

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN *Chrysophyllum cainito* L.  
TERHADAP PENINGKATAN KEPADATAN MASSA TULANG  
TRABEKULAR FEMUR MENCIT JANTAN**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAH SAIFUL 'ARIFIN**  
**NIM. 14670029**



**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 KEPADATAN MASSA TULANG  
TRABEKULAR FEMUR MENCIT JANTAN**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAH SAIFUL 'ARIFIN**  
**NIM. 14670029**

**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 KEPADATAN MASSA TULANG  
TRABEKULAR FEMUR MENCIT JANTAN**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAH SAIFUL 'ARIFIN**  
**NIM. 14670029**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 6 November 2018

Pembimbing I



**Burhan Ma'arif ZA., 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 KEPADATAN MASSA TULANG  
TRABEKULAR FEMUR MENCIT JANTAN**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAH SAIFUL 'ARIFIN**  
**NIM. 14670029**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)  
Tanggal: 6 November 2018

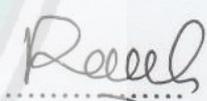
Penguji Utama : drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort.  
NIP. 19850720 200912 1 003

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

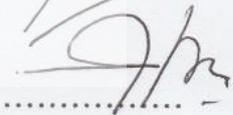
Sekretaris Penguji : Burhan Ma'arif, ZA., M.Farm., Apt.  
NIP. 19900221 201801 1 001

Anggota Penguji : Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm., Apt.  
NIP. 19761214 200912 1 002

  
.....

  
.....

  
.....

  
.....



Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Farmasi

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

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*Alhamdulillah, kupanjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan kesempatan untuk menyelesaikan tugas akhir dengan segala kekuranganku. Segala syukurku ucapkan kepada-Mu karena telah menghadirkan mereka yang selalu memberi semangat dan doa di saat kutertatih. Karena-Mu-lah mereka ada, dan karena-Mu-lah tugas akhir ini terselesaikan. Hanya pada-Mu tempatku mengadu dan mengucapkan syukur. Shalawat dan salam selalu terlimpahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW. Kupersembahkan karya sederhana ini kepada orang yang sangat kukasihi dan kusayangi:*

### **Ibunda dan Ayahanda serta Saudaraku Tercinta dan Tersayang,**

Apa yang ananda peroleh hari ini belum mampu membayar setetes keringat dan air mata Ibu dan Ayah yang selalu menjadi pelita dan semangat dalam hidup ananda. Terima kasih atas semua dukungan Ibu dan Ayah, baik moril maupun materiil, tanpa kehadiran Ayah dan Ibu di samping ananda tak mungkin menjadi seperti sekarang. Aku tak kan pernah lupa semua pengorbanan dan jerih payah yang Ibu dan Ayah berikan untukku agar dapat menggapai cita-cita dan semangat serta doa yang kau lantunkan untukku di setiap sujudmu sehingga kudapat raih kesuksesan ini. Cita-cita ananda kelak dapat membahagiakan Ibu dan Ayah. *Aamiin*. Untuk Saudaraku Wahid, tiada waktu yang paling berharga selain berkumpul dengan keluarga, di saat berjauhan kita saling merindukan dan terkadang di saat bersama kita sering bertengkar, terima kasih untuk semangat dan bantuannya.

### **Seluruh Dosen Pengajar dan Staff Jurusan Farmasi,**

Kepada Bapak Burhan Ma'arif, ZA., M. Farm., Apt selaku dosen pembimbing utama tugas akhir saya. Untuk Seluruh Dosen Pengajar dan Staff Jurusan Farmasi, terima kasih banyak untuk semua ilmu, didikan dan pengalaman yang sangat berarti, yang telah kalian berikan kepadaku.

### **Sahabatku Platinum Generation 14, serta Seluruh Civitas Akademik Farmasi,**

Terpanjat sebuah doa, *“Ya Allah, Jadikanlah Iman, Ilmu dan Amal kami sebagai lentera jalan hidup kami, keluarga kami, dan saudara seiman kami.”*  
*Aamiin*.

## HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Miftah Saiful 'Arifin

NIM : 14670029

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan

Judul Skripsi : Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *Chrysophyllum cainito* L.  
Terhadap Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur  
Mencit Jantan

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

Malang, 14 November 2018  
Yang membuat pernyataan,



**Miftah Saiful 'Arifin**  
**NIM. 14670029**

## MOTTO

وَالْعَصْرِ ﴿١﴾ إِنَّ الْإِنْسَانَ لَفِي خُسْرٍ ﴿٢﴾  
إِلَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ وَتَوَّصُوا بِالحَقِّ وَتَوَّصُوا بِالصَّبْرِ ﴿٣﴾

*“Demi masa. Sesungguhnya manusia itu benar-benar dalam kerugian, kecuali orang-orang yang beriman dan mengerjakan amal saleh dan nasehat menasihati supaya menaati kebenaran dan nasehat menasihati supaya menetapi kesabaran.”*  
(QS. Al ‘Ashr [103] ayat 1 – 3)

*“Learn from the past, keep trying and praying in this time, and successful in the future.” ~ Pengembara Ilmu, Pengelana Waktu*

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.*

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

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

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

5. drg. Arief Suryadinata, S.P., Ort. selaku konsultan yang telah memberikan arahan, motivasi dan berbagai ilmunya kepada penulis.
6. Abdul Hakim, M.P.I., M. Farm., Apt. selaku dosen penguji agama yang telah banyak memberikan arahan dan berbagai ilmunya kepada penulis.
7. Segenap civitas akademika Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang terutama seluruh dosen, terima kasih atas segala ilmu dan bimbingannya.
8. Ayah dan Ibu tercinta yang telah mencurahkan cinta kasih, doa, bimbingan, dan motivasi hingga selesainya skripsi ini.
9. Saudara tersayang yang telah memberikan semangat kepada penulis.
10. Seluruh teman-teman di Jurusan Farmasi angkatan 2014 (*Platinum Generation* 14), terutama tim *Phytoestrogen* yang berjuang bersama-sama untuk meraih mimpi dan terima kasih untuk setiap kenangan indah yang dirajut bersama dalam menggapai impian.
11. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik moril maupun materiil.

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

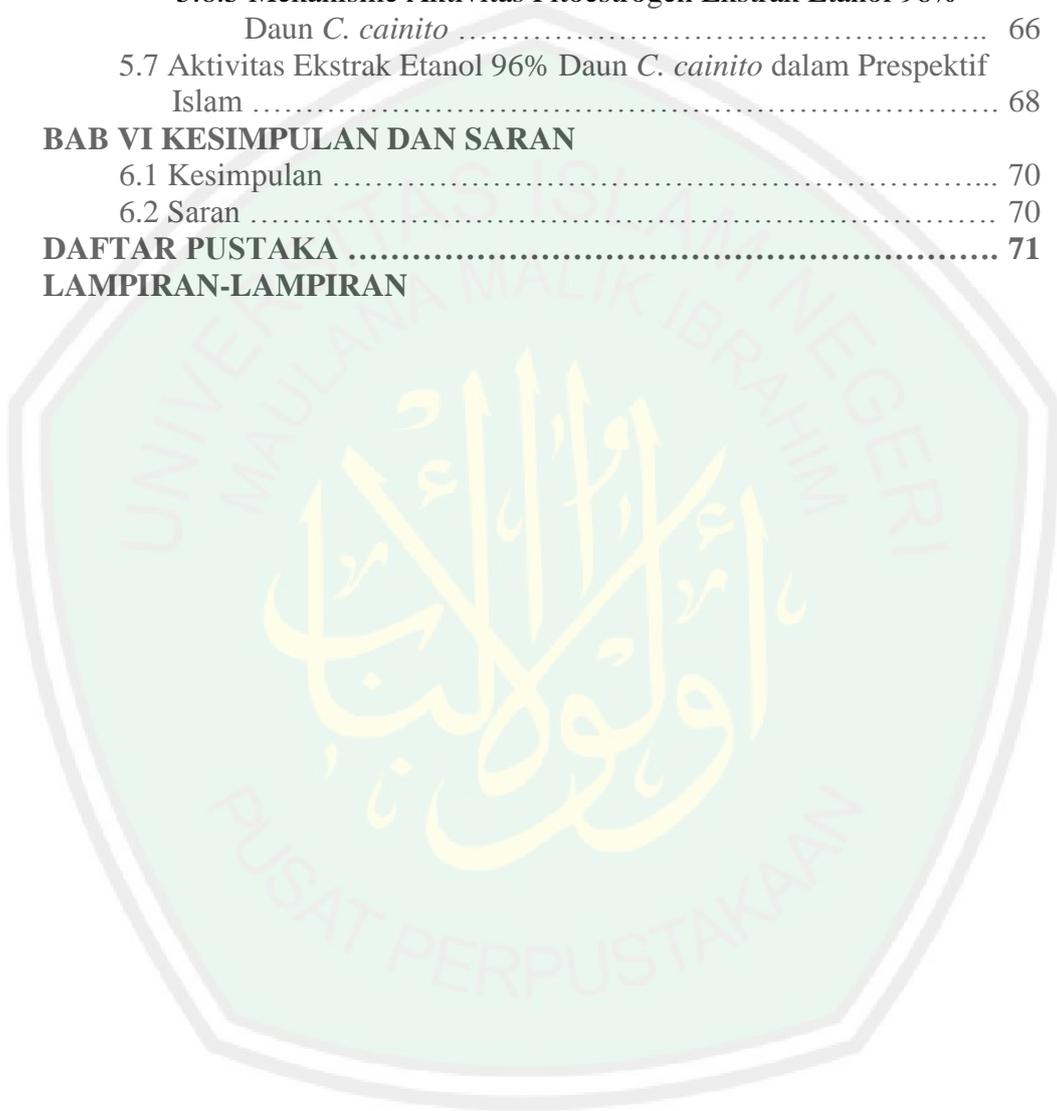
*Wassalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.*

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>HALAMAN PENGANTAR</b>	
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b>	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b>	
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b>	
<b>MOTTO</b>	
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	ix
<b>ABSTRAK</b> .....	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
1.5 Batasan Masalah .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tumbuhan dalam Prespektif Islam .....	8
2.2 Tinjauan tentang <i>C. cainito</i> .....	10
2.2.1 Klasifikasi Tumbuhan .....	10
2.2.2 Deskripsi dan Morfologi .....	10
2.2.3 Kandungan dan Manfaat .....	11
2.3 Tinjauan Flavonoid .....	12
2.4 Tinjauan Terpenoid .....	13
2.5 Tinjauan Ekstrak dan Ekstraksi Ultrasonik .....	14
2.5.1 Ekstraksi .....	15
2.5.2 Ekstraksi Ultrasonik .....	16
2.6 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	16
2.7 Tinjauan Tentang Tulang .....	18
2.7.1 Sel Tulang .....	18
2.7.2 Mekanisme <i>Remodeling</i> Tulang .....	21
2.8 Tinjauan Tentang Estrogen dan Fitoestrogen .....	23
2.8.1 Estrogen .....	23
2.8.2 Fitoestrogen .....	24
2.9 Tinjauan Tentang Osteoporosis .....	26
2.9.1 Definisi Osteoporosis .....	26
2.9.2 Klasifikasi Osteoporosis .....	27
2.9.2.1 Osteoporosis Primer .....	27
2.9.2.2 Osteoporosis Sekunder .....	27
2.9.3 Terapi Osteoporosis .....	28

2.9.3.1 Terapi dengan Alendronat .....	28
2.9.3.2 Terapi dengan Fitoestrogen .....	29
2.10 Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular	
Femur .....	29
2.10.1 Tinjauan Tentang Hewan Coba <i>Mus musculus</i> .....	29
2.10.2 Pemeriksaan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur	30
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL</b>	
3.1 Bagan Kerangka Konseptual .....	32
3.2 Uraian Kerangka Konseptual .....	33
3.3 Hipotesis Penelitian .....	34
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	35
4.1.1 Jenis Penelitian .....	35
4.1.2 Rancangan Penelitian .....	35
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	35
4.3 Sampel Penelitian .....	36
4.3.1 Sampel Tanaman .....	36
4.3.2 Sampel Hewan Coba .....	36
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	37
4.4.1 Variabel Penelitian .....	37
4.4.1.1 Variabel Bebas .....	37
4.4.1.2 Variabel Terikat .....	37
4.4.1.3 Variabel Kontrol .....	37
4.4.2 Definisi Operasional .....	37
4.5 Alat dan Bahan Penelitian .....	38
4.5.1 Alat Penelitian .....	38
4.5.2 Bahan Penelitian .....	39
4.6 Prosedur Penelitian .....	39
4.6.1 Penyiapan Bahan Tanaman .....	39
4.6.2 Pengukuran Nilai Kadar Air .....	39
4.6.3 Ekstraksi Ultrasonik .....	40
4.6.4 Skrining Fitokimia dengan KLT .....	40
4.6.5 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang	
Trabekular Femur .....	41
4.6.5.1 Uji Etik .....	41
4.6.5.2 Penyiapan Hewan Coba .....	41
4.6.5.3 Pembedahan Hewan Coba .....	44
4.6.5.4 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	44
4.6.5.5 Pengamatan Histopatologi Tulang Trabekular	
Femur Mencit Jantan .....	45
4.6.6 Analisis Data .....	45
4.7 Skema Rancangan Penelitian .....	47
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Determinasi Tanaman <i>C. cainito</i> .....	48
5.2 Preparasi Simplisia Daun <i>C. cainito</i> .....	48
5.3 Pengukuran Nilai Kadar Air .....	49
5.4 Ekstraksi Daun <i>C. cainito</i> .....	50
5.5 Skrining Fitokimia .....	53

5.6 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular	
Femur .....	56
5.6.1 Penginduksian Osteoporosis .....	57
5.6.2 Uji Aktivitas Antiosteoporosis .....	58
5.6.3 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi .....	59
5.6.4 Analisis Data .....	62
5.6.5 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen Ekstrak Etanol 96%	
Daun <i>C. cainito</i> .....	66
5.7 Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun <i>C. cainito</i> dalam Prespektif	
Islam .....	68
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1 Kesimpulan .....	70
6.2 Saran .....	70
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	71
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Klasifikasi Terpenoid .....	14
Tabel 5.1	Nilai kadar air simplisia kering daun <i>C. cainito</i> .....	50
Tabel 5.2	Hasil ekstraksi daun <i>C. cainito</i> .....	52
Tabel 5.3	Rincian profil KLT ekstrak etanol 96% daun <i>C. cainito</i> .....	55
Tabel 5.4	Hasil rerata kepadatan massa tulang tiap kelompok uji .....	61
Tabel 5.5	Hasil uji normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> .....	62
Tabel 5.6	Hasil uji homogenitas varian <i>Levene's test</i> .....	63
Tabel 5.7	Hasil uji <i>One-Way ANOVA</i> .....	63
Tabel 5.8	Hasil uji LSD .....	64
Tabel 5.9	Hasil uji <i>Chi-Square Test</i> .....	65
Tabel 5.10	Hasil nilai probabilitas .....	66

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman <i>C. cainito</i> .....	10
Gambar 2.2	Struktur dasar senyawa flavonoid .....	13
Gambar 2.3	Struktur dasar senyawa isoprene .....	14
Gambar 2.4	Sel tulang .....	21
Gambar 2.5	Proses <i>remodeling tulang</i> .....	23
Gambar 2.6	Struktur estron, 17 $\beta$ -estradiol, dan estriol .....	24
Gambar 2.7	Struktur fitoestrogen dan estrogen .....	25
Gambar 2.8	Tulang normal dan tulang osteoporosis .....	26
Gambar 3.1	Bagan kerangka konseptual .....	38
Gambar 4.1	Skema rancangan penelitian .....	47
Gambar 5.1	Tanaman <i>C. cainito</i> .....	48
Gambar 5.2	Simplisia serbuk daun <i>C. cainito</i> .....	49
Gambar 5.3	Ekstrak kering etanol 96% daun <i>C. cainito</i> .....	52
Gambar 5.4	Hasil Visualisasi Skrining Fitokimia dengan TLC <i>Visualizer</i> .....	54
Gambar 5.5	Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol 96% daun <i>C. cainito</i>	55
Gambar 5.6	Mencit normal dan osteoporosis .....	57
Gambar 5.7	Hasil preparat histopatologi tulang trabekular femur .....	60
Gambar 5.8	Pengukuran kepadatan massa tulang trabekular femur .....	61
Gambar 5.9	Hasil pengukuran histomorfometri .....	62
Gambar 5.10	Aktivitas fitoestrogen ekstrak etanol 96% daun <i>C. cainito</i> ..	67

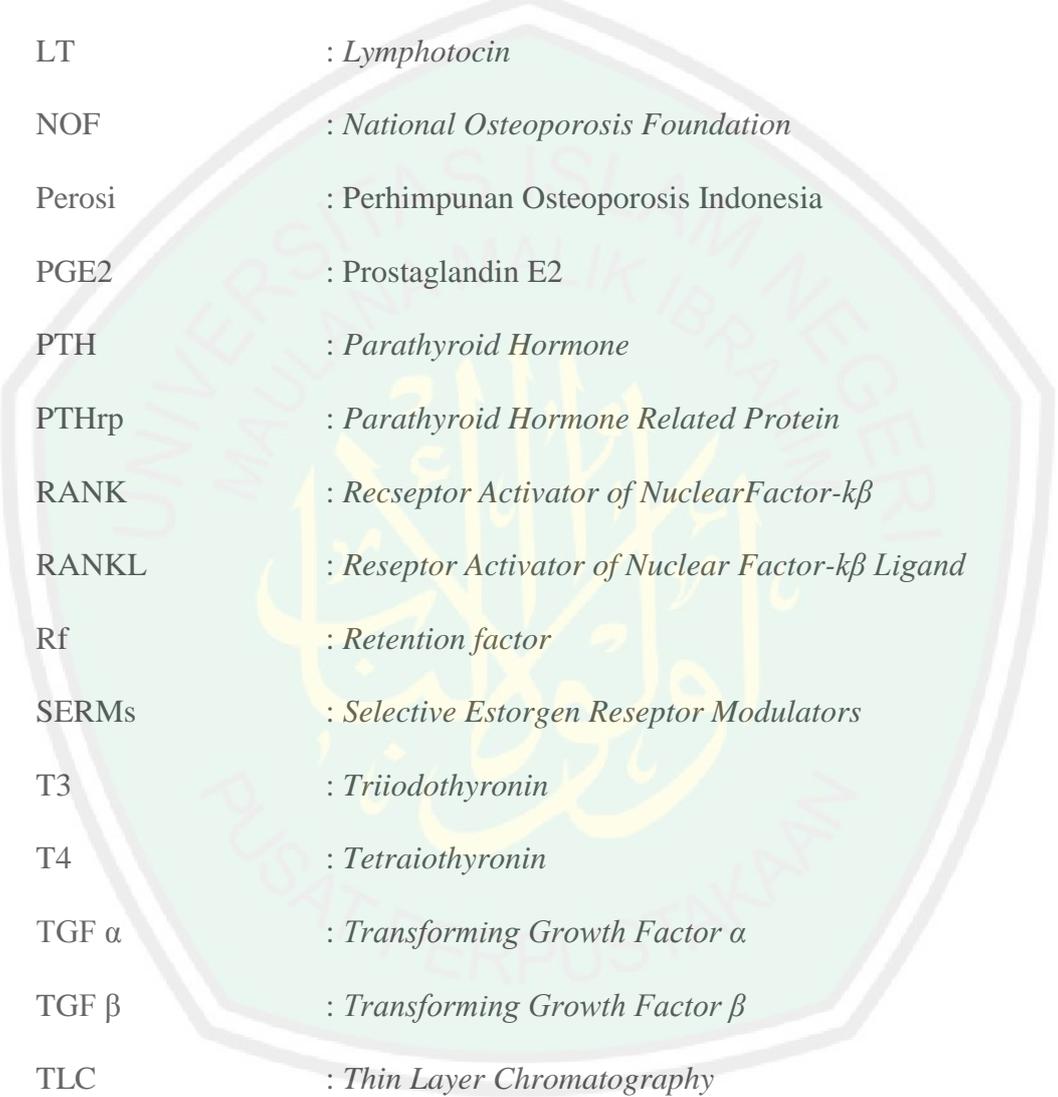
## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Hasil Determinasi Tanaman *C. cainito*
- Lampiran 2 Hasil Uji *Moisture Content* Simplisia Kering Daun *C. cainito*
- Lampiran 3 Hasil TLC *Visualizer* Ekstrak Daun *C. cainito*
- Lampiran 4 Hasil Pengukuran Histomorfometri
- Lampiran 5 Hasil Analisis Data
- Lampiran 6 Hasil Perhitungan
- Lampiran 7 Surat Keterangan Kelaikan Etik
- Lampiran 8 Prosedur Pengerjaan Preparat Histopatologi
- Lampiran 9 Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian



## DAFTAR SINGKATAN

BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
Depkes RI	: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
E1	: Estron
E2	: $17\beta$ -estradiol
E3	: Estriol
ED	: <i>Effective Dose</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
ER- $\alpha$	: <i>Estrogen alpha</i>
ER- $\beta$	: <i>Estrogen betha</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GF	: <i>Folikel de Graff</i>
GnRH	: <i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
GTP	: <i>Guanosin Trifospat</i>
HE	: Hematoksilin dan Eosin
HRT	: <i>Hormon Replacment Therapy</i>
IFN $\gamma$	: Interferon $\gamma$
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IL 1	: Interleukin 1
IL 11	: Interleukin 11
IL 6	: Interleukin 6
IOF	: <i>International Osteoporosis Foundation</i>
Kemendes RI	: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia



KEPK	: Komisi Etik Penelitian Kesehatan
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
LH	: <i>Lutenising Hormone</i>
LSD	: <i>Least Significance Different</i>
LT	: <i>Lymphotocin</i>
NOF	: <i>National Osteoporosis Foundation</i>
Perosi	: Perhimpunan Osteoporosis Indonesia
PGE2	: Prostaglandin E2
PTH	: <i>Parathyroid Hormone</i>
PTHrp	: <i>Parathyroid Hormone Related Protein</i>
RANK	: <i>Recseptor Activator of NuclearFactor-<math>k\beta</math></i>
RANKL	: <i>Reseptor Activator of Nuclear Factor-<math>k\beta</math> Ligand</i>
Rf	: <i>Retention factor</i>
SERMs	: <i>Selective Estorgen Reseptor Modulators</i>
T3	: <i>Triiodothyronin</i>
T4	: <i>Tetraiothyronin</i>
TGF $\alpha$	: <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i>
TGF $\beta$	: <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>
TNF $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TNF $\beta$	: <i>Tumor Necrosis Factor <math>\beta</math></i>
UAE	: <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
USDA	: <i>United States Department of Agriculture</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## ABSTRAK

Arifin, Miftah Saiful. 2018. **Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *Chrysophyllum cainito* L. Terhadap Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur Mencit Jantan.** Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-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.; Penguji: drg. Arief Suryadinata, S.P., Ort.

---

Fitoestrogen merupakan golongan senyawa berasal dari tumbuhan yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen. Salah satu peran fitoestrogen adalah dalam proses pembentukan tulang. *Chrysophyllum cainito* L. adalah salah satu tanaman yang diduga mengandung fitoestrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dan dosis efektif ( $ED_{50}$ ) dalam meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Penelitian dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dosis 2; 4; 8; dan 16 mg/20 BB mencit/hari selama 28 hari setelah diinduksi oleh deksametason 0,0029 mg/20 BB mencit/hari selama 28 hari sebagai model osteoporosis dan pemberian induksi alendronat 0,026 mg/20 BB mencit/hari sebagai kontrol positif. Peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur diamati dengan metode histomorfometri dan pewarnaan Hematoksilin-Eosilin (HE). Data dianalisis dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan uji *Least Significant Difference (LSD)*, dilanjutkan dengan uji Probit untuk mengetahui dosis efektif ( $ED_{50}$ ) dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Dosis efektif ( $ED_{50}$ ) ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan adalah 7,915 mg.

**Kata-kata kunci:** *Chrysophyllum cainito* L., Fitoestrogen, Kepadatan Massa Tulang

## ABSTRACT

Arifin, Miftah Saiful. 2018. **The Activity of 96% Ethanol Extract of *Chrysophyllum cainito* L. Leaves to Increased Femur Trabecular Bone Mass Density in Male Mice.** Thesis. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine 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.; Consultan: drg. Arief Suryadinata, S.P., Ort.

---

Phytoestrogens is a group of compound derived from plants that can replace the function of estrogen in its association with estrogen receptors. One of its role was in bone formation process. *Chrysophyllum cainito* L. is a plant that suspected to contain phytoestrogens. This research aims to determine the activity of 96% ethanol extract of *C. cainito* leaves in increasing trabecular femur bone mass density in male mice. The study was treatment by giving 96% ethanol extract of *C. cainito* leaves with dose 2; 4; 8; and 16 mg/20 BW mice/day in 28 days after induced by dexamethasone 0.0029 mg/20 BW mice/day in 28 days as osteoporosis model and induction of alendronate 0.026 mg/20 BW mice/day as positive control. The increasing of trabecular femur bone mass density was observated by histomorphometry and Hematoxylin-Eosin (HE) staining methods. The statistical analyses were using One-Way ANOVA, and Least Significant Difference (LSD), followed by probit analysis to determine the effective dose (ED<sub>50</sub>) of 96% ethanol extract of *C. cainito* leaves in increasing trabecular bone mass density in male mice. The results showed that administration of ethanol extract 96% of *C. cainito* leaves had the activity of increasing the trabecular bone mass density in male mice. The effective dose (ED<sub>50</sub>) of 96% ethanol extract of *C. cainito* leaves to increase the trabecular bone mass density of male mice is 7.915 mg.

**Keywords:** *Chrysophyllum cainito* L., Phytoestrogens, Bone Mass Density

## مستخلص البحث

العارفين، مفتاح سيف. 2018. نشاط مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) على زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: د. رائحة المطيعة، الماجستير. والمناقش: عارف سورياديناتا.

**الكلمات الرئيسية:** كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.)، الفيتواستروجينات، كثافة كتلة العظم.

الفيتواستروجينات هي من المركبات المشتقة من النباتات التي يمكن أن تحل وظيفة الأستروجين في تركيبها مع مستقبلاتها. من إحد أدوار الفيتواستروجينات هي في عملية تكوين العظام. و كريزوفيلوم كينيتو هي إحدى النبات التي تحتوي على الفيتواستروجينات. يهدف هذا البحث إلى تحديد وجود نشاط مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) والجرعة الفعالة ( $ED_{50}$ ) أم لا على زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. أجري هذا البحث بإعطاء مستخرجة الإيثانول 96% من 96 ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) مع بعض الجرعات 2؛ 4؛ 8؛ و 16 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا لمدة 28 يوما بعد تحريضها بديكساميثازون (*dexametason*) على المقدار 0,0029 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا كالنموذج من هشاشة العظام وتحريضها باليندرونات (*alendronat*) على المقدار 0026 ملغ / 20 غيب لكل الفئران يوميا كعنصر تحكم إيجابي. وقد لاحظ الباحث زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنج باستخدام طريقة القياس النسيجي (*histomorfometri*) مع تلويين الهيماتوكسيلين وصبغة إيوسين (*Hematoksilin-Eosilin (HE)*). وقد تم تحليل البيانات باختبار تحليل التباين في اتجاه واحد (*One-Way ANOVA*) واختبار أقل فرق معنوي (*Least Significant Difference*)، ويليها اختبار احترافي (*Probit*) لتحديد الجرعة الفعالة ( $ED_{50}$ ) من مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) على زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. وأظهرت نتائج هذا البحث أن إعطاء مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) له أثر في زيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران. والجرعة الفعالة ( $ED_{50}$ ) من مستخرجة الإيثانول 96% من ورقة كريزوفيلوم كينيتو (*Chrysophyllum cainito* L.) لزيادة كثافة كتلة العظم في ترابيق العظم الإسفنجي لذكور الفئران هي 7,915 ملغ.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Osteoporosis adalah kelainan tulang yang ditandai dengan menurunnya massa tulang, gangguan mikro-arsitektur yang dapat mengakibatkan menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang, sehingga tulang mudah patah (Kemenkes RI, 2008). Penyakit ini disebut sebagai *silent epidemic disease*, karena banyak pasien tidak menyadari bahwa mereka mengalami osteoporosis dan hanya datang pada saat terkena fraktur (Kemenkes RI, 2008). Tulang mengalami fraktur akibat dari sering membungkuk, mengangkat beban berat, maupun jatuh dari ketinggian tertentu, atau dari aktivitas apapun (Schwinghammer, 2015).

Akibat yang ditimbulkan dari osteoporosis adalah patah tulang. Menurut data statistik *National Osteoporosis Foundation* (NOF), lebih dari 44 juta orang Amerika mengalami osteopenia dan osteoporosis yang meningkatkan faktor risiko terjadinya patah tulang (Nurrochmad *et al.*, 2010). *World Health Organization* (WHO) memperkirakan pada pertengahan abad mendatang jumlah patah tulang femur di dunia akan meningkat 3 kali lipat. Pada tahun 2005 jumlah kejadian patah tulang femur di dunia adalah 1,7 juta orang dan sebanyak 0,57 juta orang di Asia. Pada tahun 2050, diperkirakan jumlah kejadian patah tulang femur di dunia per tahun meningkat sebanyak 6,26 juta orang dan di Asia sebanyak 3,25 juta orang (Kemenkes RI, 2015). Penelitian terbaru dari *International Osteoporosis Foundation* (IOF) mengungkapkan bahwa 1 dari 4 wanita lansia di Indonesia memiliki risiko terkena penyakit osteoporosis dan wanita di Indonesia memiliki

risiko terkena osteoporosis 4 kali lebih tinggi daripada pria (Kemenkes RI, 2015). Menurut Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) pada tahun 2007 osteoporosis yang terjadi pada wanita lansia mencapai 32,3% dan pada pria lansia mencapai 28,8% (Junaidi, 2007).

Osteoporosis sering terjadi pada sebagian besar wanita pascamenopause karena pada wanita pascamenopause terjadi penurunan produksi hormon estrogen (Gumelar, 2011). Estrogen mencapai kadar nilai yang rendah terjadi pada masa pascamenopause (Baziad, 2003). Gangguan sekunder yang terjadi karena kekurangan estrogen pada tubuh dalam jangka panjang mengakibatkan pengeroposan tulang atau osteoporosis (Speroff *et al.*, 2005). Selain itu, pada pria lansia juga berisiko tinggi terkena penyakit osteoporosis karena telah terjadi defisiensi hormon androgen, di mana hormon androgen terutama testoteron merupakan hormon terbanyak dalam sirkulasi yang berperan dalam menurunkan aktivitas sitokin-sitokin inflamasi sistemik yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti *Interleukin-1 (IL-1)*, *Interleukin-6 (IL-6)* dan *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) (Malkin, *et al.*, 2004). Defisiensi estrogen sebanding dengan defisiensi testoteron, karena testoteron merupakan salah satu hormon androgen yang dimetabolisme oleh enzim aromatase sitokrom p450 untuk menghasilkan 17- $\beta$ -estradiol dan berfungsi sebagai prekursor estrogen (Reid, 2000).

Bukti telah menunjukkan pentingnya estrogen dalam metabolisme dan pembentukan kembali tulang. Estrogen dalam metabolisme tulang menghambat sekresi IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  yang memelihara perkembangan osteoklas. Estrogen juga merangsang produksi *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) yang menyebabkan apoptosis osteoklas. Di samping itu terdapat reseptor estrogen di

osteoblas yang dapat merangsang aktivitas osteoblas (Kawiyana, 2009). Bahkan, bukti klinis dari pemberian *Hormone Replacement Therapy* (HRT) berupa estrogen sintetik dengan dosis yang telah disesuaikan, secara efektif dapat mencegah hilangnya massa tulang pada wanita pascamenopause dan mengurangi insiden osteoporosis (Kawiyana, 2009). Namun, penggunaan HRT dalam jangka panjang akan menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, yaitu dapat meningkatkan risiko kanker rahim serta kanker payudara (Nurrochmad *et al.*, 2010). Penggunaan HRT menurunkan risiko patah tulang sebesar 24 %, namun meningkatkan risiko kanker payudara 26%, penyakit jantung 29%, dan *stroke* 41% (Cosman, 2009). Selain risiko-risiko tersebut, HRT juga merupakan terapi yang mahal harganya (Pertamawan dan Hestiantoro, 2002).

Adanya efek samping dari HRT dan mahalnya biaya terapi menyebabkan orang mencari alternatif lain ke pengobatan tradisional yang berasal dari bahan alam terutama dari tumbuh-tumbuhan (Anggraini, 2008). Fitoestrogen merupakan golongan senyawa yang berasal dari tanaman yang memiliki struktur mirip estrogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen serta mempunyai fungsi yang mirip estrogen (Yang *et al.*, 2012). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa fitoestrogen memiliki efek protektif dalam mencegah kehilangan massa tulang akibat defisiensi hormon estrogen (Nurrochmad *et al.*, 2010). Beberapa jenis estrogen yang terdapat pada tanaman, yaitu isoflavon, kumestan, lignan, glikosida, triterpen dan senyawa lain yang bersifat fitoestrogenik, seperti diterpenoid, triterpenoid, flavon, khalkon, kumarin, dan asiklik (Hoffman, 2004).

Tumbuh-tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah SWT yang bermanfaat bagi manusia. Apabila manusia mau berpikir dan mengkaji rahasia

dibalik tumbuhan maka akan diketahui banyaknya manfaat dan khasiat tumbuhan berdasarkan jenisnya serta dapat digunakan sebagai obat untuk keberlangsungan hidup manusia. Sebagaimana yang telah disebutkan dalam Al Quran:

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

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

Tafsir kata *awalan yarouu ilaa* menunjukkan pada manusia untuk memaksimalkan potensi yang dimiliki dengan cara memperhatikan apa-apa yang tumbuh di bumi dan mengkaji manfaat tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Kata *zaujiin kariim* berasal dari kata *zaujin* yang berarti pasangan dan *karim* yang berarti baik. Kata pasangan (*zauj*) merupakan pasangan tumbuhan dengan beragam jenisnya yang tumbuh subur dan memiliki manfaat, sedangkan kata baik (*karim*) merupakan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Ayat ini menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan beragam tumbuhan yang bermanfaat di muka bumi ini untuk diambil manfaat darinya (Shihab, 2002).

Salah satu tanaman yang diduga memiliki kandungan senyawa fitoestrogen adalah tanaman kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.). *C. cainito* adalah tanaman yang berasal dari Amerika Tengah yang banyak tumbuh di Indonesia. *C. cainito* tersebar luas di pulau Jawa bagian timur dan daerah pegunungan rendah (Hidayat *et al.*, 2007). *C. cainito* diketahui mengandung berbagai polifenol antioksidan seperti: katekin, epikatekin, galokatekin, epigalokatekin, kuersetin, kuersitrin, isokuersitrin, mirisitrin, dan asam galat (Luo *et al.*, 2002). Senyawa polifenol memiliki manfaat sebagai antioksidan, mencegah perkembangan kanker, penyakit kardiovaskular, antidiabetes, osteoporosis, dan penyakit neurodegeneratif (Vauzour *et al.*, 2010).

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun *C. cainito* di antaranya adalah isoflavon. Isoflavon merupakan salah satu senyawa yang bersifat fitoestrogenik yang cukup tinggi (Grippio *et al.*, 2007). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Utamingtyas (2017) bahwa ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji efek fitoestrogenik dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur pada mencit jantan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan sejumlah hewan uji, yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) dan pemberian ekstrak dilakukan dengan dosis yang berbeda-beda untuk mendapatkan dosis efektif (ED<sub>50</sub>) yaitu dosis yang dapat memberikan aktivitas peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan sebesar 50% terhadap hewan uji.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* memiliki aktivitas peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur pada mencit jantan?
2. Berapakah dosis efektif ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang berpengaruh dalam peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan.
2. Mengetahui dosis efektif (ED<sub>50</sub>) ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang berpengaruh dalam peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Menambah referensi mengenai tanaman yang memiliki potensi sebagai sumber fitoestrogen.
2. Memberikan informasi mengenai aktivitas peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur.
3. Menambah pengetahuan di bidang kesehatan, yakni dapat memberikan informasi bahwa daun *C. cainito* merupakan pengganti hormon estrogen atau menjadi fitoestrogen sebagai agen antiosteoporosis.
4. Penggunaan obat tradisional di masyarakat, sebagai bentuk dari pemanfaatan bahan alam atau konsep *back to nature*.
5. Memberikan informasi kepada masyarakat luas tentang pentingnya membudidayakan tanaman *C. cainito* sebagai bahan obat, yaitu bahan yang bernilai ekonomis.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagian tanaman *C. cainito* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun yang berwarna hijau muda yang diperoleh dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur.
2. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak dari daun *C. cainito* menggunakan pelarut etanol 96% dan menggunakan metode ekstraksi ultrasonik.
3. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dengan berat sekitar 20-25 gram yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya
4. Penelitian ini mengambil parameter peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur dan dosis efektif ( $ED_{50}$ ) yang memberikan aktivitas dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*.
5. Peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur pada penelitian ini diamati secara histomorfometri.
6. Dosis yang diberikan adalah 2 mg, 4 mg, 8 mg, dan 16 mg/ 20 g BB mencit.
7. Pemberian dosis diberikan sesuai dengan kelompok perlakuan selama 28 hari setelah diinduksi deksametason selama 28 hari.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Al Quran merupakan kitab suci bagi umat Islam yang mengandung petunjuk bagi kehidupan manusia. Pada setiap huruf dan kata dalam Al Quran memiliki makna dan tujuan yang sangat mendalam. Al Quran bukan hanya untuk dibaca, namun untuk dipelajari untuk mendekatkan diri kepada Allah swt, dengan cara merenungi tanda-tanda-Nya (Mattson, 2013). Al Quran yang disebut juga sebagai *ayat qauliyah* (tanda-tanda kekuasaan Allah yang tertulis) yang mengajak manusia untuk merenungkan tentang alam semesta (*tafakur alam*) sebagai tanda kekuasaan Allah (*ayat kauniyah*). Adanya alam merupakan bukti adanya Allah. Alam tidak mungkin tiba-tiba ada dengan sendirinya tanpa ada yang menciptakannya. Alam semesta beserta segala isinya merupakan sebagai pertanda (*ayat*) atau bukti yang terpenting mengenai adanya Sang Pencipta (Rahman, 1996).

Al Quran bukanlah kitab sains, namun Al Quran memberikan pengetahuan tentang prinsip-prinsip sains yang dikaitkan dengan metafisik dan spiritual (Fauzan, 2015). Allah dalam wahyu-Nya tidak membuat pernyataan yang saintifik, tetapi menunjukkan tanda-tanda (*ayat-ayat*) berupa fenomena alam dan ciptaan. Jika dipahami secara benar akan mengantarkan kepada kebenaran yang tertinggi, yaitu Allah SWT (Rossidy, 2008). Salah satu dari unsur alam yang terpenting bagi kehidupan manusia yang paling tampak dan sering kali terlihat adalah tumbuh-tumbuhan. Al Quran juga sering menggunakan tumbuh-tumbuhan sebagai bukti

kekuasaan Allah dan perumpamaan untuk menyampaikan suatu hikmah (Fauzan, 2015). Sebagaimana firman Allah SWT sebagai berikut:

أَلَمْ تَرَ كَيْفَ ضَرَبَ اللَّهُ مَثَلًا كَلِمَةً طَيِّبَةً كَشَجَرَةٍ طَيِّبَةٍ أَصْلُهَا ثَابِتٌ وَفَرْعُهَا فِي السَّمَاءِ ﴿٢٤﴾  
 Artinya: *Tidakkah kamu perhatikan bagaimana Allah telah membuat perumpamaan kalimat yang baik seperti pohon yang baik, akarnya teguh dan cabangnya (menjulang) ke langit (Ibrahim: 24).*

Allah SWT telah menciptakan beragam jenis tumbuh-tumbuhan. Keanekaragaman tersebut merupakan kekuasaan (*iradah*) Allah. Dibalik keanekaragaman tersebut mempunyai hikmah dan tujuan tersendiri (Rossidy, 2008). Sebagaimana firman Allah SWT sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتٍ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُمْتَرًا كَيْبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرَّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

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

Ada banyak macam tumbuh-tumbuhan yang ada di bumi dengan beraneka ragam, bentuk, dan rasa. Manusia diperintahkan oleh Allah SWT untuk memanfaatkannya untuk proses berlangsungnya kehidupan manusia, salah satunya digunakan sebagai tanaman obat. Salah satunya adalah tanaman *C. cainito* yang harus dikaji manfaatnya dalam kehidupan manusia.

## 2.2 Tinjauan Tentang *C. cainito*

### 2.2.1 Klasifikasi Tumbuhan

Klasifikasi kenitu menurut USDA (2003) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dileniidae
Ordo	: Ebenales
Famili	: Sapotaceae
Genus	: <i>Chrysophyllum</i> L.
Spesies	: <i>Chrysophyllum cainito</i> Linn.
Nama umum/dagang	: Sawo duren (Jawa)
Nama daerah	: Kenitu (Jawa Timur)



**Gambar 2.1** Tanaman *C. cainito* (diambil dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur)

### 2.2.2 Deskripsi dan Morfologi

*C. cainito* umumnya dikenal oleh masyarakat daerah Jawa bagian Timur dengan istilah kenitu, sedangkan daerah asalnya dataran rendah Amerika Tengah

dan Hindia Barat disebut sebagai *star apple*. Tanaman ini kemudian banyak dibudidayakan di daerah tropis Tengah, Karibia, Amerika Selatan, dan Jamaika. *C. Cainito* tersebar luas pada wilayah tropis dan subtropis seperti: Florida, Australia Utara, Taiwan, Thailand, Filipina, Vietnam, Malasyia, dan Indonesia (Lim, 2013). *C. cainito* di Indonesia banyak dijumpai di pulau Jawa bagian Timur dan daerah pegunungan rendah (Hidayat *et al.*, 2007).

*C. cainito* termasuk dalam famili Sapotaceae dan banyak tumbuh di daerah dataran rendah dengan curah hujan tinggi dan lembab yaitu pada ketinggian 5-1000 meter dari permukaan laut. *C. cainito* merupakan jenis tumbuhan pohon yang tingginya berkisar 8-20 meter, dengan diameter batang lebih dari 60 cm padat, dan keras (Lim, 2013). *C. cainito* mempunyai akar tunggang, batang berkayu, bentuk silindris, tegak, permukaan bergaris kasar, warna kulit batang abu-abu gelap sampai keputihan dan mengeluarkan getah apabila batangnya dilukai. Bunganya terletak pada ketiak daun, berkelompok 5-35 kuntum bunga kecil-kecil dengan tangkai panjang, warna kekuningan sampai putih lembayung, berbau harum manis (Das *et al.*, 2010). *C. cainito* mempunyai daun tunggal dengan permukaan atas berwarna hijau dan bawah cokelat. Umumnya panjang daun sekitar 9-14 cm dan lebar 3-5 cm. Helai daun agak tebal, kaku, bentuk lonjong, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, dan pertulangan menyirip (Morton, 1987).

### **2.2.3 Kandungan dan Manfaat**

Analisis komponen volatil dari *C. cainito* terdapat 104 senyawa dengan (E)-2-heksenal, 1-heksanol, *limonene*, *linalool*,  *$\alpha$ -copaene*, dan heksadekanoat sebagai penyusun utama dan berkontribusi sebagai perasa dari buah *C. cainito* (Pino *et al.*, 2002). *C. cainito* mengandung beberapa senyawa polifenol seperti kafein,

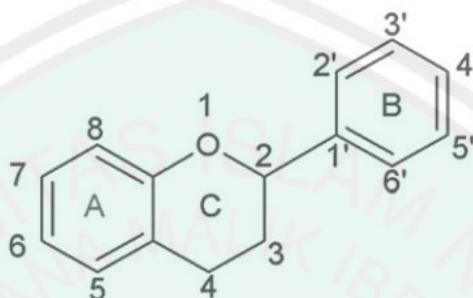
epikatekin, gallokatekin, epigallokatekin, kuersetin, kuersetin, isokuersetin, mirisitrin, dan asam galat yang berfungsi sebagai antioksidan (Luo, *et al.*, 2002). Buahnya menghasilkan senyawa antioksidan antosianin dan sianidin-3-O- $\beta$ -glukopiranosida (Einbond *et al.*, 2014). Kandungan polifenol dan flavonoid dari *C. cainito* dapat digunakan sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, kardiovaskular, antiosteoporosis, dan penyakit neurodegeneratif (Vauzour *et al.*, 2010).

Buah yang masak digunakan untuk mengurangi radang pada saluran pernafasan dan digunakan sebagai pengobatan diabetes dan untuk meringankan angina. Di Venezuela, buah yang mentah dikonsumsi untuk mengobati masalah pencernaan namun jika dikonsumsi berlebihan dapat menyebabkan sembelit. Rebusan daun *C. cainito* dapat digunakan sebagai pengobatan diabetes, pendarahan, demam, dan antikanker (Morton, 1987; Orwa *et al.*, 2009). Infus dari *C. cainito* digunakan sebagai pengobatan diabetes dan rematik persendian (Daz, *et al.* 2010). Ekstrak air dari daun *C. cainito* memiliki efek hipoglikemi, kandungan utamanya alkaloid, sterol, dan triterpen. Uji toksisitas ekstrak air dan etanol daun *C. cainito* tidak memiliki efek toksik (Shailajan dan Gurjar, 2014). Ekstrak metanol daun *C. cainito* mengandung dua senyawa triterpen yang memiliki efek antihipersensitivitas sehingga dapat menurunkan reaksi inflamasi, termasuk pada persendian (Meira *et al.*, 2014).

### 2.3 Tinjauan Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang banyak ditemukan di alam. Senyawa flavonoid ini ditemukan di tanaman berupa zat warna

merah, ungu, biru dan sebagian warna kuning (Endarini, 2016). Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana 2 cincin benzen ( $C_6$ ) terikat pada rantai propana ( $C_3$ ) dan membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$  (Lenny, 2006). Berikut merupakan struktur dasar senyawa flavonoid.

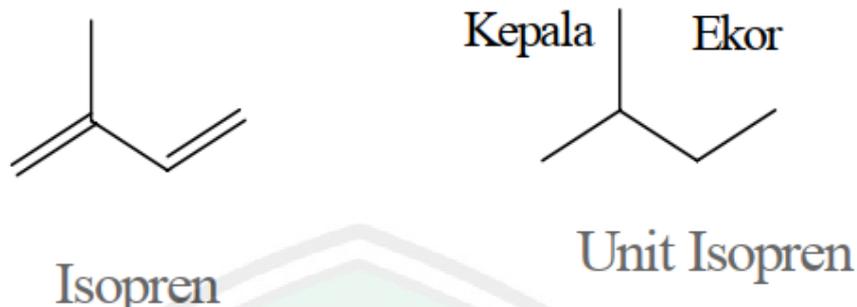


**Gambar 2.2** Struktur dasar senyawa flavonoid (Panche *et al.*, 2016)

Senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propana pada struktur flavonoid, di antaranya adalah isoflavon, flavon, flavonol, khalkon, antosianin, dan flavanon (Lenny, 2006). Kandungan senyawa isoflavon seperti genistein dan daidzein berfungsi sebagai fitoestrogen karena aktivitas ekstrogeniknya pada beberapa hewan coba (Panche *et al.*, 2016).

#### 2.4 Tinjauan Terpenoid

Terpenoid adalah kelompok senyawa metabolit sekunder yang terbesar, baik dari jumlah senyawa maupun variasi dasar strukturnya dan sering ditemukan pada tanaman tingkat tinggi serta salah satu komponen utama penyusun minyak atsiri (Endarini, 2016). Senyawa terpenoid tersusun atas karbon-karbon dengan jumlah kelipatan 5. Sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun dua atau lebih unit C-5 yang disebut unit isoprene, karena kerangka karbonnya sama seperti senyawa isoprene (Lenny, 2006). Berikut merupakan struktur dasar isoprene dan unit isoprene.



**Gambar 2.3** Struktur dasar senyawa isoprene (Lenny, 2006).

Senyawa-senyawa yang termasuk dalam kelompok terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah atom karbon penyusunnya. Penggabungan kepala dan ekor dua unit atau lebih akan membentuk mono-, seskui-, di-, tri-, tetra-, dan poli-terpenoid. Penggabungan ekor dan ekor dari unit  $C_{15}$  atau  $C_{20}$  menghasilkan triterpenoid dan steroid (Lenny, 2006). Berikut adalah klasifikasi dari golongan terpenoid.

**Tabel 2.1** Klasifikasi terpenoid (Endarini, 2016)

Kelompok Terpenoid	Jumlah Atom C
Monoterpenoid	10
Seskui-terpenoid	15
Diterpenoid	20
Triterpenoid	30
Tetraterpenoid	40
Politerpenoid	>40

## 2.5 Tinjauan Ekstrak dan Ekstraksi Ultrasonik

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

### 2.5.1 Ekstraksi

Ekstraksi suatu tanaman obat adalah pemisahan secara kimia atau fisika suatu bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan, yaitu tanaman obat. Dalam proses pembuatan ekstrak ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, di antaranya:

a. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah pembuatan serbuk simplisia kering dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak, karena semakin halus serbuk simplisia proses ekstraksi akan semakin efektif dan efisien (Depkes RI, 2000).

b. Cairan Penyari

Cairan penyari dalam proses pembuatan serbuk adalah pelarut yang optimal untuk zat kandungan berkhasiat, dengan demikian zat tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan zat kandungan lainnya serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar zat kandungan yang diinginkan. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah: Selektivitas; Kemudahan kerja dan proses pembuatan dengan cairan tersebut; Ekonomis; Ramah lingkungan; Keamanan (Depkes RI, 2000).

c. Separasi dan pemurnian

Tahapan ini bertujuan untuk menghilangkan (memisahkan) zat yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki. Proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses absorpsi dan penukar ion (Depkes RI, 2000).

d. Pemekatan atau penguapan

Pemekatan berarti peningkatan jumlah atau konsentrasi zat terlarut dengan cara menguapkan pelarut sampai menjadi kandungan kering sehingga ekstrak menjadi kental atau pekat (Depkes RI, 2000).

e. Pengeringan ekstrak

Proses pengeringan ekstrak dilakukan dengan menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, massa kering dan rapuh tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada beberapa proses pengeringan ekstrak, yaitu pengeringan evaporasi, vaporasi, sublimasi, konveksi, kontak, radiasi dan pengeringan dielektrik (Depkes RI, 2000).

### 2.5.2 Ekstraksi Ultrasonik

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

## 2.6 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) merupakan salah satu metode pemisahan fisikokimia dalam sampel berdasarkan perbedaan distribusi fase diam dan fase gerak. Fase diam berupa plat dengan lapisan bahan absorben dan fase gerak umumnya bersifat cair (larutan). Fase diam pada KLT adalah senyawa yang tidak bereaksi dengan pereaksi-pereaksi yang lebih reaktif seperti asam sulfat di antaranya adalah silika gel, aluminium oksida

(alumina) maupun selulosa. KLT sering digunakan dalam analisis pendahuluan karena memiliki kelebihan murah, mudah digunakan, dan membutuhkan analisis yang cukup cepat (Harborne, 1984).

. Parameter dari KLT adalah faktor retensi ( $R_f$ ) merupakan perbandingan jarak yang ditempuh sampel dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Adapun rumusnya adalah sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai  $R_f$  biasanya lebih kecil dari 1, nilai  $R_f$  ini digunakan untuk perhitungan kualitatif dalam pengujian sampel pada KLT. Nilai  $R_f$  kurang dari 0,2, menunjukkan bahwa belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak sehingga bentuk nodanya kurang simetris. Nilai  $R_f$  lebih dari 0,8, menunjukkan bahwa noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan sinar UV (Wulandari, 2011).

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

## 2.7 Tinjauan Tentang Tulang

Sebagai unsur utama sistem rangka dewasa, jaringan tulang berguna untuk penopang jaringan, melindungi organ vital seperti yang terdapat pada tengkorak, rongga dada, mengandung sumsum tulang di dalamnya, dan tempat pembentukan sel-sel darah. Secara fisiologi, tulang juga berfungsi sebagai tempat penimbunan atau pembebasan kalsium, fosfat dan ion-ion lain untuk mempertahankan konsentrasi yang terkendali dalam cairan tubuh (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Tulang adalah substansi paling keras yang ada pada tubuh manusia yang terdiri dari sel yang berlimpah dan materi ekstraseluler yang keras. Tulang manusia terdiri atas kolagen, molekul protein yang besar, yang merupakan 90% elemen organik tulang. Molekul-molekul kolagen membentuk serabut-serabut elastik pada tulang tapi pada tulang dewasa, kolagen mengeras karena terisi bahan anorganik *hydroxyapatite* (Indriati, 2004). Komponen kolagen pada tulang memberikan energi untuk absorpsi dan fleksibilitas tulang sedangkan komponen mineral membentuk struktur yang kaku dan kuat (Anandya, 2016). Keseimbangan yang baik antara kedua komponen tersebut dibutuhkan oleh tulang agar mampu menahan stres dan mencegah fraktur. Ketidakseimbangan kedua komponen tersebut dapat mengakibatkan kerusakan tulang dan mengakibatkan penurunan kekuatan tulang (Rogers, 2011).

### 2.7.1 Sel Tulang

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

#### a. Osteoblas

Osteoblas merupakan bentuk dari diferensiasi sel osteoprogenitor. Secara struktural osteoblas merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif dan berbentuk pipih dalam keadaan tidak aktif, memiliki diameter antara 20-30  $\mu\text{m}$  yang terlihat sangat jelas di daerah sekitar lapisan osteoid tempat jaringan tulang baru terbentuk. Membran plasma osteoblas bersifat khas yaitu kaya enzim alkali fosfatase yang konsentrasinya dalam serum digunakan sebagai indeks adanya pembentukan tulang. Sel osteoblas menghasilkan faktor pertumbuhan bersama dengan protein tulang morfogenetik dan berperan dalam sintesis reseptor hormon (Sari, 2015). Dalam perkembangan penelitian selanjutnya telah ditemukan reseptor estrogen dan reseptor kalsitriol di osteoblas (Riis, 1996).

Fungsi osteoblas adalah formasi tulang yang dipengaruhi oleh faktor lokal maupun sistemik. Faktor lokal meningkatkan formasi tulang: *Bone Morphogenetic Protein* (BMP),  $\text{TGF-}\beta$ , *Insulin Growth Factor* (IGF), estrogen, *Triiodothyronin* ( $\text{T}_3$ ), *Tetraiodothyronin* ( $\text{T}_4$ ), kalsitriol dan Prostaglandin-E2 (PGE2) (Riis, 1996). Faktor sistemik yang meningkatkan tulang adalah fluorid, *Parathyroid Hormone* (PTH), dan prostaglandin, sedangkan faktor yang menghambat formasi tulang adalah hormon kortikosteroid (Riis, 1996).

#### b. Osteosit

Osteosit merupakan sel yang telah dewasa pada tulang, berperan dalam mengatur metabolisme seperti pertukaran nutrisi dan zat sisa dengan darah. Proses pertukaran ini diperantarai oleh suatu kanal yang terdapat pembuluh darah dan berfungsi sebagai penyalur yang disebut sebagai kanalikuli (Sari, 2015). Osteosit merupakan hasil diferensiasi sel osteoblas yang terletak di antara lamela matriks

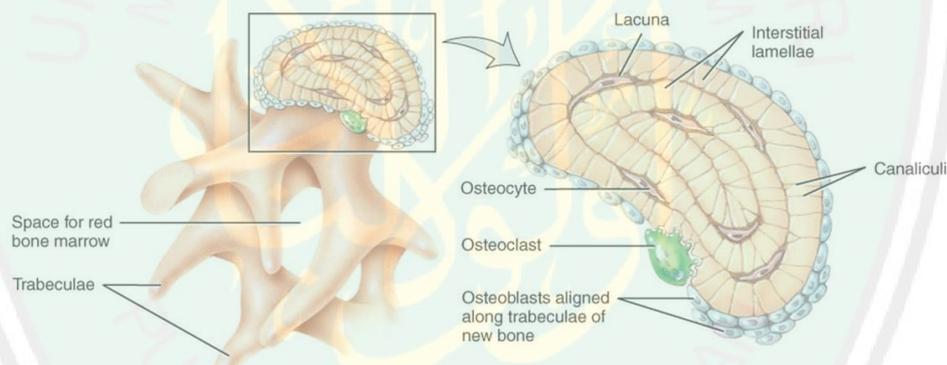
dalam lakuna pada saat pembentukan lapisan permukaan tulang berlangsung. Sel osteosit secara aktif terlibat dalam mempertahankan matriks tulang dan kematian sel yang diikuti oleh proses resorpsi matriks tersebut sehingga osteosit memiliki peran lebih penting pada saat perbaikan tulang daripada proses pembentukan tulang (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Osteosit memiliki struktur lebih kecil dari osteoblas karena kehilangan sebagian dari komponen sitoplasmanya. Struktur osteosit muda menyerupai sel osteoblas dewasa yang memiliki aparatus golgi dan retikulum endoplasma kasar yang terlihat lebih jelas, serta terdapat lisosom dalam jumlah banyak. Osteosit dapat berhubungan dengan osteosit lainnya melalui penjuluran sitoplasma melewati kanalikuli yang berfungsi untuk membantu koordinasi respons tulang terhadap stress atau deformasi (Sari, 2015).

#### c. Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa berasal dari peleburan monosit yang terkonsentrasi di endosteum dan dapat melepaskan enzim lisosom untuk memecah protein dan mineral pada matriks ekstraselulernya. Osteoklas berasal dari sel progenitor yang berbeda dengan sel tulang lainnya, karena tidak berasal dari sel mesenkim, melainkan dari jaringan mieloid yaitu monosit atau makrofag pada sumsum tulang (Sari, 2015). Aktivitas osteoklas dipengaruhi oleh beberapa hormon, yaitu: hormon sitokin, PTH, dan hormon tiroid berupa kalsitonin. Osteoklas bersama dengan PTH berperan dalam pengaturan kadar kalsium dalam darah sehingga dijadikan target pengobatan osteoporosis (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Osteoklas akan meningkat jumlah dan aktivitasnya karena adanya PTH, *Parathyroid Hormone Related Protein* (PTHrp), 1,25-vitamin D, *Lymphotoxin* (LT), *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), *Tumor Necrosis Factor  $\beta$*  (TNF- $\beta$ ), IL-1, IL-6 dan *Interleukin-11* (IL-11). Osteoklas akan menurun aktivitas dan jumlahnya karena adanya kalsitonin, estrogen, TGF- $\beta$ , *Interferon  $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), dan PGE2. Dalam proses peningkatan dan penghambatan aktivitas osteoklas, beberapa sitokin diproduksi oleh osteoblas sehingga dapat dikatakan terdapat poros osteoblas-osteoklas dalam pengendalian densitas tulang. Dibutuhkan 100-150 osteoblas untuk membentuk sejumlah tulang yang dapat menahan terjadinya patah tulang karena aktivitas 1 osteoklas (Riis, 1996).



**Gambar 2.4** Sel tulang (Slideplayer, diakses 10 Januari 2018)

### 2.7.2 Mekanisme *Remodeling* Tulang

Sel-sel tulang menjalani *modelling* dan *remodelling* untuk memungkinkan tulang untuk tumbuh dan beradaptasi sesuai kebutuhan. *Modelling* adalah ketika resorpsi tulang dan pembentukan tulang terjadi pada permukaan yang terpisah (yaitu pembentukan dan resorpsi tidak digabungkan). Contoh dari proses ini adalah penambahan panjang dan diameter tulang panjang. Pada kondisi ini proses pembentukan tulang lebih dominan terjadi daripada proses resorpsi tulang (Anandya, 2016). Proses *modeling* terjadi selama kelahiran sampai dewasa dan

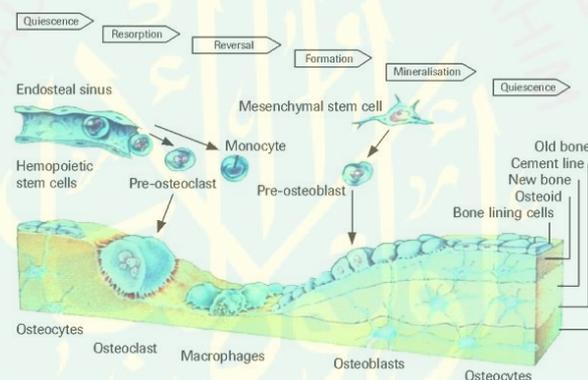
bertanggung jawab untuk memperoleh massa tulang dan perubahan bentuk tulang sedangkan *remodelling* merupakan suatu proses penyusunan jaringan tulang baru dan perombakan jaringan tulang yang sudah tua dan proses ini berlangsung secara terus menerus terjadi untuk mempertahankan massa tulang. Pada usia muda proses *remodeling* berlangsung 200 kali lebih cepat daripada usia dewasa. Proses *remodeling* yang berhubungan langsung dengan fungsi homeostasis mineral tulang dipengaruhi oleh hormon dalam tubuh seperti kalsitonin dan estrogen (Junqueira dan Carneiro, 2007).

*Remodelling* melibatkan pembentukan tulang dan resorpsi tulang yang saling berkaitan. *Remodelling* memungkinkan perubahan arsitektur tulang dalam menanggapi faktor-faktor seperti beban mekanis, tapi tanpa mengubah ukuran kerangka keseluruhan. Dalam kerangka dewasa, 5-10% dari tulang *diremodeling* setiap tahun. *Remodelling* tidak terjadi merata di seluruh kerangka, 80% dari renovasi terjadi di tulang trabekular seperti *vertebrae*, *femur proksimal*, *kalkaneus* dan *radius ultradistal* (IOF, 2016).

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

- a. Aktivasi: pre-osteoklas terstimulasi menjadi osteoklas dewasa yang aktif. Pada fase ini RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa\beta$  Ligand*) yang dihasilkan oleh prekursor osteoblas berikatan dengan reseptor yang ada pada permukaan prekursor osteoklas yaitu RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa\beta$* ), kemudian terbentuk sel osteoklas yang matang dan aktif.
- b. Resorpsi: osteoklas mencerna matriks tulang tua.

- c. Reserval: akhir dari proses resorpsi, saat osteoklas digantikan oleh osteoblas. Pada fase ini, setelah tulang selesai diresorpsi dan terbentuk rongga pada tulang maka dilepaskan sitokin-sitokin dan *growth factor* yang merupakan osteoblas dewasa pertama dari *mesenchymal stema cells* yang kemudian menstimulasi pembentukan sel osteoblas.
- d. Pembentukan: osteoblas menghasilkan matriks tulang yang baru.
- e. Fase pasif: osteoblas selesai menghasilkan matriks dan terbenam di dalamnya. Beberapa osteoblas membentuk sederet sel yang berjejer di permukaan tulang yang baru.

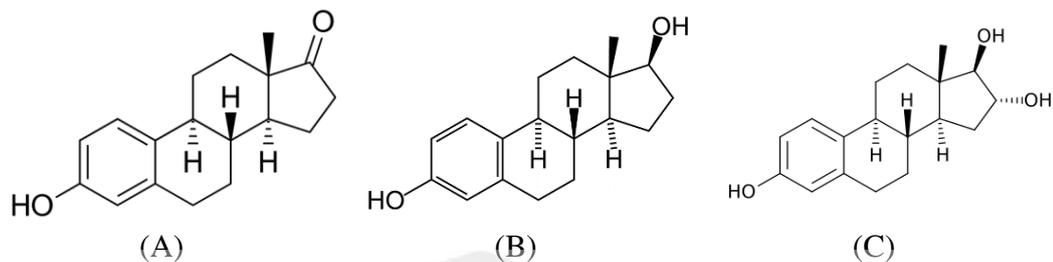


**Gambar 2.5** Proses *remodeling* tulang (Slide player, diakses 10 Januari 2018)

## 2.8 Tinjauan Tentang Estrogen dan Fitoestrogen

### 2.8.1 Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid dengan 18 atom C dan dibentuk terutama dari 17-ketosteroid androstenedion. Estrogen alamiah yang terpenting adalah estradiol (E2), estron (E1) dan estriol (E3). Secara biologis, E2 adalah yang paling aktif. Perbandingan khasiat biologis dari ketiga hormon tersebut  $E2 : E1 : E3 = 10 : 5 : 1$ . Potensi E2 12 kali potensi E1 dan 8 kali E3 sehingga E2 dianggap sebagai estrogen utama (Speroff *et al.*, 2005).



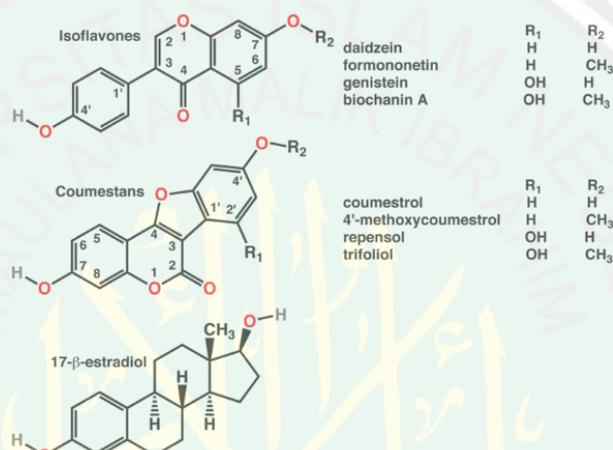
**Gambar 2.6** Struktur estron (E1) (A), 17 $\beta$ -estradiol (E2) (B), dan estriol (E3) (C) (Wikipedia, diakses 10 Januari 2018)

Estrogen merupakan hormon seks steroid memegang peran yang sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas sel osteoblas maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin-parakrin utamanya oleh sel osteoblas (Monroe *et al.*, 2003). Sel osteoblas memiliki reseptor estrogen alpha dan beta (ER- $\alpha$  dan ER- $\beta$ ) di dalam sitosol. Dalam diferensiasinya sel osteoblas mengekspresikan ER- $\beta$  10 kali lipat dari ER- $\alpha$  (Monroe *et al.*, 2003). Selain itu dalam kondisi normal, diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblas melalui reseptor yang dimilikinya mampu menurunkan sekresi sitokin yaitu: IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang dapat menstimulasi aktivitas osteoklas dalam penyerapan tulang. Di sisi lain, hormon estrogen dapat merangsang ekspresi OPG dan TGF- $\beta$  pada sel osteoblas dan sel stroma yang lebih lanjut dapat menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis sel osteoklas (Norman, 2003). Efek tak langsung estrogen terhadap tulang berhubungan dengan homeostasis kalsium yang meliputi regulasi absorpsi kalsium di usus, modulasi 1,25 (OH) $_2$ D, ekskresi kalsium di ginjal dan sekresi PTH (Ariestin, 2010).

### 2.8.2 Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan zat yang terdapat pada tumbuhan dan biji-bijian dengan struktur kimianya mirip estrogen, mempunyai efek estrogenik lemah dan

bekerja pada reseptor estrogen. Fitoestrogen berasal dari kata “fito” yang berarti tanaman dan “estrogen” karena memiliki struktur dan aktivitas biologik menyerupai estrogen (Baziad, 2003; Yang *et al.*, 2012). Fitoestrogen pada umumnya terdiri dari isoflavon, *coumestan*, *stilbene*, dan lignan. Di antara jenis estrogen tersebut, isoflavon adalah senyawa yang paling banyak dimanfaatkan karena memiliki efek estrogenik yang cukup tinggi (Grippe *et al.*, 2007).



**Gambar 2.7** Struktur fitoestrogen (isoflavon dan *coumestan*) dan estrogen (Slide share, diakses 10 Januari 2016)

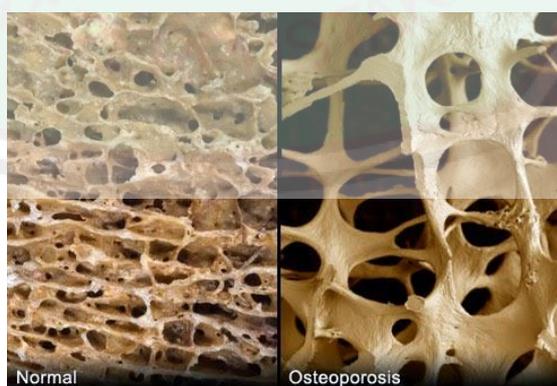
Secara umum, fitoestrogen bekerja sebagai *selective estrogen reseptor modulators* (SERMs), yaitu mampu memberikan efek estrogenik dan atau efek antiestrogenik. Pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium, dan prostat, fitoestrogen bekerja sebagai anti estrogen dan aktivitas estrogeniknya bekerja nyata pada tulang (Pawitan, 2002). Oleh karena mempunyai struktur yang menyerupai estrogen, mekanisme kerja fitoestrogen sama dengan estrogen. Fitoestrogen memiliki aktivitas estrogen lemah dan sebaliknya dalam jumlah besar dapat bersifat sebagai antiestrogen (Mei *et al.*, 2001). Fitoestrogen berikatan dengan kedua reseptor estrogen, baik itu ER- $\alpha$  maupun ER- $\beta$ , namun fitoestrogen diketahui lebih banyak berikatan pada ER- $\beta$  dibandingkan dengan ER- $\alpha$  (Silalahi, 2012).

Efek positif dari isoflavon terhadap metabolisme tulang disebabkan oleh dua mekanisme, yang pertama dengan mempengaruhi osteoklas melalui aktivasi apoptosis. Yang kedua dengan menghambat aktivitas tirosin kinase dengan memodulasi membran reseptor estrogen sehingga mengubah aktivitas fosfatase alkali (Pilsakova *et al.*, 2010).

## 2.9 Tinjauan Tentang Osteoporosis

### 2.9.1 Definisi Osteoporosis

Osteoporosis adalah kelainan tulang yang ditandai dengan menurunnya massa tulang, gangguan mikro-arsitektur yang dapat mengakibatkan menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang, sehingga tulang mudah patah (Kemenkes RI, 2008). Penyakit ini disebut sebagai *silent epidemic disease*, karena banyak pasien tidak menyadari bahwa mereka mengalami osteoporosis dan hanya datang pada saat terkena fraktur (Kemenkes RI, 2008). Tulang mengalami fraktur akibat dari sering membungkuk, mengangkat beban berat, maupun jatuh dari ketinggian tertentu, atau dari aktivitas apapun (Schwinghammer, 2015).



**Gambar 2.8** Tulang normal dan tulang osteoporosis (IOF, 2016)

## **2.9.2 Klasifikasi Osteoporosis**

### **2.9.2.1 Osteoporosis Primer**

Osteoporosis primer adalah osteoporosis yang penyebabnya tidak diketahui atau tanpa adanya kondisi klinis yang menyertai (Anggraini, 2008). Osteoporosis primer terbagi menjadi dua tipe, yaitu osteoporosis pascamenopause dan osteoporosis senilis. Osteoporosis pascamenopause ditandai dengan beberapa gejala antara lain: berdebar, pelupa, nyeri tulang belakang, rasa lemah, lesu, dan osteoporosis (Anggraini, 2008). Pada masa pascamenopause terjadi penurunan fungsi ovarium yang mengakibatkan penurunan produksi hormon estrogen (Gumelar, 2011). Estrogen mencapai kadar nilai yang rendah terjadi pada masa pascamenopause (Baziad, 2003). Gangguan sekunder yang terjadi karena kekurangan estrogen pada tubuh dalam jangka panjang mengakibatkan pengeroposan tulang atau osteoporosis (Speroff *et al.*, 2005). Adapun osteoporosis senilis sering ditemui pada pria usia lebih dari 70 tahun. Osteoporosis senilis ini terjadi karena proses penuaan (Anggraini, 2008) maupun kekurangan hormon testosteron (Kemenkes RI, 2008). Defisiensi estrogen sebanding dengan defisiensi testosteron, karena testosteron merupakan salah satu hormon androgen yang dimetabolisme oleh enzim aromatase sitokrom p450 untuk menghasilkan 17- $\beta$ -estradiol dan berfungsi sebagai prekursor estrogen (Reid, 2000). Diketahui bahwa hormon testosteron juga memiliki peran untuk meningkatkan densitas tulang (Wirakusumah, 2007).

### **2.9.2.2 Osteoporosis Sekunder**

Osteoporosis sekunder disebabkan oleh berbagai kondisi klinik yang menyertainya (Anggraini, 2008). Kondisi klinik tersebut antara lain: penyakit

tulang, pengobatan steroid jangka lama (glukokortikoid), astronot tanpa gaya berat, paralise otot, mobilitas, dan hipertiroid (Kemenkes RI, 2008). Pemberian deksametason, salah satu obat yang memiliki aktivitas glukokortikoid yang tinggi, dalam jangka panjang mengakibatkan penurunan kepadatan tulang trabekular dengan menghambat hormon estrogen untuk berikatan dengan estrogen reseptor, sehingga terjadi defisiensi estrogen yang menyebabkan ketidakseimbangan dalam proses remodeling tulang dimana proses formasi oleh sel osteoblas menurun dan resorpsi oleh sel osteoklas meningkat (Meeta, 2013; Laswati, 2015). Osteoporosis tipe ini mengalami penurunan densitas tulang yang cukup berat (Kemenkes RI, 2015).

### **2.9.3 Terapi Osteoporosis**

#### **2.9.3.1 Terapi dengan Alendronat**

Natrium alendronat merupakan biphosphonat oral golongan kedua yang efektif digunakan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit osteoporosis. Obat ini merupakan obat anti-resorpsi, yaitu obat yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat osteoklas yang memediasi resorpsi tulang. Dosis yang umum digunakan adalah 10 mg/hari atau 70 mg/minggu (Hunt, 2000). Alendronat mampu mencegah kehilangan massa tulang dan mengurangi resiko fraktur pada panggul dan vertebral. Obat golongan bifosfonat bekerja menghambat resorpsi tulang dan bergabung dengan tulang sehingga memberikan waktu paruh panjang hingga 10 tahun (Dipiro *et al*, 2014). Efek samping yang paling umum muncul adalah mual-mual, nyeri abdomen dan dispepsia sehingga untuk meminimalisir efek samping setidaknya dikonsumsi 30 menit sebelum makan (O'Connel, 2008).

### 2.9.3.2 Terapi dengan Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan alternatif pengganti estrogen yang potensial tanpa memiliki efek samping yang berbahaya (Villiers, 2009). Fitoestrogen sendiri merupakan golongan senyawa berasal dari tumbuhan yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen (*estrogen like substance*), selain mudah didapatkan senyawa golongan fitoestrogen juga dilaporkan mempunyai khasiat untuk meningkatkan massa tulang (Yang *et al.*, 2012). Pengaruh fitoestrogen pada metabolisme tulang disebabkan oleh ikatan fitoestrogen pada ER- $\beta$  yang terdapat pada tulang, yang akan mempengaruhi massa tulang melalui hambatan aktivitas osteoklas dan peningkatan aktivitas osteoblas, serta peningkatan sekresi kalsitonin yang akan menghambat aktivitas PTH terhadap proses resorpsi tulang (Baziad, 2003).

## 2.10 Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur

### 2.10.1 Tinjauan Tentang Hewan Coba *Mus musculus*

Menurut Andri (2007), sistematika mencit (*Mus musculus*) berdasarkan taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i>

*Mus musculus* hidup dalam daerah yang cukup luas penyebarannya, mulai dari iklim dingin, sedang, maupun panas dan dapat hidup terus menerus dalam kandang atau secara bebas sebagai hewan liar. *Mus musculus* adalah hewan percobaan yang sering digunakan dalam penelitian biologis maupun biomedis dan dipelihara secara intensif di laboratorium (Andri, 2007).

### 2.10.2 Pemeriksaan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur

Perlakuan pada hewan uji dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol (positif dan negatif), dan kelompok uji (varian dosis). Pemeriksaan kepadatan massa tulang trabekular femur pada hewan coba dilakukan dengan pewarnaan. Tujuan dari teknik pewarnaan adalah untuk memberikan warna yang kontras pada komponen seluler sehingga dapat dibedakan antar selnya. Setiap jenis sel memiliki afinitas yang berbeda terhadap warna, sehingga jenis pewarnaan harus berbeda untuk tiap jenis sel (Waheed, 2012).

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

1. Reaksi asam basa. Komponen seluler yang bersifat asam dapat diwarnai dengan pewarnaan yang bersifat basa dan berlaku juga sebaliknya.
2. Adsorpsi. Molekul pewarnaan yang kecil dapat menempel pada molekul sel yang lebih besar.
3. Tingkat kelarutan. Jenis pewarnaan tergantung dari tingkat kelarutan pada sel.

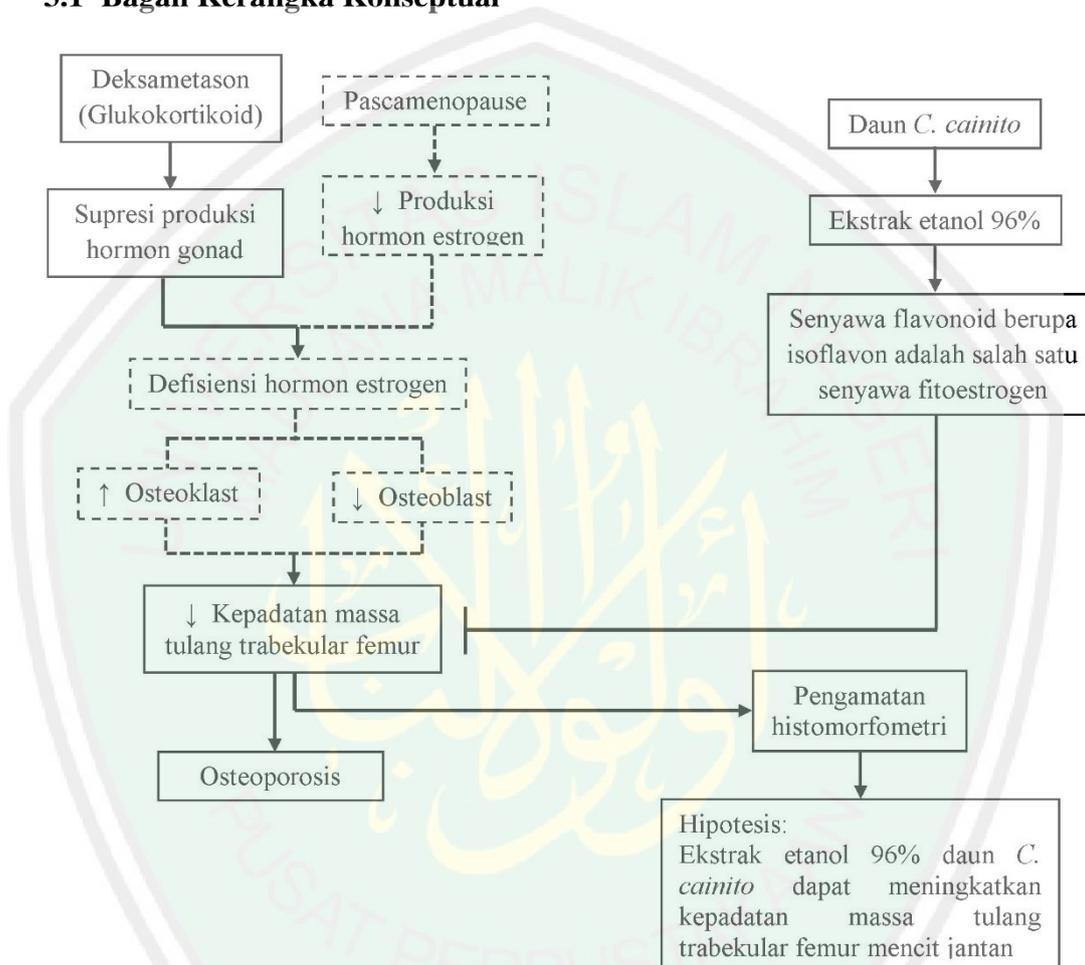
Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) akan memberikan keseimbangan warna biru dan merah dengan jelas pada jaringan, sehingga komponen sel dapat diidentifikasi dengan jelas. Hematoksilin bersifat basa sedangkan inti sel bersifat asam, keduanya menimbulkan suatu ikatan lemah sehingga inti sel dapat berwarna.

Namun sebelum mewarnai inti sel, zat warna ini dioksidasi terlebih dahulu menjadi hematein. Hal tersebut dikarenakan hematein tidak larut air dan alkohol, sehingga tidak mudah pudar ketika proses pewarnaan dilakukan. Eosin adalah zat warna sitoplasma yang sangat baik, karena zat warna ini dapat memberikan corakan pada jaringan dan corakan ini dapat bertambah apabila ditambah zat warna lain (Stevens, 1990).

Persyaratan dalam melakukan pengambilan sampel jika jaringan berupa tulang pada pewarnaan ini yaitu dilunakkan terlebih dahulu dalam larutan dekalsifikasi dengan perbandingan antara jaringan dan larutan 1 : 20 dengan waktu perendaman selama 24 jam. Larutan dekalsifikasi yaitu larutan yang berfungsi untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang sehingga tulang menjadi lunak dan memudahkan pemotongan (Muntiha, 2001). Pemeriksaan histopatologi diawali dengan pemeriksaan preparat histopatologi di bawah mikroskop yang dihubungkan pada suatu komputer dan *software* (Muntiha, 2001).

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEPTUAL**

**3.1 Bagan Kerangka Konseptual**



**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konseptual

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

### 3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Wanita yang telah mengalami pasca menopause dan pemakaian obat-obat glukokortikoid terapi jangka panjang dapat memicu terjadinya defisiensi estrogen. Pada wanita pascamenopause terjadi penurunan produksi hormon estrogen (Gumelar, 2011). Terapi jangka panjang obat-obatan glukokortikoid (deksametason) menyebabkan supresi produksi hormon gonadotropin yang menyebabkan produksi estrogen akan menurun (Wardhana, 2012). Defisiensi estrogen dapat mengganggu siklus metabolisme tulang normal yang mengakibatkan aktivitas osteoklas lebih tinggi daripada osteoblas, sehingga osteoblas tidak mampu mencukupi yang dapat mengakibatkan kehilangan jaringan tulang (Gallagher *et al.*, 2013).

Fitoestrogen merupakan golongan senyawa yang berasal dari tanaman yang memiliki struktur mirip estrogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen serta mempunyai fungsi yang mirip estrogen (Yang *et al.*, 2012). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun *C. cainito* di antaranya adalah isoflavon. Isoflavon merupakan salah satu senyawa yang bersifat fitoestrogenik (Grippio *et al.*, 2007) sehingga diharapkan mampu meningkatkan aktivitas osteoblas dan meningkatkan kepadatan massa tulang pada tulang yang mengalami osteoporosis.

Berdasarkan pernyataan di atas penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji efek fitoestrogenik dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur pada mencit jantan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan sejumlah hewan uji, yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) dan pemberian ekstrak dilakukan dengan dosis yang berbeda-beda untuk mendapatkan dosis efektif (ED<sub>50</sub>) yaitu dosis yang dapat memberikan

aktivitas peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan sebesar 50% terhadap hewan uji. Peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur dapat diketahui setelah dilakukan pengamatan secara histomorfometri, yaitu pengukuran ketebalan dari tulang trabekular femur yang diperoleh dari rata-rata kepadatan tulang tersebut dalam satuan  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dapat meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan.



## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

##### **4.1.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Penelitian eksperimental laboratoris merupakan kegiatan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan tertentu (Notoatmojo, 2010).

##### **4.1.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas reparasi bahan, pengukuran kadar air, ekstraksi bahan, dan uji aktivitas ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dalam meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan.

#### **4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2018. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dilakukan di Laboratorium Fitokimia; Penelitian *in vivo* dilakukan di Laboratorium Biomedik, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembuatan dan pembacaan preparat histopatologi tulang trabekular femur mencit dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

### 4.3 Sampel Penelitian

#### 4.3.1 Sampel Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu simplisia daun dari tanaman *C. cainito* yang diperoleh dari UPT Matera Medika, Kota Batu, Jawa Timur.

#### 4.3.2 Sampel Hewan Coba

Sampel hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu mencit (*Mus musculus*) jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

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

$$(tr - 1)(r - 1) > 15$$

Keterangan:  $tr = treatment$  (jumlah perlakuan)

$r = replication$  (jumlah ulangan/sampel)

Pada penelitian ini diberikan enam perlakuan, sehingga  $tr = 6$  dan jumlah sampel yang diperlukan dalam satu kelompok perlakuan, yaitu:

$$(6 - 1)(r - 1) > 15$$

$$r - 1 > 15 : 5$$

$$r > 3 + 1$$

$$r > 4$$

Dari perhitungan di atas, didapatkan bahwa jumlah sampel untuk setiap kelompok perlakuan adalah 4 ekor, untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian mencit sebesar 25% maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 5, sehingga total sampel yang diperlukan adalah  $6 \times 5$ , yaitu 30 ekor.

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini memiliki kriteria sebagai berikut: mencit (*Mus musculus*) jantan, berat badan 20-25 gram, sehat yang ditandai dengan bergerak aktif

#### **4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

##### **4.4.1 Variabel Penelitian**

###### **4.4.1.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol 96% dengan 4 konsentrasi dosis berbeda 2 mg, 4 mg, 8 mg, dan 16 mg/20 g BB mencit.

###### **4.4.1.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan dalam satuan  $\mu\text{m}$ .

###### **4.4.1.3 Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah mencit jantan, berat badan 20-25 gram, jenis makanan dan minuman, kesehatan mencit, perawatan mencit dan sanitasi kandang, temperatur dan kelembaban kandang, waktu pemberian makan dan minum.

##### **4.4.2 Definisi Operasional**

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol 96% adalah ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi ultrasonik daun *C. cainito* dengan pelarut etanol 96% yang telah diuapkan pada *rotary evaporator*.

2. Kontrol negatif adalah kontrol dengan tidak menambahkan ekstrak etanol 96% *C. cainito* pada perlakuan mencit jantan.
3. Kontrol positif adalah kontrol dengan menambahkan suspensi alendronat pada perlakuan mencit jantan.
4. Dosis adalah takaran bahan obat untuk induksi osteoporosis ataupun *treatment* yang diberikan kepada mencit jantan sejumlah mg yang diinduksikan dalam ml.
5. Peningkatan kepadatan tulang trabekular femur pada penelitian ini diamati secara histomorfometri, yaitu pengukuran kepadatan dari tulang trabekular femur yang diperoleh dari rerata kepadatan tulang trabekular yang diambil dari tulang femur kanan yang dihitung secara mikroskopi dengan menggunakan pewarnaan HE, dengan satuan mikrometer ( $\mu\text{m}$ ). Pengukuran rata-rata kepadatan trabekular dilakukan pada daerah metafisis dekat dengan garis epifisis yaitu dengan cara menarik garis yang sejajar dengan garis epifisis pada tulang trabekular di daerah metafisis. Pengukuran dilakukan menggunakan *software* yaitu Motic Image Plus 3.0.

#### **4.5 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.5.1 Alat Penelitian**

Alat penelitian terdiri dari alat-alat gelas seperti labu alas bulat, gelas ukur 50 dan 100 ml, *beaker glass* 100, 250, 500 ml, erlemenyer 250, 300, 500 ml, kaca arloji, pipet volume, pipet ukur, cawan porselen, spatula, sendok tanduk, batang pengaduk, wadah simplisia, *Moisture Content Analyzer* merek Mettler Toledo HC103, neraca analitik, kertas saring, corong, aluminium foil, alat ultrasonikasi

merek *Sonicator*, seperangkat *rotary evaporator*, oven, plat KLT silika gel F<sub>254</sub>, plat KLT kaca, penggaris, pipa kapiler, *chamber* eluasi, lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, TLC *Visualizer*, *software* VisionCATS, sarung tangan latex, masker, kandang mencit, tempat makan dan minum mencit, lab handuk, timbangan mencit, serbuk gergaji, jarum induksi peroral, alat-alat diseksi seperti: pisau scapel, pinset, kapas, kain kasa, jarum pentul, gunting bedah, wadah anestesi, papan sterofom, kaca preparat, mikroskop cahaya, kamera Optilab, *software* Otilab, *software* Motic Image Plus 3.0, *software* IBM SPSS Statistic 24.

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri dari simplisia daun *C. cainito*, mencit (*Mus musculus*) jantan, etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, aquades, CMC Na 0,5%, deksametason, Na-alendronat, ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*, alkohol asam 1%, alkohol absolut, ammonia lithium karbonat, kloroform, formalin 10%, xylol, paraffin cair, cat Harris Hematoksilin dan cat pembanding Eosin.

### 4.6 Prosedur Penelitian

#### 4.6.1 Penyiapan Bahan Tanaman

Daun *C. cainito* diperoleh dari UPT Materia Medika Kota Batu dalam bentuk serbuk simplisia. Proses penyimpanan serbuk simplisia daun *C. cainito* dilakukan di tempat terlindung dari cahaya dan tertutup rapat untuk mencegah kerusakan dan penurunan mutu.

#### 4.6.2 Pengukuran Nilai Kadar Air

Pengukuran nilai kadar air menggunakan alat *moisture content analyzer* merek Mettler Toledo HC103. Dikalibrasi terlebih dahulu alat *moisture content*

*analyzer*, lalu dimasukkan serbuk simplisia  $\pm 0,5$  g ke dalam wadah metal bulat. Ditunggu hingga pengukuran oleh alat selesai.

#### 4.6.3 Ekstraksi Ultrasonik

Dilakukan penimbangan serbuk simplisia daun *C. cainito* sebanyak 30 g, kemudian dilakukan penambahan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml. Dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan ekstraksi ultrasonik selama 2 menit dan direplikasi selama 3 kali. Dilakukan penyaringan dan dikumpulkan filtrat yang diperoleh, kemudian dilakukan proses penguapan pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator*. Diatur *rotary evaporator* pada suhu 50° C dengan kecepatan 70 rpm, kemudian ekstrak yang diperoleh di oven pada suhu 40° C hingga diperoleh ekstrak kering. Diperiksa secara organoleptis meliputi bentuk, warna, dan bau. Kemudian dihitung rendemen ekstrak yang dihasilkan. Disimpan ekstrak pada wadah yang tertutup rapat dan terhindar dari cahaya matahari langsung.

#### 4.6.4 Skrining Fitokimia dengan KLT

Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* kemudian dilakukan skrining fitokimia dengan KLT dan kemudian divisualisasikan dengan TLC *Visualizer*. Tahapannya adalah sebagai berikut: Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan ke dalam 10 ml etanol 96% dengan bantuan ultrasonifikasi hingga ekstrak secara merata larut dalam etanol; Kemudian dilakukan optimasi eluen, eluen yang digunakan yaitu *n*-Heksana dan Etil Asetat dengan perbandingan (6:4) dan (7:3) dan dimasukkan ke dalam *chamber*; Plat KLT *glass* dipotong sebanyak 2 buah dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 1,5 cm dan ekstrak ditotolkan pada masing-masing plat yang sudah diberi tanda batas (atas = 0,5 cm),

(bawah = 1 cm); Plat KLT yang telah ditotolkan sampel ekstrak, dimasukkan ke dalam chamber dan diamati hingga sampai tanda batas. Kemudian plat diambil dan diamati di bawah penyinaran lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasil pemisahan yang bagus ditandai dengan adanya beberapa bercak senyawa yang memisah. Kemudian dilakukan pemeriksaan lagi dengan eluensi pelarut yang memberikan hasil pemisahan yang bagus dan hasilnya diamati dengan TLC *Visualizer*; Pengamatan dengan TLC *Visualizer* menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan hasilnya diolah dengan *software visionCATS* untuk dapat menentukan nilai  $R_f$  nya.

#### **4.6.5 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur**

##### **4.6.5.1 Uji Etik**

Uji etik dilakukan pada semua hewan coba yang berjumlah 30 ekor mencit jantan. Uji etik dilakukan pada Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK), Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan nomor, No. 020/EC/KEPK-FKIK/2018 (lihat lampiran 7).

##### **4.6.5.2 Penyiapan Hewan Coba**

Mencit jantan yang akan digunakan, dilakukan adaptasi lingkungan selama 7 hari dalam kandang, diberi alas serbuk gergaji, suhu dan kelembaban lingkungan dikontrol sehingga membiasakan mencit hidup dalam lingkungan dan perlakuan baru serta membatasi pengaruh lingkungan. Setiap hari mencit diberi makan dan minum secukupnya dengan pengamatan umum yaitu mencit yang tampak sakit tidak disertakan dalam penelitian. Tanda-tanda mencit sakit adalah aktivitas berkurang, banyak diam, serta bulu kusam.

Dibagi mencit menjadi 6 kelompok, masing-masing diinduksi deksametason dengan dosis 0,0029 mg/g BB mencit sebanyak 0,12 ml/hari secara peroral selama 28 hari. 28 hari merupakan waktu yang ekuivalen 3-4 tahun pada manusia yang menyebabkan penurunan densitas massa tulang yang berhubungan dengan penurunan jumlah osteoblas (Noor, 2014). Mencit yang telah mengalami osteoporosis ditandai dengan bagian punggung yang agak membungkuk (Laswati, 2015). Pembagian kelompok uji hewan coba berdasarkan terapi yang diberikan adalah sebagai berikut:

1. Kontrol negatif (diberikan CMC-Na 0,5% sebanyak 0,12 ml/hari secara peroral selama 28 hari).
2. Kontrol positif (diberikan suspensi alendronat dengan dosis 0,026 mg/g BB mencit sebanyak 0,36 ml/hari secara peroral selama 28 hari).
3. Kelompok I (diberikan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan dosis 2 mg/g BB mencit sebanyak 0,36 ml/hari secara peroral selama 28 hari).
4. Kelompok II (diberikan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan dosis 4 mg/g BB mencit sebanyak 0,36 ml/hari secara peroral selama 28 hari).
5. Kelompok III (diberikan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan dosis 8 mg/g BB mencit sebanyak 0,36 ml/hari secara peroral selama 28 hari).
6. Kelompok IV (diberikan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan dosis 16 mg/g BB mencit sebanyak 0,36 ml/hari secara peroral selama 28 hari).

Pembuatan larutan uji untuk hewan coba sebagai berikut:

1. Pembuatan suspensi deksametason sebagai penginduksi osteoporosis
  - Dilakukan perhitungan dosis deksametason (lihat lampiran 6).
  - Cara pembuatan suspensi deksametason:

- a. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 500 mg, kemudian didispersikan merata dalam aquades panas suhu  $\pm 100^{\circ}\text{C}$  20 ml, kemudian didiamkan sampai mengembang ( $\pm 15$  menit), kemudian digerus hingga terbentuk suspensi homogen.
- b. Digerus 5 tablet deksametason 0,5 mg, ditimbang 2,436 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen.
- c. Dimasukkan dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas, kocok sampai homogen

## 2. Pembuatan suspensi alendronat untuk kelompok kontrol positif

- Dilakukan perhitungan dosis alendronat (lihat lampiran 6).
- Cara pembuatan suspensi alendronat:
  - a. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 250 mg, kemudian didispersikan merata dalam aquades panas suhu  $\pm 100^{\circ}\text{C}$  10 ml, kemudian didiamkan sampai mengembang ( $\pm 15$  menit), kemudian digerus hingga terbentuk suspensi homogen.
  - b. Digerus 1 tablet alendronat 10 mg, ditimbang 3,64 mg dan dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen.
  - c. Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen.

## 3. Pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

- Dilakukan perhitungan dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* (lihat lampiran 6).
- Cara pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*:

- a. Ditimbang CMC-Na 0,5% sebanyak 250 mg, kemudian didispersikan merata dalam aquades panas suhu  $\pm 100^{\circ}\text{C}$  10 ml, kemudian didiamkan sampai mengembang ( $\pm 15$  menit), kemudian digerus hingga terbentuk suspensi homogen.
- b. Ditimbang ekstrak sebanyak 280 mg, 560 mg, 1120 mg, dan 2240 mg dan masing-masing dicampur dengan suspensi CMC-Na 0,5%, diaduk sampai homogen.
- c. Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas, kocok sampai homogen

#### **4.6.5.3 Pembedahan Hewan Coba**

Pembedahan dilakukan untuk pengambilan tulang trabekula femur bagian kanan. Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi perinhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah mencit tidak sadar, mencit difiksasi. Tulang femur bagian kanan diambil dan dimasukkan dalam botol tertutup yang berisi formalin 10%.

#### **4.6.5.4 Pembuatan Preparat Histopatologi**

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan oleh ahli di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan preparat histopatologi tulang trabekular femur dilakukan dengan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Tahapan pembuatan preparat histopatologi di antaranya, yaitu fiksasi dan pencucian, dekalsifikasi, dehidrasi dan *clearing*, infiltrasi, pembuatan balok parafin (*embedding*), pengirisan tipis, pewarnaan dan penutupan sediaan (lihat lampiran 8).

#### 4.6.5 Pengamatan Histopatologi Tulang Trabekular Femur Mencit Jantan

Pengamatan slide dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan menggunakan kamera Optilab dan *software* Optilab. Pengukuran kepadatan massa tulang diukur menggunakan *software* Motic Image Plus 3.0 dengan perbesaran 40x dan 100x pada bagian metafisis yaitu bagian bawah epifisis yang merupakan bagian aktif untuk pertumbuhan tulang dan berpengaruh pada pembentukan bentuk struktur tulang kompak ataupun rongga tulang dan merupakan bagian yang mudah diukur dalam melihat kepadatan massa tulang serta biasanya dijadikan untuk melihat nilai T-score dalam identifikasi osteoporosis. Bagian metafisis dilakukan pengukuran 3x replikasi pada satu sisi bagian tulang untuk mendapatkan bagian dan nilai yang dapat diidentifikasi secara akurat (Rizalah *et al.*, 2016). Nilai kepadatan tulang diperoleh dari rerata perhitungan kepadatan pada tulang trabekular femur.

#### 4.6.6 Analisis Data

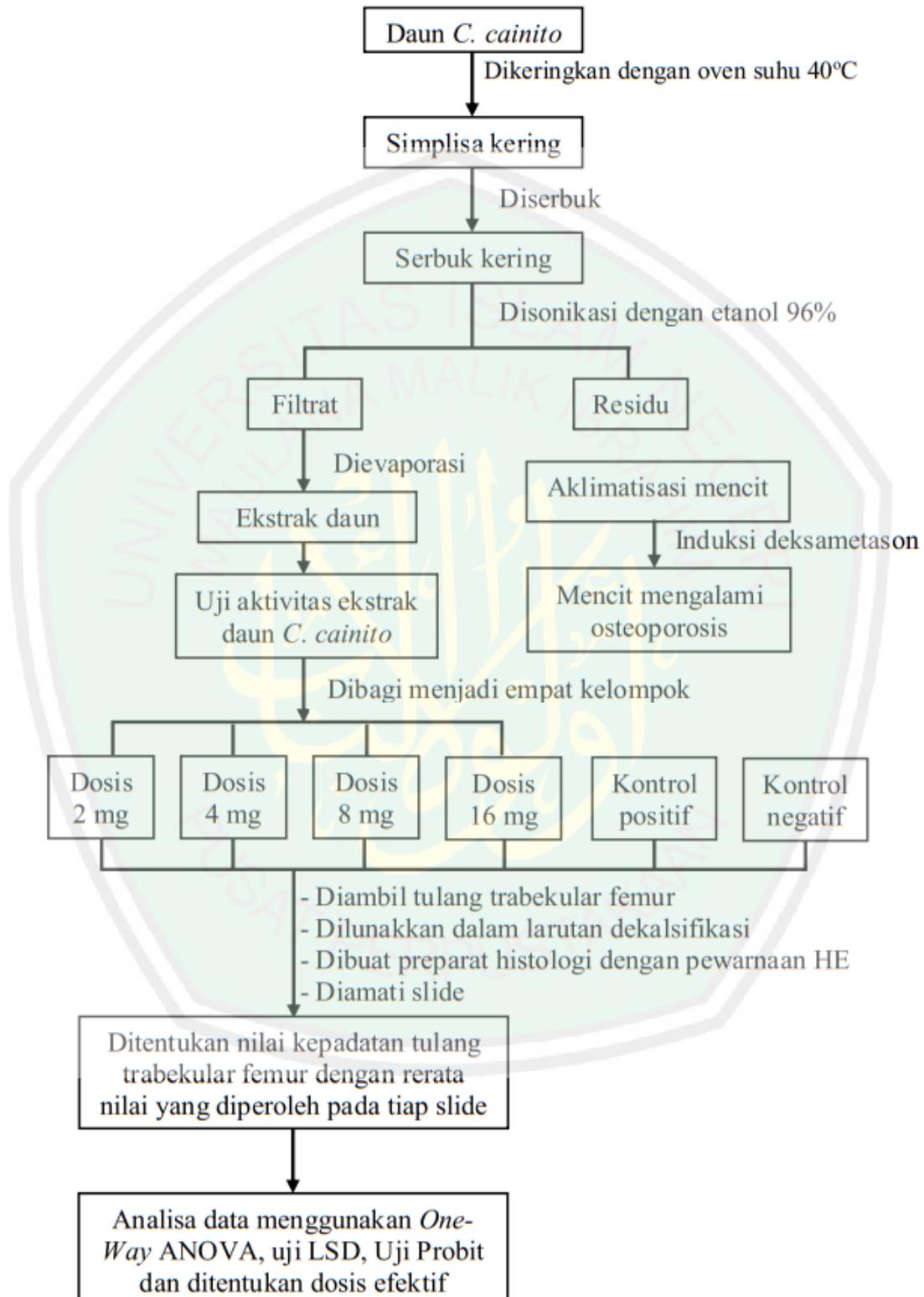
Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan, dilakukan analisa dengan menggunakan secara statistik dengan menggunakan *software* IBM SPSS Statistic 24 dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut (Dahlan, 2014):

1. Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai

pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal, digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non-parametrik.

2. Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-Way* ANOVA: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikansi, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil atau lebih dikenal dengan uji *Least Significance Different* (LSD).
4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Apabila *p-value*  $< 0,05$  berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji probit.
5. Uji Probit dilakukan untuk mengetahui dosis efektif ( $ED_{50}$ ) dari yang memberikan aktivitas peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan sebesar 50% terhadap hewan uji. Uji Probit digunakan karena percobaan menggunakan hewan coba memiliki faktor eksternal yang heterogen dan kondisi berbeda antar hewan coba, seperti fluktuatif hormon dan fisiologi tubuh pada hewan.

#### 4.7 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Determinasi Tanaman *C. cainito*

Tanaman *C. cainito* yang digunakan pada penelitian ini dilakukan identifikasi di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Hasil determinasi tanaman *C. cainito* sebagai berikut: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121b-124b-125a-126b-127a (lihat lampiran 1). Identifikasi tanaman merupakan suatu keharusan untuk mengetahui dan memastikan bahwa tanaman tersebut sesuai dengan jenis dan familinya yang akan digunakan dalam penelitian ilmiah, metode yang digunakan dalam identifikasi tanaman menggunakan kunci determinasi yang menggolongkan tumbuhan secara bertahap dari bangsa, suku, marga atau jenis, dan spesies (Zulkifli, 2009).



**Gambar 5.1** Tanaman *C. cainito*

#### 5.2 Preparasi Simplisia Daun *C. cainito*

Penelitian ini menggunakan sampel daun *C. cainito* yang diperoleh dari UPT Balai Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Daun yang diambil berwarna hijau pada bagian atasnya dan pada bagian bawah berwarna coklat keemasan. Daun yang diperoleh kemudian dilakukan proses sortasi basah untuk memisahkan dan bahan asing lainnya, seperti tanah, kerikil, dan batang. Kemudian dilakukan

pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran yang masih menempel pada daun. Daun yang sudah bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C. Suhu 40°C dipilih untuk mengurangi kadar air dalam daun dan mencegah tumbuhnya kapang serta menurunkan reaksi enzimatik yang dapat merusak simplisia namun tidak merusak kandungan kimia pada daun akibat suhu yang terlalu tinggi (Manoi, 2006).

Simplisia daun *C. cainito* yang telah kering selanjutnya dilakukan proses penggilingan sehingga diperoleh serbuk yang halus. Proses penggilingan bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi dengan memperbesar kontak antara bahan dan pelarut. Serbuk simplisia daun *C. cainito* kemudian disimpan dalam wadah toples yang kering, tidak lembab, dan terhindar dari sinar matahari langsung untuk melindungi mutu simplisia serta ditambahkan bagus serap air untuk mengurangi kelembaban yang dapat menyebabkan tumbuhnya kapang dan jamur (Laksana, 2010).



Gambar 5.2 Simplisia serbuk daun *C. cainito*

### 5.3 Pengukuran Nilai Kadar Air

Pengukuran nilai kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam suatu simplisia yang akan diuji. Kadar air yang aman untuk suatu bahan simplisia kering adalah 10-12%, sedangkan kadar air yang baik pada suatu

simplisia adalah 10%. Semakin kecil nilai kadar air maka penarikan senyawa aktif oleh pelarut lebih efektif ketika proses ekstraksi (Depkes RI, 2000).

Pengukuran nilai kadar air serbuk simplisia daun *C. cainito* menggunakan alat *Moisture Content Analyzer* merek Mettler Toledo HC103. Prinsip kerja dari alat ini adalah analisis *thermogravimetric*, yaitu menentukan perbedaan berat sampel sebelum dan sesudah pengeringan dengan menggunakan penyerapan gelombang inframerah yang berasal dari lampu halogen. Kelebihan alat ini yaitu, cara pengoperasian yang mudah dan dapat memberikan hasil yang akurat dalam waktu yang singkat (Mettler Toledo, 2015). Pengukuran kadar air dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mengurangi galat pengukuran (lihat lampiran 2). Hasil dari penentuan kadar air disajikan pada tabel 5.1 berikut ini:

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

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

Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh nilai rerata sebesar 8,12%. Dari nilai tersebut diketahui bahwa serbuk simplisia memiliki kadar air yang baik karena kadar air di bawah 10%. Kadar air yang rendah dapat meminimalkan pertumbuhan mikroorganisme seperti jamur dan kapang yang dapat mempengaruhi mutu simplisia (Depkes RI, 2000).

#### 5.4 Ekstraksi Daun *C. cainito*

Proses pembuatan ekstrak daun *C. cainito* dilakukan dengan menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Metode UAE dipilih karena lebih aman digunakan untuk menarik senyawa yang tidak tahan panas, efisiensi yang

lebih besar, waktu pengoperasian yang lebih singkat serta memperoleh hasil rendemen yang besar daripada menggunakan metode ekstraksi konvensional (Supardan, 2011). Efek gelembung mikro pada fase cair / kavitasi pada UAE dapat meningkatkan suhu dan tekanan yang memicu pecahnya gelembung yang mengakibatkan dinding sel ikut pecah, sehingga senyawa dalam sel akan keluar dan larut dalam pelarut (Hemwimol, 2006).

Tujuan dari ekstraksi ini adalah untuk menarik keluar senyawa-senyawa yang ada dalam simplisia menggunakan prinsip *like dissolves like* agar dapat berikatan dengan pelarut. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan antara simplisia dan pelarut 1:16 (b/v), di mana jumlah simplisia yang digunakan yaitu 30 g dalam 500 ml. Jumlah tersebut dipilih untuk mengefisienkan jumlah pelarut dan simplisia yang digunakan. Pemilihan pelarut etanol 96% karena pelarut tersebut merupakan pelarut ideal yang sering digunakan karena memiliki *extractive power* yang terbaik untuk melarutkan senyawa dan aman digunakan terutama dalam pembuatan ekstrak bahan baku sediaan *herbal medicine* (Arifianti *et al.*, 2014).

Proses ekstraksi dengan UAE dilakukan 3 x 2 menit, hal ini bertujuan untuk mendapatkan hasil ekstrak yang optimal. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan antara filtrat dan residunya. Filtrat yang diperoleh berupa ekstrak cair berwarna hijau, kemudian filtrat tersebut ditampung dan diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan tekanan 175 psi dan kecepatan putaran 70 rpm untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dan memisahkan senyawa aktif dari pelarut yang digunakan. Prinsip kerja dari alat ini adalah pemisahan antara ekstrak dan pelarut

menggunakan perbedaan titik didih disertai tekanan dan putaran (Nisa *et al.*, 2014). Proses penguapan tersebut dihentikan ketika volume ekstrak mencapai jumlah yang kecil dan konsistensinya berubah menjadi agak kental agar ekstrak tersebut dapat dikeluarkan dari *evaporation flask* (Abeysena and Darrington, 2014).

Ekstrak agak kental yang diperoleh dari penguapan menggunakan evaporator ini kemudian diupakan kembali dengan oven pada suhu 40°C untuk menghilangkan pelarut yang tersisa dan menghindari rusaknya senyawa karena tidak tahan dengan suhu tinggi. Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* kemudian diamati secara organoleptis, yang diperoleh berupa ekstrak kering, berwarna cokelat kehitaman, dan berbau khas.



**Gambar 5.3** Ekstrak kering etanol 96% daun *C. Cainito*

Ekstrak kering yang diperoleh kemudian di timbang dan dihitung rendemennya. Rendemen digunakan sebagai salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi yang dinyatakan dengan perbandingan antara jumlah ekstrak yang dihasilkan (berat akhir ekstrak) dengan jumlah bahan yang digunakan (berat awal simplisia) dikalikan 100% (Warsono, 2013; Sani, 2014).

**Tabel 5.2** Hasil ekstraksi daun *C. cainito*

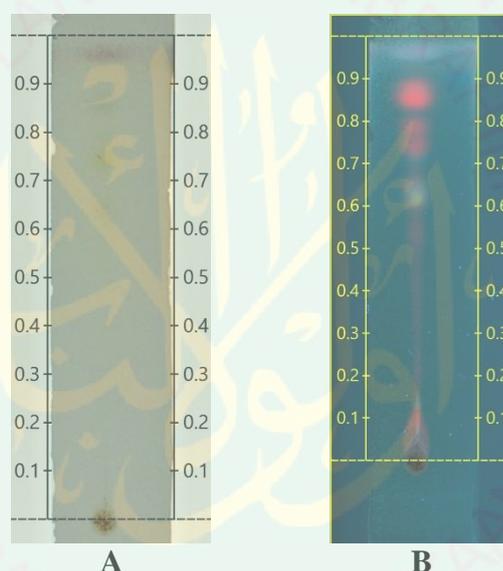
Jumlah Simplisia	Jumlah Ekstrak	Jumlah Pelarut	Metode Ekstraksi	% Rendemen
30 gram	3,71 gram	500 ml	UAE	12,36 %

## 5.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia menggunakan metode KLT dan kemudian divisualisasikan menggunakan TLC *Visualizer*. Skrining fitokimia ini bertujuan untuk pendektasian dini kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* secara kualitatif. Prinsip kerja pada skrining fitokimia dengan KLT berdasarkan adsorpsi dan partisi di mana sampel akan berpisah berdasarkan perbedaan kepolaran antara fase diam dan fase gerak nya (Dirjen POM, 1979). Fase diam yang digunakan berupa plat kaca silika gel yang bersifat polar dan fase gerak yang digunakan berupa campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 10 ml. Campuran fase gerak (eluen) ini dipilih setelah melakukan optimasi sebelumnya karena menghasilkan pemisahan noda yang baik.

Prosedur skrining fitokimia ini dimulai dengan menimbang ekstrak kering etanol 96% daun *C. cainito* sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam pelarut etanol 96% sebanyak 1 ml, metode pelarutan ekstrak dibantu dengan UAE agar lebih cepat. Ekstrak yang telah larut kemudian ditotolkan pada plat HPTLC silika gel F<sub>254</sub> menggunakan pipet mikro sebanyak 2 µm dan dieluasi dalam *chamber* yang telah berisi eluen jenuh dan ditunggu hingga eluen bergerak naik sampai tanda batas. Setelah proses eluasi selesai, plat HPTLC kemudian divisualisasi dengan menggunakan TLC *Visualizer* pada lampu cahaya putih dan lapu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm yang bertujuan untuk mengetahui dan mengidentifikasi warna yang muncul dari spot pemisahan dari golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*. Selanjutnya plat HPTLC disemprot (derivatisasi) dengan menggunakan penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% di lemari asam dan dipanaskan di atas TLC *Heater* dengan suhu 105 °C selama

beberapa menit. Mekanisme penampakan noda dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% terjadi karena gugus OH yang dimiliki H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> berfungsi sebagai ausokrom, di mana ausokrom ini dapat menyebabkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang pada cahaya tampak (Gandjar, 2007). Plat HPTLC yang telah diderivatisasi dilakukan pengamatan visualisasi kembali dengan TLC *Visualizer* dengan penggunaan lampu cahaya putih dan lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm sesuai dengan pengaturan pada alat TLC *Visualizer* sehingga noda/spot yang muncul menjadi lebih jelas (lihat lampiran 3).



**Gambar 5.4** Hasil visualisasi skrining fitokimia dengan TLC *Visualizer*

Keterangan:

A = Visualisasi plat KLT pada cahaya putih

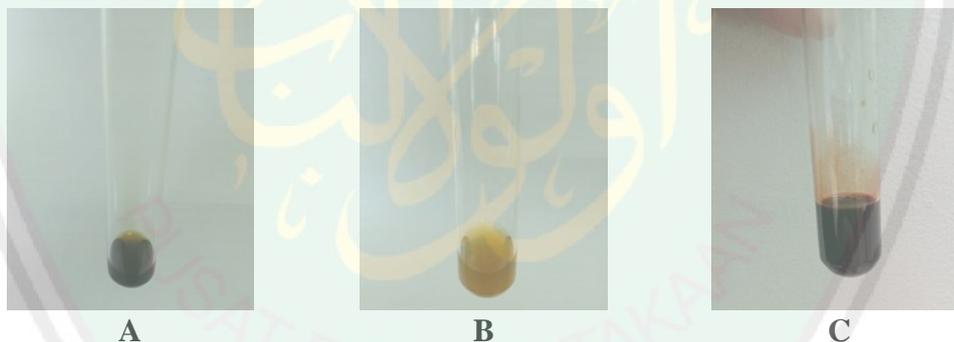
B = Visualisasi plat KLT pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm

Rincian profil plat KLT ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* pada gambar 5.4 menunjukkan bahwa adanya bercak noda berwarna kuning, hijau, dan ungu yang diikuti dengan nilai R<sub>f</sub> masing-masing noda yang menandakan bahwa dalam ekstrak tersebut terdapat senyawa golongan flavonoid, klorofil, dan terpenoid. Rincian profil plat KLT dapat dilihat pada tabel 5.3 berikut.

**Tabel 5.3** Rincian profil KLT ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

Ekstrak	No	Rf	Warna	Golongan
Etanol 96%	1	0,633	Kuning	Flavonoid
	2	0,746	Hijau	Klorofil
	3	0,850	Hijau	Klorofil
	4	0,958	Ungu	Terpenoid

Skrining fitokimia kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi golongan senyawa flavonoid menggunakan uji Bate-Smith dan Metcalf dan uji identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan uji Salkowski. Uji Bate-Smith dan Metcalf dilakukan dengan menambahkan 0,5 ml HCl pekat pada 1 ml ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Uji Salkowski dilakukan dengan menambahkan 0,5 ml kloroform dan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat pada 1 ml ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada gambar 5.5 berikut.

**Gambar 5.5** Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

Keterangan:

A = Blanko ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

B = Uji Bate-Smith dan Metcalf

C = Uji Salkowski

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa pada uji Bate-Smith dan Metcalf terjadi perubahan warna menjadi merah kekuningan, hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* mengandung senyawa golongan flavonoid. Reaksi positif pada uji Bate-Smith dan Metcalf jika memberikan warna merah, kuning, atau jingga yang menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Kosala, 2015). Pada uji Salkowski terjadi perubahan warna menjadi merah

kecoklatan, hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* mengandung senyawa golongan terpenoid. Reaksi positif pada uji Salkowski jika memberikan warna merah kecoklatan atau cincin warna merah yang menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid (Onuekwusi *et al.*, 2014).

### 5.6 Uji Aktivitas Peningkatan Kepadatan Massa Tulang Trabekular Femur

Jenis penelitian ini dilaksanakan secara *in vivo* sehingga menggunakan perlakuan induksi pada hewan coba, penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) jantan usia 5 bulan dengan kisaran berat badan 20-25 g sebanyak 30 ekor yang tampak sehat secara visual. Mencit yang sehat kemudian dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing 5 ekor dan ditempatkan pada kandang besi berukuran 20 x 30 x 20 cm. Mencit yang sudah ditempatkan pada kandang besi dilakukan proses aklimatisasi dan adaptasi selama 7 hari dengan dilakukan pemberian makan sebanyak 2 kali dalam sehari (pagi dan sore) dan kandang dibersihkan setiap 2-3 hari sekali. Penggunaan hewan coba berupa mencit berkelamin jantan disebabkan karena apabila menggunakan mencit betina dikhawatirkan terpengaruh oleh fluktuasi hormon estrogen yang dimiliki oleh hewan betina. Sehingga dapat mempengaruhi proses remodeling tulang dan mempengaruhi hasil yang akan diperoleh. Berdasarkan penelitian sebelumnya juga menggunakan mencit jantan sebagai model osteoporosis untuk mengetahui efek pemberian *Spilanthes acmella* terhadap peningkatan jumlah sel osteoblas tulang femur mencit (Laswati, 2015).

### 5.6.1 Penginduksian Osteoporosis

Hewan coba pada penelitian ini dikondisikan menjadi osteoporosis dengan dilakukan induksi deksametason secara per oral dengan dosis sebesar 0,0029 mg/g BB mencit dengan volume 0,12 ml/hari selama 28 hari. Penggunaan deksametason selama 28 hari pada mencit setara dengan penggunaan pada manusia selama 3-4 tahun (Manogalas, 2000). Deksametason merupakan obat golongan kortikosteroid yang memiliki aktivitas glukokortikoid yang tinggi, penggunaan obat ini lebih dari 3-6 bulan akan menyebabkan osteoporosis karena terjadi penghambatan proses pembentukan pada sel osteoblas (Kemenkes RI, 2015).

Mencit yang telah mengalami osteoporosis dapat dibedakan dengan mencit normal secara visual. Mencit normal memiliki warna bulu lebih cerah dan lebih lebat, bagian tulang punggung (vertebra) tidak terlihat membungkuk, dan aktif bergerak. Sedangkan, pada mencit yang telah mengalami osteoporosis dapat dilihat warna bulu tampak kusam dan bulu tidak lebat, bagian tulang punggung (vertebra) terlihat bengkak (kipotik) dan jalan mencit lebih membungkuk (Laswati, 2015).



**Gambar 5.6** Mencit normal (A) dan osteoporosis (B)

Pemberian deksametason dalam jangka panjang mengakibatkan penurunan kepadatan tulang trabekular dengan menghambat hormon estrogen untuk berikatan dengan estrogen reseptor, sehingga terjadi defisiensi estrogen yang menyebabkan ketidakseimbangan dalam proses *remodeling* tulang dimana proses formasi oleh sel

osteoblas menurun dan resorpsi oleh sel osteoklas meningkat (Meeta, 2013; Laswati, 2015). Penggunaan deksametason jangka panjang juga mengakibatkan penurunan kadar testoteron plasma pada pria hingga 50% dan secara langsung menyebabkan supresi hipofisis secara langsung (Hernawati, 2012). Kondisi ini mempengaruhi produksi estrogen dan testoteron dalam tubuh, karena kelenjar hipofisis anterior mensekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan hormon gonadotropin *lutensizing hormone* (LH). FSH berfungsi untuk menstimulasi perkembangan folikuler seperti *folikel de Graff* (GF) yang akan mensekresikan estrogen dan LH berfungsi untuk menstimulir produksi androgen (Lane, 1999; Hernawati, 2012). Defisiensi estrogen sebanding dengan defisiensi testoteron, karena testoteron merupakan salah satu hormon androgen yang dimetabolisme oleh enzim aromatase sitokrop p450 untuk menghasilkan 17- $\beta$ -estradiol dan berfungsi sebagai prekursor estrogen (Reid, 2000).

### 5.6.2 Uji Aktivitas Antiosteoporosis

Hewan coba yang telah mengalami osteoporosis diberi perlakuan dengan 6 macam kelompok perlakuan, kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif disendirikan. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok hewan yang telah mengalami osteoporosis tanpa diberi perlakuan dosis terapi, hanya diinduksi suspensi CMC-Na sebanyak 0,12 ml/hari selama 28 hari. Kelompok kontrol positif adalah kelompok hewan yang telah mengalami osteoporosis diberi perlakuan dosis alendronat sebesar 0,0026 mg/BB mencit dengan volume 0,36 ml/hari selama 28 hari. Kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 diberikan dosis masing-masing 2; 4; 8; dan 16 mg/BB mencit dengan volume 0,36 ml/hari selama 28 hari. Volume ini

merupakan volume pemberian oral yang masih diperbolehkan karena volume lambung mencit adalah 1 ml.

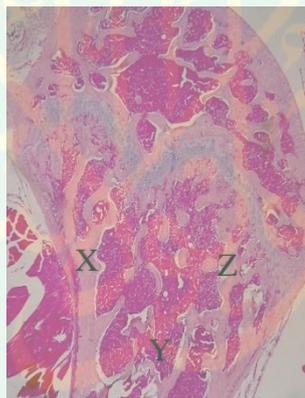
Pemberian terapi alendronate dan ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dilakukan dalam bentuk sediaan suspensi dalam CMC-Na 0,5%. Sediaan suspensi dipilih karena sifat alendronate dan ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ini sukar larut dalam air sehingga dibutuhkan bantuan *suspending agent* yang memiliki sifat larut dalam air. CMC-Na merupakan salah satu agen pensuspensi yang berifat larut dalam air, mudah diperoleh, dan harga yang relatif murah. Rentang kadar CMC-Na jika difungsikan sebagai *suspending agent* adalah 0,25 – 1% (Wade, A dan Waller, 1994).

### 5.6.3 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi

Hewan coba yang telah diberi uji perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 dilakukan pembedahan hewan coba secara mandiri. Langkah yang dilakukan dengan mengambil mencit dan dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi kapas dan kloroform yang berfungsi sebagai anestesi. Langkah selanjutnya dilakukan pembedahan pada mencit dengan meletakkan mencit di atas sterofoam dan beberapa bagian tubuh ditusuk dengan jarum untuk mempermudah proses pembedahan, kemudian diambil bagian tulang trabekular femur sebelah kanan dengan cara dipotong dan dibersihkan dari sisa daging yang menempel menggunakan gunting dan klep steril. Tulang femur yang sudah bersih dari daging yang melekat direndam pada larutan NaCl 0,9% steril untuk membersihkan sisa-sisa darah yang terdapat pada sampel tulang femur, kemudian dimasukkan ke dalam wadah salep 20 g yang telah berisi larutan formaldehid 10% dan diberi label sesuai kelompok perlakuan agar lebih mudah untuk membedakannya. Formaldehid merupakan bahan pengawet

yang sering digunakan untuk mengawetkan mayat dalam konsentrasi kecil dan cocok untuk mengawetkan tulang (Astawan, 2006).

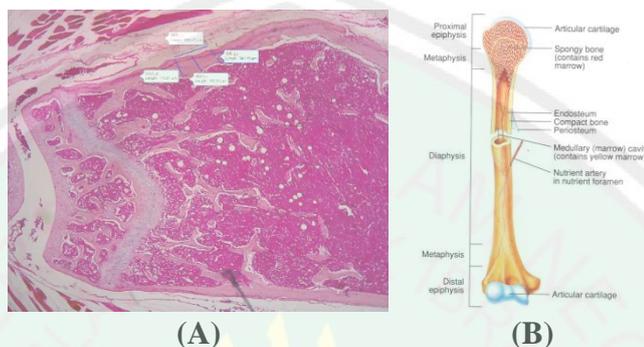
Pembuatan preparat histopatologi dilakukan oleh ahli di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (lihat lampiran 8). Pembuatan preparat histopatologi tulang trabekular femur dilakukan dengan metode pewarnaan HE. Preparat histopatologi kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan menggunakan kamera Optilab dan *software* Optilab. Hasil pengamatan ditunjukkan pada gambar 5.6, di mana bagian tulang kompak trabekular femur (X), bagian matriks tulang (Y), dan bagian rongga tulang trabekular femur (Z).



**Gambar 5.7** Hasil preparat histopatologi tulang trabekular femur

Preparat histopatologi tulang trabekular femur diamati dengan perbesaran 40x dan 100x untuk memastikan bagian tulang yang diamati benar dan dapat memilih bagian tulang yang baik karena terdapat bagian tulang yang rusak akibat proses pemotongan atau pengecetan tulang. Pengukuran kepadatan massa tulang diukur menggunakan *software* Motic Image Plus 3.0 pada bagian metafisis yaitu bagian bawah epifisis yang merupakan bagian aktif untuk pertumbuhan tulang dan berpengaruh pada pembentukan bentuk struktur tulang kompak ataupun rongga tulang dan merupakan bagian yang mudah diukur dalam melihat kepadatan massa

tulang serta biasanya dijadikan untuk melihat nilai *T-score* dalam identifikasi osteoporosis. Bagian metafisis dilakukan pengukuran 3x replikasi pada satu sisi bagian tulang untuk mendapatkan bagian dan nilai yang dapat diidentifikasi secara akurat (Rizalah *et al.*, 2016).

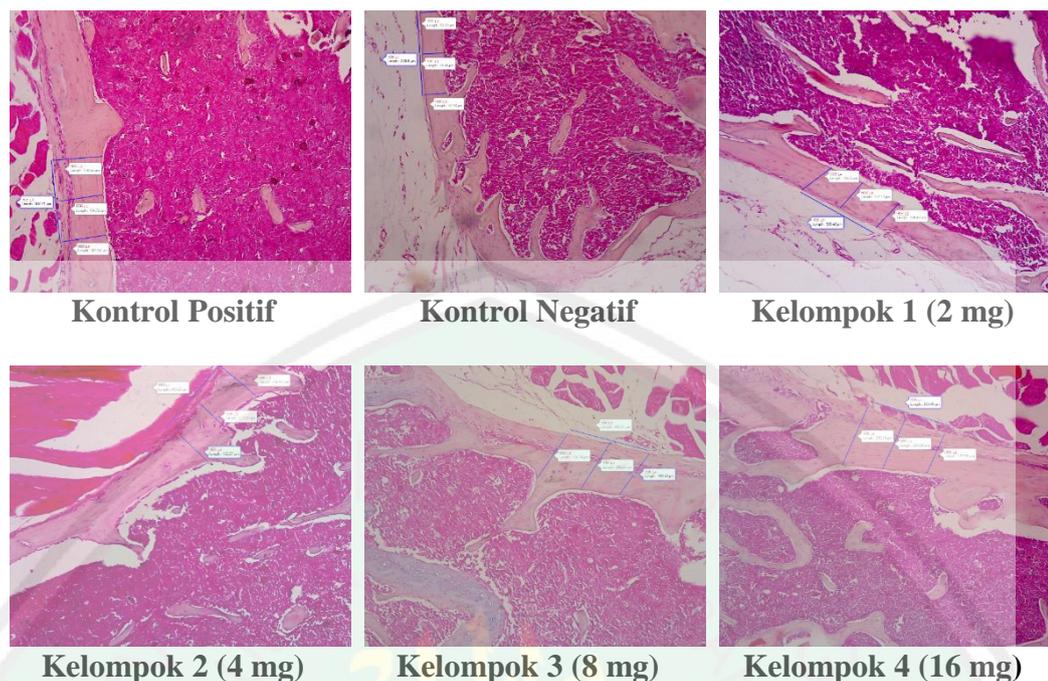


**Gambar 5.8** Pengukuran kepadatan massa tulang trabekular femur (A) Sampel preparat histopatologi; (B) Struktur tulang tabekular femur

Pemeriksaan histomorfometri dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur dalam satuan  $\mu\text{m}$  (lihat lampiran 4). Hasil rerata tiap kelompok uji kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif untuk mengetahui adanya aktivitas atau tidak pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*. Hasil pemeriksaan histomorfometri yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 5.4 dan gambar 5.9 sebagai berikut.

**Tabel 5.4** Hasil rerata kepadatan massa tulang tiap kelompok uji

Kelompok Uji	Rerata Kepadatan Massa Tulang ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
Kontrol Positif	153,06 $\pm$ 9,00
Kontrol Negatif	82,90 $\pm$ 18,25
Kelompok Dosis 1 (2 mg)	142,93 $\pm$ 17,63
Kelompok Dosis 2 (4 mg)	162,36 $\pm$ 15,99
Kelompok Dosis 3 (8 mg)	183,26 $\pm$ 8,83
Kelompok Dosis 4 (16 mg)	210,34 $\pm$ 15,30



Gambar 5.9 Hasil pengukuran histomorfometri

#### 5.6.4 Analisis Data

Analisis data hasil rerata kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan yang diperoleh dari pengamatan secara histomorfometri dilakukan dengan menggunakan metode *One-Way* ANOVA dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan suatu data dinyatakan dalam (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan ( $\alpha$ ) 95% dari *software* IBM SPSS Statistic 24. Metode ANOVA dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat uji parametric, yaitu nilai uji normalitas dan homogenitas *p-value* > 0,05 (lihat lampiran 5).

Uji normalitas data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan *Shapiro-Wilk* terhadap hasil pengukuran kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan yang ditunjukkan pada tabel 5.5 sebagai berikut.

Tabel 5.5 Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Signifikansi	Keterangan
Kontrol Positif	0,665	Normal
Kontrol Negatif	0,816	
Dosis 1 (2 mg)	0,764	
Dosis 2 (4 mg)	0,879	
Dosis 3 (8 mg)	0,845	
Dosis 4 (16 mg)	0,439	

Berdasarkan data pada tabel 5.5 diperoleh nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ( $p\text{-value} > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan yang berarti bahwa semua distribusi data pada masing-masing kelompok yang diperoleh adalah normal. Selanjutnya setelah diperoleh data pada uji normalitas normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian menggunakan *Levene's test*. Hasil uji *Levene's test* dapat dilihat pada tabel 5.6 sebagai berikut:

**Tabel 5.6** Hasil uji homogenitas varian *Levene's test*

Kelompok	Signifikansi	Keterangan
Kontrol Positif	0,485	Homogen
Kontrol Negatif		
Dosis 1 (2 mg)		
Dosis 2 (4 mg)		
Dosis 3 (8 mg)		
Dosis 4 (16 mg)		

Berdasarkan data pada tabel 5.6 diperoleh nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ( $p\text{-value} > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan yang berarti bahwa semua distribusi data pada masing-masing kelompok yang diperoleh adalah homogen. Selanjutnya setelah diperoleh data dinyatakan normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji analisis perbedaan *One-Way ANOVA*. Hasil uji *One-Way ANOVA* dapat dilihat pada tabel 5.7 sebagai berikut:

**Tabel 5.7** Hasil uji *One-Way ANOVA*

Kelompok	Signifikansi	Keterangan
Kontrol Positif	0,00	Berbeda signifikan
Kontrol Negatif		
Dosis 1 (2 mg)		
Dosis 2 (4 mg)		
Dosis 3 (8 mg)		
Dosis 4 (16 mg)		

Berdasarkan data pada tabel 5.7 diperoleh nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 ( $p\text{-value} < 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan kepadatan massa tulang trabekular femur antar kelompok

perlakuan. Analisis kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil menggunakan uji LSD. Nilai kepadatan massa tulang trabekular femur suatu kelompok dinyatakan berbeda signifikan dengan kepadatan massa tulang trabekular femur kelompok lainnya apabila memiliki  $p\text{-value} < 0,05$  (lihat lampiran 5). Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.8 sebagai berikut:

**Tabel 5.8** Hasil uji LSD

Kelompok	Positif	Negatif	Dosis 1 (2 mg)	Dosis 2 (4 mg)	Dosis 3 (8 mg)	Dosis 4 (16 mg)
Positif		0,000*	0,342	0,384	0,009*	0,000*
Negatif	0,000*		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Dosis 1 (2 mg)	0,342	0,000*		0,078	0,001*	0,000*
Dosis 2 (4 mg)	0,384	0,000*	0,078		0,059	0,000*
Dosis 3 (8 mg)	0,009*	0,000*	0,001*	0,059		0,018*
Dosis 4 (16 mg)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,018*	

\*Berbeda signifikan dengan nilai signifikansi ( $p\text{-value}$ )  $< 0,05$

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

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa secara umum menyatakan adanya perbedaan signifikan antara kelompok uji dosis 1, 2, 3, 4, dan kontrol positif terhadap kelompok kontrol negatif. Hal ini dinyatakan dengan adanya nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 ( $p\text{-value} < 0,05$ ) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok lain. Sehingga dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* pada semua kelompok perlakuan dosis 1, 2, 3, 4 (2; 4; 8; 16 mg) memiliki aktivitas dalam meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan, serta kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan alendronate dengan dosis 0,026 mg memiliki aktivitas dalam meningkatkan kepadatan massa tulang

trabekular femur mencit jantan yang ditinjau dari nilai uji LSD terhadap kelompok kontrol negatif.

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

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok uji dosis 3 dan 4 (8 dan 16 mg) terhadap kelompok kontrol positif dengan masing-masing memiliki nilai signifikansi 0,009 dan 0,000 ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Sedangkan untuk kelompok uji dosis 1 dan 2 (2 dan 4 mg) masing-masing memiliki nilai signifikansi 0,342 dan 0,384 ( $p\text{-value} > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa pada kelompok uji dosis tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan hal tersebut dapat dinyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* dengan dosis 8 dan 16 mg dapat diketahui mampu memberikan efek farmakologis lebih baik dari golongan bifosfonat yaitu alendronat yang dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif.

Selanjutnya untuk mengetahui dari nilai dosis optimum yang diberikan dilakukan uji menggunakan uji Probit Analisis yaitu *Chi-Square Test* dari data pengukuran kepadatan massa tulang trabekular femur. Hasil uji *Chi-Square Test* dapat dilihat pada tabel 5.9 sebagai berikut:

**Tabel 5.9** Hasil uji *Chi-Square Test*

		<b>Chi-Square</b>	<b>Df</b>	<b>Sig.</b>
<b>PROBIT</b>	<b>Pearson Goodness of Fit Test</b>	4,614	1	0,032*

\*Nilai signifikan  $< 0,05$  faktor heterogenitas digunakan sebagai acuan kalkulasi nilai limit

Hasil uji *Chi-Square Test* menunjukkan bahwa nilai dari data yang diperoleh pada perlakuan tiap kelompok pemberian dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

yaitu signifikan karena nilai  $p$ -value  $<0,05$ . Selanjutnya untuk melihat dosis efektif ( $ED_{50}$ ) dilakukan uji probabilitas yang dapat dilihat pada tabel 5.10 sebagai berikut:

**Tabel 5.10** Hasil nilai probabilitas

Probability	Estimate
0,250	6,659
0,500	7,915
0,750	9,408
0,990	14,364

Hasil nilai probabilitas uji *Chi-Square* menunjukkan bahwa nilai  $ED_{50}$  dan  $ED_{99}$  berturut-turut yaitu 7,915 dan 14,364. Nilai  $ED_{50}$  menunjukkan nilai dosis efektif ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang dapat diberikan yaitu sebesar 7,915 mg, sedangkan nilai  $ED_{99}$  menunjukkan nilai dosis maksimum yang dapat diberikan atau dosis letal yang dapat menyebabkan overdose sehingga kurang efektif dalam peningkatan efek farmakologis yang diberikan yaitu sebesar 14,364 mg.

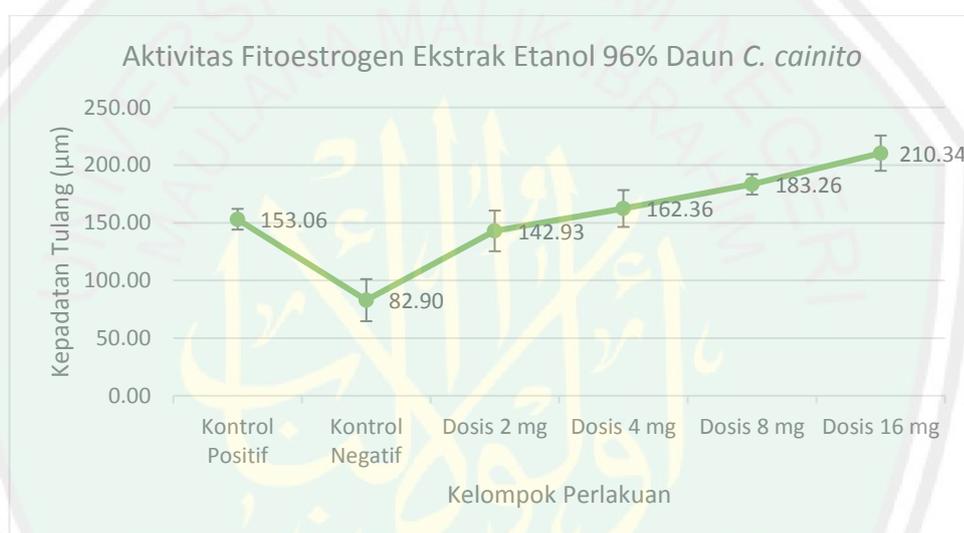
#### 5.6.5 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen Ekstrak Etanol 96% Daun *C. cainito*

Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang terdapat pada suatu tumbuhan yang memiliki struktur kimia mirip dengan estrogen, mempunyai efek estrogenik, dan bekerja pada reseptor estrogen (Baziad, 2003; Yang *et al.*, 2012). Fitoestrogen merupakan alternatif pengganti estrogen yang potensial tanpa memiliki efek samping yang berbahaya (Villiers, 2009). Aktivitas senyawa fitoestrogen bekerja secara nyata pada tulang (Pawitan, 2002). Uji secara *in vitro* diketahui bahwa fitoestrogen memiliki mekanisme dapat meningkatkan aktivitas pembentukan sel osteoblas dan menghambat pembentukan sel osteoklas sehingga dapat digunakan sebagai pencegahan osteoporosis (Branca, 2003).

Senyawa fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada tubuh, baik reseptor estrogen alfa ( $ER-\alpha$ ) maupun estrogen reseptor beta ( $ER-\beta$ ), namun fitoestrogen berikatan dengan  $ER-\beta$  10 kali lebih besar daripada dengan  $ER-\alpha$

(Silalahi, 2012). Aktivitas fitoestrogen yang berikatan dengan ER- $\beta$  yang terdapat pada tulang akan mempengaruhi massa tulang dengan menghambat aktivitas sel osteoklas dan meningkatkan aktivitas sel osteoblas serta peningkatan sekresi kalsitonin yang akan menghambat aktivitas hormon paratiroid (PTH) terhadap proses resorpsi tulang (Baziad, 2003).

Hasil aktivitas senyawa fitoestrogen yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* ditunjukkan pada gambar 5.8 sebagai berikut.



**Gambar 5.10** Aktivitas fitoestrogen ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua kelompok terapi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* memberikan aktivitas peningkatan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan. Efek dari peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur terjadi karena adanya aktivitas estrogenik pada senyawa fitoestrogen yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen yang menyebabkan peningkatan homeostasis remodeling tulang (Urasopon *et al.*, 2008). Hasil penelitian ini memiliki dosis efektif ( $ED_{50}$ ) sebesar 7,915 mg, dosis efektif merupakan suatu dosis yang dapat memberikan efek terapeutik pada 50% dari seluruh hewan percobaan. Hasil

penelitian ini sama dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Utamingtyas (2017) yang menyatakan bahwa dosis optimum pada ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason adalah 8 mg. Penelitian berikutnya yang dilakukan oleh Mustofa (2018) menyatakan bahwa dosis 8 mg ekstrak etil asetat daun *C. cainito* memiliki aktivitas tertinggi pada peningkatan kepadatan tulang trabekular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason.

### 5.7 Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun *C. cainito* dalam Prespektif Islam

Allah SWT menciptakan yang ada di alam semesta ini baik di langit dan di bumi melainkan sebagai tanda-tanda kekuasaan Allah SWT bagi orang-orang yang berakal, yaitu orang-orang yang selalu memikirkan penciptaan yang ada di langit dan di bumi untuk menambah rasa keimanannya kepada Allah SWT. Hal ini tercantum dalam Al Qur'an Surah Ali 'Imran ayat 190-191, bahwa Allah SWT berfirman:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (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."*

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidaklah sia-sia, maka kita sebagai manusia yang berakal diperintahkan untuk memahami dan merenungkan apa saja yang telah diciptakan oleh-Nya. Salah satunya memahami tumbuhan-tumbuhan yang ada disekitar kita yang merupakan ayat kauniyah-Nya di antaranya dengan cara melakukan penelitian terhadap aktivitas ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan terdapat dosis yang efektif dalam meningkatkan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan. Ini merupakan bukti bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di muka bumi ini memiliki kadar dan ukuran masing-masing. Hal ini sebagaimana dengan firman Allah dalam Al Quran Surah Al Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

*Artinya: "Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran."*

Menurut Shihab (2002), bahwa ayat ini menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah. Ukuran yang sesuai dengan hikmah bisa diartikan bahwa ukuran dan takaran tersebut seimbang dan tepat, yaitu yang tidak berlebihan maupun tidak kurang dari takaran yang telah ditetapkan yang dapat berkhasiat atau bermanfaat bagi makhluk Allah SWT. Pada penelitian ini konteks ukuran yang sesuai dengan hikmah merupakan dosis efektif (ED<sub>50</sub>) ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* yang memberikan pengaruh terhadap peningkatan kepadatan massa tulang trabekular femur mencit jantan yaitu sebesar 7,915 mg.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* memiliki aktivitas meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan.
- b. Dosis efektif (ED<sub>50</sub>) ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* untuk meningkatkan kepadatan tulang trabekular femur mencit jantan adalah 7,915 mg.

#### **6.2 SARAN**

Diharapkan untuk peneliti selanjutnya dapat melakukan uji aktivitas daun *C. cainito* terhadap penyakit lainnya yang dipengaruhi oleh defisiensi hormon estrogen seperti demensia, neuropati, jantung koroner, dan penuaan untuk mengetahui aktivitas fitoestrogen dari ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

## DAFTAR PUSTAKA

- Abeyseena, I. and Darrington, R. 2014. *Understanding Evaporation and Concentration Technologies. Part 1-Basic Principle of Commonly Used Evaporation Technologies*. Ipswich, UK: Genevac Ltd.
- Abidin, Z. 2011. Analisa Pengukuran Kadar Larutan Temulawak Menggunakan Metode TLC (*Thin Layer Chromatography*) [skripsi]. Surabaya: Jurusan Teknik Fisika, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Anandya, R. 2016. Uji Efektivitas Injeksi Alendronat Pada Defect Tulang Akibat Osteoporosis [skripsi]. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Andri, W.Y. 2007. Produksi Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Substitusi Bawang Putih (*Alium sativum*) dalam Ransum [skripsi]. Bogor: Program Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Perternakan, Fakultas Peternakan, IPB.
- Anggraini, W. 2008. *Fitoestrogen sebagai Alternatif Alami Terapi Sulih Hormone untuk Pengobatan Osteoporosis Primer pada Wanita Pascamenopause*. Volume 231, halaman: 25-31.
- Ariestine, A.D. 2010. *Terapi Sulih Hormon Pada Osteoporosis*. Medan: Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.
- Afriantini, L., Rice D.O., Idha K. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinentesisin dalam Ekstrak *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. Volume 2, Nomor 1: 1-4.
- Astawan, M. 2006. *Membuat Mie dan Bihun*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Branca F. 2003. Dietary Phyto Oestrogens and Bone Health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 877-887.
- Cosman, F. 2009. *Osteoporosis: Panduan Lengkap agar Tulang Anda Tetap Sehat*. Yogyakarta: B-First.
- Dahlan, S. 2004. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Uji Hipotesis*. Jakarta: Bina Mitra Press.
- Das A, Bin Nordin DB, Bhaumik A. 2010. A brief review on *Chrysophyllum cainito*, *IJPI's Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulations*. Vol 1.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: BaktiHusada, 13-18.
- Dipiro J.T., Talbert R.L, Yee G.C., Matzke G.R, Wells B.G., and Possey L.M. 2014. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, 9<sup>th</sup> Ed., Mc Graw Hill, New York, p. 1482-1500.
- Dirjen POM. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Einbond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X. D., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. 2004. Anthocyanin Antioxidants from Edible Fruits. *Food Chem*. Vol 84: 23–28.
- Endarini, L.H. 2016. *Farmakognosi dan Fitokimia*. Jakarta: Pusdik SDM Kesehatan.
- Fauzan, A. 2015. *Tumbuh-Tumbuhan dan Buah-Buahan dalam Al-Quran* [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Ushuluddin dan Pemikiran Islam, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga.
- Ferguson, N. 2004. *Osteoporosis in Focus*. Chicago: Pharmaceutical Press.
- Gallager, J.C. & Tella, S.H. 2013. *Controversies in Osteoporosis Management: Antiresorptive Therapy for Preventing Bone Loss: When to Use One or Two Antiresorptive Agents?*. Clinical Obstetrics And Gynecology.
- Grippio A, Capps K, Rougeau B and Gurley BJ. 2007. Analysis of flavonoid phytoestrogens in botanical and ephedra-containing dietary supplements. *Ann Pharmacother*. 41: 1375-82.
- Gumelar, L.A.S. 2011. *Profil Perempuan Indonesia 2011*. Jakarta : CV. Birru Laut.
- Hanafiah K.A. 2004. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Harborne, J. B. 1984. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro Edisi II, Penerbit ITB, Bandung, 6-8, 25-64, 70, 72.
- Hemwimol, S., P. Pavasant, and A. Shotipruk. 2006. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 13: 543-548.
- Hernawati. 2012. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari Tanaman Kedelai*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Hidayat, M. A., Umiyah, Ulva, E. U. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Metanol Beberapa Varian Buah Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dari Daerah Jember. *Berk Panel Hayati*. Volume 13: 45-50.

- Hoffmann, David L. 2004. *New Holistic Herbal*. Herbal Materia Medica.
- Hunt, R. H. Marshall, J. K., Rainsford, K. D., James, C. 2000. A Randomized Controlled Trial to Assess Alendronate-Associated Injury of the Upper Gastrointestinal Tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 1451-1457.
- Indriati, E. 2004. *Antropologi Forensik*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- International Osteoporosis Foundation. *Introduction to Bone Biology : All About Your Bone*. In: [www.iofbonehealth.org](http://www.iofbonehealth.org). diambil pada tanggal 11/01/2016.
- Junaidi, I, 2007. *Osteoporosis – Seri Kesehatan Populer*. Cetakan kedua, Penerbit PT Bhuana Ilmu Populer.
- Junqueira LC and Carneiro J. 2007. *Basic Histology: Text and Atlas*. Ed.11. Poule; McGraw-Hill Medical.
- Kawiyana, I. K. S. 2009. Osteoporosis Patogenesis Diagnosis dan Penanganan Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam*. Volume 10, Nomor 2.
- Kawiyana, S. 2009. Interleukin-6 yang Tinggi sebagai Faktor Resiko terhadap Kejadian Osteoporosis pada Wanita Pascamenopause Defisiensi Estrogen. *Jurnal Penyakit Dalam*. Volume 10, Nomor 1.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman Pengendalian Osteoporosis*. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Nomor 1142/MENKES/SK/XII/2008.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. *Infodatin Data dan Kondisi Penyakit Osteoporosis di Indonesia*, Pusat data dan informasi Kemenkes RI, Jakarta
- Kosala, K. 2015. Uji Fitokimia dan Toksisitas Fraksi Ekstrak Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) dengan Reaksi Warna dan Brine Shrimp Lethaly Test. *Molluca Medica*, Volume 8, Nomor 1 halaman 98-104.
- Laswati, H., Mangestuti A, Retno W. 2015. Efek Pemberian *Spilantes acmella* dan Latihan Fisik terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit yang Diinduksi Deksmetason. Surabaya: Universitas Airlangga, Volume 25, Nomor 1, halaman 43-50.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida, dan Alkaloida; Senyawa Terponoida dan Steroida*. Medan: Fakultas MIPA, Universitas Sumatera Utara.
- Lim, T. 2013. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Vol 6, Fruits*. New York: Springer.

- Luo, Xiao-Dong, Margaret J. Basile, Edward J. Kennely. 2002. Polyphenolic Antioxidants form The Fruit of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1379-1382.
- Malkin, Chris J., Peter J. Pugh, Richard D. Jones, Dheeraj K, Kevin S. Channer, and T. Hugh J. 2004. The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (7): 3313-18. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031069>
- Manolagas S C. 2000. Birth and death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* 21(2): 115-37.
- Manoi, F. 2006. Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Mutu Simplisia Sambiloto. *Bul. Littro* 2006 (1): 1-5.
- Mattson, I. 2013. *Ulumul Quran Zaman Kita* terj. Cecep Lukman Yasin. Jakarta: Zaman.
- Meeta. 2013. *Postmenopause Osteoporosis Basic and Clinical Consept*s. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, p. 2, 20-22.
- Mei J, Shirley S. C. Yeung, and Annie W. C. Kung. 2001. High Dietary Phytoestrogen Intake Is Associated with Higher Bone Mineral Density in Postmenopausal but Not Premenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(11):5217–5221.
- Meira NA, Klein LC Jr, Rocha LW, Quintal ZM, Monache FD, Cechinel Filho V and Quintao NL. 2014. Anti-inflammatory and anti-hypersensitive effects of the crude extract, fractions and triterpenes obtained from *Chrysophyllum cainito* leaves in mice. *J Ethnopharmacol*. 151: 975-983.
- Morton. 1987. Star Apple Fruits of Warm Climates. *Miami Florida*. 408-410.
- Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin. *Balai Penelitian Veterine*. Bogor
- 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: Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nisa, G.K., Wahyunanto A.G., Yusuf H. 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. Volume 2, Nomor 1, halaman 72-78.
- Noor, Z. 2014. *Buku Ajar: Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Jakarta: Salemba Medika.

- Norman H & Bell. 2003. RANK Ligand and The Regulation of Skeletal Remodeling. *J Clin Invest* Volume 111, halaman 1120-1122.
- Notoatmojo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Nurrochmad, A., Leviana, F. Wulancarsari, C. G., Lukitaningsih, E. 2010. Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent Bone Loss in and Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. *International Journal of Phytomedicine* 2, 363-372.
- O'Connell, M.Beth & Vondracek, S. 2008. Chapter 93 : *Osteoporosis and Other Metabolic Disease*. Dalam : J.T. Dipiro penyunt. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 7th ed. US: The McGraw-Hill Companies, Inc. P. 1483-1496.
- Onuekwusi E.C., Akanya H.O., Evans E.C. 2014. Phytochemical Constituents of Seeds of Ripe and Unripe *Blighia Sapida* (K. Koenig) and Physicochemical Properties of The Seed Oil, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* ISSN (Online): 2319-6718 pp. 31-40.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Simons, A. 2009. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., dan Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. Volume 5, halaman 1-15.
- Pawitan, J. A. 2002. Phytoestrogens-Protection Against a Wide Range of Diseases. *Medical Progress*. Volume 1, halaman 9-13.
- Pertawarman, A. & Hestiantoro, A. 2002. Manfaat Isoflavon pada Wanita Menopause. *Majalah Obstet Ginekol Indonesia*, Vol 26 1, 49-55.
- Pilsakova, I., Rieckensky, I., Jagla, F. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research* 59, 651-664.
- Pino, J., Marbot, R., & Rosado, A. 2002. Volatile Constituents of Star Apple (*Chrysophyllum cainito* L.) from Cuba. *Flavour Fragr J*. Vol 17: 401-403.
- Rahman, Fazlul. 1996. *Tema Pokok Al Quran* terj. Anas Mahyudin. Bandung: Pustaka.
- Reid, Ian R. 2000. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 14 (2): 279-98. <https://doi.org/10.1053/beem.2000.0074>.
- Riis, BJ. 1996. The Role of Bone turnover in The Pathophysiology of Osteoporosis. *Br J Obstet Gynaecol* 103 (Suppl 13): 9-15.
- Rizalah, Suci I, Muhammad H., Septa S. W. 2016. Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) terhadap Ketebalan

- Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariektomi. *eJurnal Pustaka Kesehatan*. Volume 4, Nomor 1.
- Rogers, K., 2011. *Bone and Muscle: Structure, Force and Motion*. New York: Britannica Educational Publishing. P. 44-45.
- Rossidy, I. 2008. *Fenomena Flora dan Fauna dalam Prespektif Al Quran*. Malang: UIN Malang Press.
- Sani, R.N., Fithri C.N., Ria D.A., Jaya M.M. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut Tetraselmis chuii. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Volume 2, Nomor 2, halaman 121-126.
- Sari, A.M. 2015. Struktur Histologi Femur Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Swiss Webster Ovariektomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai [skripsi]. Jember: Jurusan Biologi. Fakultas MIPA. Universitas Jember.
- Schwinghammer, T.L. 2015. *Chapter 3: Osteoporosis*. Dalam: J.T. Dipiro penyunt. *Pharmacotherapy Handbook 9th ed*. United State of America : McGraw-Hill Companies, Inc. P.16.
- Shailajan S and Gurjar D. 2014. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Chrysophyllum cainito* Linn. Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 26(1), May – Jun 2014; Article No. 17, Pages: 106-111. ISSN 0976 – 044X.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. 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 Diovariektomi [skripsi]. Jakarta: Program Studi Farmasi. Fakultas MIPA. Universitas Indonesia.
- Slideplayer. 2018. <http://www.slideplayer.com/>. Diakses 10 Januari 2018.
- Slideshare. 2018. *Phytochemicalsinfoods*. <https://www.slideshare.net/elishagayhidalgo/phytochemicalsinfoods>. Diakses 10 Januari 2018.
- Speroff Leon., Fritz Marc A. 2005. *Menopause and the Perimenopousal Transition*. New York : Lippincott Williams & Wilkins.
- Stevens, Alan, Bancrof, John D. 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques: The Hematoxylin*. 3<sup>rd</sup> edition. Edinburgh: New York.
- Supardan, M.D., Fuadi, A., Alam, P.N., Arpi, N. 2011. Solvent extraction of ginger leoresin using ultrasound. *Makara Sains*, 15: 163-167.
- USDA, NRCS. 2013. *The Plants Database, Version 3.5*(<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas*, volume 59, nomor 2, halaman: 137–148.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J.P. E. 2010. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*. Volume 2, halaman: 1106-1131.
- Villiers, T. J. 2009. Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. Elsevier : *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Volume 23 halaman: 73- 85.
- Waheed, U., Ansari, Asim. 2012. *Laboratory Techniques in Histopatology: A Handbook for Medical Technologies*. Pakistan: Lambert Academic Publishing.
- Wardhana, W. 2012. Faktor-faktor Risiko Osteoporosis Pada Pasien dengan Usia di Atas 50 Tahun. *Karya Tulis Ilmiah*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Warsono, Agus W., Dwi D. 2013. *Proses Pembelajaran & Penilaian*. Yogyakarta: Graha Cendekia.
- Wirakusumah E.S. 2007. *Mencegah Osteoporosis*. Penebar Plus. Jakarta: Hal 11.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Wikipedia. 2018. <http://www.wikipedia.org/>. Diakses 10 Januari 2018.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 51. Page 229-235.
- Zulkifli. 2009. Eksplorasi dan Studi Keragaman *Garcinia L.* Berdasarkan Sumber Kunci Determinasi Bagi Perkuliahan Botani Tumbuhan Tinggi. *Jurnal Biologi Indonesia*. Vol.9(2): 52-65.

## LAMPIRAN-LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman *C. cainito*



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/369/102.7/2017  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Kenitu**

Memenuhi permohonan saudara :

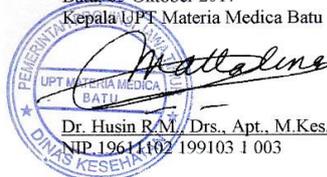
Nama : BURHAN MA'ARIF Z.A., M.Farm., Apt.  
NIDT : 19900221 201701011 124  
Instansi : JURUSAN FARMASI, FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

- 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 : *Chrysophyllum cainito* 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. Filipina: Caimito.
  - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121b-124b-125a-126b-127a.
- 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.
- Nama Simplisia : *Chrysophylli cainitii* Folium / Daun Kenitu.
- 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.
- Penggunaan : Penelitian.
- 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, 05 Oktober 2017

Kepala UPT Materia Medica Batu



Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.  
NIP. 19641102 199103 1 003

Lampiran 2. Hasil Uji *Moisture Content* Simplisia Kering Daun *C. cainito*

## L.2.1 Replikasi 1

**Method name** FITOESTROGEN

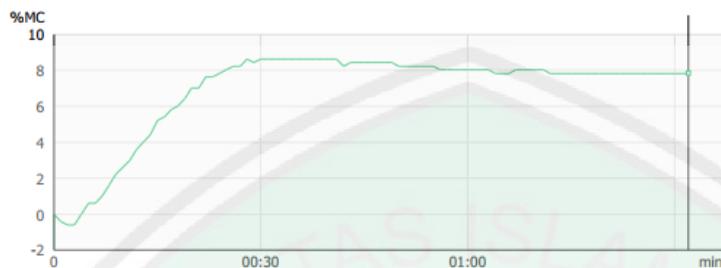
Date &amp; Time 24.07.2018 / 09:03

Measured values and drying curve

**End result** 7.83%MC

Duration

01:32 min



Comment:

Start weight	0.498 g
Dry Weight	0.459 g
Moisture Content	0.039 g

## L.2.2 Replikasi 2

**Method name** FITOESTROGEN

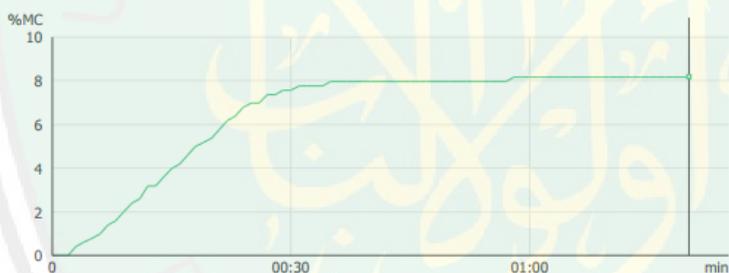
Date &amp; Time 24.07.2018 / 09:24

Measured values and drying curve

**End result** 8.17%MC

Duration

01:20 min



Comment:

Start weight	0.502 g
Dry Weight	0.461 g
Moisture Content	0.041 g

## L.2.3 Replikasi 3

**Method name** FITOESTROGEN

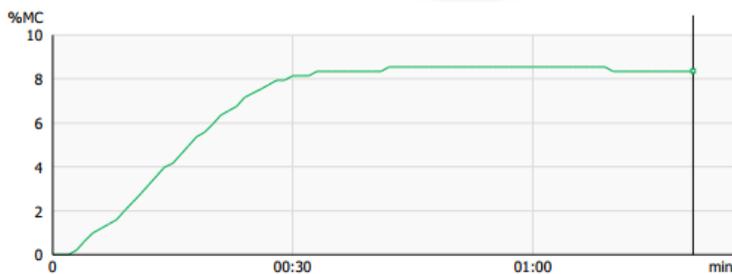
Date &amp; Time 24.07.2018 / 09:32

Measured values and drying curve

**End result** 8.35%MC

Duration

01:20 min

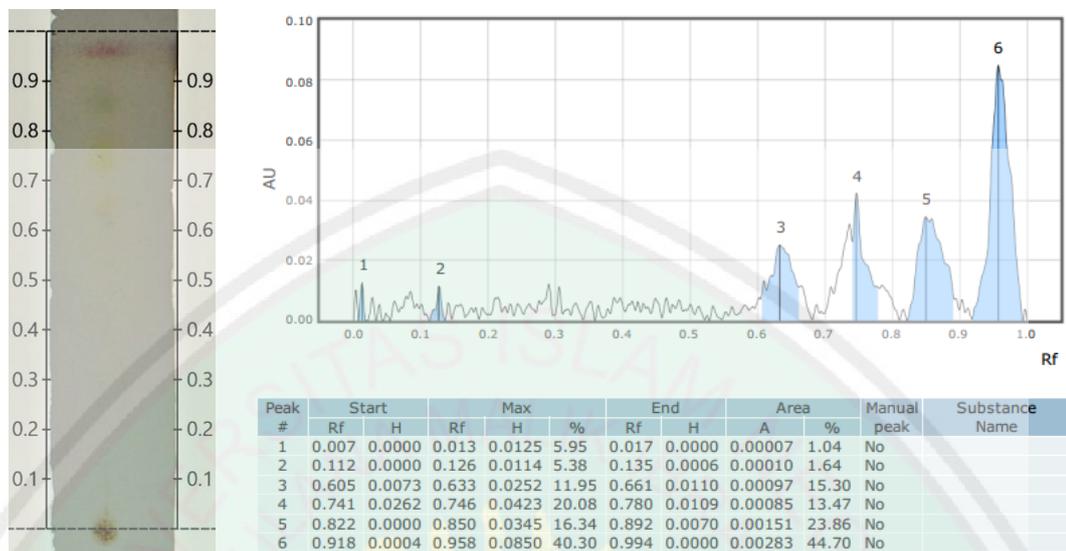


Comment:

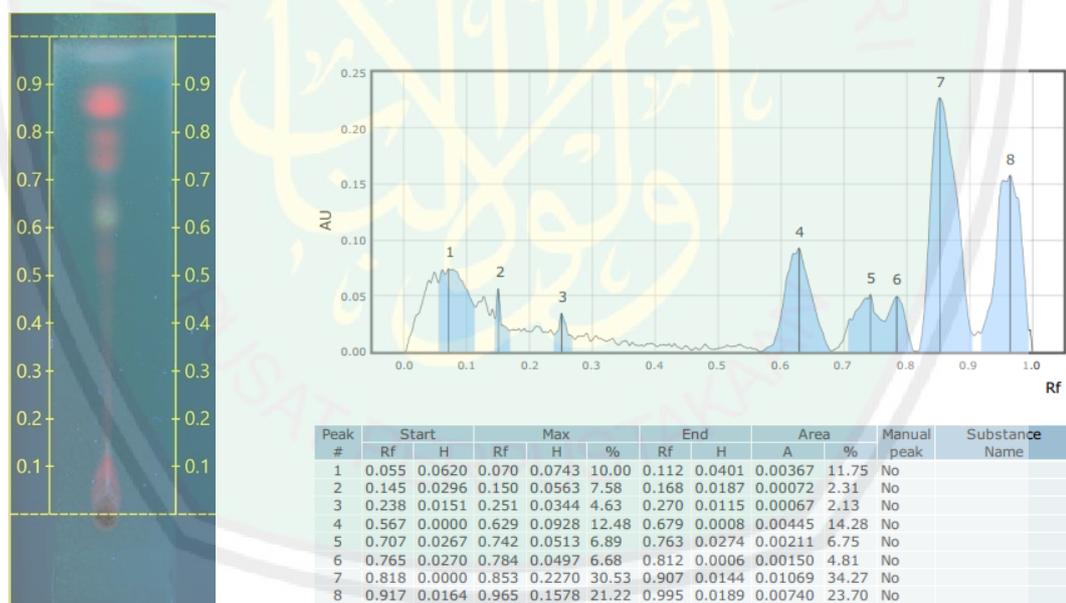
Start weight	0.503 g
Dry Weight	0.461 g
Moisture Content	0.042 g

**Lampiran 3. Hasil TLC Visualizer Ekstrak Daun *C. cainito***

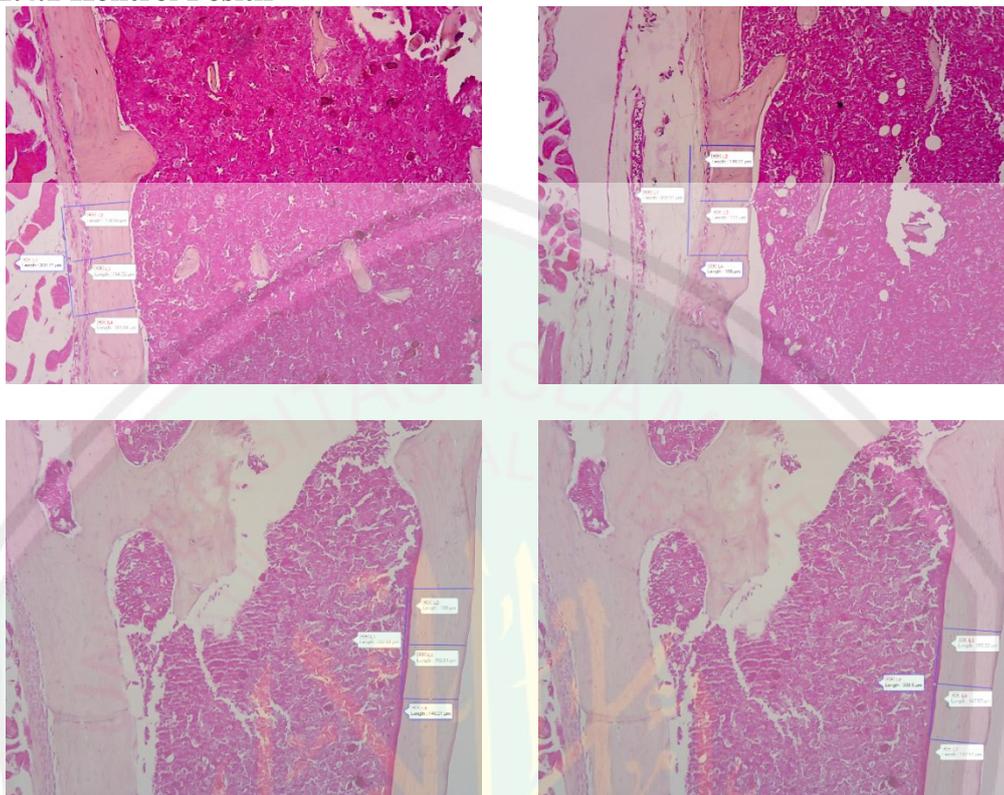
**L.3.1 Pengamatan pada lampu putih**



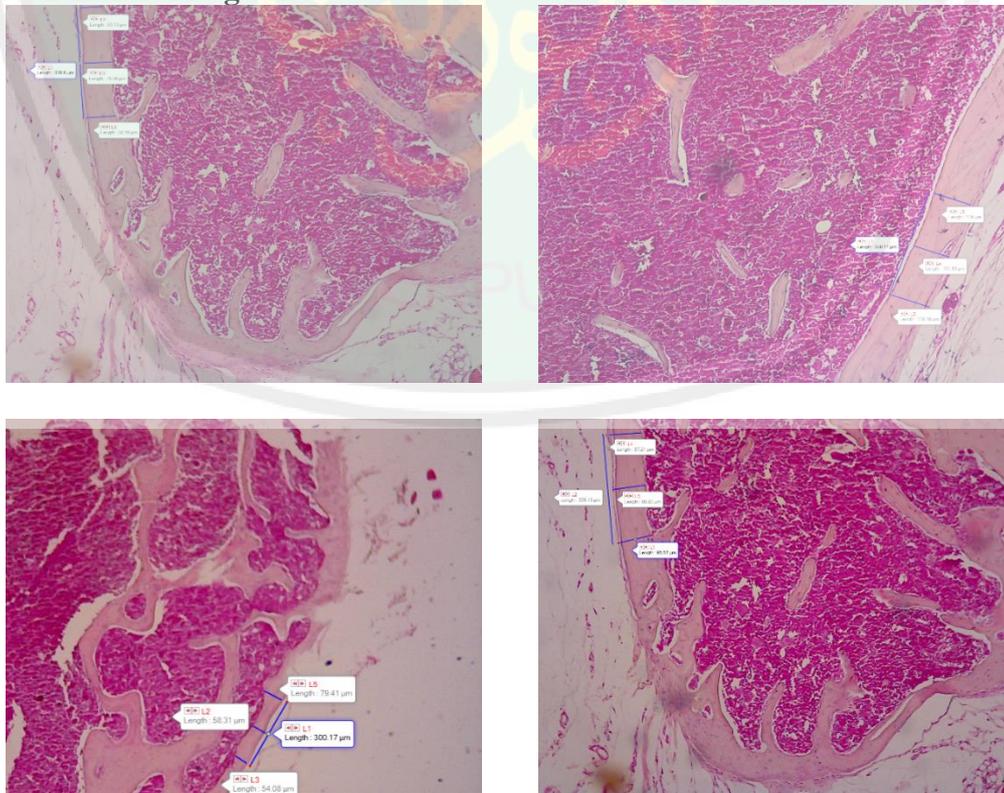
**L.3.2 Pengamatan pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm**



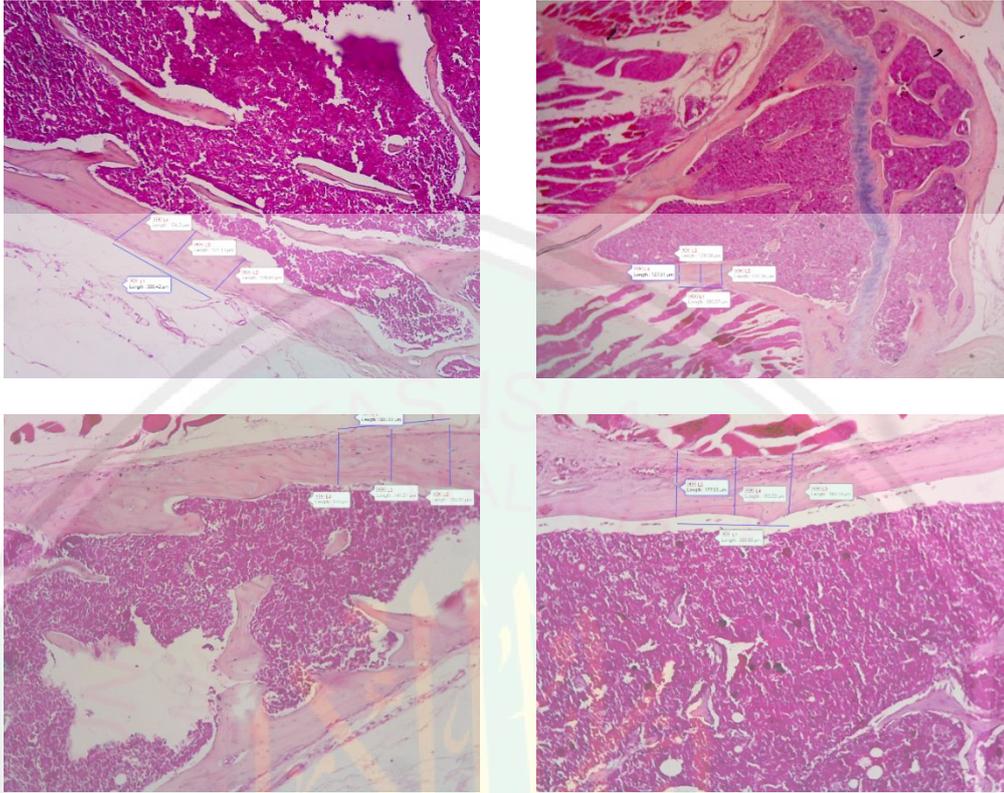
### Lampiran 4. Hasil Pengukuran Histomorfometri L.4.1 Kontrol Positif



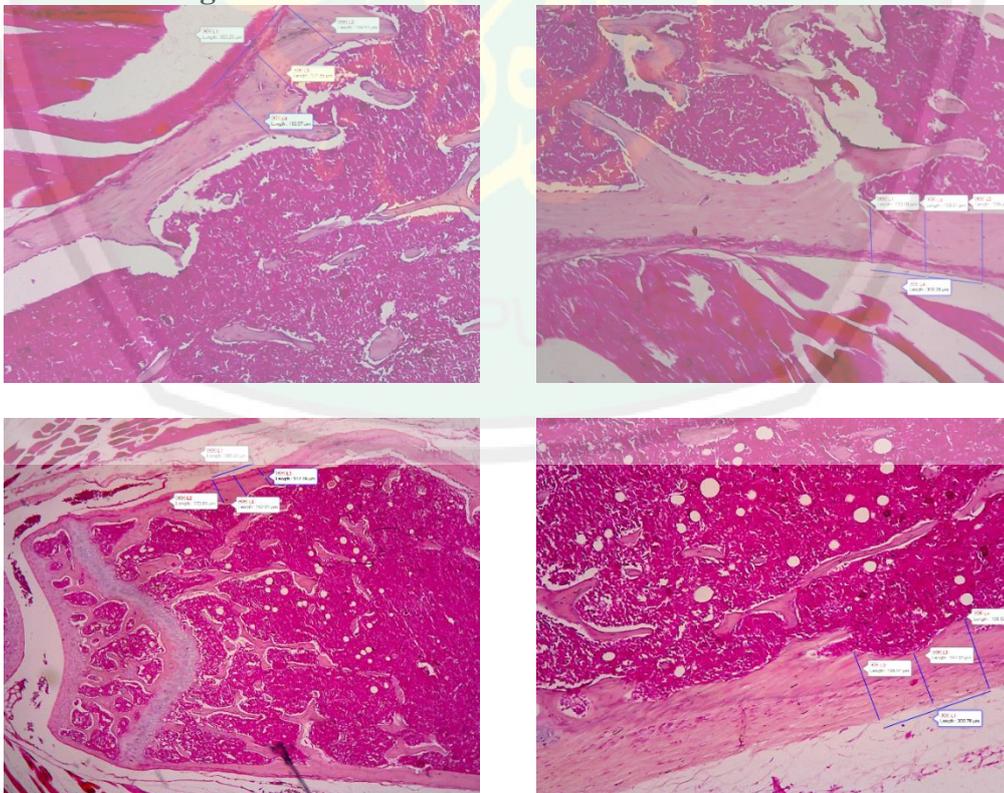
### L.4.2 Kontrol Negatif



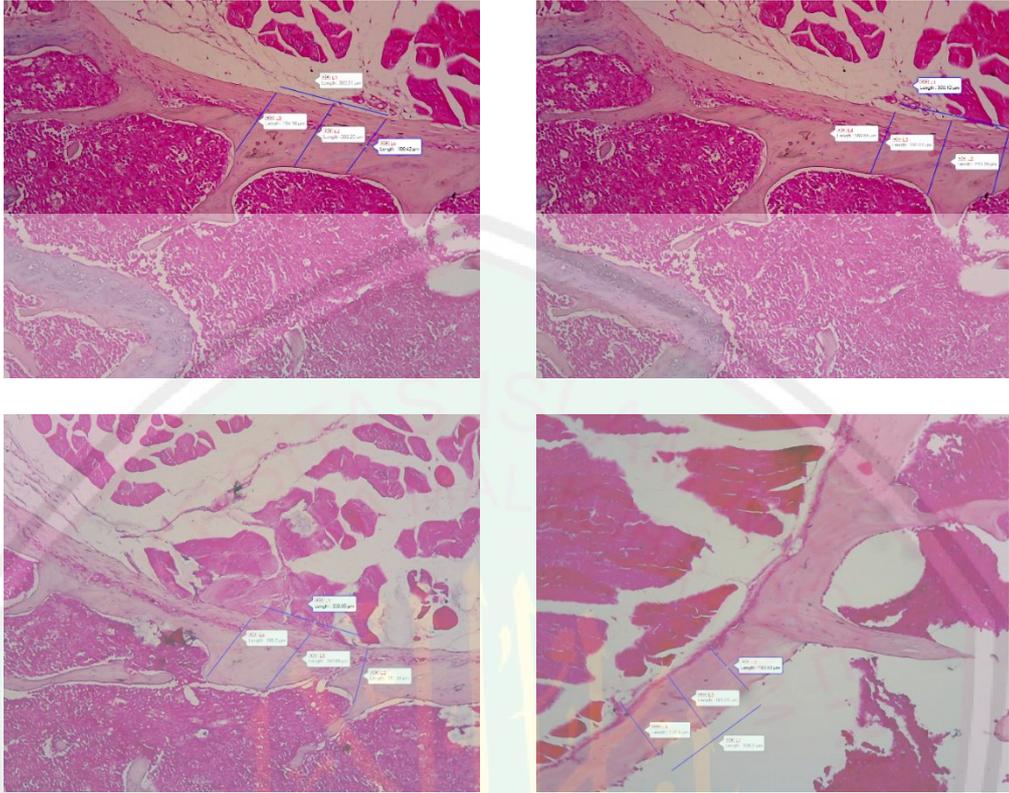
**L.4.3 Dosis 2 mg ekstrak etanol 96% daun *C. cainito***



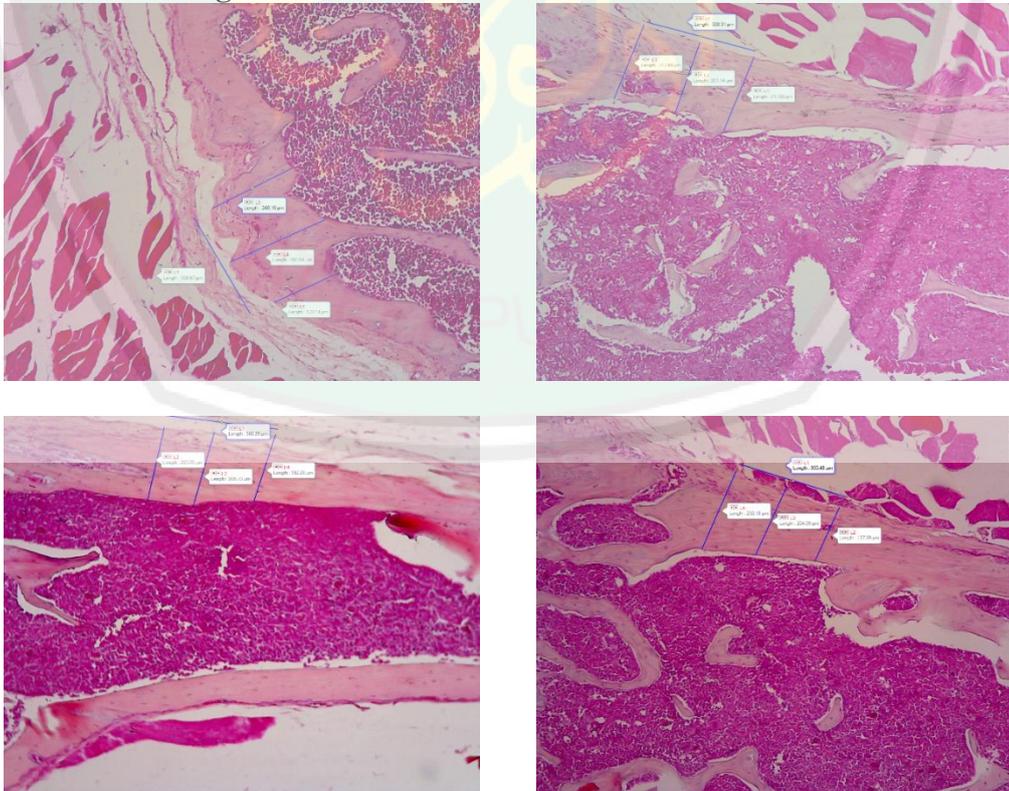
**L.4.4 Dosis 4 mg ekstrak etanol 96% daun *C. cainito***



**L.4.5 Dosis 8 mg ekstrak etanol 96% daun *C. cainito***



**L.4.6 Dosis 16 mg ekstrak etanol 96% daun *C. cainito***



#### L.4.7 Data ketebalan tulang trabekular femur tiap kelompok dalam satuan $\mu\text{m}$

Replikasi	Kelompok 1				Kelompok 2				Kelompok 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	179.55	146.01	160.00	155.32	75.06	58.31	108.16	86.83	129.38	140.00	177.03	120.97
2	154.72	131.00	146.01	147.57	80.16	54.08	105.00	95.57	141.39	141.01	163.44	121.17
3	161.94	155.00	152.01	147.57	63.13	79.41	101.83	87.21	127.51	164.01	155.03	134.20
Total	496.21	432.01	458.02	450.46	218.35	191.80	314.99	269.61	398.28	445.02	495.50	376.34
Rata-rata	165.40	144.00	152.67	150.15	72.78	63.93	105.00	89.87	132.76	148.34	165.17	125.45
Rata2 Total	153.06				82.90				142.93			
Nilai SD	9.00				18.25				17.63			

Replikasi	Kelompok 4				Kelompok 5				Kelompok 6			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	153.08	147.79	196.51	131.55	194.16	192.09	163.53	213.15	173.14	217.08	192.28	230.18
2	158.01	173.91	144.31	159.67	180.42	151.34	181.01	169.54	280.64	201.14	203.05	204.09
3	189.00	162.61	198.92	132.97	202.25	199.20	171.60	180.87	240.16	217.64	206.73	157.99
Total	500.09	484.31	539.74	424.19	576.83	542.63	516.14	563.56	693.94	635.86	602.06	592.26
Rata-rata	166.70	161.44	179.91	141.40	192.28	180.88	172.05	187.85	231.31	211.95	200.69	197.42
Rata2 Total	162.36				183.26				210.34			
Nilai SD	15.99				8.83				15.30			

Keterangan:

Kelompok 1: Kontrol positif dengan terapi alendronate

Kelompok 2: Kontrol negatif tanpa perlakuan

Kelompok 3: Terapi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 2 mg

Kelompok 4: Terapi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 4 mg

Kelompok 5: Terapi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 8 mg

Kelompok 6: Terapi ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* 16 mg

## Lampiran 5. Hasil Analisis Data

### L.5.1 Uji normalitas

#### Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kepadatan Tulang	Kontrol Positif	.267	4	.942	4	.665
	Kontrol Negatif	.210	4	.966	4	.816
	Dosis 2 mg	.218	4	.958	4	.764
	Dosis 4 mg	.224	4	.976	4	.879
	Dosis 8 mg	.198	4	.970	4	.845
	Dosis 16 mg	.236	4	.902	4	.439

a. Lilliefors Significance Correction

### L.5.2 Uji homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variance

Kepadatan Tulang		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Kepadatan Tulang	Based on Mean	.929	5	18	.485
	Based on Median	.837	5	18	.541
	Based on Median and with adjusted df	.837	5	14.853	.544
	Based on trimmed mean	.936	5	18	.482

### L.5.3 Uji ANOVA *One-way* (p=0,05)

#### ANOVA

Kepadatan Tulang					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37040.255	5	7408.051	34.377	.000
Within Groups	3878.846	18	215.491		
Total	40919.101	23			

### L.5.4 Uji Least Significant Difference (LSD)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kepadatan Tulang

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	70.16000*	10.38006	.000	48.3523	91.9677
	Dosis 2 mg	10.12500	10.38006	.342	-11.6827	31.9327
	Dosis 4 mg	-9.26750	10.38006	.384	-31.0752	12.5402
	Dosis 8 mg	-30.20833*	10.38006	.009	-52.0160	-8.4006
	Dosis 16 mg	-57.28833*	10.38006	.000	-79.0960	-35.4806
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-70.16000*	10.38006	.000	-91.9677	-48.3523
	Dosis 2 mg	-60.03500*	10.38006	.000	-81.8427	-38.2273
	Dosis 4 mg	-79.42750*	10.38006	.000	-101.2352	-57.6198
	Dosis 8 mg	-100.36833*	10.38006	.000	-122.1760	-78.5606
	Dosis 16 mg	-127.44833*	10.38006	.000	-149.2560	-105.6406
Dosis 2 mg	Kontrol Positif	-10.12500	10.38006	.342	-31.9327	11.6827
	Kontrol Negatif	60.03500*	10.38006	.000	38.2273	81.8427
	Dosis 4 mg	-19.39250	10.38006	.078	-41.2002	2.4152
	Dosis 8 mg	-40.33333*	10.38006	.001	-62.1410	-18.5256
	Dosis 16 mg	-67.41333*	10.38006	.000	-89.2210	-45.6056
Dosis 4 mg	Kontrol Positif	9.26750	10.38006	.384	-12.5402	31.0752
	Kontrol Negatif	79.42750*	10.38006	.000	57.6198	101.2352
	Dosis 2 mg	19.39250	10.38006	.078	-2.4152	41.2002
	Dosis 8 mg	-20.94083	10.38006	.059	-42.7485	.8669
	Dosis 16 mg	-48.02083*	10.38006	.000	-69.8285	-26.2131
Dosis 8 mg	Kontrol Positif	30.20833*	10.38006	.009	8.4006	52.0160
	Kontrol Negatif	100.36833*	10.38006	.000	78.5606	122.1760
	Dosis 2 mg	40.33333*	10.38006	.001	18.5256	62.1410
	Dosis 4 mg	20.94083	10.38006	.059	-.8669	42.7485
	Dosis 16 mg	-27.08000*	10.38006	.018	-48.8877	-5.2723
Dosis 16 mg	Kontrol Positif	57.28833*	10.38006	.000	35.4806	79.0960
	Kontrol Negatif	127.44833*	10.38006	.000	105.6406	149.2560
	Dosis 2 mg	67.41333*	10.38006	.000	45.6056	89.2210
	Dosis 4 mg	48.02083*	10.38006	.000	26.2131	69.8285
	Dosis 8 mg	27.08000*	10.38006	.018	5.2723	48.8877

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

### L.5.6 Uji Analisis Probit (ED<sub>50</sub>)

	Confidence Limits						
	Probability	95% Confidence Limits for Dosis Ekstrak C. cainito			95% Confidence Limits for log(Dosis Ekstrak C. cainito) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT <sup>a</sup>	.010	4.361	.	.	.640	.	.
	.020	4.677	.	.	.670	.	.
	.030	4.898	.	.	.689	.	.
	.040	5.054	.	.	.704	.	.
	.050	5.193	.	.	.715	.	.
	.060	5.314	.	.	.725	.	.
	.070	5.423	.	.	.734	.	.
	.080	5.522	.	.	.742	.	.
	.090	5.614	.	.	.749	.	.
	.100	5.700	.	.	.756	.	.
	.150	6.069	.	.	.783	.	.
	.200	6.380	.	.	.805	.	.
	.250	6.659	.	.	.823	.	.
	.300	6.920	.	.	.840	.	.
	.350	7.171	.	.	.856	.	.
	.400	7.417	.	.	.870	.	.
	.450	7.664	.	.	.884	.	.
	.500	7.915	.	.	.898	.	.
	.550	8.174	.	.	.912	.	.
	.600	8.445	.	.	.927	.	.
	.650	8.736	.	.	.941	.	.
	.700	9.053	.	.	.957	.	.
	.750	9.408	.	.	.973	.	.
	.800	9.819	.	.	.992	.	.
	.850	10.322	.	.	1.014	.	.
	.900	10.991	.	.	1.041	.	.
	.910	11.159	.	.	1.048	.	.
	.920	11.344	.	.	1.055	.	.
	.930	11.552	.	.	1.063	.	.
	.940	11.788	.	.	1.071	.	.
	.950	12.063	.	.	1.081	.	.
	.960	12.394	.	.	1.093	.	.
	.970	12.814	.	.	1.108	.	.
	.980	13.395	.	.	1.127	.	.
	.990	14.364	.	.	1.157	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

## Lampiran 6. Hasil Perhitungan

### L.6.1 Perhitungan rendemen

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{3,71 \text{ gram}}{30 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 12,37 \% \end{aligned}$$

### L.6.2 Perhitungan dosis deksametason

- Dosis deksametason untuk manusia (70 kg) = 1,125 mg/hari (Laswati, 2015)
- Dosis deksametason untuk mencit (20 g) =  $1,125 \times 0,0026$   
= 0,0029 mg/20g BB mencit/hari
- Berat deksametason yang digunakan =  $0,0029 \text{ mg} \times 30 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari}$   
= 2,436 mg
- Dibuat dalam 100 ml =  $\frac{0,0029 \text{ mg}}{2,436 \text{ mg}} \times 100 \text{ ml}$   
= 0,12 ml/hari

### L.6.3 Perhitungan dosis alendronat

- Dosis alendronat untuk manusia (70 kg) = 10 mg/hari (Ferguson, 2004)
- Dosis alendronat untuk mencit (20 g) =  $10 \times 0,0026$   
= 0,026 mg/20g BB mencit/hari
- Berat alendronat yang digunakan =  $0,026 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari}$   
= 3,64 mg
- Dibuat dalam 100 ml =  $\frac{0,026 \text{ mg}}{3,64 \text{ mg}} \times 50 \text{ ml}$   
= 0,36 ml/hari

### L.6.4 Perhitungan dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito*

Perhitungan dosis yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya dilakukan oleh Laswati, dkk (2015) yaitu, dosis ekstrak etanol *spilanthès acmella* 4,14 mg/20 g BB yang telah memberikan efek pada peningkatan jumlah sel osteoblas. Pada penelitian Utamingtyas (2017) dinyatakan bahwa dosis ekstrak etanol 70% daun *C. cainito* 8 mg/20 g BB yang telah meningkatkan kepadatan

tulang trabekular vertebra pada mencit betinya yang diinduksi deksametason. Sehingga perhitungan dosis ekstrak etanol 96% daun *C. cainito* sebagai berikut:

$$\begin{aligned} 1) \text{ Dosis 1} &= 2 \text{ mg}/20\text{g BB} \\ \text{Berat ekstrak yang digunakan} &= 2 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 280 \text{ mg} \\ \text{Dibuat dalam 50 ml} &= \frac{2 \text{ mg}}{280 \text{ mg}} \times 50 \text{ ml} \\ &= 0,36 \text{ ml/hari} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2) \text{ Dosis 2} & \\ \text{Berat ekstrak yang digunakan} &= 4 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 560 \text{ mg} \\ \text{Dibuat dalam 50 ml} &= \frac{4 \text{ mg}}{560 \text{ mg}} \times 50 \text{ ml} \\ &= 0,36 \text{ ml/hari} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3) \text{ Dosis 3} & \\ \text{Berat ekstrak yang digunakan} &= 8 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 1120 \text{ mg} \\ \text{Dibuat dalam 50 ml} &= \frac{8 \text{ mg}}{1120 \text{ mg}} \times 50 \text{ ml} \\ &= 0,36 \text{ ml/hari} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 4) \text{ Dosis 4} & \\ \text{Berat ekstrak yang digunakan} &= 16 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} \times 28 \text{ hari} \\ &= 2240 \text{ mg} \\ \text{Dibuat dalam 50 ml} &= \frac{16 \text{ mg}}{2240 \text{ mg}} \times 50 \text{ ml} \\ &= 0,36 \text{ ml/hari} \end{aligned}$$

Jadi, jumlah ekstrak etanol 96% *C. cainito* yang diperlukan untuk induksi, yaitu sebanyak 4200 mg

## Lampiran 7. Surat Keterangan Kelaikan Etik

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

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

Judul Aktifitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* Presl. Dan *Chrysophyllum cainito* L. Terhadap Jumlah Sel Osteoblast dan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit

Sub Judul Aktifitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* Presl. Dan *Chrysophyllum cainito* 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.

Malang, 07 SEP 2018  
Ketua

Mengetahui,  
Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang



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 8: Prosedur Pengerjaan Preparat Histopatologi

### PROSEDUR Pengerjaan PREPARAT HISTO PATOLOGI

#### I. PROSES PEMOTONGAN JARINGAN BERUPA MAKROSS

1. Jaringan atau Spesimen Penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan bafer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
4. Di masukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual
6. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit
7. Alarm bunyi tanda selesai.

#### II. PROSES PENGEBLOKAN & PEMOTONGAN JARINGAN

1. Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron

#### III. PROSES DEPARAFINISASI

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron , di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 drajat , kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit

**IV. PROSES PEWARNAAN ( HE )**

- |   |                              |
|---|------------------------------|
| 1. Cat utama Harris Hematoksilin selama | 10-15 Menit                  |
| 2. Cuci dengan air mengalir selama      | 15 Menit                     |
| 3. Alkohol asam 1 %                     | 2-5 Celup                    |
| 4. Amonia lithium karbonat              | 3-5 Celup (bila kurang biru) |
| 5. Eosin                                | 10-15 Menit                  |

**V. Alkohol bertingkat :**

- Alkohol 70% 3 menit
- Alkohol 80% 3 menit
- Alkohol 96% 3 menit
- Alkohol Absolut 3 menit

**VI. Penjernihan (Clearring) :**

- Xylol 15 menit
- Xylol 15 menit

**VII. Mounting dengan entelan dan deckglass.**

- Slide / objekglass ditutup dengan cover glass dan biarkan slide kering pada suhu ruangan Setelah slide kering siap untuk diamati

Malang, 12 Januari 2017  
Kepala Laboratorium Patologi Anatomi  
Fak. Kedokteran Univ. Brawijaya



dr. Eviana Norahmawati, SpPA (K)

NIP. 19691028 199702 2 001

## Lampiran 9: Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian



(1)  
Tanaman *C. cainito*



(2)  
Simplisia serbuk halus daun *C. cainito*



(3)  
Uji kadar air simplisia daun *C. cainito*



(4)  
Penimbangan simplisia daun *C. cainito*



(5)  
Proses ultrasonikasi simplisia daun *C. cainito*



(6)  
Proses penyaringan filtrate dan residu ekstrak daun *C. cainito*



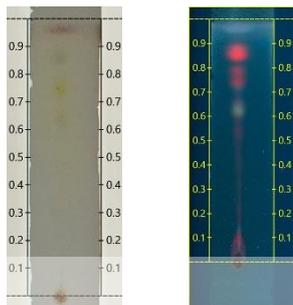
(7)  
Proses pemisahan pelarut dari ekstrak menggunakan *rotary evaporator*



(8)  
Proses pengovenan ekstrak daun *C. cainito*

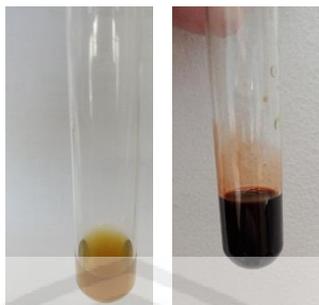


(9)  
Proses penimbangan ekstrak daun *C. cainito*



(10)

Proses skrining fitokimia dengan metode KLT dan TLC *Visualizer*



(11)

Proses skrining fitokimia uji Bate-Smith dan Metcalf dan Uji Salkowski



(12)

Proses pemberian perlakuan pada mencit jantan



(13)

Proses pembedahan mencit jantan dan pengambilan tulang femur



(14)

Proses pengawetan tulang dengan formalin 10%



(15)

Proses pembuatan preparat: (a) pemotongan tulang



(16)

Proses pembuatan preparat: (b) pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE)



(17)

Preparat histologi tulang femur mencit jantan yang sudah jadi



(18)

Pengukuran preparat histologi tulang trabekular femur mencit jantan