearing*

Jaringan yang telah mengalami proses fiksasi akan memiliki kandungan air yang tinggi. Hal ini akan mempersulit proses pemotongan karena akan menyebabkan jaringan menjadi terlalu lunak yang dapat menyebabkan deformasi saat dipotong. Dehidrasi merupakan proses menghilangkan air dari tulang dan menggantinya dengan etanol. Etanol yang digunakan adalah etanol bertingkat, mulai dari 70, 96 sampai dengan absolut dengan dua kali pergantian dilakukan pada masing-masing konsentrasi. Semakin lama spesimen tulang direndam dengan alkohol 96% dan absolut, maka spesimen tulang tersebut akan semakin sulit dipotong. Pelarut lain yang dapat digunakan dalam proses dehidrasi adalah aseton, butil alkohol, dan isopropil alkohol (Yuehuei dan Martin, 2003).

Pada proses *clearing*, etanol absolut yang digunakan pada proses dehidrasi harus dihilangkan karena alkohol tidak larut dan tidak bercampur dengan parafin. Jadi diperlukan larutan yang dapat larut ataupun bercampur baik di alkohol maupun di paraffin. Pelarut yang sering digunakan untuk tujuan ini adalah benzen, toluen, dan xilen. Pelarut ini juga akan melarutkan jaringan sehingga jaringan menjadi transparan. Hal inilah yang menyebabkan langkah ini disebut sebagai *clearing* (Yuehuei dan Martin, 2003).

4. Infiltrasi dan Embedding

Pada proses infiltrasi, pelarut yang digunakan pada waktu *clearing* digantikan dengan paraffin. Paraffin terdiri dari dua jenis, yaitu *soft* paraffin dan *hard* paraffin. Titik leleh *soft* paraffin adalah 50-52°C atau 53-55°C, sedangkan titik leleh *hard* paraffin adalah 56-58°C atau 60-68°C. Pemilihan titik leleh dan jenis paraffin yang akan digunakan dilakukan berdasarkan tebal dan jenis jaringan yang akan diinfiltrasi. *Soft* paraffin untuk jaringan yang lunak dan *hard* paraffin untuk jaringan yang keras. Jika jaringan nantinya akan dipotong cukup tebal, sebaiknya dipilih *soft* paraffin. Untuk jaringan yang akan dipotong dengan ketebalan 5-7 µm, gunakan *hard* paraffin dengan titik leleh 56-58°C. Sedangkan untuk jaringan yang akan dipotong dengan ketebalan kurang dari 5µm, gunakan *hard* paraffin dengan titik leleh 60-68°C. Selain itu, kondisi temperatur ruangan juga mempengaruhi pemilihan paraffin. Pada ruangan yang panas lebih dianjurkan untuk menggunakan *hard* paraffin.

Setelah spesimen tulang diinfiltrasi dengan paraffin, spesimen ini selanjutnya akan mengalami proses *embedding*. Spesimen tulang ditempatkan dalam sebuah kotak kecil atau kotak kertas yang telah diisi dengan paraffin cair.

5. Sectioning

Mikrotom merupakan perangkat mekanik yang dapat memotong jaringan dengan tebal yang sama, yaitu 1-10 µm. Alat ini bekerja dengan menggerakkan blok jaringan ke atas dan ke bawah sehingga blok melewati pisau yang memotong paraffin dan jaringan menjadi lembaran yang tipis-tipis.

6. *Mounting dan Staining*

Lembaran diletakkan di pemanas lalu tambahkan air suling untuk mengapungkan paraffin. Kelebihan air selanjutnya dibuang dan lembaran dibiarkan kering selama semalaman.

Jaringan yang dipelajari dengan mikroskop cahaya harus diwarnai terlebih dahulu karena sebagian besar jaringan tidak berwarna. Kebanyakan warna akan membedakan antara asam dan komponen dasar dari sel. Kombinasi hematoxilin dengan eosin merupakan pewarna yang paling sering digunakan dalam histologi. Setelah diwarnai, lembaran dapat diamati dengan menggunakan mikroskop optik.

2.12 Uji ANOVA

Analisis of variance atau *ANOVA* merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya (Ghozali, 2009). Prinsip uji *Anova* adalah melakukan analisis variabilitas data menjadi dua sumber variasi yaitu variasi di dalam kelompok (*within*) dan variasi antar kelompok (*between*). Bila variasi *within* dan *between* sama (nilai perbandingan kedua varian mendekati angka satu), berarti nilai mean yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila variasi antar kelompok lebih besar dari variasi didalam kelompok, nilai mean yang dibandingkan menunjukkan adanya perbedaan. Uji *Anova* dapat dibagi menjadi 2 jenis berdasarkan jumlah variabel yang diamati, yaitu *One Way*

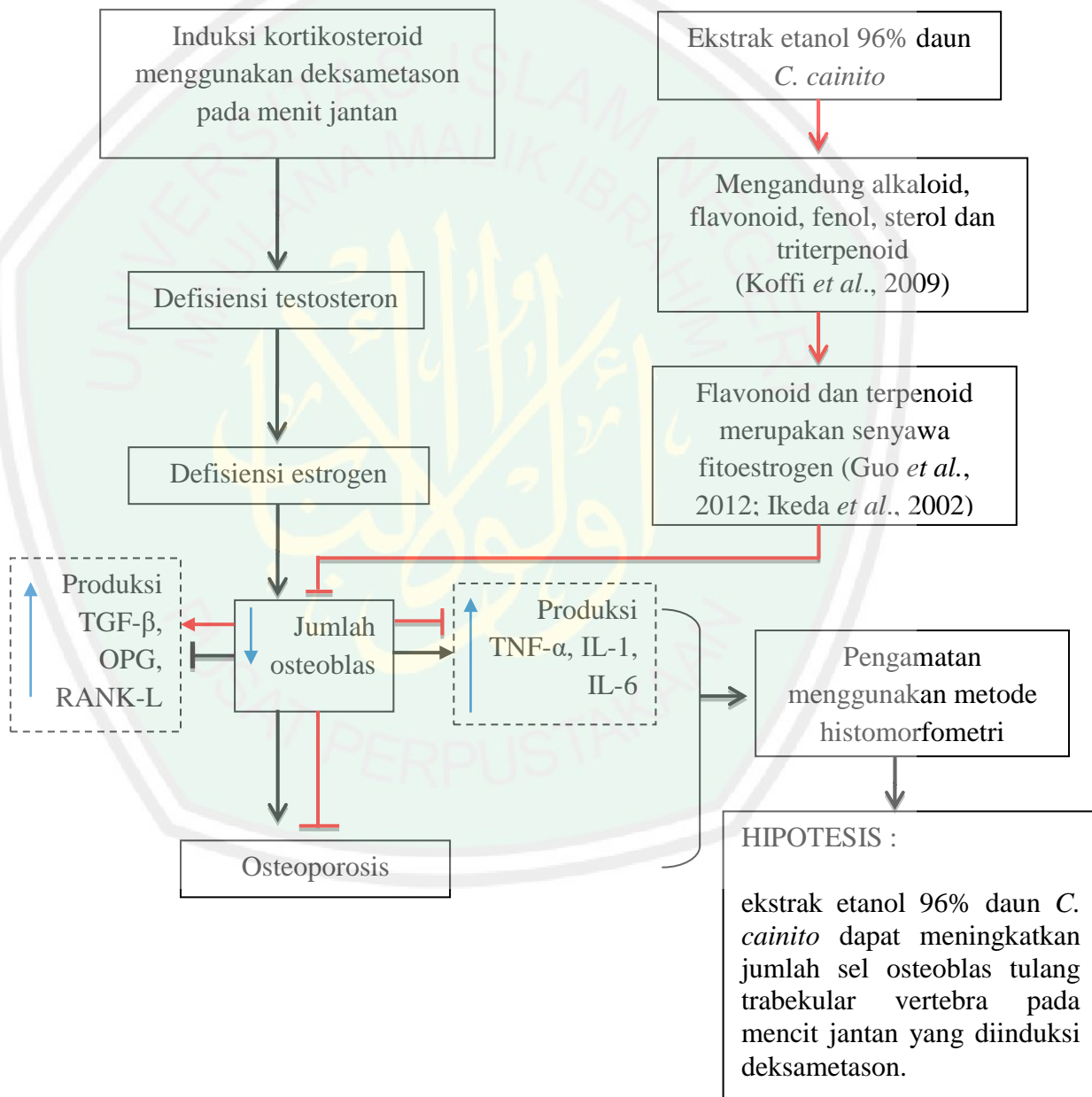
Anova dan *Two Way Anova*. *One Way Anova* digunakan bila ada satu variabel yang ingin diamati, sedangkan *Two Way Anova* digunakan apabila terdapat dua variabel yang ingin diamati (Ghozali, 2009).



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual

Keterangan : ↓ : menyebabkan
 ↓ : mengandung
 ↓ : menurunkan
 ↑ : meningkatkan
 ⊥ : menghambat
 — : variabel yang diteiti
 ---- : variabel yang tidak diteiti

3.2. Uraian Kerangka Konseptual

Osteoporosis terjadi ketika metabolisme tulang seseorang terganggu. Metabolisme tulang secara normal adalah adanya keseimbangan antara aktivitas osteoklas dan aktivitas osteoblas. Seseorang akan menderita osteoporosis apabila aktivitas osteoklas lebih tinggi daripada osteoblas, sehingga osteoblas tidak mampu mencukupi atau mengisi rongga tulang yang telah diresorpsi. Pada penelitian ini, digunakan mencit jantan model osteoporosis dengan cara diinduksi obat kortikosteroid deksametason karena penggunaan kortikosteroid jangka panjang dapat menyebabkan osteoporosis (Sambo *et al.*, 2009).

Obat kortikosteroid ini secara langsung menyebabkan supresi hipofisis sehingga kelenjar hipofisis anterior yang mensekresi hormon gonadotropin *lutensizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) akan menurun yang diikuti penurunan kadar testosteron. Kemudian proses aromatisasi juga akan menurun karena kadar bahan utama yaitu testosteron juga menurun sehingga

kadar estrogen yang merupakan hasil dari proses aromatisasi juga menurun (Reid, 2000).

Pada 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) yang merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang. Di lain pihak estrogen meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor beta* (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 (Waters, 1999).

C. cainito atau kenitu merupakan tumbuhan yang mengandung flavonoid dan terpenoid pada daunnya. Flavonoid dan terpenoid merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip estrogen dan telah diketahui memiliki efek estrogenik karena mengandung senyawa fitoestrogen sehingga dipilih daun tanaman *C. cainito* yang mengandung flavonoid dan terpenoid ini sebagai obyek untuk diteliti efeknya terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas sebagai parameter adanya pertumbuhan tulang.

3.3. Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason. Penelitian eksperimental laboratorik merupakan kegiatan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan tertentu (Notoatmojo, 2010).

4.1.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri dari.

1. Ekstraksi daun *C. cainito* menggunakan pelarut etanol 96%
2. Uji aktivitas ekstrak etanol 96% terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra pada mencit jantan yang diinduksi deksametason
3. Penentuan ED₅₀ ekstrak

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Juli 2018. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia Departemen Biologi Farmasi Jurusan Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim, Laboratorium Biomedik Farmasi Jurusan

Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biomedik Universitas Muhamadiyah Malang.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Daun *C. cainito* dari pohon *C. cainito* yang ditanam di Balai Materia Kota Malang, Jawa Timur.

4.3.2. Sampel

Sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun *C. cainito* yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu Malang.

4.3.3. Sampel Hewan Coba

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan dewasa berumur 5 bulan dengan kondisi badan yang sehat secara pengamatan visual, mempunyai berat badan antara 20-30 gram yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penentuan jumlah sampel hewan coba pada setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer: $(n-1)(t-1) \geq 15$, dimana n menunjukkan ulangan minimal dari setiap perlakuan dan t menunjukkan jumlah perlakuan (Jusman and Abdullah, 2009). Berdasarkan rumus tersebut maka ditentukan $n=4$ dan untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian mencit sebesar 20% maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 5, sehingga jumlah seluruh sampel penelitian menjadi 30 mencit.

4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1. Variabel Penelitian

4.4.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang diberikan sebagai perlakuan dengan beberapa dosis

4.4.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra

4.4.1.3. Variabel Kontrol

Jenis mencit (*Mus musculus*), jenis kelamin mencit (jantan), umur mencit 5 bulan, berat badan rata-rata 20-30 gram, jenis makanan dan minuman, kesehatan mencit yang ditandai dengan pergerakan aktif mencit, perawatan mencit dan sanitasi kandang, temperatur dan kelembaban kandang, waktu pemberian makan dan minum

4.4.2. Definisi Operasional

1. Dosis adalah takaran bahan obat untuk induksi osteoporosis ataupun takaran yang diberikan pada mencit sebagai bahan perlakuan.
2. Osteoporosis merupakan penyakit degeneratif akibat tidak seimbangnya resorpsi tulang dan formasi tulang.
3. Ekstrak etanol 96% Ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi ultrasonik daun *C. cainito* dengan pelarut etanol 96%. Dosis 2 mg/20 gBB mencit; 4 mg/20 gBB mencit; 8 mg/20 gBB mencit; dan 16 mg/20gBB mencit.

4. Ekstrak kering merupakan ekstrak bebas pelarut.
5. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok hewan coba yang diberi perlakuan menggunakan natrium alendronat setelah mencit diinduksi deksametason selama 4 minggu.
6. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok hewan coba yang tidak diberi perlakuan.
7. Peningkatan jumlah sel osteoblas pada penelitian ini diamati dengan metode histomorfometri yaitu penghitungan pengukuran jumlah osteoblas dari tulang trabekular vertebra hewan coba yang dihitung secara mikroskopi.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Instrumen Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat ekstraksi ultrasonik, kertas saring, *chamber* eluasi, plat KLT silika gel F₂₅₄, lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, cawan poselen, peralatan gelas seperti labu alas bulat, gelas ukur, *beaker glass*, erlenmeyer, pipet, *rotary vacuum evaporator*, penyemprot noda, timbangan mencit, kandang mencit, mikroskop, komputer, sonde.

4.5.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu simplisia daun *C. cainito* yang diperoleh dari Balai Materia Media Batu Malang, Etanol 96%,

aquadest, vanillin, H₂SO₄ pekat, bahan pewarnaan (HE), aquadest, klorofom, NaCl, larutan formalin 10%, CMC-Na.

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Penyiapan Simplisia *C. cainito*

Daun *C. cainito* dipanen, lalu dicuci dan dikeringkan dibawah sinar matahari pada jam 7-11 pagi. Hal ini dimaksudkan agar daun kering tetap berwarna hijau. Daun *C. cainito* yang sudah kering lalu diserbuk kemudian ditimbang dan disimpan di tempat yang kering serta terlindung dari paparan sinar matahari untuk mencegah penurunan mutu dan kerusakan.

4.6.2. Prosedur Ekstraksi

Proses ekstraksi simplisia daun *C. cainito* dilakukan menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol 96%, hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga kering. Langkah-langkah ekstraksi yang dilakukan adalah sebagai berikut.

1. Ditimbang 30 gram simplisia *C. cainito*
2. Simplisia dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml etanol 96%
3. Diatur waktu untuk proses ekstraksi yaitu 3 x 2 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya
4. Hasil ekstraksi disaring
5. Residu ditambahkan kembali dengan pelarut sebanyak 2 x 150 ml disertai ulangan proses 3 dan 4

6. Filtrat yang terkumpul dimasukkan labu alas bulat pada *rotary vacuum evaporator*
7. Suhu alat diatur 50°C dengan kecepatan pemutaran 70 rpm
8. Ekstrak hasil rotary evaporator diuapkan kembali (dikeringkan) dalam oven pada suhu 40°C agar diperoleh ekstrak kering bebas pelarut

4.6.3. Uji Aktivitas Ekstrak 96% Daun *C. cainito* terhadap Peningkatan Jumlah Osteoblas Tulang Trabekular Vertebra

4.6.3.1. Penyiapan Hewan Coba

Mencit jantan yang akan digunakan, dilakukan adaptasi lingkungan selama satu minggu dalam kandang berupa bak plastik 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.

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit jantan yang sudah diketahui berat badannya dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing perlakuan 5 kali perulangan dan pada masing-masing mencit diinduksi deksametason 0,0029 mg/20gBB mencit selama 4 minggu. Waktu 4 minggu merupakan waktu yang ekuivalen dengan 3-4 tahun pada manusia yang menyebabkan penurunan massa tulang yang berhubungan dengan penurunan jumlah osteoblas (Manolagas, 2000).

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan

Kelompok	Jumlah hewan coba	Perlakuan
Kontrol negatif	5	Diberikan suspensi CMC Na 0,5% sebanyak 0,3 ml/20 g mencit/ hari secara peroral selama 4 minggu.
Kontrol positif	5	Diberikan suspensi natrium alendronat 0,3 ml/20 gBB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu
Kelompok uji 1	5	diberikan suspensi ekstrak etanol 96% <i>C. cainito</i> dengan dosis 2 mg/g BB mencit sebanyak 0,3 ml/ 20g BB mencit secara peroral selama 4 minggu
Kelompok uji 2	5	diberikan suspensi ekstrak etanol 96% <i>C. cainito</i> dengan dosis 4 mg/g BB mencit sebanyak 0,3 ml/ 20g BB mencit secara peroral selama 4 minggu
Kelompok uji 3	5	diberikan suspensi ekstrak etanol 96% <i>C. cainito</i> dengan dosis 8 mg/g BB mencit sebanyak 0,3 ml/ 20g BB mencit secara peroral selama 4 minggu
Kelompok uji 4	5	diberikan suspensi ekstrak etanol 96% <i>C. cainito</i> dengan dosis 16 mg/g BB mencit sebanyak 0,3 ml/ 20g BB mencit secara peroral selama 4 minggu

4.6.3.2. Penentuan Dosis

1. Dosis Ekstrak

Perhitungan dosis ekstrak yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Utaminingtyas, 2017 yaitu dosis ekstrak etanol

daun *C. cainito* untuk uji kepadatan tulang yang digunakan yaitu 2 mg/ 20 gBB, 4 mg/20gBB, 8 mg/20gBB, dan 16 mg/20gBB mencit sehingga dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut (dosis perlakuan dan jumlah ekstrak yang ditimbang):

$$\begin{aligned}\text{a. dosis 1} &= 2 \text{ mg/20gBB} \\ &= 2 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 280 \text{ mg}\end{aligned}$$

Ekstrak yang ditimbang untuk dosis 2 mg/20gBB adalah 336 mg

$$\begin{aligned}\text{b. dosis 2} &= 4 \text{ mg/20gBB} \\ &= 4 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 560 \text{ mg}\end{aligned}$$

Ekstrak yang ditimbang untuk dosis 4 mg/20gBB adalah 672 mg

$$\begin{aligned}\text{c. dosis 3} &= 8 \text{ mg/20gBB} \\ &= 8 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 1120 \text{ mg}\end{aligned}$$

Ekstrak yang ditimbang untuk dosis 8 mg/20gBB adalah 1,344 g

$$\begin{aligned}\text{d. dosis 4} &= 16 \text{ mg/20gBB} \\ &= 16 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 2240 \text{ mg}\end{aligned}$$

Ekstrak yang ditimbang untuk dosis 16 mg/20gBB adalah 2,240 g

2. Dosis Deksametason sebagai penginduksi osteoporosis

dosis deksametason untuk manusia (70 kg) = 1,125 mg/hari (Laswati *et al.*, 2015)

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

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

Jumlah deksametason yang ditimbang adalah $0,0029 \text{ mg} \times 30 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} = 2,436 \text{ mg}$

3. Dosis natrium alendronat untuk kontrol positif

dosis natrium alendronat untuk manusia (70 kg) = 10 mg/hari

dosis natrium alendronat untuk mencit (20 g) = $10 \text{ mg} \times 0,0026$
 $= 0,026 \text{ mg}/20\text{gBB}/\text{hari}$

Jumlah natrium alendronat yang ditimbang adalah $0,026 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} = 3,64 \text{ mg}$

4.6.3.3. Pembuatan Bahan Uji

1. Pembuatan mucilago CMC-Na 0,5 %

- CMC-Na 0,5% ditimbang sebanyak 0,5 g dan didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian digerus hingga homogen.
- Mucilago dipindahkan ke labu ukur 50 ml dan ditambahkan aquadest hingga tanda batas, dikocok sampai homogen.

Mucilago ini diberikan kepada kelompok kontrol negatif sebanyak 0,3 ml/20gBB mencit/hari secara peroral selama 4 minggu.

2. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dosis 2 mg/20gBB

- CMC-Na 0,5% ditimbang sebanyak 0,5 g dan didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian digerus hingga terbentuk suspensi homogen

- Ekstrak daun *C. cainito* ditimbang sebanyak 280 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na, diaduk sampai homogen
- Dimasukkan (2) ke labu ukur 50 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda batas, dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada kelompok perlakuan dosis 2 mg/20gBB sebanyak 0,3 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan $\frac{2 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{280 \text{ mg}} = 0,3 \text{ ml}$ secara peroral selama 4 minggu

3. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dosis 4 mg/20g BB

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 0,5 g dan didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diaduk sampai mengembang (± 15 menit), kemudian di gerus hingga terbentuk suspensi homogen
- Ditimbang ekstrak daun *C. cainito* 560 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen
- Dipindahkan (2) ke labu ukur 50 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda, dikocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada kelompok perlakuan ekstrak dosis 4 mg/20 g BB sebanyak 0,3 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan $\frac{4 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{560 \text{ mg}} = 0,3 \text{ ml}$ secara peroral selama 4 minggu.

4. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dosis 8 mg/20g BB

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 0,5 g, didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian gerus hingga terbentuk suspensi homogen
- Ditimbang ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 1120 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen
- Diindahkan (2) ke labu ukur 100 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda, kocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada kelompok perlakuan ekstrak dosis 8 mg/20 g BB sebanyak 0,3 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan $\frac{8 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{1120 \text{ mg}} = 0,3$ ml secara peroral selama 4 minggu.

5. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dosis 16 mg/20g BB

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 0,5 g, didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian gerus hingga terbentuk suspensi homogen
- Ditimbang ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 2240 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen
- Diindahkan (2) ke labu ukur 50 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda, kocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada kelompok perlakuan ekstrak dosis 16 mg/20 g BB sebanyak 0,3 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan $\frac{16 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{2240 \text{ mg}} = 0,3 \text{ ml}$

secara peroral selama 4 minggu.

6. Pembuatan suspensi natrium alendronat untuk kontrol positif

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 0,5 g, didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian gerus hingga terbentuk suspensi homogen
- Digerus satu tablet natrium alendronat 10 mg, ditimbang sebanyak 3,5 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen
- Diindahkan (2) ke labu ukur 50 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda, kocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada kelompok kontrol positif dosis 0,026mg/20gBB

sebanyak 0,7 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan $\frac{0,0026 \text{ mg} \times 50 \text{ ml}}{3,64 \text{ mg}} = 0,3 \text{ ml}$

secara peroral selama 4 minggu.

7. Pembuatan suspensi deksametason sebagai penginduksi osteoporosis

- Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 0,5 g, didispersikan merata diatas 10 ml aquadest panas suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, diamkan sampai mengembang (± 15 menit), kemudian gerus hingga terbentuk suspensi homogen
- Digerus 5 tablet deksametason 0,5 mg, ditimbang sebanyak 2,436 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen
- Diindahkan (2) ke labu ukur 100 ml
- Ditambahkan aquadest sampai tepat tanda, kocok hingga homogen

Suspensi ini diberikan kepada semua kelompok perlakuan dosis 0,0029 mg/20gBB sebanyak 0,12 ml/20gBB mencit/ hari dari perhitungan

$$\frac{0,0029 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{2,436 \text{ mg}} = 0,12 \text{ ml} \text{ secara peroral selama 4 minggu.}$$

4.6.3.4. Pembuatan Preparat Histologi

Mencit dikorbankan nyawanya dengan cara memasukkan mereka ke dalam toples yang mengandung *chloroform*. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian punggung untuk mengambil tulang vertebranya. Pembedahan dilakukan dengan cara menggunting kulit secara mid sagital pada bagian punggung. Kemudian dilanjutkan dengan menggunting otot sama seperti menggunting kulit hingga bagian tulang vertebra terlihat. Tulang vertebra diangkat dengan cara menggunting ruas ke-2 hingga ruas ke-7. Kemudian tulang dicuci dalam larutan NaCl kemudian disimpan dalam wadah tertutup yang telah berisi formalin 10%.

Tulang dalam larutan formalin 10% tersebut dipotong dengan pisau tajam setebal 5 mm lalu dimasukkan ke dalam larutan fiksatif (*formalin buffer netral* 10%) selama 24 jam lalu dicuci dengan air. Dilakukan dekalsifikasi dengan *nitric acid* 5% aquosa selama semalam dan dicuci dengan air untuk menghilangkan asam lalu jaringan didehidrasi dalam *tissue processor*, kemudian diinfiltrasi pada mesin *Tissue-Tek TEC* sehingga terbentuk blok jaringan. Setiap blok jaringan kemudian dipotong menggunakan mikrotom (Microm HM 315) dengan ketebalan empat mikron. Preparat kemudian diapungkan dalam penangas air lalu diambil dengan gelas objek. Preparat lalu dikeringkan dalam inkubator selama satu malam pada suhu 37-38°C, diberi warna dengan Harris HE. Proses pewarnaan dilanjutkan

dengan *mounting* (penutupan preparat dengan *cover glass*, menggunakan *permount* sebagai perekat) (Muliani dan Tirtayasa, 2014).

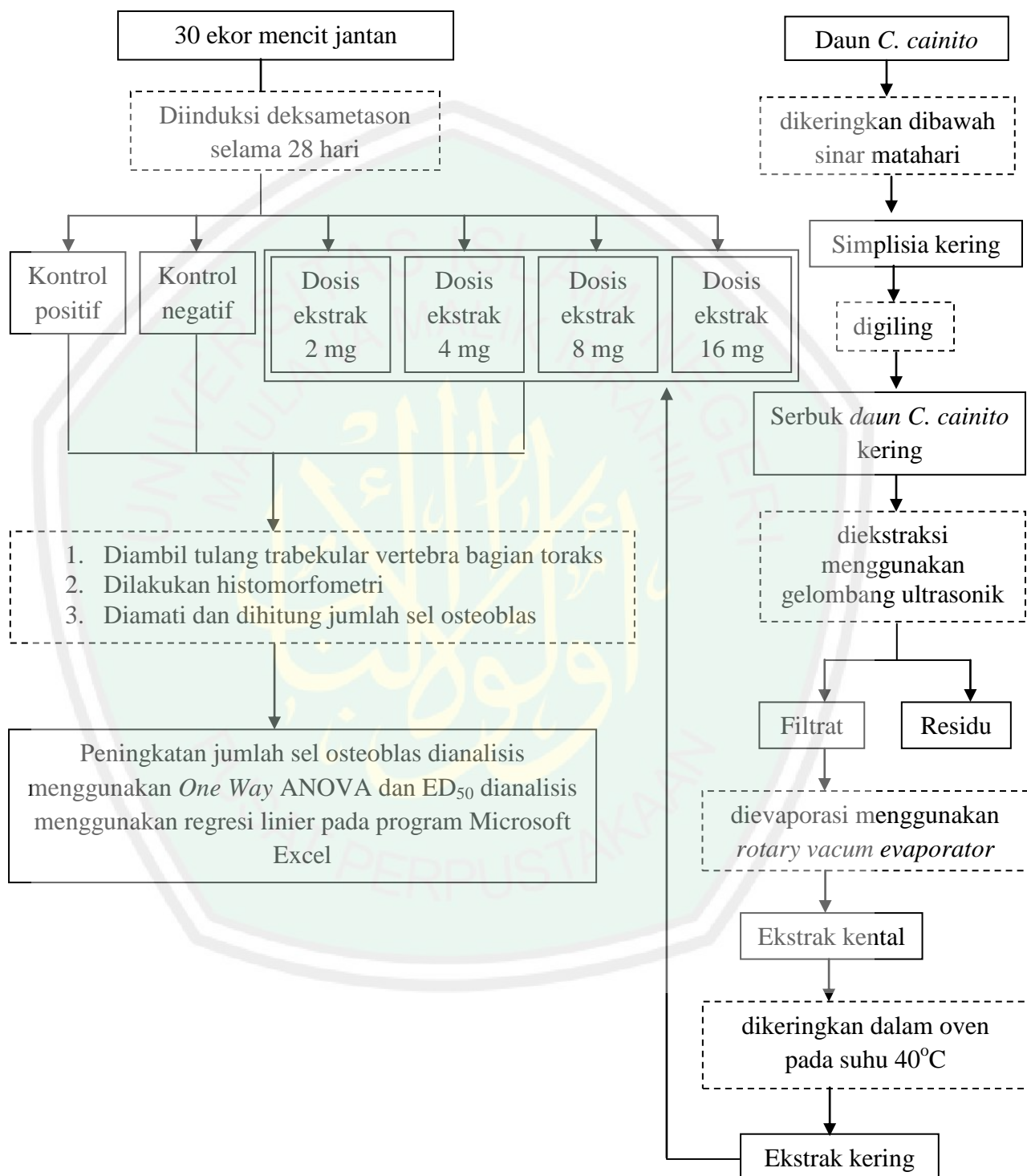
4.6.3.5. Teknik penghitungan Sel Osteoblas

Jumlah osteoblas dinyatakan dalam total sel osteoblas dalam 5 lapangan pandang tulang trabekular vertebra. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang telah terkalibrasi pada pembesaran 100 kali pada pengecatan dengan hematoxyllin eosin (HE), sel-sel osteoblas terlihat berwarna, basofil, berbentuk kuboid dan berinti satu (mononucleus) (Muliani *et al.*, 2014).

4.7. Analisis Data

Analisis hasil menggunakan SPSS 20. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji normalitas *Saphiro - Wilk* untuk melihat distribusi data dan dianalisis dengan uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen ($P \text{ value} > 0,05$) maka dilanjutkan dengan *One Way ANOVA*. Jika pada uji ANOVA diperoleh $P \text{ value} < 0,05$ maka terdapat perbedaan jumlah sel osteoblas yang signifikan antar kelompok perlakuan. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *post hoc* yaitu uji beda nyata terkecil/LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan lainnya. Apabila $P \text{ value} > 0,05$ berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan maka hipotesis ditolak (Dahlan, 2004). Selain situ, nilai efektifitas dosis 50% (ED_{50}) dihitung berdasarkan analisis probit % peningkatan jumlah sel osteoblas selama 4 minggu dilanjutkan dengan analisis menggunakan regresi linier dengan program Microsoft Excel.

4.8 Skema Rancangan Penelitian



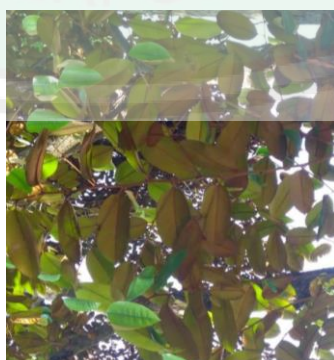
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penyiapan Serbuk Simplisia

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman kenitu atau *C. cainito*. Bagian tanaman yang digunakan sebagai sampel adalah bagian daun. Sampel diperoleh dari lahan budidaya tanaman UPTD Materia Medika Batu. Daun yang telah dipanen disortasi dan dicuci menggunakan air mengalir untuk membersihkan kotoran-kotoran yang menempel pada daun. Daun yang telah dicuci kemudian dikeringkan di dalam ruangan yang telah didesain sedemikian rupa sehingga intensitas paparan sinar matahari yang masuk dapat teratur. Tujuan dilakukan proses pengeringan adalah untuk mengurangi kadar air pada daun sehingga dapat mencegah tumbuhnya kapang dan menurunkan reaksi enzimatis yang dapat merusak simplisia (Manoi, 2006). Pengeringan dilakukan selama 2x24 jam dengan suhu yang berkisar antara 30°- 40°C bertujuan agar kandungan kimia simplisia tidak rusak akibat paparan suhu tinggi dalam waktu yang lama.



Gambar 5.1 Daun *C. cainito* segar

Daun yang telah kering atau disebut simplisia kemudian digiling sehingga diperoleh serbuk yang halus. Tujuan dilakukan penggilingan adalah untuk memperbesar luas permukaan sampel sehingga akan mempermudah proses ekstraksi karena besarnya kontak antara bahan dan pelarut akan mempermudah keluarnya senyawa dari sampel. Selanjutnya serbuk simplisia disimpan dalam wadah tertutup yang dilengkapi silica gel agar simplisia tetap kering sehingga tidak rusak atau berkurang mutunya.



Gambar 5.2 Serbuk daun *C. cainito*

5.2 Pengukuran Kadar Air Serbuk Daun *C. cainito*

Pengukuran kadar air merupakan tahapan uji yang dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel. Pengukuran kadar air sampel serbuk simplisia daun *C.cainito* menggunakan alat *Moisture Content Analyzer* merk Mettler Toledo HC103. Prinsip kerja alat ini adalah analisis *thermogravimetric*, yaitu menentukan perbedaan berat sampel sebelum dan setelah proses pengeringan dengan menggunakan penyerapan gelombang inframerah yang berasal dari lampu halogen. Kelebihan dari penggunaan alat ini adalah cara pengoperasian yang mudah serta dapat memberikan hasil yang akurat

dengan waktu yang singkat. Berikut adalah tabel hasil penentuan kadar air sampel serbuk simplisia daun *C.cainito* yang dinyatakan dalam tiga replikasi.

Tabel 5.1 Hasil penentuan kadar air serbuk simplisia daun *C. cainito*

Sampel	Replikasi	Kadar Air (%)	Rata-Rata (%)±SD
Simplisia daun <i>C.</i> <i>cainito</i>	1	7,83	8,12 ± 0,26
	2	8,17	
	3	8,35	

Hasil rerata kadar air serbuk simplisia daun *C. cainito* adalah 8,12%. Hasil ini telah sesuai dengan rentang standar kadar air simplisia yang baik menurut Menkes RI (1994) yaitu tidak lebih dari 10%. Kadar air yang rendah dapat memperpanjang umur simpan simplisia, karena kadar air yang rendah dapat membatasi pertumbuhan mikroba dan reaksi kimia.

5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun *C. cainito*

Ekstraksi daun *C. cainito* dilakukan dengan menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) merupakan teknik ekstraksi dengan memberikan gelombang ultrasonik pada bahan yang akan dilakukan ekstraksi. Ekstraksi ultrasonik dapat menyebabkan efek kavitasi baik pada dinding maupun membran sel tanaman. Efek tersebut berdampak pada penetrasi pelarut yang lebih baik terhadap membran sel sehingga meningkatkan laju perpindahan massa pada jaringan serta perpindahan senyawa dari sel ke pelarut sehingga proses ekstraksi dapat

berlangsung dengan cepat (Chemat dan Muhammed, 2011). Efek kavitasi pada UAE menghasilkan daya patah yang akan memecah dinding sel secara mekanis dan meningkatkan transfer material sehingga senyawa target lebih banyak terekstrak (Firdaus *et al.*, 2010).

Sebanyak 30 g sampel serbuk daun *C. cainito* diekstraksi menggunakan 500 ml pelarut etanol 96% atau dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:16 (b/v). Digunakan pelarut etanol karena pelarut etanol dapat menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar dari jaringan sel bahan. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan pada membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Etanol dapat melarutkan hampir semua bahan organik baik senyawa polar maupun senyawa semipolar, sehingga senyawa-senyawa kimia aktif dapat terlarut dalam pelarut. Selain itu, berdasarkan penelitian Arifianti *et al.*, 2014 pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengestraksi yang mempunyai *extractive power* yang terbaik untuk hampir semua senyawa.

Hasil ekstraksi kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Filtrat tersebut diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dan kecepatan putaran 70 rpm sehingga diperoleh ekstrak agak kental kemudian dikeluarkan dari *evaporation flask*. Pada evaporator digunakan pompa vakum sehingga proses penguapan ekstrak lebih mudah dan lebih cepat. Selain itu, dengan menggunakan evaporator, pelarut yang diuapkan dapat diperoleh dan digunakan kembali sehingga lebih efektif dan efisien. Ekstrak agak kental yang diperoleh dari hasil penguapan dengan evaporator ini kemudian diuapkan kembali menggunakan oven dengan suhu 40°C untuk mencegah rusaknya senyawa dalam

ekstrak yang tidak tahan panas. Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang diperoleh kemudian diamati secara organoleptis, yaitu meliputi bentuk, warna, dan bau. Secara organoleptis, ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ini berbentuk kental agak kering seperti karamel, berwarna coklat kehitaman, dan berbau khas. Dari 30 g serbuk kering daun *C. cainito* dihasilkan 3,71 g ekstrak sehingga diperoleh nilai rendemen sebesar 12,36 %.



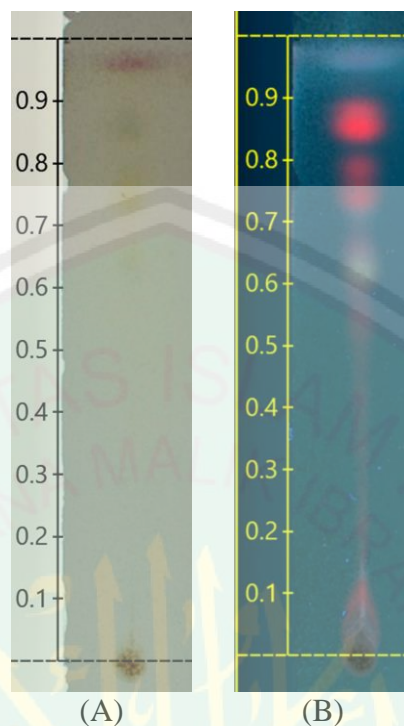
Gambar 5.3 Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

5.4 Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia pada penelitian ini dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan visualisasi menggunakan TLC *Visualizer*. KLT merupakan suatu metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan ialah plat kaca silika gel yang bersifat polar. Ekstrak kering etanol 96% daun *C. cainito* ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 1 ml etanol 96%. Kemudian larutan tersebut ditotolkan pada plat sebanyak 2 μ m dan dieluasi dalam *chamber* yang telah berisi eluen jenuh. Eluen yang digunakan yaitu campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 7:3. Campuran eluen ini dipilih setelah melakukan

optimasi sebelumnya karena menghasilkan pemisahan noda yang baik (tidak berekor). Noda-noda ini terpisah berdasarkan kepolarannya. Noda yang mempunyai harga R_f lebih rendah cenderung memiliki kepolaran yang lebih tinggi karena lebih terdistribusi ke fase diam yang bersifat polar dibandingkan noda yang mempunyai harga R_f lebih besar karena lebih terdistribusi ke dalam fase gerak.

Setelah proses eluasi selesai yang ditandai dengan eluen telah mencapai batas atas plat, plat disemprot menggunakan penampak noda H_2SO_4 10% kemudian dipanaskan diatas TLC *Heater* suhu $105^{\circ}C$ selama 5 menit. Setelah proses tersebut selesai, plat diamati menggunakan TLC *Visualizer* menggunakan cahaya tampak, menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Hasil pengamatan ditunjukkan pada gambar 5.4 dan tabel 5.2.



Gambar 5.4 Hasil uji KLT ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan penyemprot H_2SO_4 10% menggunakan TCL visualizer yang diamati dibawah cahaya putih (A), dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm (B)

Rincian profil KLT ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ditunjukkan pada tabel 5.2. Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa adanya bercak noda berwarna kuning, hijau, dan ungu yang diikuti dengan nilai rf masing-masing noda yang menandakan bahwa dalam ekstrak tersebut terdapat senyawa golongan flavonoid, klorofil, dan terpenoid.

Tabel 5.2 Rincian profil KLT ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* pada cahaya tampak

No	Rf	Warna	Golongan
1.	0,633	Kuning	Flavonoid
2.	0,746	Hijau	Klorofil
3.	0,850	Hijau	Klorofil
4.	0,958	Ungu	Terpenoid

Untuk mengetahui lebih spesifik adanya senyawa terpenoid dalam ekstrak, dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan penyemprot noda spesifik terpenoid yaitu vanilin-H₂SO₄. Adanya senyawa terpenoid ditandai dengan munculnya bercak berwarna ungu, biru, biru-ungu, orange ke merah ungu, dan merah coklat (Wagner, 1983 dalam Dewi, 2009). Hasil yang tampak dari uji KLT ekstrak etanol 96% daun *C.cainito* adalah munculnya bercak berwarna merah ungu pada plat setelah disemprot vanilin-H₂SO₄ dan dipanaskan diatas *TLC heater* suhu 105° C selama 5 menit. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung terpenoid.

Selain menggunakan KLT, skrining fitokimia untuk membuktikan adanya senyawa golongan flavonoid dan terpenoid dilakukan menggunakan uji warna. Hasil yang diperoleh adalah terbentuknya larutan berwarna merah setelah uji Salkowski, yaitu setelah 0,01 g ekstrak yang dilarutkan dalam 1 ml etanol 96% kemudian ditetesi 0,5 ml kloroform dan 1 ml H₂SO₄ pekat yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *C.cainito* mengandung senyawa golongan

terpenoid (Asmara, 2017). Uji selanjutnya yaitu uji Bate-Smith dan Metcalf untuk mengetahui senyawa golongan flavonoid dalam ekstrak. Hasil yang diperoleh pada pengujian ini adalah positif karena terbentuk larutan berwarna merah setelah penambahan HCl pekat. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa adanya flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna merah pada uji Bate-Smith dan Metcalf (Marliana *et al.*, 2005).

5.5 Penginduksian Osteoporosis

Kondisi osteoporosis dibuat menggunakan deksametason 0,0029 mg/20g BB dengan volume 0,12 ml satu kali sehari selama 4 minggu pada mencit. Deksametason adalah salah satu kortikosteroid sintesis dengan aktivitas glukokortikoid yang sangat tinggi. Konsumsi obat ini selama 4 minggu pada mencit setara dengan 3-4 tahun penggunaan pada manusia (Manolagas, 2000). Padahal menurut Kementerian Kesehatan RI (2015) penggunaan obat golongan ini dalam jangka waktu lebih dari 3-6 bulan dapat mengakibatkan terhambatnya proses pembentukan tulang pada osteoblas.

Mencit dengan kondisi osteoporosis dapat dibedakan dengan mengamati bentuk tulang belakangnya. Mencit yang telah mengalami osteoporosis akan tampak adanya pembungkukan pada tulang belakang (kipotik). Kondisi juga ini diduga bahwa mencit telah mengalami pengeroposan tulang (osteoporosis). Berikut gambar pengamatan osteoporosis secara visual



Gambar 5. 5 Mencit normal (A) dan osteoporosis (B)

Pemberian deksametason mengakibatkan penurunan jumlah sel osteoblas tulang trabekular. Hal ini dikarenakan penggunaan obat glukokortikoid jangka panjang dapat menurunkan kadar testosteron plasma pada pria serta dapat mereduksi konsentrasi testosteron bebas hingga 50% (tergantung dosis penggunaan). Obat ini secara langsung menyebabkan supresi hipofisis sehingga kondisi ini akan berpengaruh pada produksi testosteron dan estrogen dalam tubuh karena kelenjar hipofisis anterior mensekresi hormon gonadotropin *lutenising hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) dimana LH menstimulir produksi androgen. Testosteron merupakan salah satu hormon androgen yang kemudian dimetabolisme oleh enzim *aromatase* sitokrom p450 untuk menghasilkan 17β -estradiol sehingga penurunan kadar testosteron juga akan menyebabkan penurunan kadar estrogen (Reid, 2000).

Hormon estrogen merupakan salah satu hal yang mempengaruhi pertumbuhan tulang. Pada percobaan dengan menggunakan hewan, defisiensi estrogen menyebabkan peningkatan terjadinya osteoklastogenesis dan kehilangan massa tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen, terjadi pembentukan tulang

kembali dan didapatkan penurunan produksi dari IL-1, IL-6 serta TNF- α , begitu juga selanjutnya akan terjadi penurunan produksi RANK-Ligan (RANK-L). Di sisi lain estrogen akan terus merangsang diferensiasi osteoblast agar mengekspresikan osteoprotegerin (OPG) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) pada sel osteoblas dan sel stroma, sehingga akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel osteoklas sehingga osteoporosis tidak terjadi karena penyerapan dan pembentukan tulang seimbang (Bell, 2003).

Pada proses diferensiasi dan aktivasi, estrogen menekan ekspresi RANK-L dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK (Bell, 2003). Begitu juga secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti : IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α dan IL-7. Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- β , yang selanjutnya TGF- β ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Oursler, 2003).

Efek estrogen terhadap jumlah sel osteoblas yaitu estrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen β yang terdapat pada osteoblas dan menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas melalui aktivasi *transforming growth factor β* (TGF- β) (Kim and Barnes, 1998). *Transforming-growth factor β* merupakan salah satu protein yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi, determinan, diferensiasi, motilitas, dan kematian sel.

Transforming growth factor β *transforming-growth factor β* akan mempengaruhi kerja enzim tirosin kinase yang merupakan enzim penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel (Massagu, 1998). Estrogen dapat meningkatkan proliferasi dan meningkatkan diferensiasi osteoblas menjadi osteosit sehingga pembentukan tulang dapat terjadi dengan cepat dan kepadatan tulang juga akan semakin meningkat.

5.6 Uji Efek Antiosteoporosis

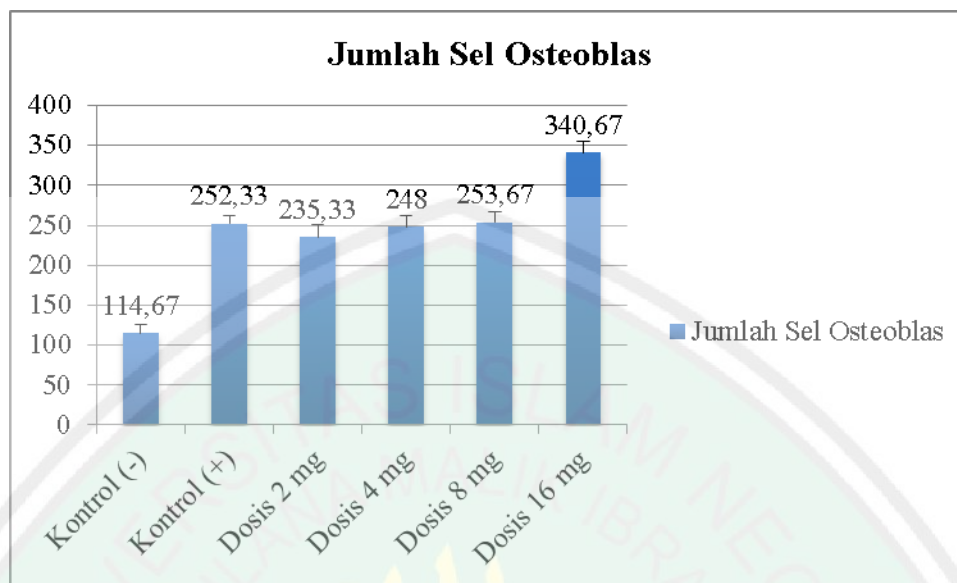
Pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dilakukan dengan membuat suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam CMC Na 0,5%. Sediaan untuk perlakuan yang dipilih adalah berbentuk suspensi karena sifat ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ini tidak larut dalam air sehingga dibutuhkan bantuan *suspending agent* yang memiliki sifat *water soluble* yaitu salah satunya adalah CMC Na. CMC Na merupakan salah satu *suspending agent* yang bersifat *water soluble*, mudah didapat, dan murah. Rentang kadar CMC Na jika difungsikan sebagai *suspending agent* adalah 0,25-1% (Wade and Waller, 1994) sehingga pada penelitian ini digunakan kadar 0,5%. Suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ini dibuat dalam 50 ml dengan masing-masing dosis yaitu 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, dan 16 mg/ml sehingga volume maksimal yang diperoleh oleh setiap mencit adalah 0,4 ml. Volume ini merupakan volume pemberian oral yang masih diperbolehkan karena volume lambung mencit adalah 1 ml.

Pada hari ke-29, mencit dikorbankan dengan menggunakan kloroform. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian punggung untuk mengambil tulang vertebranya. Pembedahan dilakukan dengan cara menggunting kulit secara mid sagital pada bagian punggung. Kemudian dilanjutkan dengan menggunting otot sama seperti menggunting kulit hingga bagian tulang vertebra terlihat. Tulang vertebra diangkat dengan cara menggunting ruas ke-2 hingga ruas ke-7. Kemudian tulang dicuci dalam larutan NaCl kemudian disimpan dalam wadah tertutup yang telah berisi formalin 10% dan dibuat preparat.

Pada penelitian ini parameter yang akan diamati adalah peningkatan jumlah sel osteoblas pada setiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok hewan yang telah osteoporosis tanpa perlakuan. Data yang digunakan adalah rerata jumlah sel osteoblas tulang traberkular vertebra dalam 5 lapang pandang dengan satuan buah (tabel 5.3).

Tabel 5.3 Data rerata jumlah osteoblas tiap kelompok

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Jumlah Osteoblas/5 lapang pandang ± SD
Kontrol (+)	252,33 ± 10,39
Kontrol (-)	114,67 ± 10,07
Dosis 2 mg	235,33 ± 15,88
Dosis 4 mg	248,00 ± 14,47
Dosis 8 mg	253,67 ± 13,51
Dosis 16 mg	340,67 ± 14,52

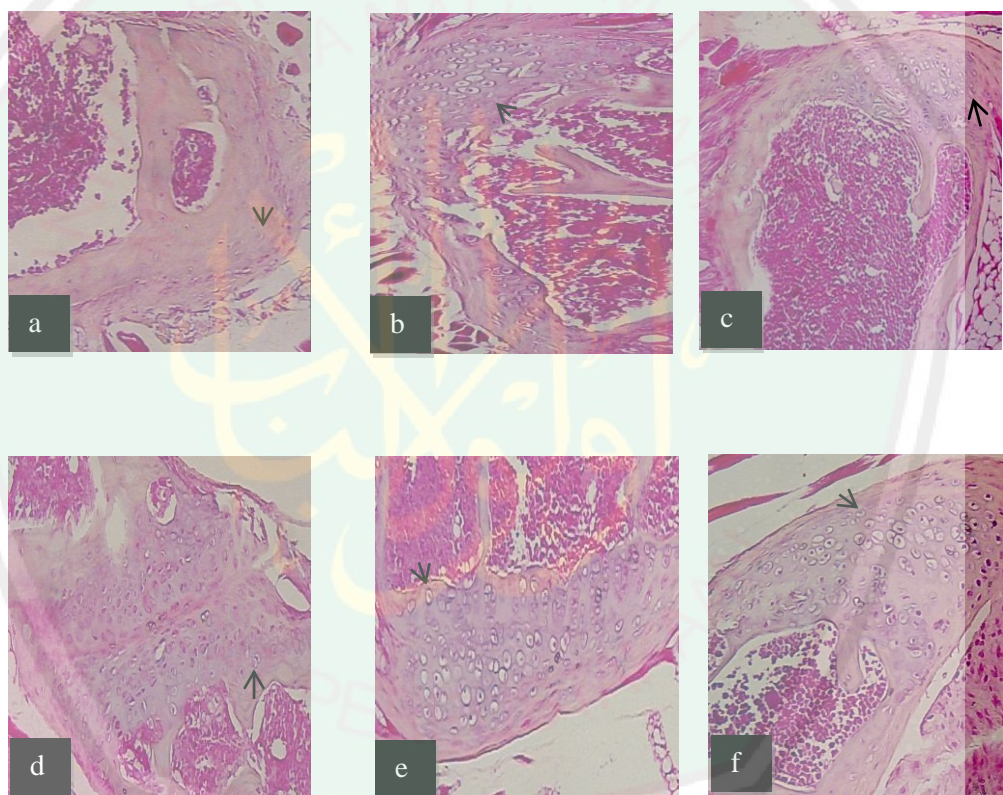


Gambar 5.6 Grafik rerata jumlah osteoblas tiap kelompok

Berdasarkan hasil pada tabel 5.3 di atas, dapat dilihat bahwa jumlah rata-rata sel osteoblas per 5 lapang pandang berturut-turut dari yang terkecil adalah kontrol negatif yaitu sebanyak 114,67; dosis 2 mg/20gBB mencit yaitu sebanyak 235,33 buah; dosis 4 mg/20gBB yaitu sebanyak 248 buah; kontrol positif yaitu sebanyak 252,33; dosis 8 mg/20gBB mencit yaitu sebanyak 253,67 buah dan jumlah sel osteoblas terbanyak terdapat pada dosis 16 mg/20gBB mencit yaitu 340,67 buah. Hal ini menunjukkan telah terjadi peningkatan kepadatan tulang setelah dilakukan terapi. Kelompok kontrol negatif memiliki jumlah osteoblas yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang lain. Secara statistik, kelompok ini memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelima kelompok lainnya. Sedikitnya jumlah osteoblas pada kelompok ini dikarenakan terjadinya penurunan kadar hormon estrogen dalam tubuh mencit akibat induksi deksametason. Hormon estrogen seharusnya dapat mempercepat apoptosis dari sel osteoklas dan menstimulasi proliferasi osteoblas. Karena kelompok ini tidak

mendapatkan asupan fitoestrogen, maka tidak ada yang menggantikan hormon estrogen yang hilang sehingga jumlah osteoblas lebih sedikit dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

Pembuatan preparat histologi menggunakan teknik pengecatan Hemaktosilin dan Eosin (HE) dimana sel osteoblas ditunjukkan dengan tanda panah. Adapun hasil pengamatan gambar histopatologi sebagai berikut:



Gambar 5.7 Histopatologi tulang traberkular vertebra mencit jantan dengan kontrol negatif (a); kontrol positif (b); dosis 2 mg (c); dosis 4 mg (d); dosis 8 mg (e);dosis 16 mg (f)

5.7 Analisis Data

Data rerata jumlah sel osteoblas tulang traberkular vertebra mencit jantan yang diinduksi deksametason dianalisis menggunakan metode ANOVA *one-way*

dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95 % dari *software* IBM SPSS Statistic 20. Uji ANOVA dapat dilakukan hanya jika data memenuhi syarat-syarat uji parametrik yaitu nilai uji normalitas dan homogenitas *p-value* > 0,05.

Uji normalitas jumlah sel osteoblas tulang traberkular vertebra ini menggunakan *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 *P-value* uji normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	<i>p-value</i>	Keterangan
Kontrol positif	0,520	Normal
Kontrol negatif	0,414	Normal
Dosis 2 mg	0,948	Normal
Dosis 4 mg	0,454	Normal
Dosis 8 mg	0,266	Normal
Dosis 16 mg	0,921	Normal

Berdasarkan tabel 5.4 diperoleh *p-value* kelima kelompok > 0,05, maka distribusi data dinyatakan normal. Setelah dinyatakan normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian menggunakan *Levene's test*. Hasil uji homogenitas varian pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 *P-value* uji homogenitas varian *Levene's test*

Perlakuan	<i>p-value</i>	Keterangan
Kontrol positif	0,602	Homogen
Kontrol negatif		
Dosis 2 mg		
Dosis 4 mg		
Dosis 8 mg		
Dosis 16 mg		

Berdasarkan tabel 5.5 diperoleh *p-value* kelima kelompok $> 0,05$, maka dapat diketahui bahwa varian data homogen. Setelah data dinyatakan normal dan homogen, maka analisis selanjutnya adalah analisis perbedaan dengan ANOVA *One-way*. Hasil uji perbedaan ANOVA *One-way* dapat dilihat pada tabel 5.6.

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

Perlakuan	<i>p-value</i>	Keterangan
Kontrol positif	0,000	Berbeda signifikan
Kontrol negatif		
Dosis 2 mg		
Dosis 4 mg		
Dosis 8 mg		
Dosis 16 mg		

Berdasarkan uji ANOVA *One-way* yang diperoleh, data memiliki signifikansi $p\text{-value} < 0,05$ artinya terdapat perbedaan signifikan jumlah sel osteoblas pada tulang traberkular vertebra antar kelompok. Analisis kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD). Jumlah sel osteoblas tulang traberkular vertebra suatu kelompok dinyatakan berbeda signifikan dengan jumlah sel osteoblas tulang traberkular vertebra kelompok lainnya apabila memiliki $p\text{-value} < 0,05$. Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.7 dan secara lengkap dapat dilihat di lampiran 3.

Tabel 5.7 Hasil uji LSD

Perlakuan	1	2	3	4	5	6
1		BS*	-	-	-	BS*
2	BS*		BS*	BS*	BS*	BS*
3	-	BS*		-	-	BS*
4	-	BS*	-		-	BS*
5	-	BS*	-	-		BS*
6	BS*	BS*	BS*	BS*	BS*	

Keterangan:

1. Kontrol positif
2. Kontrol negatif
3. Dosis 2 mg
4. Dosis 4 mg
5. Dosis 8 mg
6. Dosis 16 mg

*BS= Berbeda Signifikan

a. Hasil uji LSD antara kelompok terapi ekstrak etanol 96 % daun *C. cainito* dengan kelompok kontrol negatif

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara jumlah sel osteoblas semua kelompok perlakuan ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* (dosis 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg) dengan kontrol negatif dengan *P value* masing-masing 0,002; 0,001; 0,000; dan 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* pada dosis-dosis tersebut dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular vertebra mencit jantan.

b. Hasil uji LSD antara kelompok terapi ekstrak etanol 96 % daun *C. cainito* dengan kelompok kontrol positif

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok 6 (terapi ekstrak etanol 96 % daun *C. cainito* dosis 16 mg) dengan kelompok 1 sebagai kontrol positif dengan *P value* 0,005 ($p < 0,05$). Sedangkan untuk ketiga kelompok lainnya (dosis 2 mg, dosis 4 mg, dosis 8 mg) memiliki *P value* masing-masing 0,559; 0,895; dan 0,943 ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa suspensi ekstrak etanol 96 % daun *C. cainito* pada dosis tersebut tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kontrol positif.

Semua dosis yang diuji pada kelompok perlakuan memiliki efek farmakologis yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan signifikan dengan kontrol negatif. Efek farmakologis kelompok 5 (terapi dengan ekstrak etanol 96%

daun *C. cainito* dosis 8 mg) hampir sama dengan efek farmakologis alendronat yang diberikan pada kelompok 1 sebagai kontrol positif dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas. Jadi, apabila keempat dosis tersebut dibandingkan, maka suspensi ekstrak etanol 96% daun *C.cainito* dosis 16 mg merupakan dosis yang memiliki efek tertinggi dalam peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra mencit jantan. Namun, berdasarkan probit yang dianalisis menggunakan SPSS 20 diperoleh dosis efektif (ED_{50}) dari semua data tersebut adalah 9,5 mg/20gBB mencit/hari.

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

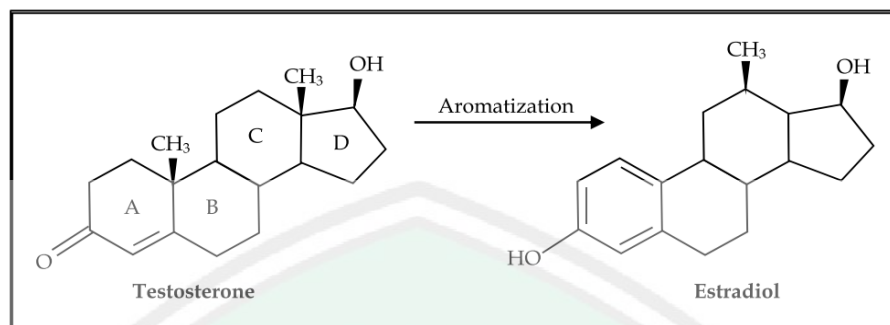
إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”

Pada QS. Al Qamar ayat 49 dijelaskan bahwa Dia menciptakannya dengan qadha' (qadar) yang telah diketahui-Nya, tertulis oleh pena-Nya, demikian pula sifat-sifat yang ada padanya dan bahwa yang demikian itu mudah bagi Allah. Sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah . Ukuran yang sesuai dengan hikmah juga dapat diartikan sebagai dosis yang sesuai menurut Allah SWT. Dosis yang sesuai menurut Allah SWT juga dapat berarti dosis yang tidak berlebihan atau sesuai dengan ukuran (Shihab, 2002). Pada penelitian ini, konteks dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang dinyatakan efektif memberikan aktivitas antiosteoporosis diukur menggunakan perhitungan ED_{50} yaitu 9,5 mg/20gBB mencit/hari.

Pria dengan kondisi hipogonadisme beresiko tinggi terkena osteoporosis. Defisiensi androgen merupakan jalur patofisiologi kunci dalam kondisi tersebut. Testosteron merupakan androgen yang terbanyak dalam sirkulasi. Telah banyak dilakukan penelitian observasional yang menemukan adanya hubungan antara penggunaan terapi testosteron pada pria dan dampak positifnya terhadap kepadatan tulang serta risiko patah tulang akibat osteoporosis menjadi lebih rendah. Selain itu, testosteron juga telah diliti dapat mengurangi sitokin-sitokin inflamasi sistemik yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α (Malkin *et al.*, 2004).

Menurut Rochira *et al.* (2015), Testosteron merupakan androgen terdapat dalam sirkulasi dalam jumlah banyak. Pada laki-laki, testosteron dan estradiol adalah steroid seks yang bekerja pada jaringan tulang. Testosteron diproduksi dari sel Leydig di testis, sementara estradiol berasal dari hasil aromatisasi testosteron oleh kompleks enzimatis aromatase. Aromatase adalah enzim sitokrom P450 yang dikodekan oleh gen CYP19A1 yang memainkan peran kunci dalam biosintesis estrogen. Enzim ini mengkatalisasi konversi Δ^4 -androstenedione menjadi estrone dan dari testosteron ke estradiol. Reaksi aromatisasi testosteron ditunjukkan pada gambar 5.8.



Gambar 5.8 Proses aromatisasi

Senyawa fitoestrogen yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* adalah flavonoid dan terpenoid. Flavonoid dan terpenoid dianggap sebagai senyawa fitoestrogen karena memiliki aktivitas biologis mirip hormon estrogen, yaitu aktivitas untuk menjaga dan meningkatkan kepadatan tulang serta mencegah pengeroposan tulang (Gupta *et al.*, 2016). Salah satu penelitian yang menunjukkan adanya efek estrogenik flavonoid adalah aktivitas pengaktifan transkripsi pERE-Luc sehingga dapat menginduksi fosforilasi reseptor estrogen (ER α) pada sel osteoblas kultur setelah diberi perlakuan menggunakan kaemferol. Aktivasi ER ini dihubungkan dengan biomarker diferensiasi osteoblast seperti aktivitas ALP dan transkripsi gen. Kaemferol juga memicu proses mineralisasi osteoblas (Guo *et al.*, 2012). Selain kaemferol, senyawa flavonoid lain seperti miristin juga dinyatakan memiliki efek estrogenik. Secara *in silico*, miristin diketahui dapat berikatan dengan asam-asam amino pada *Human Estrogen Receptor* (HER) dengan jarak ikatan terdekat 2,549309 Å dan energi yang dibutuhkan untuk berikatan sebesar -9,50017 Suganya *et al.* (2014). Sedangkan untuk aktivitas estrogenik senyawa terpenoid ditunjukkan dengan adanya penelitian oleh Ikeda *et al.* (2002). Berdasarkan penelitian tersebut, terpenoid

yang ditemukan pada family Umbelliferae khususnya *Ferula jaeschkeana* dikatakan memiliki efek estrogenik karena dapat memodulasi pemberian sinyal estrogen mirip SERMs (*selective estrogen receptor modulators*) sehingga secara khusus, fitestrogen berupa terpenoid seperti ferutinine, dimungkinkan berguna sebagai SERM alami.

Penelitian oleh Laswati dan Agil (2015) juga menjelaskan bahwa pemberian *Spilanthus acmella* yang mengandung senyawa fitroestrogen berupa flavonoid dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular femur pada mencit jantan model osteoporosis. Berdasarkan jurnal tersebut, aktivitas antiosteoporosis pada penelitian tersebut berasal dari fitotestosteron yang terkandung dalam tanaman, namun kandungan fitotestosteron dari tanaman tersebut perlu pembuktian lebih lanjut.

Cara kerja estrogen yaitu dengan menghambat penyerapan tulang oleh osteoklas, yaitu sebagai agen anti-resorptif yang melindungi tulang dari kehilangan massa tulang lebih lanjut. Sedangkan androgen memiliki efek potensial pada proliferasi, diferensiasi, dan mineralisasi sel-sel garis turunan osteoblas, dan mengatur produksi berbagai sitokin autokrin dan parakrin (IL-1b, IL-6, IGFs, IGFBPs, PGE2, TGF-b) di dalam tulang (Hofbauer and Khosla, 1999). Penelitian oleh Wiren *et al.* (2008) menyatakan bahwa androgen yang tidak teraromatisasi menjadi estradiol seperti 5 α -dihidrotestosteron (DHT) juga dimungkinkan dapat meningkatkan pembentukan tulang dan massa tulang.

Penelitian yang dilakukan secara *in vitro* menyatakan bahwa baik estrogen maupun testosteron dapat menghambat perkembangan osteoklas dan

aktivitasnya serta dapat merangsang apoptosis osteoklas. Akan tetapi, pada studi yang dilakukan terhadap lansia normal laki-laki yang telah dibuat hipogonad akut menunjukkan bahwa estrogen memainkan peran lebih dominan dalam mengatur resorpsi tulang daripada testosteron. Berdasarkan penelitian tersebut, diperkirakan bahwa estrogen menyumbang dua pertiga atau lebih dari total efek hormon seks steroid pada aktivitas resorpsi tulang, dan testosteron menyumbang paling banyak sepertiga dari efek. Sehingga, memerlukan penelitian lebih lanjut untuk memperjelas bahwa peningkatan kepadatan tulang tersebut dikarenakan adanya efek langsung dari testosteron atau efek tidak langsung oleh aromatisasi dari testosteron ke estradiol, baik secara perifer atau lokal oleh osteoblas (Khosla *et al.*, 2002).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan.

1. Ekstrak etanol 96% daun *Chrysophillum cainito* L. memiliki aktivitas antiosteoporosis dilihat dari peningkatan jumlah sel osteoblast pada mencit jantan yang diinduksi deksametason.
2. Dosis efektif (ED₅₀) ekstrak etanol 96% daun *Chrysophillum cainito* L. adalah 9,5mg/20gBB mencit/hari

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi lain efek ekstrak daun *C. cainito* dalam menanggulangi berbagai penyakit lainnya. Selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik ekstrak. Kemudian apabila digunakan uji *in vivo*, sebaiknya hewan yang sehat juga tetap digunakan sebagai perbandingan parameter.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Qurthubi, I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi, Terj. Al-Jami' Li Ahkaam Al-Qur'an*. Diterjemahkan oleh Dudi Rosyadi Dkk. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Alusy, S.S. 2011. *Tafsir Al-Muyassar*. Diterjemahkan oleh Abu Yusuf. Solo: An-Naba'.
- Anggraini, W. 2008. Fitoestrogen Sebagai Alternatif Alami Terapi Sulih Hormone Untuk Pengobatan Osteoporosis Primer Pada Wanita Pascamenopause. *Scientific Journal in Dentistry*. Volume 231: 25–31.
- Anonim. 2017a. "Pertumbuhan Tulang." 2017. www.dokudok.com. Diakses pada 1 Januari 2018.
- . 2017b. "Triterpene." 2017. <https://en.wikipedia.org>. Diakses pada 1 Januari 2018.
- Antal, Z. 2009. Congenital Adrenal Hyperplasia : Diagnosis , Evaluation , and Management. *Pediatric in Review*. Volume 30, Nomor 7: 49–57.
- Arifianti, L., Oktarina, R.D., and Kusumawati, I. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi. *E-Journal Planta Husada*. Volume 2, Nomor 1: 3–6.
- Asmara, A.P. 2017. Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder dalam Ekstrak Metanol Bunga Turi Merah (*Sesbania Grandiflora* L . Pers). *Al-Kimia*. Volume 5 , Nomor 1.
- Audran, M. 2010. Bone Health Is Also For Men. *Medicographia*. Volume 32, Nomor 4: 417–21.
- Bell, N. H. 2003. RANK Ligand and the Regulation of Skeletal Remodeling. *Journal of Clinical Investigation*. Volume 111, Nomor 8: 1120–22.
- Bord, S. H. A., Beavan, S., Compston, J. 2001. Estrogen Receptor Alfa and Beta Are Differentially Expressed in Developing Human Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 86, Nomor 5: 2309–14.
- Bunckwalter, J.A., Glinicher, M.J., Cooper, R.R. 1995. Bone Biology. *J., Bone Joint Surg*. Volume 77, Nomor 8.
- Bustamam, N. 2008. Fitoestrogen dan Kesehatan Tulang. *Bina Wijaya*. Volume 19, Nomor 3: 146–50.
- Chavassieux, P.M., Arlot, M.E., Roux, J.P., Portero, N., Daifotis, A., Yates, A.J.,

- and Hamdy, N.A.T. 2000. "Effects of Alendronate on Bone Quality and Remodeling in Glucocorticoid- Induced Osteoporosis: A Histomorphometric Analysis of Transiliac Biopsies. *Journal of Bone and Mineral Research*. Volume 15, Nomor 4: 754–62.
- Chemat, F., Zill, H., and Muhammed. 2011. Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction. *Journal Ultrasonic Sonochemistry*. Volume 18: 813–35.
- Cornwell, T., Cohick, W., and Ilya R. 2004. "Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry*. Volume 65, Nomor 8: 995–1016.
- Cos, Paul, Tess D.B., Apers, S., Berghe, D.V., Luc P., and Arnold, J.V. 2003. Phytoestrogens: Recent Developments. *Planta Medica*. Volume 69, Nomor 7: 589–99.
- Dahlan, S. 2004. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Uji Hipotesis*. Jakarta: Bina Mitra Press.
- Das, A., Dato I.R., Badaruddin, B.N., and Amiya. 2010. A Brief Review on *Chrysophyllum cainito*. *JPI's Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulations*. Volume 1, Nomor 1: 1–7.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Dewi, R.C. 2009. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.) (Skripsi). Surakarta: Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Einbond, L.S., Kurt A.R., Xiao, D.L., Margaret, J.B., and Edward, J.K. 2004. "Anthocyanin Antioxidants from Edible Fruits." *Food Chemistry*. Volume 84: 23–28.
- Enmark, E., Huikko, M.P., Grandien, K.L.S., Lagercrantz, J., Fied, G., Nordenskjöld, and Gustafsson, J.A. 1997. Human Estrogen Receptor Beta Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 62, Nomor 12: 4258–65.
- Erickson, E.F., Kasem, L., and Aarhus. 1992. The Cellular Basis of Bone Remodeling. *Sandoz Journal of Medical Science*. Volume 31: 2-3.
- Firdaus, M.T., Izam, A., & Rosli, R.P. 2010. Ultrasonic Assisted Extraction of

- Triterpenoid Saponins from Mangrove Leaves. In *The 13th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress*. Taipei. 1-8.
- Fuadi, A. 2012. Ultrasonik Sebagai Alat Bantu Ekstraksi Oleoresin Jahe. *Jurnal Teknologi*. Volume 12, Nomor 1: 14–21.
- Ghozali, I. 2009. *Aplikasi Multivariate Dengan Program SPSS*. Semarang: Badan penerbit Universitas Diponegoro.
- Gritter, R. J., Obbits, J.M., Schwarting, B. 1991. *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi)*. Diterjemahkan oleh K. Pandawinata. 2nd ed. Bandung: ITB.
- Guo, A.J., Choi, R.C., Ken Y.Z., Vicky, P.C., Tina, T.D., Zheng-tao, W., Günter, V., David, T.L., and Karl, W.T. 2012. Kaempferol as a Flavonoid Induces Osteoblastic Differentiation via Estrogen Receptor Signaling. *Chinese Medicine*. Volume 7, Nomor 10: 1–7.
- Gupta, C., Prakash, D., and Sneh, G. 2016. Phytoestrogens as Pharma Foods. *Adv Food Technol Nutr Sci Open Journal*. Volume 2, Nomor 1: 19–31.
- Guyton, C.A. 1995. *Fisiologi Kedokteran Dan Mekanisme Penyakit*. Andrianto. Jakarta: EGC.
- Handayani, H., Feronika, H.S., dan Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. Volume 4, Nomor 1: 262–72.
- Hofbauer, L., C., and Khosla, S. 1999. Androgen Effects on Bone Metabolism: Recent Progress and Controversies. *European Journal of Endocrinology*. Volume 140, Nomor 4: 271–86.
- Ikeda, K., Arao, Y., Otsuka, H., Nomoto, S., and Horiguchi, H. 2002. Terpenoids Found in the Umbelliferae Family Act as Agonists / Antagonists for ER alfa and ER beta: Differential Transcription Activity between Ferutinine-Liganded ER alfa and ER beta. *Elsivier*. Volume 291, Nomor 2: 354–60.
- Jehle P.M. 2003. Steroid-Induced Osteoporosis; How Can It Be Avoided? *Oxford Journals*. Volume 18, Nomor 5.
- Junquiera, L.C., Jose, C., Robert, O.K. 2007. *Histologi Dasar*. 8th ed. Jakarta: EGC.
- Jusman, S.W.A. and Abdullah, H. 2009. Oxidative Stress In Liver Tissue Of Rat Induced By Chronic Systemic Hypoxia. *Makara Kesehatan*. Volume 13, Nomor 1: 34–38.

- Kalra, N. and Ishmael, F.T. 2014. Cross-Talk between Vitamin D , Estrogen and Corticosteroids in Glucocorticoid Resistant Asthma. *OA Inflammation*. Volume 22, Nomor 2: 1–10.
- Khosla, S., Elizabeth, J., Atkinson, Colin, R., Dunstan, and O’Fallon, W.M. 2002. Effect of Estrogen *versus* Testosterone on Circulating Osteoprotegerin and Other Cytokine Levels in Normal Elderly Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 87, Nomor 4: 1550–54.
- Kim, H., Peterson, T.G., and Barnes, S. 1998. Mechanisms of Action of the Soy Isoflavone Genistein: Emerging Role for Its Effects via Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathways. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 68, Nomor 6: 1418–1425.
- Kiyama, R. 2017. Estrogenic Terpenes and Terpenoids: Pathways, function, and Application. *European Journal of Pharmacology*. Volume 9, Nomor 49.
- Kleerekoper, M. and Avioli. 1993. *Evaluation and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, Dalam Premier on the Metabolism Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd ed. New York: Raven Press.
- Koffi, N., Amoikon, K.E., Tiebre, M.S., Kadja, B., and Zirihi, G.N. 2009. Effect of Aqueous Extract of Chrysophyllum Cainito Leaves on the Glycaemia of Diabetic Rabbits. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Volume 3, Nomor 10: 501–6.
- Lane, N. 1999. *The Osteoporosis Book Guide for Patients and Their Families*. New York: Oxford University Press.
- Laswati, H., Agil, M., Widyowati, R. 2015. “Efek Pemberian Spilanthos Acmella Dan Latihan Fisik Terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit Yang Diinduksi Deksametason.” *Media Litbangkes*. Volume 25, Nomor 1: 5–12.
- Linus Pauling Institute. 2004. *Lignan*. Oregon State University. 2004. <http://lpi.oregonstate.edu>. Diakses pada 1 Januari 2018.
- Mahmudati, N. 2011. “Kajian Biologi Molekuler Peran Estrogen/Fitoestrogen Pada Metabolisme Tulang Usia Menopause.” Di dalam *Seminar Nasional VIII Pendidikan Biologi*. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Malkin, C.J., Peter, J.P., Richard, D.J., Dheeraj, K., Kevin, S. Channer, and Jones, T. H. 2004. The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 89, Nomor 7: 3313–18.

- Manoi, F. 2006. Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Mutu Simplisa Sambiloto. *Bul. Littro*. Volume 1: 1–5.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. Volume 21, Nomor 2: 115–37.
- Marcus, R., Feldman, D., Kelsey, J. 1996. *Osteoporosis*. New York: Academic Press.
- Marliana, S. D., Suryanti, V., dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq. Swartz*) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmas*. Volume 3, Nomor 1 : 26–31.
- Massagu, J. 1998. TGF- β Signa Transduction. *Biochem*. Volume 67: 753–91.
- Meira, N.A., Luiz, C.K., Lilian W.R., Zhelmy, M.Q., Franco, D.M., Valdir, C.F., and Nara, L.M.Q. 2014. Anti-Inflammatory and Anti-Hypersensitive Effects of the Crude Extract, Fractions and Triterpenes Obtained from *Chrysophyllum cainito* Leaves in Mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 151, Nomor 2: 975–83.
- [Menkes RI] Kementerian Kesehatan RI. 1994. “Menteri Kesehatan Republik Inoonesia Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor : 661/Menkes/Sk/Vii/ 1994 Tentang Persyaratan Obat Tradisional”. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
- [Menkes RI] Kementrian Kesehatan RI. 2015. *Indofatin Data Dan Kondisi Penyakit Osteoporosis Di Indonesia*. Jakarta: Pusat data dan informasi Kemenkes RI.
- Migliaccio S.B.M. and Malavolta, N. 2009. Management of Glucocorticoids-Induced Osteoporosis. *Role of Teriparatide*. Volume 5, Nomor 2.
- Morton, J. 1987. Star Apple in: Morton. J., *Fruits of Warm Climates*. Volume 408.
- Muliani, I.N.M.K. dan Tirtayasa, K. 2014. Pemberian Kalsium Laktat Dan Berenang Meningkatkan Osteoblast Pada Epiphysis Tulang Radius Mencit Perimenopause. *Jurnal Veteriner*. Volume 15, Nomor 1: 39–45.
- Murray, R.K. 2003. *Hormone Action And Signal Transduction in Harper's Illustrated Biochemistry*. Mc Grow Hill: Lange Basic Science.
- Mustofa, A.S. 2018. Aktivitas Ekstrak Etil Asetat Daun Kenitu (*Chrysophyllum*

cainito) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit Betina Yang Diinduksi Deksametason (Skripsi). Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Nikose, S., Pradeep, S., Sohael, K., Mridul, A., Shounak, T., Mahendra, G., and Swapnil, G. 2015. Women ' s Health Care Prevalence of Osteoporosis in Female Population in Rural Central India [By Calcaneal Ultrasound]. *Journal Women's Health Care* 4 (5): 4–6.
- Ningsih, I.Y., Zulaikhah, S., Hidayat, M.A., and Kuswandi, B. 2016. Antioxidant Activity of Various Kenitu (*Chrysophyllum Cainito* L.) Leaves Extracts from Jember, Indonesia. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. Volume 9: 378–85.
- Notoatmojo, S. 2010. *Metode Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Oursler, M.J. 2003. Direct and Indirect Effects of Estrogen on Osteoclasts. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. Volume 3, Nomor 4: 363–366.
- Pawitan, J.A. 2002. Phytoestrogens-Protection Against a Wide Range of Diseases. *Medical Progress*. Volume 1: 9–13.
- Prideaux, M., Findlay, D.M., and Gerald J.A. 2016. Osteocytes: The Master Cells in Bone Remodelling, *Current Opinion in Pharmacology*. Volume 28:24-30
- Poulsen, R.C. and Kruger, M.C. 2008. Soy Phytoestrogens: Impact on Postmenopausal Bone Loss and Mechanisms of Action. *Nutrition Reviews*, Vol. 66: 359–74.
- Rachman, I.A. 2006. *Osteoporosis Primer In Osteoporosis*. Jakarta: Raja Grafinda Persada.
- Ramadani, M. 2010. Faktor-Faktor Resiko Osteoporosis Dan Upaya Pencegahannya. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Andalas*. Volume 4, Nomor 2: 111–15.
- Reid, I.R. 2000. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*. Volume 14, Nomor 2: 279–98.
- Rochira, V., Kara, E., Carani, C. 2015. The Endocrine Role of Estrogens on Human Male Skeleton . *International Journal of Endocrinology*, Volume 2015:1-15.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Sambo, A.P., Umar, H., Adam, J.M.F. 2009. Causes of Secondary Osteoporosis. *The Indonesian Journal of Medical Science*. Volume 2, Nomor 1: 41–50.
- Samruan, W., Gasaluck, P., and Oonsivilai, R. 2014. Total phenolic and flavonoid contents of Soybean fermentation by *Bacillus subtilis* SB-MYP-1. *Advanced Materials Research*, Volume 931: 1587-1591.
- Sennang A. N., Mutmainnah, R.D.N., Pakasi, Hardjoeno. 2006. Analisis Kadar Osteokalsin Serum Osteopenia Dan Osteoporosis. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. Volume 12, Nomor 2: 49 dan 52.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al Misbah: Pesan Kesan Dan Keserasian Al Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Silalahi, M.S.S. 2012. Uji Aktivitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 70% Buah Kacang Panjang (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp.) Berdasarkan Penurunan Jumlah Osteoklas Pada Growth Plate Tulang Tikus Yang Diovariectomi (Skripsi). Jakarta: Universitas Indonesia.
- Sudharma, N.I. 2012. Faktor eksternal yang Berhubungan dengan Kadar Hormon Testosteron pada Laki-Laki Usia 40 Tahun Keatas di Kecamatan Cilandak Jakarta Selatan (Skripsi). Jakarta: Universitas Indonesia
- Suganya, J., Mahendran, R., and Devi, L.N. 2014. *In Silico* Docking Studies of Selected Flavonoids - Natural Healing Agents *In Silico* Docking Studies of Selected Flavonoids - Natural Healing Agents against Breast Cancer. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. Volume 15, Nomor 19: 8155–59.
- Susilo, Y. 2012. Sintesis Estradiol -17 β -Hemisuksinat Bertanda 125I dan Studi Ikatannya terhadap reseptor Estrogen Menggunakan Metode Scintillation Proximity Assay (Tesis). Jakarta: Universitas Indonesia.
- Sylvia, A.P., & Lorraine, M.W. 1995. *Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. 4th ed. Jakarta: EGC.
- Takenaka, Kentaro. 2011. *Bone Remodeling Simulation Focused on Bone Remodeling Cycle*. Biomechanic Lab, Kyoto University. 2011. <http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp>. Diakses pada 1 Januari 2018.
- United States Departement of Agliculture. 2003. *Plant Database*. 2003. <https://plants.usda.gov>. Diakses pada 1 Januari 2018.
- Utaminingtyas, N.U. 2017. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit Betina Yang Diinduksi Deksametason (Skripsi).

Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Wade, A. and Waller, P. J . 1994. *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Second Edition*. 231st ed. London: London Press.

Wagner, H. 1983. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer-Verlag.

Wardhana, W. 2012. Faktor Risiko Osteoporosis Pada Pasien Dengan Usia Di Atas 50 Tahun (Jurnal Media Muda). Semarang: Universitas Diponegoro.

Waters, K.M., Gebhart, J.B., Rickard, D.J. 1999. Potential Roles of Estrogen Reseptor- α and - β in the Regulation of Human Osteoblast Functions and Gene Expression. The Menopause at the Millenium. In *The Proceeding of the 9th International Menopause Society World Congress on Menopause*. Yokohama, Japan.

Widiyati, E. 2006. Penentuan Adanya Senyawa Triterpenoid Dan Uji Aktivitas Biologi Pada Beberapa Spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *Jurnal Gradien*. Volume 2: 116–22.

Wiren, K.M., Anthony, A. Semirale, Xiao, W.Z., Adrian, W., Steven, M. T., Christopher, P., Mitchell B.S., and Karl J.J. 2008. Targeting of Androgen Receptor in Bone Reveals a Lack of Androgen Anabolic Action and Inhibition of Osteogenesis. A Model for Compartment-Specific Androgen Action in the Skeleton. *Bone*. Volume 43, Nomor 3: 440–51.

Yang, T.S., Sung, Y.W., Yu, C.W., Chu, H.S., Fa, K.L., Chen, S.C., Chao, Y.T., Jou, H.J., Huang, J.P., and Huang, K.E. 2012. Effects of Standardized Phytoestrogen on Taiwanese Menopausal Women. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. Volume 51, Nomor 2: 229–35.

Yuehuei and Martin, K.L. 2003. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New Jersey: Humana Press.

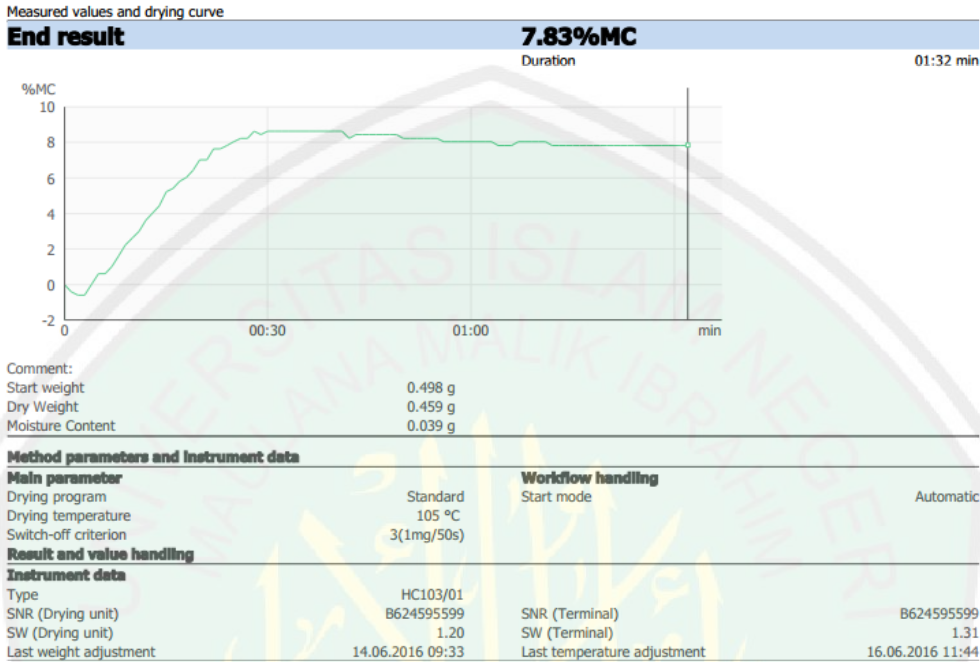
Zulaikhah, S. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan, Polifenol, dan Flavonoid Ekstrak Air, Aseton, Etanol Beberapa Varian Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Dari Daerah Jember (Skripsi). Jember: Universitas Jember.



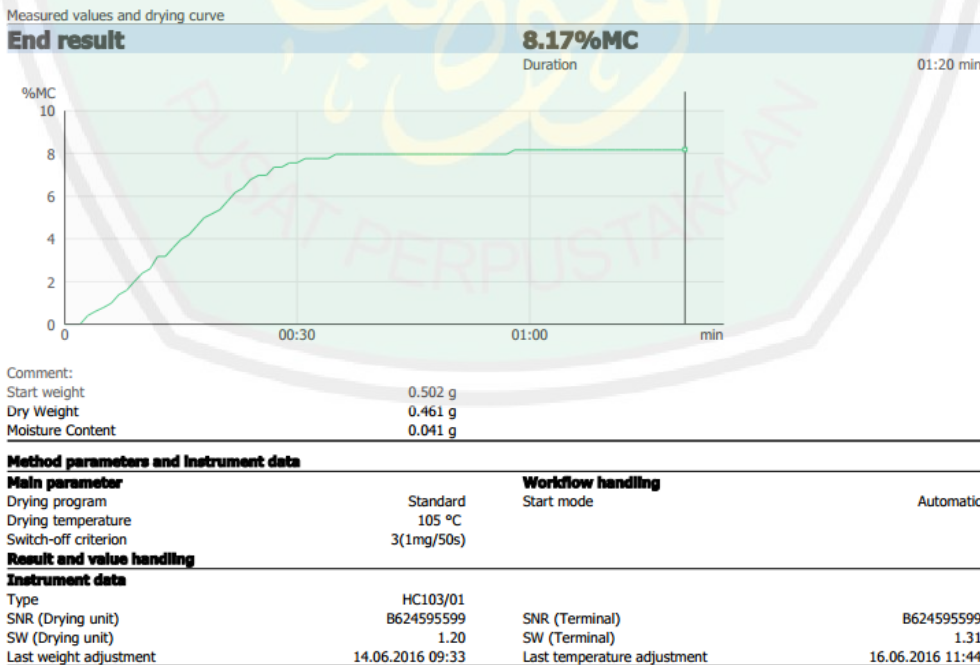
LAMPIRAN – LAMPIRAN

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

a. Replikasi 1

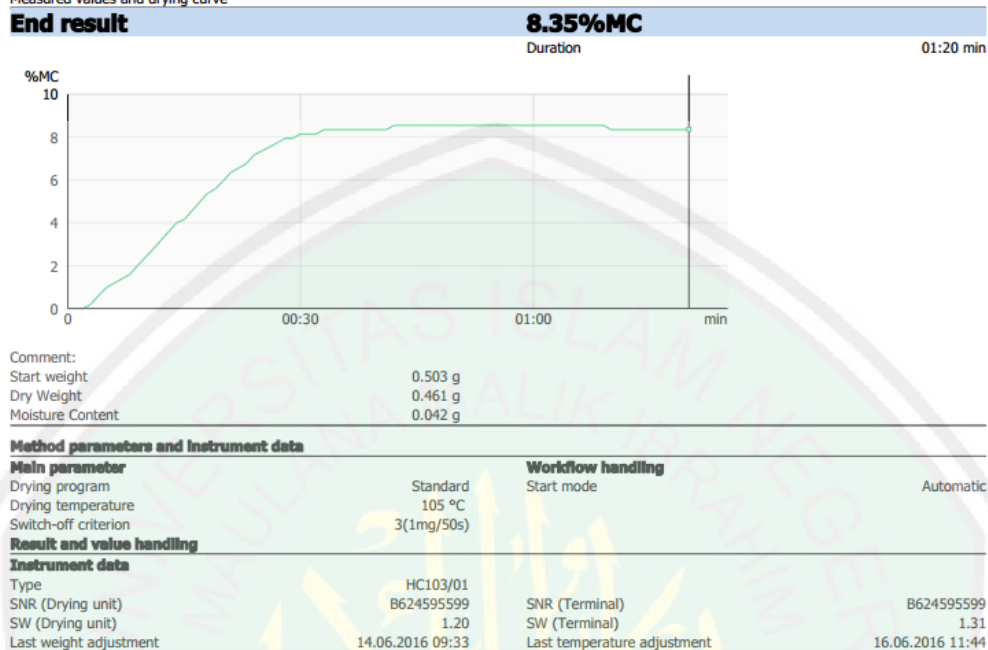


b. Replikasi 2



c. Replikasi 3

Measured values and drying curve

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

Sampel	Replikasi	Kadar Air (%)	Rata-Rata (%)
Simplisia daun <i>C. cainito</i>	1	7,83	8,12
	2	8,17	
	3	8,35	

Lampiran 2: Data Jumlah Sel Osteoblas Tiap Kelompok

Replikasi	Jumlah Sel					
	k+	k-	2 mg	4 mg	8 mg	16 mg
1	202	120	236	257	229	293
2	265	88	214	217	269	342
3	290	136	256	270	263	387
Rata-Rata	252.3333	114.6667	235.3333	248	253.6667	340.6667



Lampiran 3: Hasil Analisis Data

a. Uji normalitas

Perlakuan		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Jumlah_sel	kontrol positif	.938	3	.520
	kontrol negatif	.909	3	.414
	dosis 2 mg	.999	3	.948
	dosis 4 mg	.920	3	.454
	dosis 8 mg	.860	3	.266
	dosis 16 mg	.998	3	.921

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah_sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.750	5	12	.602

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

ANOVA

Jumlah_sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	73429.111	5	14685.822	13.246	.000
Within Groups	13304.667	12	1108.722		
Total	86733.778	17			

d. Uji *Least Significant Difference* (LSD)

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Jumlah_sel						
LSD						
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol positif	kontrol negatif	127.00000*	27.18728	.001	67.7640	186.2360
	dosis 2 mg	16.33333	27.18728	.559	-42.9027	75.5693
	dosis 4 mg	3.66667	27.18728	.895	-55.5693	62.9027
	dosis 8 mg	-2.00000	27.18728	.943	-61.2360	57.2360
	dosis 16 mg	-92.33333*	27.18728	.005	-	-33.0973

					151.5693	
kontrol negatif	kontrol positif	- 127.00000*	27.18728	.001	- 186.2360	-67.7640
	dosis 2 mg	- 110.66667*	27.18728	.002	- 169.9027	-51.4307
	dosis 4 mg	- 123.33333*	27.18728	.001	- 182.5693	-64.0973
	dosis 8 mg	- 129.00000*	27.18728	.000	- 188.2360	-69.7640
	dosis 16 mg	- 219.33333*	27.18728	.000	- 278.5693	- 160.0973
dosis 2 mg	kontrol positif	-16.33333	27.18728	.559	-75.5693	42.9027
	kontrol negatif	110.66667*	27.18728	.002	51.4307	169.9027
	dosis 4 mg	-12.66667	27.18728	.650	-71.9027	46.5693
	dosis 8 mg	-18.33333	27.18728	.513	-77.5693	40.9027
	dosis 16 mg	- 108.66667*	27.18728	.002	- 167.9027	-49.4307
dosis 4 mg	kontrol positif	-3.66667	27.18728	.895	-62.9027	55.5693
	kontrol negatif	123.33333*	27.18728	.001	64.0973	182.5693
	dosis 2 mg	12.66667	27.18728	.650	-46.5693	71.9027
	dosis 8 mg	-5.66667	27.18728	.838	-64.9027	53.5693
	dosis 16 mg	-96.00000*	27.18728	.004	- 155.2360	-36.7640
dosis 8 mg	kontrol positif	2.00000	27.18728	.943	-57.2360	61.2360
	kontrol negatif	129.00000*	27.18728	.000	69.7640	188.2360
	dosis 2 mg	18.33333	27.18728	.513	-40.9027	77.5693
	dosis 4 mg	5.66667	27.18728	.838	-53.5693	64.9027
	dosis 16 mg	-90.33333*	27.18728	.006	- 149.5693	-31.0973
dosis 16 mg	kontrol positif	92.33333*	27.18728	.005	33.0973	151.5693
	kontrol negatif	219.33333*	27.18728	.000	160.0973	278.5693
	dosis 2 mg	108.66667*	27.18728	.002	49.4307	167.9027
	dosis 4 mg	96.00000*	27.18728	.004	36.7640	155.2360
	dosis 8 mg	90.33333*	27.18728	.006	31.0973	149.5693

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

e. Probit Analysis

Confidence Limits							
Probability		95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for $\log(\text{Dosis})^b$		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	5.828	.	.	.766	.	.
	.020	6.173	.	.	.790	.	.
	.030	6.402	.	.	.806	.	.
	.040	6.580	.	.	.818	.	.
	.050	6.729	.	.	.828	.	.
	.060	6.858	.	.	.836	.	.
	.070	6.973	.	.	.843	.	.
	.080	7.078	.	.	.850	.	.
	.090	7.174	.	.	.856	.	.
	.100	7.264	.	.	.861	.	.
	.150	7.650	.	.	.884	.	.
	.200	7.970	.	.	.901	.	.
	.250	8.256	.	.	.917	.	.
	.300	8.522	.	.	.931	.	.
	.350	8.775	.	.	.943	.	.
	.400	9.023	.	.	.955	.	.
	.450	9.269	.	.	.967	.	.
	.500	9.518	.	.	.979	.	.
	.550	9.773	.	.	.990	.	.
	.600	10.040	.	.	1.002	.	.
	.650	10.323	.	.	1.014	.	.
	.700	10.630	.	.	1.027	.	.
	.750	10.972	.	.	1.040	.	.
	.800	11.366	.	.	1.056	.	.
	.850	11.842	.	.	1.073	.	.
	.900	12.470	.	.	1.096	.	.
	.910	12.627	.	.	1.101	.	.
	.920	12.799	.	.	1.107	.	.
	.930	12.991	.	.	1.114	.	.
	.940	13.209	.	.	1.121	.	.
	.950	13.463	.	.	1.129	.	.
	.960	13.766	.	.	1.139	.	.

	.970	14.149	.	.	1.151	.	.
	.980	14.675	.	.	1.167	.	.
	.990	15.543	.	.	1.192	.	.
a. A heterogeneity factor is used.							
b. Logarithm base = 10.							



Lampiran 4: Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian

a. Ekstraksi daun *C. cainito*



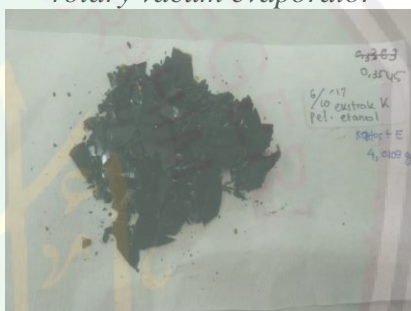
Proses ekstraksi menggunakan metode UAE



Proses penguapan pelarut menggunakan rotary vacuum evaporator



Penguapan kembali ekstrak kental dalam oven

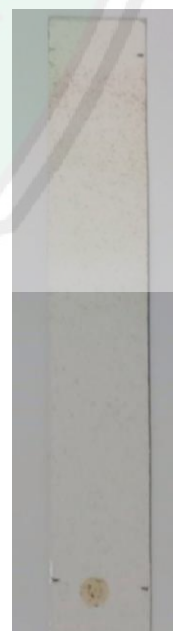


Ekstrak etanol 96% *C. cainito* kering

b. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

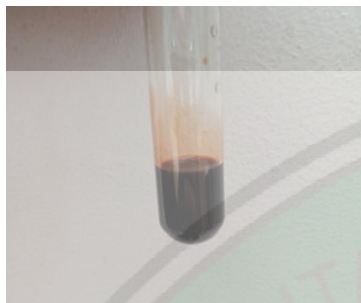


Proses eluasi

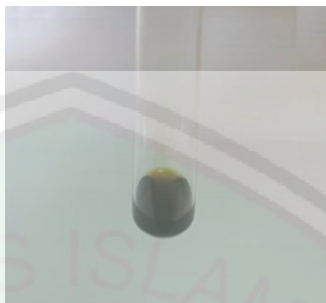


Hasil KLT menggunakan penampak noda vanillin-asam sulfat

c. Uji Warna



Hasil uji Salkowski



Blanko

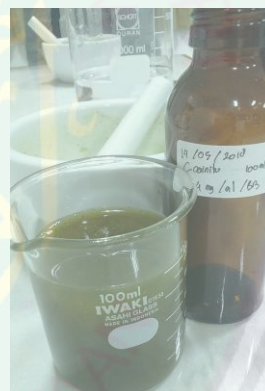


Hasil uji Bate-Smith dan Metcalf

d. Perlakuan Hewan Coba



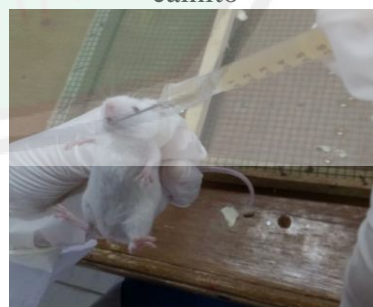
Suspensi deksametason



Suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*



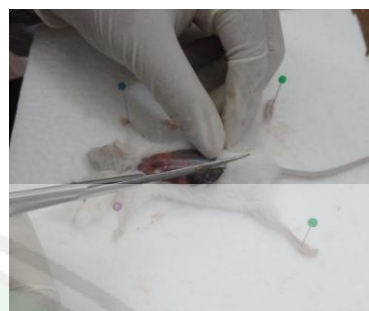
Aklimatisasi dalam laboratorium



Proses penyondetan



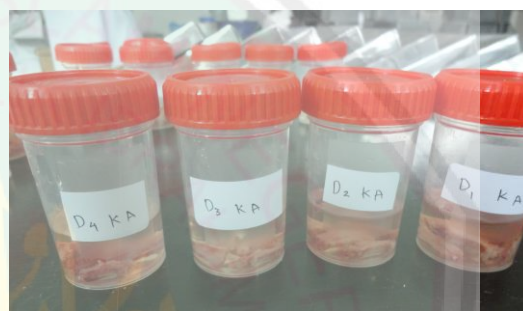
Anestesi inhalasi menggunakan kloroform



Proses pembedahan



Proses pencucian tulang trabekular vertebra dalam larutan NaCl



Tulang trabekular vertebra dalam formalin 10%



Preparat histologi tulang trabekular vertebra dengan pewarnaan HE

Lampiran 5: Perhitungan

- a. Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned}\%R &= \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{3,711 \text{ g}}{30,0099 \text{ g}} \times 100\% = 12,366\%\end{aligned}$$

- b. Perhitungan H₂SO₄ 10 %

$$\begin{aligned}M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 10 \% \times 25 \text{ ml} &= 96 \% \times V2 \\ 2,6 \text{ ml} &= V2\end{aligned}$$

Lampiran 6: Surat Keterangan *Ethical clearance*

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

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

Mengetahui,
Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Malang, 07 SEP 2018
Ketua




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

dr. Avin Ainur F, MBiomed
NIP. 198002032009122002

Keterangan :

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

Lampiran 7: Determinasi Tanaman



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No 87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 354/ 102.7/ 2017
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Kenitu**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : REYHAN AMIRUDDIN
 NIM : 14670018
 Instansi : JURUSAN FARMASI
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kenitu

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Ebenales
Famili	: Sapotaceae
Genus	: Chrysophyllum
Spesies	: <i>Chrysophyllum cainito</i> L.
Nama Umum	: Indonesia: Sawo hijau, apel ijo, genitu, kenitu, manicu, sawo ijo, sawo hejo (Snd), sawo kadu. Inggris: Caimito, star apple. Melayu: sawu duren, pepulut. Thailand: Sataa appoen. Pilipina: Caimito.
Kunci Determinasi	: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121b-124b-125a-126b-127a.

2. Morfologi : Habitus: Tumbuhan berbentuk pohon, berumur menahun (perennial), tinggi 15 - 20 m.
 Batang: Batang berkayu, silindris, tegak, warna cokelat, permukaan kasar. Daun: Daun tunggal, warna permukaan atas hijau - bawah cokelat, panjang 9 - 14 cm, lebar 3 - 5 cm, helaian daun agak tebal, kaku, bentuk lonjong (elliptica), ujung runcing (acutus), pangkal meruncing (acuminatus), tepi rata, pertulangan menyirip (pinnate). Bunga: Perbungaan terletak di ketiak daun, berupa kelompok 5-35 kuntum bunga-bunga kecil bertangkai panjang, kekuningan hingga putih lembayung kelopak 5 helai, mahkota berbentuk tabung bercuping 5, panjang sampai 4 mm. Buah: buni (bacca), bulat, warna hijau keputih-putihan, dengan biji hitam, pipih, panjang sekitar 1 cm, berkeping dua. Akar: Akar tunggang.

3. Nama Simplicia : Chrysophylli cainitii Folium / Daun Kenitu.

4. Kandungan kimia : Daun mengandung flavonoid, saponin, dan tanin. Selain itu, juga mengandung zat yang belum diketahui tetapi mempunyai fungsi menurunkan kadar gula darah dan juga antioksidan dan anti kanker.

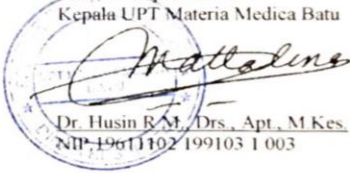
5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=320>, diakses 26 April 2010.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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

Batu, 27 September 2017
 Kepala UPT Materia Medica Batu


 Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.
 NIP. 196111021991031003



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

Jl. Ir. Soekarno No.34 Dadaprejo Batu, Telepon (0341) 577033 Faksimile (0341) 577033
Website: <http://fkk.uin-malang.ac.id> E-mail: fkk@uin-malang.ac.id

LEMBAR PERSETUJUAN PERBAIKAN (REVISI) UJIAN SKRIPSI

Naskah ujian skripsi yang disusun oleh:

Nama : Firsta Roisatul Islamiyah
NIM : 14670022
Judul : Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *Chrysophillum cainito* L. terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas tulang Trabekular Vertebra Mencit Jantan

Tanggal Ujian Skripsi : 7 November 2018

Telah dilakukan perbaikan sesuai dengan saran tim pembimbing dan tim penguji.

No	Nama Dosen	Tanggal Revisi	Tanda Tangan
1.	Weka Sidha Bhagawan, M.Farm., Apt.	14 - 11 - 2018	
2.	Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm., Apt.	13 - 11 - 2018	
3.	Dr. Roihatul Mutiah, M.Kes., Apt.	14 - 11 - 2018	
4.	Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm., Apt.	13 - 11 - 2018	

Catatan :

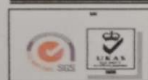
1. Batas waktu maksimum melakukan revisi 2 Minggu. Jika tidak selesai, mahasiswa TIDAK dapat mendaftarkan diri untuk mengikuti Yudisium
2. Lembar revisi dilampirkan dalam naskah skripsi yang telah dijilid, dan dikumpulkan di Bagian Administrasi Jurusan Farmasi selanjutnya mahasiswa berhak menerima Bukti Lulus Ujian Skripsi.

Malang, 14 November 2018

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi



Dr. Roihatul Mutiah, M.Kes., Apt.
NIP. 19800203 200912 2 003



Certificate No: ID08/1219

Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlak, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional