

**AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI N-BUTANOL
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl) SECARA
IN VITRO PADA SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh :

MU'AKIBATUL HASANAH

NIM. 15670011



PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI N-BUTANOL
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl) SECARA
IN VITRO PADA SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

**Diajukan kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Dalam Memperoleh Gelar Sarjana (S. Farm)**

**Oleh :
MU'AKIBATUL HASANAH
NIM. 15670011**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2019

**AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI N-BUTANOL
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl) SECARA *IN*
VITRO PADA SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh :

MU'AKIBATUL HASANAH

NIM. 15670011

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk diuji:

Tanggal: 7 Mei 2019

Dosen Pembimbing 1

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

Dosen Pembimbing II

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

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi**



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

**AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI N-BUTANOL
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl) SECARA *IN*
VITRO PADA SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh :

MU'AKIBATUL HASANAH

NIM. 15670011

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

Tanggal: 07 Mei 2019

Ketua Penguji : Weka Sidha Bhagawan, M. Farm., Apt (.....)
NIP. 199881124 20160801 1 085

Anggota Penguji 1. Burhan Ma'arif ZA., M. Farm., Apt. (.....)
NIP. 19900221 201801 1 001
2. drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. (.....)
NIP. 19850720 200912 1 003
3. Abdul Hakim, S.Si., M.PI., Apt. (.....)
NIP. 19761214 200912 1 002



**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Farmasi**

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

**PERNYATAAN
KEASLIAN PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Mu'akibatul Hasanah
NIM : 15670011
Fakultas/ Jurusan : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan/ Farmasi
Judul Penelitian : Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi N-Butanol Daun
Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl) Secara *In Vitro* Pada
Sel Mikroglia HMC3

Menyatakan dengan sebenar benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur unsur plagiarasi karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dari disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur unsur plagiarasi, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku

Malang, 07 Mei 2019
Yang Membuat Pernyataan,



Mu'akibatul Hasanah
NIM. 15670011

MOTTO

مَنْ خَرَجَ فِي طَلَبِ الْعِلْمِ فَهُوَ فِي سَبِيلِ اللَّهِ

“Barang siapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada di jalan Allah”



HALAMAN PERSEMBAHAN

Allhamdulillahirobbil'aalamin

Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT beserta shalawat dan salam kepada nabi Muhammad SAW sehingga bisa terselesaikannya skripsi ini. Disertai rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan tulisan karya sederhana ini kepada orang-orang yang selalu membantu penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Kedua orangtua, bapakku tercinta Muhammad Sutihar, ibuku tersayang Siti Aisyah yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan dari segala bentuk, semangat dan kasih sayang yang tak pernah putus sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik dan lancar. Kakak tercinta Mita danansari dan Mas Dendy Rio yang telah mendukung dan mendoakan selama ini. Serta akek dan mbah titi yang selalu ikut serta mendoakan untuk terselesainya skripsi ini.

Terima kasih saya ucapkan kepada Bu Choirunil Chotimah, M.Si dan Bu Helly Nurul Karima, M.P selaku laboran di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya yang telah memberikan motivasi dan pengarahan di laboratorium sehingga saya bisa menyelesaikan penelitian ini

Terimakasih tak terhingga kepada sahabat, teman-teman farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang terukhusus *Pharmajelly* angkatan 2015, *Big Family* Kelas A angkatan 2015, teman-teman proyek Fitoestrogen (Eka, Dila, Denis, Malik, Nanda, Menara dan Udin) yang telah memberikan semangat yang tak pantang menyerah dan warna selama menempuh penelitian ini, serta mak elis squads (wirda, dinda dan mbak piki) yang telah memberikan dukungan dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

Tak cukup kata-kata untuk menggambarkan perjuangan yang telah ditempuh, kecuali rasa syukur yang penulis panjatkan kepada Allah SWT. Semoga senantiasa dipertemukan dalam kebaikan. Selamat dan sukses untuk teman-teman.

Kepada semua pihak yang telah membantu terselesainya skripsi ini, Terima Kasih.

KATA PENGANTAR

Assalamu’alaikum Wr. Wb.

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmat, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S. Farm). Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada nabi besar Muhammad SAW bagi keluarga, sahabat serta pengikutnya. Penulis menyadari bahwa telah banyak pihak yang telah berpartisipasi dalam penyelesaian penulisan proposal skripsi ini, iringan doa dan ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp. B., Sp. BP (RE-K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Roihatul Muti’ah, M. Kes., Apt. selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Burhan Maarif ZA, M. Farm., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, bimbingan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.
5. drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, bimbingan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.
6. Dr. Roihatul Muti’ah, M. Kes., Apt. selaku dosen wali yang telah memberikan saran dan motivasi kepada penulis.
7. Choirunil Chotimah, M. Si, Helly Nurul Karima, M P serta staf maupun laboran Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya yang telah memberikan pengalaman dan arahan kepada penulis.

8. Segenap sivitas akademika Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang terutama dosen serta staf Jurusan Farmasi yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
9. Keluargaku Bapak Muhammad Sutihar dan Ibu Siti Aisyah, Mbak Mita Danansari dan Mas Dendy Rio serta akek dan mbah titi atas doa dan dukungan kepada penulis.
10. Teman teman Fitoestrogen UIN 2015 Eka, Dila, Denis, Malik, Nanda, Menara dan Udin. Serta tidak lupa kakak-kakak Fitoestrogen UIN 2014 atas pengalaman serta motivasinya kepada penulis.
11. Teman temanku dari *PHARMAJELLY*, *Big Family* yang tak bisa disebutkan satu persatu, serta Mak elis Squads (Wirda, Dinda dan mbak Piki).
12. Serta semua pihak yang berpartisipasi dan membantu dalam menyelesaikan skripsi baik berupa moril maupun materiil.

Penulis tidak dapat membalas semua selain melantunkan doa tulus dan ikhlas semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih baik. Semoga skripsi yang masih memerlukan penyempurnaan ini dapat memberikan manfaat serta menambah hasanah ilmu pengetahuan pembaca. Amin...

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 07 Mei 2019
Penulis

Mu'akibatul Hasanah
15670011

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGAJUAN	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	
PENELITIAN MOTTO	
HALAMAN PERSEMBAHAN	
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	ix
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
مستخلص البحث.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.5 Batasan Masalah.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tanaman (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl)	10
2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi	10
2.1.2 Habitus dan Morfologi	11
2.1.3 Kandungan dan Manfaat.....	11
2.2 Tinjauan Metode Ekstraksi.....	12
2.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi	13
2.3 Tinjauan tentang Ekstrak.....	19

2.4 Tinjauan tentang Fraksinasi Cair-cair	20
2.5 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	21
2.6 Tinjauan tentang Flavonoid.....	22
2.7 Tinjauan tentang Pascamenopause.....	24
2.8 Tinjauan Tentang Mekanisme Estrogen.....	25
2.9 Tinjauan Tentang Neuroglia dan Mikroglia.....	29
2.10 Tinjauan Tentang sel mikroglia HMC3	32
2.11 Tinjauan tentang Interferon- γ (IFN- γ).....	33
2.12 Tinjauan tentang Neurodegeneratif	34
2.13 Tinjauan tentang Neuroinflamasi	35
2.14 Tinjauan tentang Fitosetrogen	35
2.15 Tinjauan tentang <i>Immunocytochemistry</i>	37
2.16 Tinjauan tentang MHC II	38
2.17 Tinjauan tentang Confocal Laser Scanning Microscopy	39
2.18 Tinjauan Uji Statistik Inferensial	40

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Skema Kerangka Konseptual	42
3.2. Uraian Kerangka Konseptual dan Hipotesis	43
3.2.1. Uraian Kerangka Konseptual.....	43
3.2.2. Hipotesis Penelitian	46

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	47
4.1.1. Jenis Penelitian	47
4.1.2. Rancangan Penelitian.....	47
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian	47
4.3. Sampel Penelitian.....	48
4.3.1. Sampel Tanaman	48
4.3.2. Sampel Sel	48
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	48
4.4.1. Variabel Penelitian	48
4.4.2. Definisi Operasional	49
4.5. Alat dan Bahan	50
4.5.1 Alat	50
4.5.2 Bahan	51
4.6. Prosedur Penelitian.....	52
4.6.1 Determinasi Tanaman.....	52
4.6.2 Preparasi Sampel	52
4.6.3 Analisis Kadar Air Simplisia <i>M.crenata</i>	53
4.6.4 Prosedur Ekstraksi	54
4.6.5 Prosedur Fraksinasi.....	54
4.6.6 Kultur Sel HMC3.....	55
4.6.7 Pembuatan Sampel.....	56
4.6.8 Uji Aktivitas dengan Menggunakan metode <i>Immunocytochemistry</i>	56

4.7 Analisis Data	57
4.8 Skema Alur Penelitian.....	60

BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman dan Preparasi Sampel.....	61
5.2 Analisis Kadar Air Simplisia <i>M. crenata</i>	62
5.3 Prosedur Ekstraksi	63
5.4 Prosedur Fraksinasi	65
5.5 Identifikasi senyawa dengan KLT.....	68
5.6 Kultur Sel HMC3	71
5.7 Uji Aktivitas Antineuroinflamasi metode <i>Immunocytochemistry</i>	72
5.8 Analisis Data Fluoresensi MHC II	80
5.9 Mekanisme aktivitas fitoestrogen antineuroinflamasi fraksi n-Butanol daun <i>M.crenata</i>	86
5.10 Aktivitas Antineuroinflamasi fraksi n-Butanol daun <i>M. crenata</i> dalam Perspektif Islam	91

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan.....	96
6.2 Saran.....	96

DAFTAR PUSTAKA.....	97
----------------------------	-----------

LAMPIRAN-LAMPIRAN	112
--------------------------------	------------

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Marsilea crenata</i> C. Presl.....	11
Gambar 2.2 Proses mekanisme ekstraksi UAE	18
Gambar 2.3 Proses terjadinya ekstraksi menggunakan metode UAE	19
Gambar 2.4 Struktur dasar Flavonoid	23
Gambar 2.5 Penggolongan Flavonoid	24
Gambar 2.6 Struktur estron, 17 β -estradiol dan estriol	26
Gambar 2.7 Mekanisme jalur pensinyalan estrogen di otak.....	29
Gambar 2.8 Hubungan Neuron dengan Neuroglia.....	30
Gambar 2.9 Pengamatan SEM dan pengamatan CLSM	40
Gambar 2.10 Diagram CLSM	40
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual.....	42
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian.....	60
Gambar 5.1 hasil ekstrak kental etanol 96% daun <i>M.crenata</i>	65
Gambar 5.2 Proses Fraksinasi n-Butanol dalam corong pisah.....	66
Gambar 5.3 Fraksi n-Butanol	68
Gambar 5.4 Visualisasi Identifikasi senyawa dengan <i>TLC Visualizer</i>	70
Gambar 5.5 Gambar sel HMC 3 yang telah konfluen 70-85%	72
Gambar 5.6 Plating fraksi n-Butanol.....	73
Gambar 5.7 Intensitas Fluoresensi MHC II.....	77
Gambar 5.8 Intensitas MHC II pada Fraksi n-Butanol daun <i>M.crenata</i>	79
Gambar 5.9 Sel HMC3 setelah pemberian IFN- γ dan fraksi n-Butanol.....	87
Gambar 5.10 Mekanisme penghambatan aktivasi NF-kB oleh ER teraktivasi	90

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Jumlah Daun <i>M.crenata</i>	61
Tabel 5.2 Nilai kadar air serbuk simplisia kering herba <i>M.crenata</i>	62
Tabel 5.3 Tabel berat ekstrak, fraksi dan % rendemen fraksi n-Butanol <i>M.crenata</i>	68
Tabel 5.4 Rincian Profil KLT fraksi n-Butanol daun <i>M. crenata</i>	70
Tabel 5.5 Intensitas fluoresensi MHC II pada Fraksi n-Butanol.....	78
Tabel 5.6 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	80
Tabel 5.7 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's test</i>	81
Tabel 5.8 Uji Korelasi <i>Spearman Rank</i>	82
Tabel 5.9 Hasil Uji Beda <i>Kruskal-Wallis test</i>	83
Tabel 5.10 Hasil Uji <i>Least Significant Difference (LSD)</i>	84
Tabel 5.11 Hasil Uji Chi-Square	85
Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas Uji <i>Chi-Square</i>	86

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Determinasi Tanaman <i>M. crenata</i>	112
Lampiran 2 Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Serbuk Simplisia Daun <i>M. crenata</i>	113
Lampiran 3 Hasil Perlakuan Uji Aktivitas metode ICC.....	116
Lampiran 4 Perhitungan dan Preparasi Sampel	119
Lampiran 5 Hasil Analisis Data	122
Lampiran 6 Dokumentasi Alat dan Penelitian	126

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

%	: Persen
°	: Derajat
$\leq$	: Kurang dari sama dengan
$\geq$	: Lebih dari sama dengan
<	: Kurang dari
>	: Lebih dari
α	: Alfa
β	: Beta
κ	: Kappa
C	: Celcius
ng	: nanogram
mg	: milligram
μ g	: mikrogram
nM	: nanoMolar
μ l	: Mikroliter
ml	: Mililiter
g	: Gram
k (+)	: Kontrol Positif
k (-)	: Kontrol Negatif
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
CLSM	: <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
ED ₅₀	: <i>Effective Dose 50</i>
TSH	: Terapi Sulih Hormon
UAE	: <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
TLC	: Thin Layer Chromatography
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>

TLR : *Toll Like Receptor*
HMC 3: Human Microglial Cell 3
MHC II: *Major Histocompatibility Complex II*
APC : Antigen Presenting Cell
ER : *Estrogen Receptor*
IFN- γ : Interferon- γ
IL : Interleukin
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*
ATCC : *American Type Culture Collection*
LSIH : Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
EMEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*
FBS : Fetal Bovine Serum
PBS : *Phosphate Buffer Saline*
DMSO: *Dimethyl Sulfoxide*
PFA : *Paraformaldehyde*
BSA : *Bovine Serum Albumin*
FITC : *fluorescein isothiocyanate*
CO₂ : Karbon dioksida

ABSTRAK

Hasanah, Mu'akibatul. 2019. **Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi n-Butanol Daun Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl) Secara *In Vitro* Pada Sel Mikroglia HMC3.** Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Burhan Ma'arif ZA., M.Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Penguji : Weka Sidha Bhagawan, M. Farm., Apt.

Defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya neuroinflamasi karena aktivasi patologi dari sel mikroglia, hal itu menjadi faktor penyebab terjadinya penyakit neurodegeneratif. Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur atau fungsi yang sama seperti estrogen. Daun *Marsilea crenata* C. Presl. diduga mengandung senyawa fitoestrogen yang dapat menggantikan estrogen dalam tubuh. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dan ED₅₀ dari fraksi n-Butanol daun *M.crenata* dalam menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3. Uji aktivitas dilakukan dengan pemberian fraksi n-Butanol daun *M. crenata* dengan dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm terhadap sel HMC3 yang diinduksi IFN- γ selama 24 jam sebagai induktor inflamasi dan pemberian genistein 50mM sebagai kontrol positif. Analisis pengamatan intensitas fluoresensi MHC II menggunakan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM. Analisis statistik menggunakan uji korelasi *spearman rho* memiliki korelasi yang sedang, ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi 0,562 dan uji beda *Kruskal-wallis* menunjukkan nilai signifikansi 0,012 ($p < 0,050$), maka terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok perlakuan. Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok perlakuan dosis terhadap kontrol negatif dengan nilai $p < 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dosis fraksi n-Butanol daun *M. crenata* dapat menurunkan intensitas fluoresensi MHC II dan nilai ED₅₀ yang didapatkan 2,205 ppm. Dari hasil penelitian tersebut, fraksi n-Butanol daun *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi dalam menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 pada dosis 250 ppm.

Kata-kata kunci: Fitoestrogen, *Marsilea crenata* C. Presl, Antineuroinflamasi, MHC II, HMC3.

ABSTRACT

Hasanah, Mu'akibatul. 2019. Activity of Antineuroinflammation n-Butanol Fraction Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl) *In Vitro* on HMC3 Microglia Cells. Essay. Department of Pharmacy. Faculty of Medicine and Health Sciences. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Mentor: (I) Burhan Ma'arif ZA., M.Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Examiner : Weka Sidha Bhagawan, M. Farm., Apt.

Estrogen deficiency causes neuroinflammation due to pathological activation of microglia cells, it can be a factor causing neurodegenerative disease. Phytoestrogens are compounds that have the same structure or function as estrogen. Leaves of *Marsilea crenata* C. Presl. thought to contain phytoestrogen compounds that can replace estrogen in the body. The purpose of this research was to know the activity and ED₅₀ of n-Butanol fraction of *M.crenata* leaves to reducing MHC II fluorescence intensity in HMC3 microglia cells. An activity test was carried out by giving n-Butanol fraction of *M. crenata* leaves at a dose of 62.5 ppm, 125 ppm and 250 ppm to HMC3 cells that had been induced by IFN- γ for 24 hours as an inflammatory inductor and administration of genistein 50mM as a positive control. Analysis of MHC II fluorescence intensity were observed using the ICC method with CLSM instrument. Statistical analysis using the *Spearman Rho* correlation test has a moderate correlation, indicated by a correlation coefficient of 0.562 and *Kruskal-wallis* difference test showing a significance value of 0.012 ($p < 0.05$), then there are significant differences in all treatment groups. The results of the LSD test showed that there were significant differences in all treatment groups with negative controls ($p < 0.05$). The results showed that the dose of n-Butanol fraction of *M. crenata* leaves can reduce the intensity of MHC II fluorescence and ED₅₀ values obtained 2.205 ppm. From the results of these research, the n-Butanol fraction of *M. crenata* leaves has antineuroinflammation activity in reducing MHC II fluorescence intensity in HMC3 microglia cells at a dose of 250 ppm.

Key words: Phytoestrogen, *Marsilea crenata* C. Presl, Antineuroinflammation, MHC II, HMC3.

مستخلص البحث

الحسنة، معقبة. 2019. نشاط مضادة التهاب الدماغ للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية (*Marsilea crenata C. Presl*) خارج الحويوة (*In Vitro*) في الخلية الدبقية الصغيرة HMC3. البحث الجامعي، قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: عارف سورباديناتا. المخبر: ويكا سيدا بغاوان الماجستير. الكلمات الرئيسية: الفيتواستروجين، السراخس المائية، مضادة التهاب الدماغ، من مجمع التوافق النسيجي الثاني، و الخلية الدبقية الصغيرة.

يؤدي نقص الاستروجين إلى حدوث التهاب الدماغ بسبب التنشيط المرضي للخلايا الصغيرة، بحيث يمكن أن يكون عاملاً مسبباً من حدوث أمراض التنكس العصبي (*neurodegeneratif*). تعتبر الفيتواستروجين (*Fitoestrogen*) مركب له وظيفة أو بنية مثل الاستروجين. تظن أن ورقة السراخس المائية (*Marsilea Crenata C. Presl*) تحتوي على مركب الفيتواستروجين الذي يمكن أن تحل محل الاستروجين في الجسم. والهدف من هذا البحث هو معرفة نشاط و الجرعة الفعالة (ED_{50}) للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية لتخفيض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) في الخلية الدبقية الصغيرة HMC3. تم اختبار النشاط من خلال إعطاء الجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية بالجرعات التالية: 62.5 فغم، 125 فغم و 250 فغم على الخلية الدبقية الصغيرة HMC3 بعد خلطها مع الإنترفيرون γ لمدة 24 ساعة كمقياس للالتهابات وإعطاء جينيسيتين 50 كعامل التحكم الإيجابي. تحليل كثافة الفلورية من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) باستخدام طريقة الكيمياء النسيجية المناعية (*Immunocytochemistry*) بمساعدة أداة مجهر ليزر ماسح (CLSM). التحليل الإحصائي باستخدام الاختبار الارتباطي لسيفرمان (*spearman rho*) وبالارتباط المعتدل مما تدل عليه درجة الارتباط المبينة 0.562 واختبار الخلاف لكروشكال-واليس (*Kruskal-wallis*) مما أظهر درجة الأهمية 0.012 ($F > 0.050$)، فتعني أن هناك اختلاف كبير في جميع المجموعات العلاجية. وأظهرت نتائج اختبار ثنائي إيثيل أميد حمض الليسرجيك (LSD) وجود اختلاف كبير في كل المجموعة العلاجية بالجرعات المختلفة على عامل التحكم السلبي بالدرجة $F > 0.050$. وأشارت نتائج هذا البحث إلى أن إعطاء جرعات للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية يخفض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) والدرجة من الجرعة الفعالة (ED_{50}) المحسولة منها هي 2.205 فغم، حيث أن الجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية له نشاط كمضادة التهاب الدماغ في تخفيض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) في الخلية الدبقية الصغيرة HMC3 بالجرعة 250 فغم.

الكلمات المفتاحية: فيتويستروغنز، *Marsilea crenata C. Presl*، التهاب مضادات الالتهاب، MHC II، HMC3

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah Negara kepulauan yang memiliki Luas sekitar 1,3% dari luas bumi, Namun memiliki tingkat keberagaman kehidupan yang sangat tinggi termasuk flora dan faunanya (Kusmana dan Hikmat, 2015). Persebaran flora yang tumbuh di Indonesia mencapai 30 ribu dari 40 ribu jenis flora yang tumbuh di dunia (Syukur dan hernani, 2001). Indonesia merupakan urutan negara terbesar ketujuh dengan jumlah spesies mencapai 20.000 spesies dan 40% merupakan tumbuhan endemik Indonesia (Kusmana dan Hikmat, 2015). Potensi tumbuhan di Indonesia merupakan suatu berkah dari Allah SWT yang harus dikembangkan dalam bidang ekonomi, kesehatan maupun dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Seperti dalam Al-Qur'an Allah SWT berfirman dalam surah An-Nahl (16) ayat 11 sebagai berikut:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي
ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya:” Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman, zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang

demikian demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.”

Berdasarkan ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan hujan untuk menumbuhkan tanaman-tanaman yang indah dan berbagai buah-buahan yang memiliki beraneka bentuk, bau, rasa dan warna. Diantaranya memiliki manfaat untuk makanan dan ada pula sebagai obat-obatan. Semua itu tidak dapat diketahui kecuali oleh orang-orang berilmu dan yang memikirkannya (Shihab, 2002). Menurut Quthb (2008) dalam tafsir *Fi Zhilalil Qur'an* tumbuhan itu mulia dengan segala kehidupan yang ada di dalamnya yang bersumber dari Allah SWT. Ungkapan ini mengisyaratkan kepada manusia untuk memuliakan dan menjaga ciptaan Allah SWT yaitu dengan terus melakukan perkembangan-perkembangan dalam penelitian-penelitian yang berkaitan dengan pemanfaatan dan khasiat dari tumbuhan.

Pemanfaatan dan khasiat dari tumbuhan salah satunya yaitu tumbuhan Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) yang telah dimanfaatkan di Surabaya, Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat dan merupakan kekayaan *ethno-cultural* masyarakat Surabaya, sehingga *M. crenata* memiliki potensi besar untuk dikembangkan menjadi obat herbal Indonesia. Selain dimanfaatkan sebagai makanan, *M. crenata* juga mempunyai manfaat lain khususnya di bidang kesehatan, seperti peluruh air seni, ekspektoran, analgesik, kusta dan demam (Astuti, 2013; Nantasomsaran *et al.*, 2013; Rindawati, 2015). Hasil uji aktivitas *in silico*, *in vitro* dan *in vivo* daun *M. crenata* juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat memiliki afinitas yang tinggi

terhadap *estrogen receptor* β (ER- β), serta dapat menginduksi proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas, sehingga dapat meningkatkan kepadatan tulang (Laswati, 2011; Ma'arif, 2015; Ma'arif *et al.*, 2016; Adityara, 2017; Widiyasa, 2017). Manfaat-manfaat tersebut dikarenakan kandungan kimia yang ada pada daun *M. crenata* mengandung senyawa golongan steroid, karbohidrat, flavonoid, saponin, terpenoid, polifenol dan golongan asam amino yaitu asam palmitat yang diduga memiliki peran sebagai agen antiosteoporosis (Tyaningsih, 2007; Yacoeb *et al.*, 2010; Nurjanah *et al.*, 2012; Ma'arif *et al.*, 2016; Titisari *et al.*, 2016).

Potensi *M. crenata* yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap ER- β dan dapat meningkatkan kepadatan tulang merupakan bukti bahwa *M. crenata* merupakan sumber fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan sekelompok senyawa yang berasal dari tanaman yang memiliki struktur mirip estrogen atau dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen yang dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, black cohosh, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2018). Hal tersebut didukung oleh beberapa penelitian yaitu kandungan Fitoestrogen pada *M. crenata* diduga memiliki peran sebagai agen antiosteoporosis, terutama dalam perbaikan dan peningkatan laju osteogenesis (Kim *et al.*, 2013 dan Trisunuwati, 2017). Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* secara *in vivo* pada mencit betina dengan metode *radio immunoassay* (RIA) menunjukkan adanya senyawa yang memiliki struktur mirip 17 β -estradiol (Laswati, 2011). Pengujian ekstrak n-heksana secara *in vitro* terhadap sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan adanya proses diferensiasi sel osteoblas MC3T3-E1 (Ma'arif *et al.*, 2018). Penelitian lain yaitu

dengan analisis menggunakan GC-MS menunjukkan daun *M. crenata* mengandung beberapa jenis senyawa yang dapat meningkatkan proses pembentukan tulang dengan mekanisme induksi faktor transkripsi proses pembentukan tulang pada sel osteoblas (Ma'arif *et al.*, 2016).

Aktivitas fitoestrogen di dalam tubuh sangat penting sebagai pengganti estrogen dengan ikatannya bersama ER yang berperan sebagai homeostasis dalam tubuh. Pada otak dalam jangka waktu tertentu fitoestrogen dapat meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel otak maupun menghambat pembentukan Nf- κ B dengan cara menghambat *Toll like Receptors*, sehingga hal ini dapat menjadi dasar awal fitoestrogen pada *M.crenata* bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Neuroprotektor dari *M.crenata* ini dapat menghambat terjadinya Neuroinflamasi akibat kenaikan mikroglia teraktivasi (Lee *et al.*, 2013; Matt dan Johnson, 2016). Neuroinflamasi yang berkelanjutan akan menjadi salah satu penyebab terjadinya neurodegeneratif (Witney *et al.*, 2009). Neurodegeneratif merupakan suatu kondisi patologis dimana sel saraf mengalami kehilangan struktur dan fungsi secara progresif (Kovac, 2014). Contoh penyakit neurodegeneratif adalah *Alzheimer disease*, *Parkinson disease*, *Huntington disease* dan *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. (Abeliovich dan Gitler, 2016; Canter *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2016; Wyss-Coray, 2016). Prevalensi Penyakit neurodegeneratif yang paling banyak yaitu *Alzheimer disease* dan *Parkinson disease* yang dapat mempengaruhi sekitar 24 juta orang secara global dan meningkat lebih dari 15 kali lipat dengan bertambahnya usia yang dilaporkan antara usia 65 dan 85 yang mayoritas

penderitanya adalah wanita (Reitz *et al.*, 2011; Mayeux dan Stern 2012; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). Hal ini terjadi pada rentang usia tersebut karena wanita mengalami masa pascamenopause dimana pada keadaan tersebut terjadi penurunan produksi estrogen karena adanya kegagalan apoptosis sel dan terjadinya perubahan aktivitas estrogen dalam tubuh yang dipengaruhi oleh peningkatan usia. Akibatnya, tubuh akan mengalami defisiensi estrogen (Ji dan Yu, 2015).

Defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause dapat diterapi dengan pemberian substansi estrogen dari luar tubuh yaitu *Hormon Replacment Therapy* (HRT) (Beral, 2003). Namun, penggunaannya memiliki efek merugikan yaitu terjadinya peningkatan kanker endometrium, kanker payudara, emboli bahkan stroke yang berujung pada kematian (Jantarantotai *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013). Kelemahan tersebut mendorong perlunya alternatif terapi yang lebih aman yaitu penggunaan Fitoestrogen (Alldredge *et al.*, 2013; Jantaranotai *et al.*, 2013).

Berdasarkan penjabaran di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat *M. crenata* sebagai sumber fitoestrogen untuk mencegah terjadinya penyakit neurodegeneratif melalui mekanisme antineuroinflamasi yang dapat menjadi alternatif terapi pada wanita pascamenopause akibat defisiensi estrogen. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antineuroinflamasi fraksi n-butanol *M. crenata* pada *Human Microglial Cell3* (HMC3) dengan mengamati marker spesifik yang muncul karena aktivasi HMC3 yaitu *Major Histocompatibility Complex* (MHC II). Marker MHC II menjadi fokus pengamatan karena marker ini merupakan bagian dari imun spesifik yang muncul

akibat terjadinya peningkatan jumlah mikroglia teraktivasi dan protein pertama yang aktifkan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yaitu mikroglia sebagai presentasi antigen eksogen. Selanjutnya antigen yang dipresentasikan oleh MHC II tersebut akan mengaktivasi sel T helper melalui reseptornya. Sel T helper yang teraktivasi tersebut kemudian akan mensekresikan sejumlah sitokin dan interleukin untuk pengaturan respon imun (Endang, 2016). Sehingga, penggunaan MHC II dalam penelitian ini dapat menjadi gambaran awal terjadinya proses inflamasi dalam rangkaian respon imun dalam tubuh khususnya di SSP dan diharapkan dapat mempengaruhi ekspresi dari mediator-mediator inflamasi lainnya (Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015; Paracha *et al.*, 2015; Matt dan Johnson, 2016, Endang, 2016).

Penggunaan fraksi n-butanol yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% didasarkan pada skrining aktivitas dan golongan fitoestrogen yang merupakan kelompok senyawa isoflavon sehingga diharapkan dapat ditarik oleh pelarut n-butanol yang bersifat polar. Selain itu, berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilakukan profil metabolit yang menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas estrogenik pada ekstrak etanol 96% yaitu dengan senyawa mayor 4- [N-{2-[(6-Chloro-2-methyl-4-quinoliny)amino]ethyl} N[4methoxyphenyl)sulfonyl] βalanyl) amino] 3methoxyNphenylbenzamide) (Rukiana, 2018). Proses fraksinasi dilakukan dengan metode cair-cair untuk memperoleh senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya sehingga diperoleh fraksi n-butanol. Aktivasi HMC3 dilakukan dengan menginduksi IFN-γ. Pemberian induktor IFN-γ pada pengamatan ini cukup beralasan karena IFN-γ dapat memberikan gambaran

proses terjadinya neurodegeneratif pada wanita yang mengalami pascamenopause dan memiliki peran mengaktivasi makrofag atau mikroglia dengan meningkatkan ekspresi molekul MHC II dengan berperan sebagai aktivator transkripsinya (Endang, 2016; Kulkarani *et al.*, 2016). Marker MHC II diamati dengan metode *Immunocytochemistry* (ICC). Pemilihan metode ICC yaitu lebih selektif pada target yang dituju yaitu sel dengan pendaran warna yang dihasilkan dari penambahan Fluorescence yang ditautkan pada antibodi sekunder, sehingga marker MHC II dapat terlihat. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan instrument *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) yaitu jenis mikroskop fluoresensi dengan kedalaman fokus yang tinggi dan dapat menyajikan gambar tiga dimensi dengan bantuan fokus dari komputer sehingga lebih baik dari mikroskop konvensional.

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi motivasi kepada pembaca dan praktisi kesehatan untuk mendalami potensi *M. crenata* sebagai sumber fitoestrogen untuk neuroprotektor dan juga dapat memberikan pengetahuan baru mengenai *M. crenata* yang dapat menghambat terbentuknya mikroglia teraktivasi penyebab neuroinflamasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi n-butanol *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi pada sel HMC3 dengan pengukuran marker MHC II diamati dengan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM?

2. Berapakah nilai ED_{50} fraksi n-butanol *M. crenata* sebagai antineuroinflamasi pada sel HMC3 dengan pengukuran marker MHC II diamati dengan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui fraksi n-butanol *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi pada HMC3 dengan pengukuran marker MHC II diamati dengan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM.
2. Mengetahui nilai ED_{50} fraksi n-butanol *M. crenata* sebagai antineuroinflamasi pada sel HMC3 dengan pengukuran marker MHC II diamati dengan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi dan pengetahuan baru dibidang penelitian pengobatan herbal mengenai aktivitas fraksi n-butanol *M. crenata* terhadap sel mikroglia HMC3 sebagai antineuroinflamasi
2. Memberikan acuan dalam pengembangan sediaan produk herbal untuk terapi antineuroinflamasi terutama pada wanita pascamenopause.

1.5 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah daun *M. crenata* yang diambil dari daerah Benowo, Surabaya dan diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang
2. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode UAE
3. Fraksinasi metode cair-cair menggunakan pelarut n-butanol yang diperoleh dari fraksinasi dengan pelarut n-heksaa, etil asetat, n-butanol dan pelarut air.

4. Sel yang digunakan yaitu HMC3 yang didapatkan di ATCC dan dilakukan kultur di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.
5. Marker yang diamati yaitu MHC II dengan menggunakan metode ICC dengan instrument CLSM.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman (*Marsilea crenata* C. Presl)

2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi

Marsilea crenata C. Presl merupakan tumbuhan air yang banyak terdapat dilingkungan air tawar seperti sawah, kolam, danau dan sungai. *M. crenata* memiliki beberapa nama lain seperti jukut calingcin0gan (Sunda), tapak itek (Malaysia), upat-upat (Filiina), chutul phnom (Kamboja), pak vaen (Laos), phak waen (Thailand), dan *water clover fern* (Inggris) (Afriastini, 2003). *M. crenata* tumbuh tersebar di Asia Tenggara pada daerah yang mempunyai ketinggian 900 meter di atas permukaan air laut dan umumnya tumbuh merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm (Afriastini, 2003).

Menurut USDA (2003) klasifikasi *M. crenata* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Division	: Pteridophyta
Class	: Filicopsida
Order	: Hydropteridales
Family	: Marsileaceae
Genus	: <i>Marsilea</i> L.
Species	: <i>Marsilea crenata</i> C. Presl.



Gambar 2.1 *Marsilea crenata* C. Presl (Ma'arif *et al.*, 2016)

2.1.2 Habitus dan Morfologi

- Habitus** : Paku air atau paku rawa, dengan tangkai panjang dan tegak, panjang 2-30 cm
- Daun** : Daun berdiri sendiri atau dalam berkas, menjari berbilangan 4, anak daun menyilang berhadapan, berbentuk baji bulat telur, gundul atau hampir gundul, 3-22 kali 2-18 mm, urat daun rapat berbentuk kipas, pada air yang tidak dalam muncul di atas air, pada air yang mengapung (Steeins, 1975 dalam Ma'arif, 2012).
- Akar** : Akar pada tanaman *M. crenata* tertanam dalam substrat di dasar perairan (Afriastini, 2003).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat

M. crenata memiliki manfaat di bidang kesehatan seperti peluruh air seni, ekspektoran, analgesik, kusta dan demam (Astuti, 2013; Nantasomsaran *et al.*, 2013; Rindawati, 2015). Secara turun temurun sudah digunakan untuk mengobati penyakit asma, batu empedu, batu ginjal, infeksi saluran kemih, radang amandel, radang kerongkongan, sakit kuning, salesma dan *cantengan* (bengkak pada jari tangan atau kaki karena infeksi) dan infeksi telinga (Sarl, 2008). Hasil uji aktivitas

in silico, *in vitro* dan *in vivo* daun *M. crenata* juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat memiliki afinitas yang tinggi terhadap *estrogen receptor* β (ER- β), serta dapat menginduksi proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas, sehingga dapat meningkatkan kepadatan tulang (Laswati, 2011; Ma'arif *et al.*, 2016; Adityara, 2017; Widiyari, 2017; Ma'arif *et al.*, 2018). Manfaat-manfaat tersebut dikarenakan kandungan kimia yang ada pada daun *M. crenata* mengandung saponin, triterpenoid bebas, steroid, flavonoid dan polifenol (Tiyaningsih, 2007; Yacoeb *et al.*, 2010). *M. crenata* juga memiliki kandungan air yang tinggi yaitu sebesar 82,59%, abu 1,72%, protein 1,91%, lemak 0,36%, karbohidrat 11,46 % dan serat kasar 1,96%. Ekstrak kasar *M. crenata* mengandung 6 komponen bioaktif yaitu alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino (Nurjanah *et al.*, 2012). *M. crenata* banyak memiliki senyawa yang bersifat volatil diantaranya yaitu monoterpenoid, diterpenoid dan beberapa kelompok asam amino yang memiliki aktivitas. Salah satu asam amino yang terdapat pada *M. crenata* yang memiliki aktivitas antiosteoporosis yaitu asam palmitat (Ma'arif *et al.*, 2016).

2.2 Tinjauan Metode Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstraksi

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

metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014).

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

2.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi

Metode ekstraksi yang dilakukan dipilih berdasarkan pertimbangan tertentu. Metode ekstraksi telah banyak diperkenalkan untuk memperoleh senyawa target secara optimal dan terbagi berdasarkan adanya penggunaan panas atau tidak selama proses berlangsung (Handa, 2008). Metode ekstraksi yang sering digunakan untuk memperoleh senyawa target yaitu sebagai berikut.

2.2.2.1 Metode ekstraksi dingin

A. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar) (Dirjen POM, 2000). Metode ini menggunakan prinsip kesetimbangan antara ekstrak dengan pelarut, proses ekstraksi akan dihentikan ketika diperkirakan telah tercapai kesetimbangan konsentrasi senyawa aktif dengan pelarut. Keuntungan dari metode ini yaitu sederhana, mudah dilakukan

dan dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Namun, metode ini memiliki kerugian yaitu memerlukan waktu yang relatif lama dan hasil yang diberikan dalam jumlah sedikit dan besar kemungkinan senyawa banyak yang hilang dan lain sebagainya (Agoes, 2007; Mukhriani, 2014).

2.2.2.2 Metode ekstraksi panas

A. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya, terus menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya 1-5 kali bahan. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru, sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area, metode ini membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Dirjen POM, 2000; Mukhriani, 2014).

B. Soxhletasi

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

C. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan

adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Dirjen POM, 2000).

D. Digesti

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

E. Infus

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

F. Dekok

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

G. Destilasi Uap

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

yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi (Dirjen POM, 2000).

2.2.2.3 Metode Ekstraksi Lainnya

A. Ekstraksi Berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturut-turut beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Dirjen POM, 2000).

B. Superkritikal Karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia dan umumnya digunakan gas karbondioksida dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Dirjen POM, 2000).

C. Ekstraksi Energi Listrik

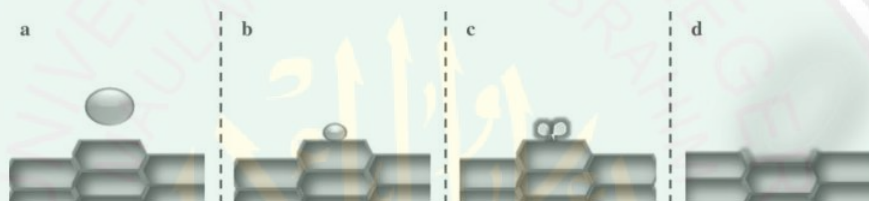
Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "*electric-discharges*" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik (Dirjen POM, 2000).

D. Ekstraksi Ultrasonik (*Ultrasonic Assisted Extraction*)

Ekstraksi ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-20.000 kHz (Banu dan Catherine, 2015). Prinsip kerja dari ekstraksi ini yaitu meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga timbul fraksi interfase (Ma'arif, 2012; Medina-Torres *et al.*, 2017). Mekanisme yang terjadi yaitu intensifikasi massif transfer massa dan laju kecepatan pelarut ke bahan sel dari bagian tanaman. Mekanisme ekstraksi oleh ultrasonik melibatkan dua jenis fenomena fisika yaitu difusi di dinding sel dan pembilasan isi sel setelah memecahkan dinding. Kadar air sampel, tingkat penggilingan, ukuran partikel dan pelarut merupakan faktor yang sangat penting untuk memperoleh ekstraksi yang efisien dan efektif. Selain itu, suhu, tekanan, frekuensi dan waktu sonikasi adalah faktor yang juga mempengaruhi kerja UAE. UAE juga telah digabungkan dengan berbagai teknik klasik untuk meningkatkan efisiensi sistem konvensional. Dalam unit ekstraksi pelarut, perangkat ultrasonik ditempatkan pada posisi yang tepat untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi (Azmir *et al.*, 2013).

Metode ekstraksi UAE memiliki faktor penentu keberhasilan diantaranya adalah ukuran partikel ekstrak, moisture content bahan dan pelarut yang digunakan (Ngaha Njila *et al.*, 2017). *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) memiliki kekuatan kavitasi akustik sebagai kekuatan pendorong utama yang mampu menginduksi serangkaian kompresi dan *rarefactions* dalam molekul pelarut, sehingga menyebabkan pembentukan gelembung sebagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al.*, 2017). Proses terjadinya mekanisme

ekstraksi metode ini diawali dengan terjadi perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitasi. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Vilkhu *et al.*, 2008). Proses mekanisme ini dapat diamati pada gambar berikut ini (Esclapez *et al.*, 2011):

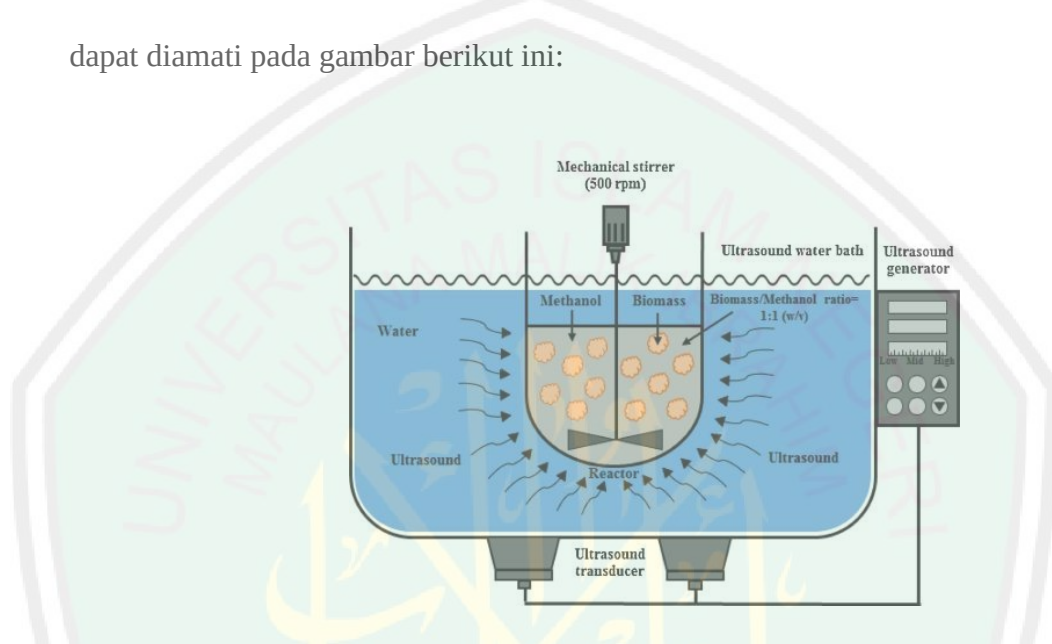


Gambar 2.2 Proses mekanisme ekstraksi UAE

- Gelembung cavitasi mendekati dinding sel
- Gelembung cavitasi berusaha membuat pori pada dinding sel
- Gelembung melekat dan menyebabkan aliran deras senyawa (microjets)
- Senyawa dalam bahan keluar menuju pelarut

Metode UAE memiliki keuntungan yaitu mudah untuk ditangani, aman dan ekonomis (Vieira *et al.*, 2013). Selain itu, Keuntungan dari UAE yaitu mengurangi waktu ekstraksi, energi dan penggunaan pelarut. Energi ultrasonik dapat memberikan beberapa manfaat lainnya yaitu pencampuran yang lebih efektif, transfer energi yang lebih cepat, pengurangan gradien termal dan temperatur ekstraksi, ekstraksi selektif, pengurangan ukuran peralatan, respon lebih cepat terhadap pengendalian proses ekstraksi, peningkatan produksi dan menghilangkan langkah-langkah proses seperti metode lainnya (Chemat *et al.*,

2008). Namun, penggunaan metode ini juga memiliki kerugian yaitu penggunaan yang sulit dilakukan untuk skala besar, memiliki biaya pengerjaan tinggi serta gelombang yang ditimbulkan meskipun jarang terjadi dapat merubah struktur senyawa aktif dalam simplisia (Banu dan Catherine, 2015). Proses metode ini dapat diamati pada gambar berikut ini:



Gambar 2.3 Proses terjadinya ekstraksi menggunakan metode

2.3 Tinjauan tentang Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995). Ada beberapa jenis ekstrak yakni ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5-30%. Ekstrak kering jika mengandung kadar air kurang dari 5% (Voight, 1994).

Faktor yang mempengaruhi ekstrak yaitu faktor biologi dan faktor kimia. Faktor biologi meliputi spesies tumbuhan, lokasi tumbuh, waktu pemanenan, penyimpanan bahan tumbuhan, umur tumbuhan dan bagian yang digunakan. Sedangkan faktor kimia yaitu faktor internal (jenis senyawa aktif dalam bahan, komposisi kualitatif senyawa aktif, komposisi kuantitatif senyawa aktif, kadar total rata-rata senyawa aktif) dan faktor eksternal (metode ekstraksi, perbandingan ukuran alat ekstraksi, ukuran kekerasan dan kekeringan bahan, pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, kandungan logam berat, kandungan pestisida) (Dirjen POM, 2000).

Selain faktor yang mempengaruhi ekstrak, ada faktor penentu mutu ekstrak yang terdiri dari beberapa aspek, yaitu kesahihan tanaman, genetik, lingkungan tempat tumbuh, penambahan bahan pendukung pertumbuhan, waktu panen, penanganan pasca panen, teknologi ekstraksi, teknologi pengentalan dan pengeringan ekstrak dan penyimpanan ekstrak (Saifudin *et al.*, 2011).

2.4 Tinjauan tentang Fraksinasi Cair-cair

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik (Soebagio *et al.*, 2007). Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar, dan yang bersifat polar akan larut kedalam pelarut polar (Harborne, 1987). Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong

pisah atau dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV), Kromatografi Kolom (KK), *Size-exclusion Chromatography* (SEC), *Solid-phase Extraction* (SPE) (Sarker *et al.*, 2006).

Fraksinasi menggunakan corong pisah dapat dilakukan dengan memasukkan kedua pelarut yang tidak saling bercampur tersebut ke dalam corong pisah kemudian dikocok dan didiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing bergantung kepada kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan terbentuk dua lapisan. Pelarut yang memiliki massa jenis lebih tinggi akan berada di lapisan bawah dan yang memiliki massa jenis lebih kecil akan berada di lapisan atas. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak nantinya akan terpisah sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa akan tertarik oleh pelarut yang tingkat kepolarannya sama dengan senyawa tersebut (Odugbemi, 2008 and Dey, 2012). Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti petroleum eter, n-heksana, klorofom, dietil eter, etilasetat, n-butanol dan etanol. Pemilihan pelarut pada ekstraksi umumnya tergantung pada sifat analitnya dimana pelarut dan analit harus memiliki sifat yang sama, analit yang bersifat nonpolar akan terekstraksi pada pelarut yang nonpolar sedangkan analit yang semipolar terlarut pada pelarut yang semipolar (Venn, 2008).

2.5 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu cara pemisahan fisikokimia dimana lapisan pemisah terdiri atas bahan-bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang

cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan pada fase diam. Fase diam yang sering digunakan dalam KLT yaitu silica dan alumina (Sudjadi, 2007; Rahmawati *et al.*, 2013). Fase diam yang telah di totolkan, dimasukkan ke dalam bejana tertutup rapat yang berisi fase gerak yang cocok. Fase gerak KLT merupakan pelarut pengembang yang dapat bergerak sepanjang fase diam. Pemilihan fase gerak sangat dipengaruhi oleh polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan (Stahl, 1985).

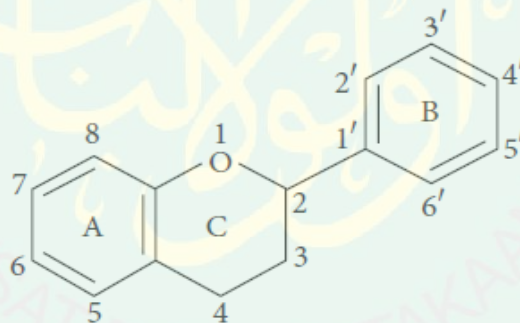
KLT memiliki beberapa fungsi dalam pemakaiannya yaitu sebagai metode untuk pengujian secara kualitatif, kuantitatif atau preparatif dan sering digunakan untuk pemilihan sistem pelarut yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (Roy *et al.*, 1991). KLT memiliki kelebihan analisis cepat, memerlukan bahan yang sedikit dalam proses pengerjaannya (Abidin, 2011).

Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai R_f yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f yang berguna untuk identifikasi senyawa yaitu senyawa standar (Abidin, 2011).

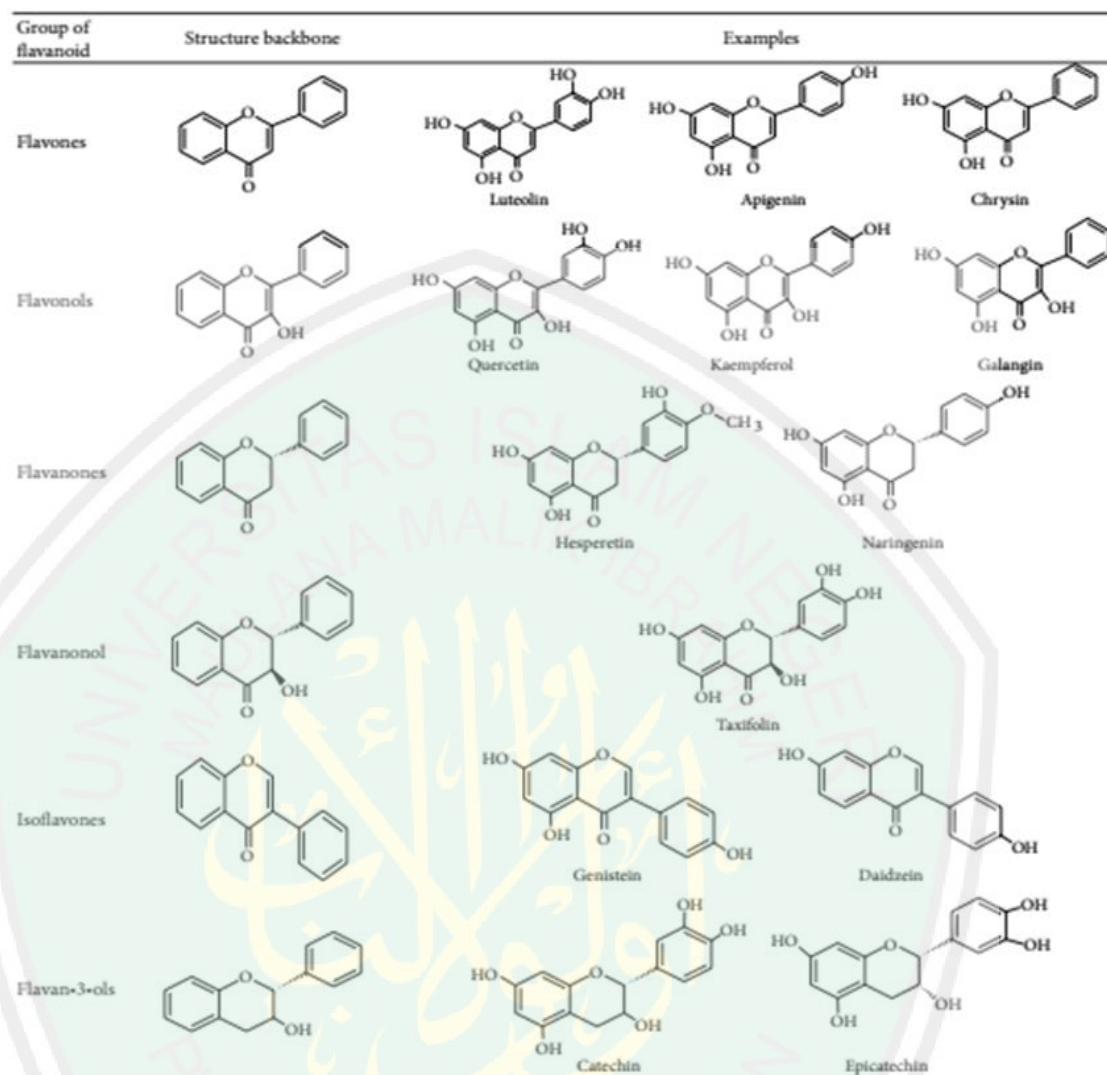
2.6 Tinjauan tentang Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang termasuk dalam kelompok besar polifenol (Zuraid *et al.*, 2017). Senyawa ini terdapat pada semua bagian tanaman termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah, dan biji. Flavonoid mempunyai

kemampuan sebagai penangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi lipid (Banjarnahor dan Artanti, 2014; Trembl dan Smejkal, 2016). Flavonoid memiliki rantai C₆-C₃-C₆ yang sering ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk glikosida pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino. (Sirait, 2007; Bhat *et al.*, 2009). Flavonoid terdapat beberapa kelas yang semua kelas mengandung 15 atom karbon dalam intinya, yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Perbedaan tingkat oksidasi -C₃- penghubung inilah yang menjadi menjadi dasar penggolongan jenis flavonoid.



Gambar 2.4 Struktur dasar Flavonoid (Kumar and Pandey, 2013)



Gambar 2.5 Penggolongan Flavonoid (Kumar dan Pandey, 2013).

2.7 Tinjauan tentang Pascamenopause

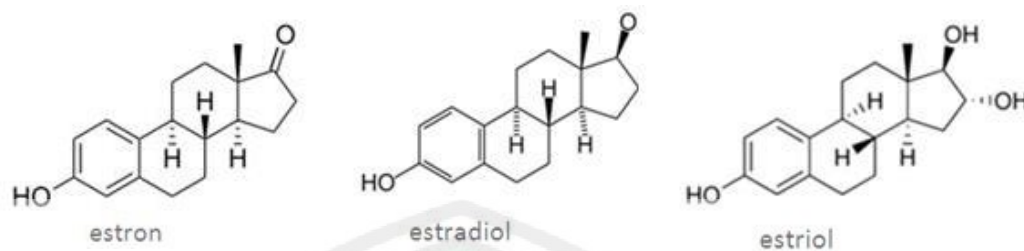
Pascamenopause merupakan suatu fase pada tahapan keempat dari proses menopause (Nugroho, 2013). fase ini merupakan fase transisi dimana banyak terjadi masalah kesehatan pada wanita (Febriyani dan Sundari, 2016). Pascamenopause dimulai sejak satu tahun setelah haid terakhir seorang wanita.

Perubahan yang terjadi pada wanita pascamenopause adalah penurunan tingkat libido seksual. Hal itu dapat dikatakan sebagai efek dari penurunan produksi estrogen (Nugroho, 2013).

Secara normal, wanita memproduksi hormon estrogen yang paling dominan yaitu estradiol yang berasal dari ovarium dan estron yang berasal dari konversi androstenedion di jaringan perifer. Mendekati masa menopause atau yang disebut dengan masa perimenopause aktivitas dari folikel pada ovarium mulai berkurang. Pada masa pascamenopause mengakibatkan fungsi ovarium terhenti memproduksi hormon estrogen. Terdapat pula penurunan kadar hormon androgen seperti androstenedion dan testosteron yang sulit dideteksi pada masa pascamenopause (Amran, 2011). Sehingga, hormon estrogen mencapai nilai yang rendah pada masa ini yang dapat meningkatkan resiko timbulnya penyakit-penyakit tertentu (Baziad, 2003).

2.8 Tinjauan Tentang Mekanisme Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid dengan 10 atom C dan dibentuk terutama dari 17-ketosteroid androstenedion. Estrogen alamiah yang terpenting adalah estradiol, estron dan estriol. Secara biologis, estradiol adalah yang paling aktif dan paling banyak dalam tubuh yaitu dengan perbandingan khasiat biologis berturut-turut dari ketiga hormon tersebut (estradiol, estron dan estriol) yaitu 10 : 5 : 1. Potensi estradiol yakni 12 kali dari potensi estron dan 8 kali dari potensi estriol sehingga estradiol dianggap sebagai estrogen utama (Speroff *et al.*, 2005)



Gambar 2.6 Struktur estron, 17 β -estradiol dan estriol (Poppy, 2010)

Selain di ovarium, estrogen juga di sintesis di adrenal, testis, plasenta, jaringan lemak dan susunan saraf pusat namun dalam jumlah yang kecil. Hal ini menyebabkan wanita mempunyai kadar estrogen yang rendah setelah menopause (Baziad, 2003). Estrogen memiliki fungsi secara umum yaitu sebagai perangsang sintesis DNA melalui pembentuk utusan RNA (*messenger RNA*), sehingga terjadi peningkatan sintesis protein (Iswahyuni, 2011).

Estrogen memiliki peran yang sangat penting dalam fungsi modulasi Sistem saraf pusat yaitu memberikan perlindungan dari kerusakan pada otak, terutama dengan mengurangi respon inflamasi. Estrogen mengurangi respon inflamasi, seperti pada penekanan produksi beberapa mediator proinflamasi termasuk ekspresi protein dan kadar IL-1 β , IL-6, dan TNF α (Lewis *et al.*, 2008; Khaksari *et al.*, 2011; Asl *et al.*, 2013). Selain itu, sebagai antiinflamasi, estrogen juga dapat menghambat ekspresi MMP-9 dan siklooksigenase (Lewis *et al.*, 2008). Estrogen memiliki peran dalam gangguan neurodegeneratif seperti *Alzheimer disease* (AD) dan *Parkinson disease* (PD) (Cersosimo dan Benarroch, 2015). Salah satu jenis estrogen yaitu estradiol dapat mengatur fungsi mikroglia dan astrosit yang berhubungan dengan peradangan dengan menghambat

pelepasan sitokin dan aktivasi serta migrasi sel imun (Asl *et al.*, 2013). ER β banyak terdistribusi di jaringan otak tikus dewasa (Mitra *et al.*, 2003).

Mekanisme regulasi estrogen khususnya 17 β -estradiol di otak terdiri dari 4 jalur yaitu jalur *ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling, ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling, The ER-independent pathway* dan *Ligand-independent activation of ER*. Adapun penjelasannya sebagai berikut ini (Cui *et al.*, 2013):

1. *ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling*

Jalur *ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling* estrogen akan berikatan dengan *Esrogen receptor* (ER). Estrogen yang berikatan dengan ER akan menjadi estrogen yang teraktivasi. ER teraktivasi akan bertranslokasi dari membran plasma ke nukleus di mana estrogen ER teraktivasi tersebut dapat merekrut faktor transkripsi dan kofaktor lain untuk urutan target spesifik DNA, estrogen response elements (EREs), dalam promotor gen yang responsif estrogen. Dalam jalur ini, terdapat dua mekanisme ikatan antara Estrogen dengan ER, yaitu melalui jalur *classical* dan *nonclassical*. Pada jalur *classical*, ER yang teraktivasi dan masuk ke nukleus akan berikatan dengan EREs yang merupakan bagian dari DNA dan mengekspresikan protein-protein tertentu. Sedangkan pada jalur *nonclassical* ER teraktivasi tidak berikatan dengan EREs, namun berikatan dengan faktor-faktor transkripsi dan mempengaruhi aktivitasnya seperti faktor transkripsi *stimulating protein-1* (SP-1), *activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor kB* (NF-kB), and c-jun. Selanjutnya berikatan dengan Promotor DNA dan terjadi proses transkripsi menghasilkan protein.

2. *ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling*

Pada jalur ini, estrogen berikatan dengan ER di membran. Terdapat dua jenis estrogen di membrane yaitu ER-X dan GPR30. Pengiriman sinyal oleh ER melalui second messengers dengan tiga kemungkinan yaitu translokasi ke nukleus dan berikatan dengan promotor DNA sehingga menghasilkan protein. Kedua yaitu *second messengers* dapat mengaktifkan reseptor membran yang lain seperti reseptor *tyrosine kinase*, *metabotropic glutamate receptors* (mGluRs) dan membuka *ion channels*, sehingga mengakibatkan rangkaian mekanisme dan ekspresi protein lain. Ketiga, *second messengers* dapat mengaktifkan jalur lain melalui aktivitas nontranskripsional.

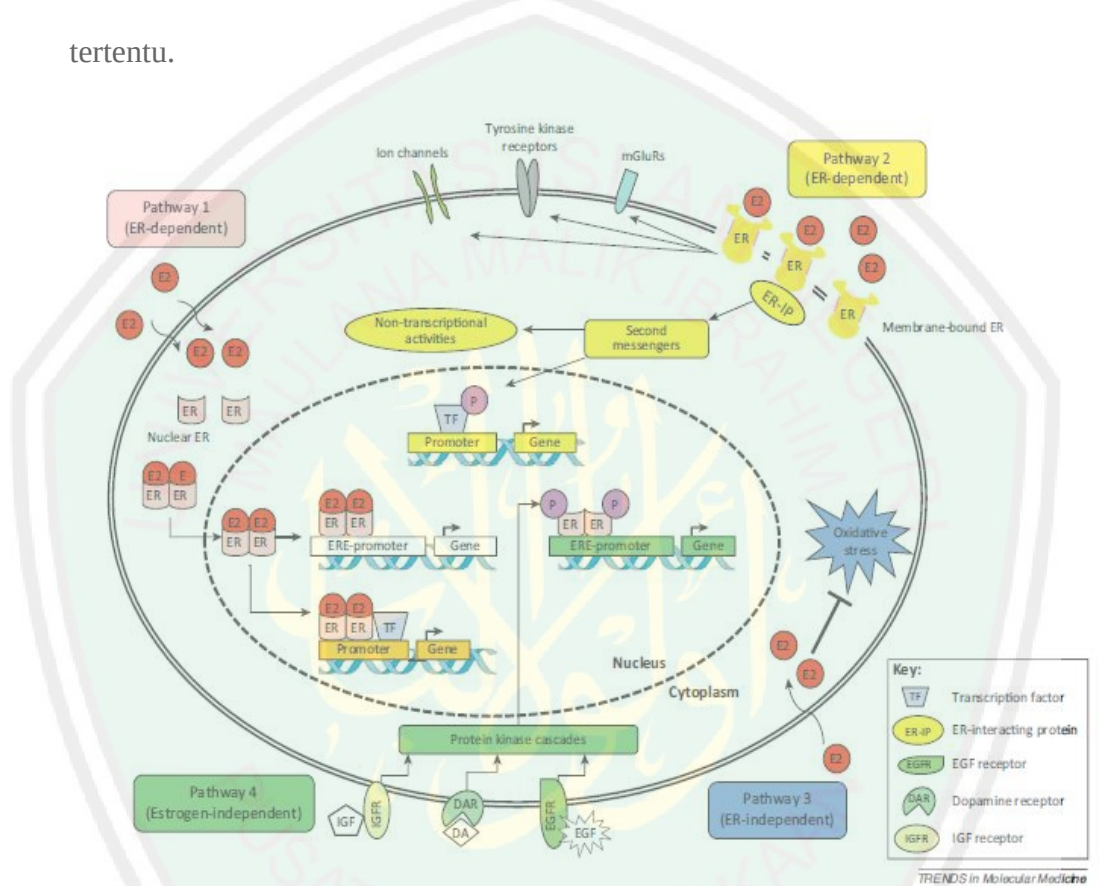
3. *The ER-independent pathway*

Meskipun sebagian besar tindakan biologis estrogen dimediasi melalui ER, namun dalam jalur ini, estrogen tidak berikatan dengan ER. estrogen dapat berperan sebagai agen antioksidan dan menekan stres oksidatif melalui jalur ER-independen. Estrogen dapat mengatur aktivitas enzimatik untuk melindungi kerusakan sel; Estrogen secara efektif mencegah stres pro-oksidan dengan membatasi pelepasan *Reactive Oxygen species* (ROS) dari mitokondria yang rusak melalui cincin fenolik A dari estrogen.

4. *Ligand-independent activation of ER*

Dalam kondisi fisiologis normal, ER dapat diaktifkan dengan cara ligan-independen melalui pensinyalan yang dipicu oleh berbagai faktor, termasuk neurotransmitter seperti dopamin, faktor pertumbuhan seperti epidermal growth factor (EGF) dan insulin-like growth factor-1 (IGF-1) dan aktivator jalur sinyal

intraseluler tertentu, seperti yang dimediasi oleh kinase PKC, PKA, MAPK dan phosphatidylinositol 3-kinase. Aktivasi jalur ligan-independen terkait dengan fosforilasi ER oleh ikatan protein seluler kinase dan ER teraktivasi akan berikatan dengan EREs dan promotor di DNA sehingga dapat menghasilkan protein tertentu.

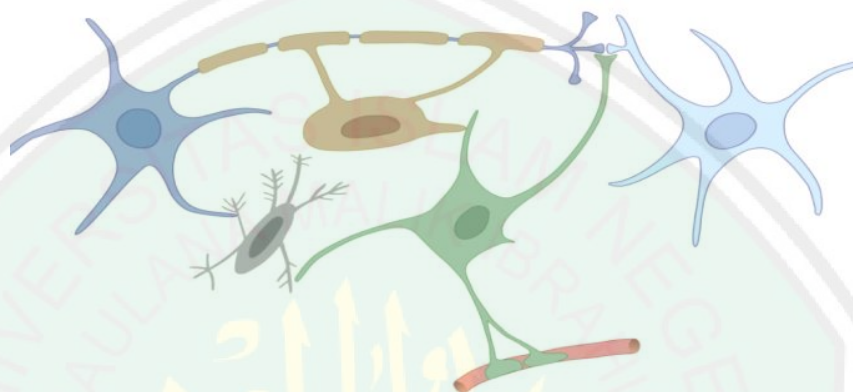


Gambar 2.7 Mekanisme jalur pensinyalan estrogen di otak

2.9 Tinjauan Tentang Neuroglia dan Mikroglia

Neuroglia merupakan sekumpulan sel yang memiliki peran diantaranya pemberi nutrisi, pelindung, pengatur homeostasis serta penunjang kehidupan dari sel neuron (Slone, 1994; Verkhratsky dan Parpura, 2014). Secara garis besar neuroglia terbagi menjadi Makroglia dan Mikroglia dimana Makroglia masih dibagi lagi menjadi Astrosit dan Oligodendrosit (Slone, 1994; Kettenmann dan

Verkhatsky, 2013; Verkhatsky dan Parpura, 2014). Penjelasan sebelumnya telah disebutkan bahwa neuroglia yang terbagi menjadi Astrosit, Oligodendrosit dan Mikroglia memiliki peran penting dalam memberikan penunjang dan homeostasis kehidupan sel neuron.



Gambar 2.8 Neuron (ungu) yang diselubungi aksonnya oleh Oligodendrosit (coklat) selain itu neuron melakukan sinaps dengan Mikroglia (kelabu) untuk meningkatkan terjadinya neurogenesis dan mencegah terjadinya neurodegeneratif (Varnum dan Ikezu, 2012). Terakhir adalah Astrosit (hijau) yang menyerupai bentuk bintang memberikan nutrisi untuk semua sistem saraf pusat (SSP) dan memiliki koneksi dengan sistem vaskular (merah) (Gundersen *et al.*, 2015).

Sel mikroglia pertama kali di karakterisasi oleh Pio del Rio-Hortega dengan memberikan gambaran yang jelas mengenai *phenotype* morfologinya pada sekitar tahun 1920 (Kettenmann *et al.*, 2011). Mikroglia berasal dari sel myeloid di perifer yang jumlahnya mencapai 12% sel yang bertindak sebagai bentuk aktif utama dari sistem imun di Sistem Saraf Pusat (Block *et al.*, 2007; Filiano *et al.*, 2015). Sel ini terakumulasi di lesi (daerah cedera) yang diakibatkan adanya gangguan neurodegeneratif seperti *Alzheimer disease*, *Parkinson disease*, *Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)* dan *Multiple Sclerosis (MS)* (D. Farfara *et al.*, 2008). Mikroglia yang telah aktif dapat menjalankan fungsinya sebagai fungsi

sebagai neurotoksik seperti melepaskan sitokin, kemokin, interleukin dan fungsi sebagai neuroprotektif seperti fagositosis dan melakukan perbaikan pada sel (Eyo dan Long-JunWu, 2013; Suzumura, 2013; Morales *et al.*, 2014).

Mikroglia secara garis besar memiliki 2 fenotipe yaitu M1 yang cenderung mengindikasikan mikroglia mendapatkan stimulus patologis yang bersifat neurotoksik serta M2 yang cenderung mengindikasikan mikroglia mendapatkan stimulus fisiologis (Nakagawa dan Chiba, 2015; Xiong *et al.*, 2016; Kanazawa *et al.*, 2017). Penjelasan tersebut cukup beralasan karena ketika mikroglia memasuki fenotipe M1 melepaskan marker tertentu (MHC II dan TNF α) dan mediator peradangan (Interleukin (IL) 1 β maupun 6) yang bersifat neurotoksik. Berbeda dengan fenotipe M1, fenotipe M2 memiliki peran untuk mengatasi fenotipe M1, mempertahankan hidup neuron serta memfasilitasi fagositosis neuron yang mati secara fisiologis. Aktivasi dari M2 akan menghasilkan IL-4 atau IL-13 untuk mengatasi peradangan dan perbaikan jaringan (Tang dan Le, 2015; Orihuela *et al.*, 2016; Tang dan Le, 2016). Fenotipe M2 pada mikroglia masih terbagi menjadi 3 bagian diantaranya

- a. M2a, berperan dalam perbaikan dan regenerasi sel (Kanazawa *et al.*, 2017)
- b. M2b, berperan sebagai imunoregulator (Kanazawa *et al.*, 2017; Tang dan Le, 2015)
- c. M2c, berperan dalam deaktivasi sel (pengurangan aktivitas mikroglia) (Kanazawa *et al.*, 2017).

Namun perlu dicermati bahwa fenotipe M1 dan M2 perlu dijaga dalam keadaan seimbang karena M1 dihilangkan memungkinkan terjadinya kelainan

fibrosis maupun disfungsi endotel (Tang dan Le, 2015). Selain itu, Mikroglia pada umumnya memiliki 3 bentuk morfologi diantaranya adalah *ameboid* ketika sel mikroglia mengalami pertumbuhan, *ramified* ketika mikroglia dewasa serta memiliki peran menjaga homeostasis otak dan *activated* ketika mikroglia mendapatkan stimulus secara fisiologis seperti Il-4 dan Il-13 maupun stimulus secara patologis seperti IFN- γ (Patro *et al.*, 2016). Pada penyakit neurodegeneratif, terdapat mikroglia yang aktif dalam jumlah yang besar. Hal ini merupakan suatu kondisi yang disebut mikrogliosis yang melibatkan mikroglia aktif dalam patologi penyakit (Block *et al.*, 2007).

2.10 Tinjauan Tentang sel mikroglia HMC3

Sel mikroglia pertama kali di karakterisasi oleh Pio del Rio-Hortega dengan memberikan gambaran yang jelas mengenai *phenotype* morfologinya pada sekitar tahun 1920 (Kettenmann *et al.*, 2011). Sel mikroglial yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sel mikroglial HMC3 (ATCC® CRL-3304™) dengan spesifikasi

Organisme Asal	: <i>Homo sapiens</i> (manusia)
Jaringan	: Otak
Tipe Sel	: Mikroglia
Usia	: Embrio
Morfologi	: Makrofag
Sifat Pertumbuhan	: Melekat
Penggunaan	: Sel mikroglial manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglial primer. Seringkali digunakan untuk analisis

biokimia terkait fungsi sel mikroglial di dalam otak, seperti dalam mekanisme neuroinflamasi.

Sumber : ATCC

2.11 Tinjauan tentang Interferon- γ (IFN- γ)

Kelompok Interferon terbagi menjadi 2 tipe yaitu tipe I yang terdiri dari IFN- α dan IFN- β sedangkan tipe II hanya terdapat IFN- γ dimana perbedaan paling terlihat secara patofisiologi adalah kelompok tipe I dapat aktif ketika sel mengalami kematian maupun kerusakan sedangkan tipe II dapat aktif ketika mendapat stimulus dari sel imun seperti sel T maupun Natural Killer (Kulkarani *et al.*, 2016). IFN- γ dapat aktif ketika telah berikatan dengan 2 reseptornya yaitu IFNGR1 dan IFNGR2 namun IFN- γ lebih poten berikatan dengan IFNGR1 sehingga dapat mengekspresikan marker fisiologis maupun faktor diferensiasi sel neuronal. Namun perlu dicermati karena IFN- γ memiliki peran ganda yang dapat berperan dalam kondisi fisiologis maupun patologis. Keadaan patologis dapat terjadi ketika IFN- γ dalam keadaan berlebih sehingga mengaktifkan mikroglia maupun makroglia pada sistem saraf pusat yang dapat menyebabkan Neurodegeneratif (Kulkarani *et al.*, 2016). Penjelasan tersebut berkaitan dengan kemampuan IFN- γ dalam menginduksi transkripsi gen yang dapat mengkodekan MHC II yang dapat memicu munculnya mediator peradangan seperti *Interleukin 1*, *Interleukin 6*, *Tumor Necrosis Factor α* maupun mediator peradangan lainnya (Jantaratnotai *et al.*, 2013; Mojic *et al.*, 2018).

Peran IFN- γ dalam sistem imun adaptif dapat meningkatkan aktivitas fagositik makrofag dan meningkatkan ekspresi molekul MHC II dengan berperan

sebagai aktivator transkripsi MHC II. MHC II berada di permukaan APC (makrofag) yang berperan sebagai presentasi antigen eksogen yang mengalami fagositosis oleh APC terhadap sel T Helper. Selanjutnya antigen yang dipresentasikan tersebut akan mengaktivasi sel T helper melalui reseptornya. Sel T helper disebut juga sel CD4+ karena mengandung glikoprotein CD4. Sel T helper akan segera memproduksi sitokin yang selanjutnya melakukan regulasi atau pengaturan respon imun. Sel T helper akan berdeferensiasi menjadi sel Th1, sel Th2 dan sel Th17, bergantung kepada sitokin di lingkungan lokalnya (Endang, 2016).

2.12 Tinjauan tentang Neurodegeneratif

Neurodegeneratif merupakan suatu kondisi patologis pada sel saraf dimana sel saraf tersebut mengalami kehilangan struktur atau fungsi sebenarnya secara progresif (Kovac, 2014). Proses neurodegeneratif terjadi disebabkan oleh berkurangnya sel-sel neuron pada struktur saraf, seperti halnya yang terdapat pada penyakit neurodegeneratif otak. Penderita neurodegeneratif akan mengalami gangguan memori dan pergerakan (Bertram *et al.*, 2005). Penyakit neurodegeneratif seringkali dikarakterisasi dengan penumpukan *beta amyloid* yang berlebih. *Beta amyloid* ini bersifat neurotoksik dan menyebabkan kematian pada sel-sel saraf yang dikarakterisasi oleh sel-sel saraf yang degeneratif. Selanjutnya juga disebutkan bahwa neurodegeneratif ini dapat terjadi karena beberapa penyebab seperti perubahan biokimia, genetik maupun peningkatan radikal bebas penyebab terjadinya stres oksidatif yang merujuk pada terjadinya mekanisme neuroinflamasi pada sistem sel saraf (Kovacs, 2016).

2.13 Tinjauan tentang Neuroinflamasi

Neuroinflamasi pada sistem saraf secara spesifik dapat muncul karena terjadinya kenaikan mikroglia teraktivasi sehingga meningkatkan ekspresi marker spesifik seperti *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) yang kemudian memicu munculnya mediator peradangan seperti *Interleukin 1*, *Interleukin 6*, *Tumor Necrosis Factor α* maupun mediator peradangan lainnya (Jantarantotai *et al.*, 2013; Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015; Matt dan Johnson, 2016). Kenaikan mikroglia teraktivasi ini sendiri secara genetika dapat muncul karena terjadinya defisiensi estrogen pada wanita yang telah memasuki masa pascamenopause (Lee *et al.*, 2013).

2.14 Tinjauan tentang Fitosterogen

Fitoestrogen adalah senyawa yang memiliki struktur senyawa bahkan aktivitas yang menyerupai dengan estrogen maupun estradiol yang ditemukan dalam mamalia (Sirotkin dan Harrath, 2014). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, black cohosh, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al.*, 2013). Fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten (Jefferson *et al.*, 2002). Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*) (Achdiat, 2003). Fitoestrogen merupakan alternatif pengganti estrogen yang potensial tanpa memiliki efek samping yang berbahaya (Ososki dan Kennelly, 2003; Villiers, 2009; Yang *et al.*, 2012).

Fitoestrogen dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor estrogen (*estrogen like substance*). Pengertian fitoestrogen sendiri saat ini masih banyak diperdebatkan, dimana ada beberapa teori yang menyebutkan senyawa golongan fitoestrogen merupakan senyawa dari tanaman yang memiliki struktur mirip 17β -estradiol, seperti senyawa golongan isoflavon (genistein, deidzein), isosterol, triterpenoid dan steroid. Namun pada perkembangannya, muncul teori yang menyebutkan fitoestrogen merupakan senyawa dari tanaman yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan estrogen reseptor. Pengertian fitoestrogen yang kedua ini memiliki arti yang lebih luas dari pengertian pertama, karena senyawa tidak dibatasi dengan struktur yang harus mirip dengan 17β -estradiol, namun hanya dipersyaratkan untuk dapat berikatan dengan estrogen reseptor dengan afinitas yang baik dan dapat menimbulkan efek terapi yang mirip dengan estrogen (Cos *et al.*, 2003; Ososki dan Kennelly, 2003; Dweck, 2006; Villiers, 2009). Fitoestrogen dipercaya dapat mengurangi efek samping penggunaan terapi sulih hormon dengan memberikan tingkat keamanan yang lebih baik namun dengan aktifitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015).

Pada tanaman dikenal ada beberapa kelompok fitoestrogen yaitu isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti *flavones*, *chalconcs*, *diterpenoids*, *triterpenoids*, *coumarins* dan *acyclics*. Pada kelompok fitoestrogen tersebut isoflavon merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, dikarenakan kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi (Achdiat, 2003). Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak

disintesis oleh tanaman. Senyawa yang diindikasikan memiliki fungsi antifertilitas antara lain fitoestrogen. Fitoestrogen banyak ditemukan pada tanaman kelompok biji-bijian, buah-buahan dan sayuran. Secara struktur dan fungsional, fitoestrogen serupa dengan 17β -estradiol dan merupakan senyawa difenolik (Kuntana, 2005).

Aktifitas fitoestrogen sendiri didalam otak memiliki beberapa manfaat setelah digunakan dalam jangka waktu tertentu seperti meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel-sel otak maupun menghambat pembentukan NF- κ B dengan cara menghambat aktifitas *Toll Like Receptors* dengan reaksi fosforilasi pada protein p38. Aktifitas untuk menghambat aktifitas TLR ini yang kemudian menjadi dasar awal fitoestrogen dapat bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Fitoestrogen dipercaya dapat mengurangi efek samping penggunaan terapi sulih hormon dengan memberikan tingkat keamanan yang lebih baik namun dengan aktifitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015).

2.15 Tinjauan tentang *Immunocytochemistry*

Immunocytochemistry merupakan suatu teknik yang umum digunakan dalam laboratorium untuk memvisualisasikan lokasi suatu protein atau antigen tertentu dalam sel dengan menggunakan antibodi primer yang berikatan secara spesifik terhadap protein atau antigen tersebut. Antibodi primer memungkinkan visualisasi protein di bawah mikroskop fluoresensi setelah berikatan lebih lanjut dengan antibodi sekunder yang sudah terkonjugasi dengan gugus fluorochrome dimana salah satunya adalah FITC (Ma'arif *et al.*, 2018). ICC memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi apakah sel dalam sampel tertentu dapat

mengekspresikan antigen yang diinginkan (Taylor dan Rudbeck, 2013). Perbedaan dasar ICC dengan *immunohistochemistry* (IHC) terletak pada sampel atau objek yang digunakan, pada ICC sampel yang digunakan berupa sel utuh yang hampir seluruh matriks ekstraselularnya dihilangkan, termasuk didalamnya sel-sel yang diisolasi dari jaringan tubuh, sedangkan pada IHC sampel yang digunakan adalah potongan dari jaringan biologis, dimana sel-sel masih dikelilingi oleh arsitektur jaringan atau berupa sel-sel lain yang biasanya ditemukan dalam jaringan utuh (Taylor dan Rudbeck, 2013).

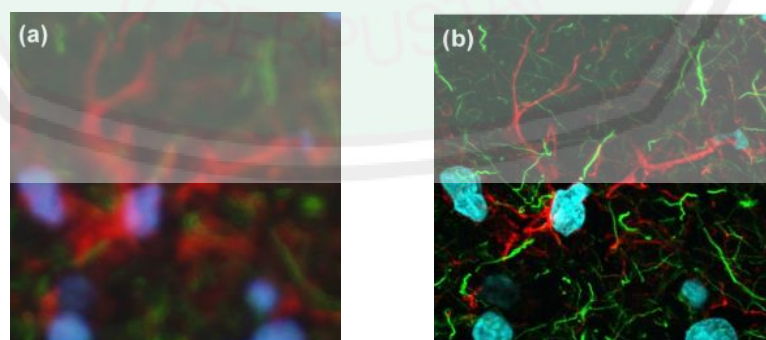
2.16 Tinjauan tentang MHC II

MHC II merupakan bagian dari imun spesifik terutama pada beberapa APC seperti makrofag dan sel B (Paracha *et al.*, 2015). Molekul MHC kelas II juga disebut dengan HLA II merupakan transmembran heterodimer glikoprotein yang memiliki rantai alfa dan beta. Pada manusia terdapat 3 isotipe berbeda diantaranya (HLA-DR, HLA-DQ dan HLA-DP) dari kesemuanya mengkodekan dengan jelas bagian A dan B pada lengan pendek kromosom ke 6 (Hanna dan Etzioni, 2014). MHC II memiliki panjang rantai amino 18-20 dimana alurnya secara terbuka disediakan oleh domain Alfa dan Beta. Kompleks dari MHC II-peptida selanjutnya berinteraksi dengan Sel T helper CD4, hingga mempengaruhi respon penurunan aktifitas dengan cara melakukan lokalisasi inflamasi dan pembengkakan dengan cara memanggil fagosit atau mengaktifkan sel B (Grimholt, 2015). Kenaikan molekul MHC II terjadi karena induksi oleh IFN- γ dan hal ini penting untuk menyajikan antigen untuk limfosit Sel T helper CD4 (Lisak *et al.*, 2016). Beberapa sel tidak selalu mengekspresikan molekul MHC II

namun ekspresi tersebut dapat muncul setelah diinduksi beberapa stimuli dimana salah satu yang dikenal dan potensial adalah IFN- γ . Molekul MHC II memiliki beberapa peran kunci dalam sistem imun adaptif dimana secara langsung mengembangkan, mengaktifkan dan menjaga keseimbangan dari Sel T helper CD4+ (Hanna dan Etzioni, 2014).

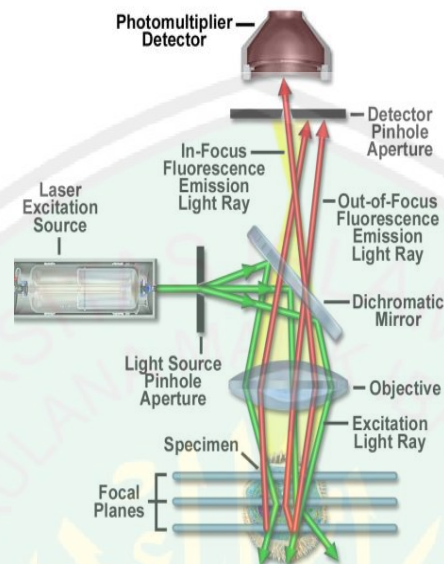
2.17 Tinjauan tentang Confocal Laser Scanning Microscopy

Confocal Laser Scanning Microscopy merupakan instrumen yang digunakan untuk mengamati sampel dengan memanfaatkan laser sebagai sumber pengamatan dan menggunakan kamera untuk merekam hasil pengamatan dimana selanjutnya diolah menggunakan software pengolah data yang terdapat pada komputer. Pada instrumen ini digunakan pendar sampel setelah dikenai laser dengan panjang gelombang tertentu (Lattante *et al.*, 2014). Instrumen ini pada awalnya dikembangkan oleh seorang mahasiswa kesehatan di Amerika Serikat bernama Marvin Minsky untuk mengamati aktivitas sel ota (Claxton *et al.*, 2010). Instrumen ini memberikan struktur sel lebih baik dibandingkan dengan SEM maupun TEM yang dapat diamati pada gambar berikut ini:



Gambar 2.9 (a) pengamatan SEM (b) pengamatan CLSM
(Claxton *et al.*, 2010)

Instrumen ini memiliki mekanisme kerja yang sedikit rumit untuk menghasilkan hasil yang luar biasa yang dapat diamati pada gambar berikut ini:



Gambar 2.10 Diagram CLSM (Claxton *et al.*, 2010)

2.18 Tinjauan Uji Statistik Inferensial

Uji statistik inferensial merupakan salah satu jenis ilmu statistik yang digunakan untuk mengambil sebuah keputusan yang didasarkan pada uji statistik yang telah dilakukan terhadap sampel yang diambil dari suatu populasi yang melibatkan data yang akan dikumpulkan, diolah dan dianalisis dan pada akhirnya dapat ditarik kesimpulan dari data (Aryani, 2013). Berdasarkan hasil yang didapatkan, terdapat dua jenis pengujian yaitu parametrik dan non parametrik. *Analysis of variance* (ANOVA) merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya (Ghozali, 2009). *One way* ANOVA dilakukan untuk menguji perbedaan pada tiga kelompok atau lebih berdasarkan satu variabel independen. Uji *Kruskal-Wallis* merupakan jenis uji non-parametrik yang

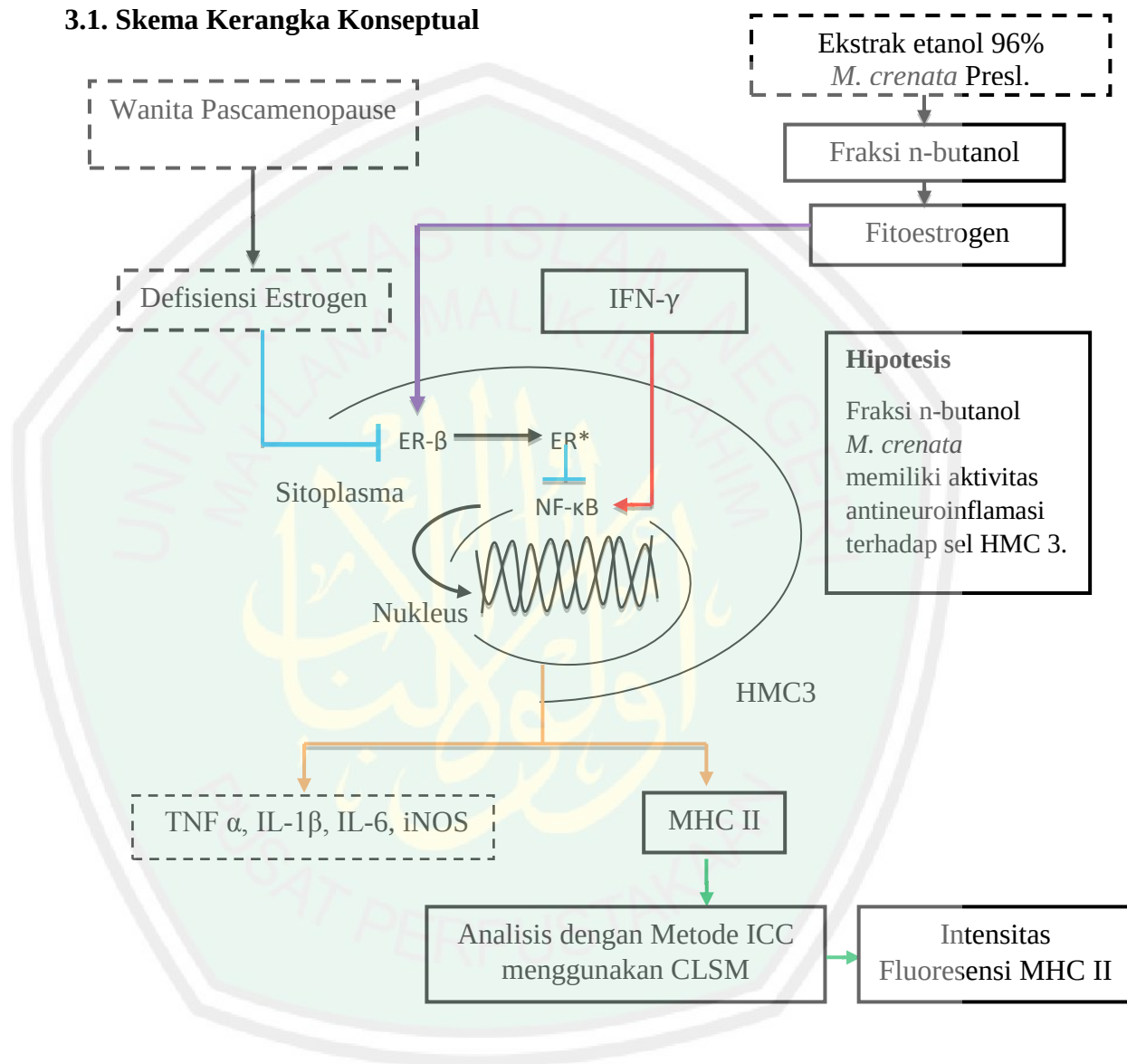
digunakan untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok data sampel. Uji *Kruskal-Wallis* digunakan ketika asumsi normalitas tidak terpenuhi atau nilai varians tidak sama. H_0 dalam uji *Kruskal Wallis* adalah bahwa k sampel berasal dari populasi yang sama (Hidayat dan Istiadah, 2011). Dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan jika signifikansi nilai kritis $< 0,05$ (H_0 ditolak).



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Skema Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

Keterangan Gambar

	= Mengaktivasi		= Masuk dan Berikatan
	= Metode Pemeriksaan		= Fokus Penelitian
	= Menghambat		= Pendukung Penelitian
	= Alur Penelitian		
	= Menghasilkan		

3.2. Uraian Kerangka Konseptual dan Hipotesis

3.2.1. Uraian Kerangka Konseptual

Masa pascamenopause terjadi penurunan produksi estrogen karena adanya kegagalan apoptosis sel dan terjadinya perubahan aktivitas estrogen pada sistem saraf yang dipengaruhi oleh peningkatan usia (Ji dan Yu, 2015). Akibatnya, tubuh akan mengalami defisiensi estrogen. Keadaan defisiensi estrogen akan menghambat *Estrogen Receptor* β (ER- β) berikatan dengan estrogen dalam tubuh yang berakibat pada penurunan *Estrogen Receptor* teraktivasi (ER*) salah satunya yang terdapat pada Sistem Saraf Pusat (SSP). Padahal, *Estrogen Receptor* teraktivasi (ER*) dapat menghambat aktivitas *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) yang berperan dalam faktor transkripsi DNA respon inflamasi (Kalaitzidis dan Gilmore, 2005). Sehingga, penurunan jumlah ER* pada sel-sel sistem saraf pusat berakibat dengan terjadinya peningkatan aktivitas NF- κ B yang dapat mempengaruhi sintesis protein salah satunya pada sel mikroglia HMC3 (Villa *et al.*, 2016).

Ekstrak etanol 96% *M.crenata* dibuat fraksi n-butanol dengan variasi dosis tertentu. Penggunaan ekstrak etanol 96% pada *M.crenata* karena berdasarkan

penelitian sebelumnya telah dilakukan profil metabolit yang menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas estrogenik pada ekstrak etanol 96% yaitu dengan senyawa mayor 4- [N-{2-[(6-Chloro-2-methyl-4-quinolinyl)amino]ethyl}N[4methoxyphenyl)sulfonyl]βalanyl)amino]3methoxyNphenylbenzamide) (Rukiana, 2018). Pada penggunaan fraksi diduga terdapat senyawa-senyawa yang sudah tergolongkan dan sederhana dibandingkan dengan penggunaan ekstrak yang masih multi compounds. Sehingga, jika dilakukan penelitian lanjutan dengan penggunaan fraksi etil asetat, aktivitas-aktivitas senyawa didalam fraksi mudah dikontrol pada proses standarisasi fraksi. Penggunaan fraksi n-butanol didasarkan pada skrining aktivitas dan penarikan senyawa isoflavon yang merupakan kelompok fitoestrogen sehingga diharapkan dapat ditarik oleh pelarut n-butanol yang bersifat polar. Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki kemiripan dalam struktur kimia dengan estrogen mamalia, estradiol dan dapat berikatan dengan reseptor-reseptor estrogen (Younes dan Honma, 2011; Rietjens *et al.*, 2013; Paterni *et al.*, 2014). Pemberian fitoestrogen pada wanita pascamenopause dapat mencegah penurunan kadar estrogen di dalam tubuh (Sirotkin, 2014).

Penelitian ini dilakukan secara *In vitro* sehingga diperlukan penggambaran keadaan defisiensi estrogen pada keadaan sebenarnya. Penggambaran tersebut pada penelitian ini menggunakan induktor berupa IFN- γ untuk mengaktifkan NF- κ B pada sel mikroglia HMC3 (ATCC, 2017). Pemberian induktor IFN- γ pada pengamatan ini cukup beralasan karena IFN- γ dapat memberikan gambaran proses terjadinya neurodegeneratif pada wanita yang mengalami pascamenopause

(Kulkarani *et al.*, 2016). Agen proinflamasi seperti IFN- γ secara patofisiologis akan memasuki mikroglia melalui *Toll Like Receptor 4* (TLR4) sehingga mengaktifkan NF κ B untuk mendekati inti sel mikroglia karena terjadi pergantian isomer senyawa protein dari monomer menjadi oligomer dan kemudian mempengaruhi sintesis protein sel (Tang dan Le, 2015; Villa *et al.*, 2016). Sintesis protein sel yang terganggu kemudian akan merubah bentukan sel dan akan mengekspresikan marker tertentu seperti Interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-8), Kemokin, sitokin (TNF α) dan *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) (Azcutia *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2015; Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016;)

Marker MHC II menjadi fokus pengamatan karena marker ini merupakan bagian dari imun spesifik yang muncul akibat terjadinya peningkatan jumlah mikroglia teraktivasi dan menjadi salah satu marker yang dapat diamati ketika terjadi keadaan neurodegeneratif (Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015; Paracha *et al.*, 2015; Matt dan Johnson, 2016). Dalam sistem imun adaptif, IFN- γ memiliki peran mengaktivasi makrofag atau mikroglia dan meningkatkan ekspresi molekul MHC II dengan berperan sebagai aktivator transkripsinya. MHC II berperan pada presentasi antigen eksogen yang mengalami fagositosis oleh APC yaitu mikroglia terhadap sel T helper. Selanjutnya antigen yang dipresentasikan tersebut akan mengaktivasi sel T helper melalui reseptornya. Sel T helper yang teraktivasi tersebut kemudian akan mensekresikan sejumlah sitokin dan interleukin untuk pengaturan respon imun (Endang, 2016). Sehingga, penggunaan MHC II dalam penelitian ini dapat menjadi gambaran awal terjadinya proses

inflamasi dalam rangkaian respon imun dalam tubuh khususnya di SSP dan diharapkan dapat mempengaruhi ekspresi dari mediator-mediator inflamasi lainnya. Pengukuran marker dapat diukur dengan melihat sinyal intensitas warna yang dihasilkan oleh MHC II dengan metode *Immunocytochemistry* (ICC) dan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Hipotesis dalam penelitian ini yaitu fraksi n-butanol *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi pada sel mikroglia HMC3 secara *in vitro* dengan menurunkan produksi marker MHC II.

3.2.2. Hipotesis Penelitian

Fraksi n-butanol *M. crenata* memiliki aktivitas antineuroinflamasi pada sel HMC3 dengan pengukuran marker MHC II menggunakan metode ICC dengan bantuan instrument CLSM.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *True experimental Post Test Only* untuk mengetahui aktivitas antineuroinflamasi fraksi n-butanol *M. crenata* Presl. terhadap sel Mikroglia HMC3 yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan tertentu (Sarwono, 2006).

4.1.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas preparasi bahan, ekstraksi bahan, fraksinasi dan uji aktivitas antineuroinflamasi fraksi n-butanol *M. crenata* Presl. terhadap sel Mikroglia HMC3 menggunakan marker MHC II dengan metode ICC dibantu Instrumen CLSM.

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2018. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Kultur dan Laboratorium *Bio Imaging* Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.3. Sampel Penelitian

4.3.1. Sampel Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah Daun *M. crenata* yang diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya dan diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang.

4.3.2. Sampel Sel

Sampel sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HMC3 yang diperoleh dari ATCC dan di kultur di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1. Variabel Penelitian

4.4.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah fraksi n-butanol dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm.

4.4.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah fluoresensi MHC II yang menunjukkan terjadinya neuroinflamasi pada sel mikroglia HMC3.

4.4.1.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu dan lama inkubasi sel, keadaan lingkungan sel dan media kultur sel.

4.4.2. Definisi Operasional

1. Populasi adalah keseluruhan dari semua variabel yang menyangkut masalah yang diteliti (Nursalam, 2003). Populasi dalam penelitian ini adalah Tanaman Semanggi yang tumbuh di Indonesia.
2. Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih dengan teknik sampling tertentu untuk bisa mewakili atau memenuhi populasi (Nursalam, 2003). Sampel pada penelitian ini adalah Tanaman Semanggi yang berasal dari desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur dan diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang.
3. Fraksi n-butanol *M. crenata* diperoleh dari proses ekstraksi menggunakan etanol 96% dengan menggunakan metode UAE. Fraksi n-butanol kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan sisa pelarut n-butanol. Hasilnya didapatkan fraksi n-butanol *M. crenata* berwarna hijau kecoklatan dan kental.
4. Sel mikroglia HMC3 dikondisikan pada keadaan inflamasi dengan menginduksikan IFN- γ pada sel. IFN- γ disekresikan oleh sel-sel yang telah mendapatkan rangsangan dari berbagai stimulus inflamasi maupun reaksi imun lainnya (Schreiber, 2003 dan Czarniecki, 2006). Peran regulasi dari IFN- γ (IFN tipe 2) dapat mengaktifkan gen MHC II, berbeda dengan IFN- α dan IFN- β (IFN tipe 1) yang dapat meregulasi ekspresi MHC I (Xu, 2003 dan Raymond, 2012).
5. Kontrol negatif adalah sel yang tidak mendapatkan perlakuan dosis fraksi
6. Kontrol positif adalah sel yang mendapatkan perlakuan isolate genistein.

7. Dosis merupakan jumlah atau takaran fraksi yang diberikan kepada objek dalam satuan atau unit tertentu.
8. ICC merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui intensitas MHC II sebagai marker yang berikatan dengan antibodi setelah ditambahkan dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC).
9. CLSM adalah instrumen yang digunakan untuk mengamati sinyal intensitas warna yang dihasilkan dari hasil ICC untuk mengetahui intensitas MHC II.
10. Fluoresensi MHC II adalah pendaran cahaya dari CLSM yang menunjukkan terjadinya neuroinflamasi pada sel mikroglia HMC3.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Preparasi Sampel

Alat-alat yang digunakan dalam proses preparasi sampel diantaranya yaitu Blender, gunting dan ayakan 60 mesh.

4.5.1.2 Analisis Kadar Air simplisia *M. crenata*

Alat-alat yang digunakan dalam analisis kadar air simplisia daun *M. crenata* yaitu *Moisture Analyzer*, timbangan analitik, cawan porselen dan spatula.

4.5.1.3 Ekstraksi Ultrasonik *M. crenata*

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi *M. crenata* yaitu neraca analitik, gelas beker, gelas ukur, labu ukur, gelas arloji, pipet tetes, pipet ukur, batang pengaduk, corong gelas, erlenmeyer, wadah maserat, cawan porselen, sendok tanduk, spatula, kertas saring, aluminium foil, *Ultrasonic bath* dan *rotary evaporator*.

4.5.1.4 Fraksinasi menggunakan Corong pisah

Alat-alat yang digunakan untuk fraksinasi yaitu corong pisah, statif, klem, gelas beaker, gelas ukur dan batang pengaduk.

4.5.1.5 Kultur sel HMC3

Alat-alat yang digunakan pada kultur sel HMC3 yaitu *Conical Tube* 15 mL, *Conical Tube* 50 mL, *Micropipet* 1000 μ L, *Flask Culture*, *Sput* 10 mL, *craper*, pipet ukur steril 5 mL, *milipore* 0,22 μ m, dan instrument-instrumen yang digunakan yaitu ThermoScientific HeraSafe KS *Bio Safety Cabinet* (BSC), ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂ *Incubator*, ThermoScientific Aquabath 18022AQ *Waterbath*, Olympus IX 71 *Inverted Microscope* dan L W *Centrifuge*.

4.5.1.6 Uji Aktivitas dengan Menggunakan metode Immunocytochemistry

Alat-alat yang digunakan yaitu 24 *micro-plate*, mikropipet 1000 μ L, *milipore* 0,22 μ m, *conical tube* 15 mL dan *conical tube* 50 mL, *eppendorf tube* steril, *coverslips* dan instrument-instrumen yang digunakan yaitu ThermoScientific HeraSafe KS *Bio Safety Cabinet* (BSC), ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂ *Incubator*, ThermoScientific Aquabath 18022AQ *Waterbath*, Olympus IX 71 *Inverted Microscope*, L W *Centrifuge* dan *Confocal Laser Scanning Microscopy* Olympus Fluoview FV1000.

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Ekstraksi Ultrasonik *M. crenata*

Bahan-bahan yang digunakan adalah *M. crenata* yang diambil di sawah daerah Benowo Surabaya. Pelarut yang digunakan yaitu Etanol 96%.

4.5.2.2 Fraksinasi menggunakan Corong pisah

Bahan-bahan yang digunakan dalam fraksinasi menggunakan corong pisah yaitu pelarut n-butanol.

4.5.2.3 Kultur HMC3

Bahan yang digunakan dalam kultur sel yaitu HMC3 yang diperoleh dari LSIH Universitas Brawijaya Malang, *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), FBS 10% dan Antibiotik *Penisilin-Streptomisin* (Pen-strep) 1%, IFN- γ , 0,25% Tripsin-0,53 mM EDTA, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Etanol 70% dan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

4.5.2.4 Uji Aktivitas dengan Menggunakan metode Immunocytochemistry

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas dengan metode ICC yaitu 4% *paraformaldehyde*, media kultur yaitu EMEM, FBS 10%, *Dimetil Sulfoksida* (DMSO), 0.2% Triton X-100, Anti-Rabbit MHC II, Antibodi sekunder Anti-Rabbit FITC, Bovine Serum Albumin (BSA) 1%, *Paraformaldehyde* (PFA) 4% dan Aluminum foil.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman akan dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang.

4.6.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan sebagai berikut ini:

1. Daun *M. crenata* dipanen dan dicuci
2. Dikeringkan dibawah sinar matahari pada jam 7-11 pagi
3. Diserbuk dan ditimbang serbuk simplisia *M. crenata*

4. Disimpan di tempat yang kering serta terlindung dari paparan sinar matahari untuk mencegah penurunan mutu dan kerusakan.

4.6.3 Analisis Kadar Air Simplisia *M.crenata*

Penentuan kadar air dalam bahan pangan dengan metode pengeringan juga dapat dilakukan dengan menggunakan *moisture analyzer*. Penggunaan *moisture analyzer* dalam penentuan kadar air lebih praktis dan lebih cepat daripada penentuan kadar air dengan menggunakan oven (Adawiyah, 2007). Dengan menggunakan *moisture analyzer*, kita dapat mengetahui persentase kadar air pada sampel secara langsung yang ditampilkan pada monitor. Analisis kadar air ini menggunakan *moisture analyzer* bermerek mettler toledo. Adapun prosedur penggunaannya yaitu sebagai berikut:

1. Dinyalakan alat *moisture analyzer*
2. Dilakukan kalibrasi dan layar menunjukkan tampilan 0,000 g
3. Penutup alat dibuka dan *sample pan* kosong dimasukan ke dalam *sample pan hadler*.
4. Penutup alat diturunkan dan secara otomatis alat akan menunjukkan tampilan 0,000 g pada layar monitor.
5. Simplisia sejumlah $\pm 0,500$ gram dimasukan ke dalam *sample pan* dan penutup alat diturunkan.
6. Kemudian secara otomatis, alat akan mengukur kadar air serbuk simplisia Semanggi.

Pengukuran selesai ditandai dengan muncul angka pada %MC pada monitor. Menurut Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor:

661/MENKES/SK/VII/1994 tentang persyaratan obat tradisional menyatakan bahwa kadar air tidak lebih dari 10%.

4.6.4 Prosedur Ekstraksi

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

1. Ditimbang serbuk simplisia *M. crenata* sebanyak 30 gram
2. Simplisia dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan 200 ml etanol 96%
3. Diatur waktu untuk proses ekstraksi menggunakan UAE yaitu 3x2 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya.
4. Hasil ekstraksi disaring
5. Residu ditambahkan kembali dengan pelarut sebanyak 2 x 150 ml disertai ulangan proses 3 dan 4.
6. Filtrat yang terkumpul dimasukkan labu *rotary evaporator*.
7. Suhu alat diatur 50°C dengan kecepatan pemutaran 70 rpm.
8. Ekstrak hasil *rotary evaporator* diuapkan kembali (dikeringkan) dalam oven pada suhu 40°C.

4.6.5 Prosedur Fraksinasi

Proses Pembuatan Fraksi dapat dilakukan dengan beberapa tahapan berikut ini:

1. ekstrak etanol 96% dilarutkan dalam air dan diaduk sampai semua ekstrak larut

2. campuran Ekstrak dan air dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:1
3. Hasil dari fraksi n-heksana disimpan dan residu yang diperoleh ditambahkan aquades kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat
4. Fraksi etil asetat disimpan dan residu yang diperoleh ditambahkan aquades kemudian ditambahkan n-butanol dalam corong pisah
5. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan n-butanol
6. Kedua lapisan tersebut dipisahkan
7. Residu air yang diperoleh difraksinasi kembali menggunakan n-butanol dengan langkah yang sama seperti sebelumnya
8. Selanjutnya fraksi n-butanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*
9. Fraksi n-butanol yang diperoleh ditimbang dan dihitung nilai rendemen.

4.6.6 Kultur Sel HMC3

Kultur sel HMC3 dilakukan sebagai berikut:

1. Dilakukan pemanasan *vial cell* dengan *waterbath* $37^{\circ}\text{C}/ \leq 2$ menit.
2. Dipindahkan 5 mL media dengan spuit dalam *Conical Tube*.
3. Jarum diganti filter $0,22\ \mu\text{m}$ dan dipindahkan ± 2 mL ke *Conical Tube*.
4. Dipindahkan sel dengan *micropipet* ke *Conical Tube*.
5. Ditambahkan 3 mL media tersisa ke *Conical Tube*.
6. Di *mix gentle* dan disentrifugasi 800 rpm/7 menit
7. Dibuang supernatan dan diambil *pellet* sel.

8. Dipindahkan ± 2 mL ke *Conical Tube*.
9. Dimasukkan *pellet* kedalamnya dan ditambahkan ± 3 mL media.
10. Dipindah campuran media dan sel dari *Conical Tube* ke *flask culture*.
11. Diberi label (nama sel, tanggal kerja).
12. Diamati dengan mikroskop *inverted*.
13. Diinkubasi dengan suhu $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5%.

4.6.7 Pembuatan Sampel

Pembuatan larutan sampel induk fraksi n-butanol 5000 ppm dilakukan sebagai berikut ini:

1. Ditimbang 50 mg sampel fraksi n-butanol *M. crenata*
2. Ditambahkan 50 μl 0,5% Tween 80 dan DMSO 0,5% (b/v) 1 ml kemudian diaduk homogen.
3. Dimasukkan fraksi dalam labu ukur dan ditambahkan DMSO 0,5% (b/v) sampai 10 ml.
4. Larutan sampel difiltrasi menggunakan 0.22 μl Millipore
5. Disimpan dalam tabung steril dan diencerkan larutan induk dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm.

4.6.8 Uji Aktivitas dengan Menggunakan metode *Immunocytochemistry*

Langkah pengujian aktivitas dengan menggunakan metode ICC yaitu sebagai berikut:

1. Ditanam sel pada 24 *well-microplate* dan diberi label kemudian diinkubasi $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ 5%.

2. Dilakukan pemberian larutan IFN- γ untuk mengaktivasi sel dengan dosis 10 ng/ml dan kemudian diinkubasi 37°C/CO₂ 5% selama 24 jam.
3. Diberikan perlakuan fraksi n-butanol *M. crenata* dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm serta perlakuan untuk kontrol positif dengan pemberian genistein dalam 24-micro-plate dan diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C/CO₂ 5%.
4. Sel setelah 24 jam, kemudian difiksasi dengan PFA 4% selama 10 menit
5. Dicuci sel dengan PBS dan ditambahkan TritonX-100 untuk permeabilitas membran selama 10 menit
6. Dicuci dengan PBS dan ditambahkan dengan *blocking buffer* 1 % BSA selama 30 menit
7. Dibuang larutan BSA dan dimasukkan antibodi primer Anti-Rb MHC II selama 24 jam dalam suhu 4°C.
8. Dicuci PBS dan ditambahkan antibodi sekunder Anti-Rb FITC selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBS.
9. Diamati sel pada CLSM pada panjang gelombang 488 nm dengan cara diambil *coverslip* dalam 24 well-microplate dan diletakkan dikaca preparat secara terbalik kemudian ditetaskan sedikit PBS

4.7 Analisis Data

Dilakukan analisis data statistik untuk mengetahui nilai intensitas dari fraksi yang telah diuji aktivitas. Jenis data dalam penelitian ini adalah Rasio yaitu data bersifat angka (titik nol) dalam arti yang sesungguhnya, sehingga termasuk

dalam data Parametrik. Dalam uji parametrik dilakukan analisis data dengan cara sebagai berikut (Dahlan, 2014):

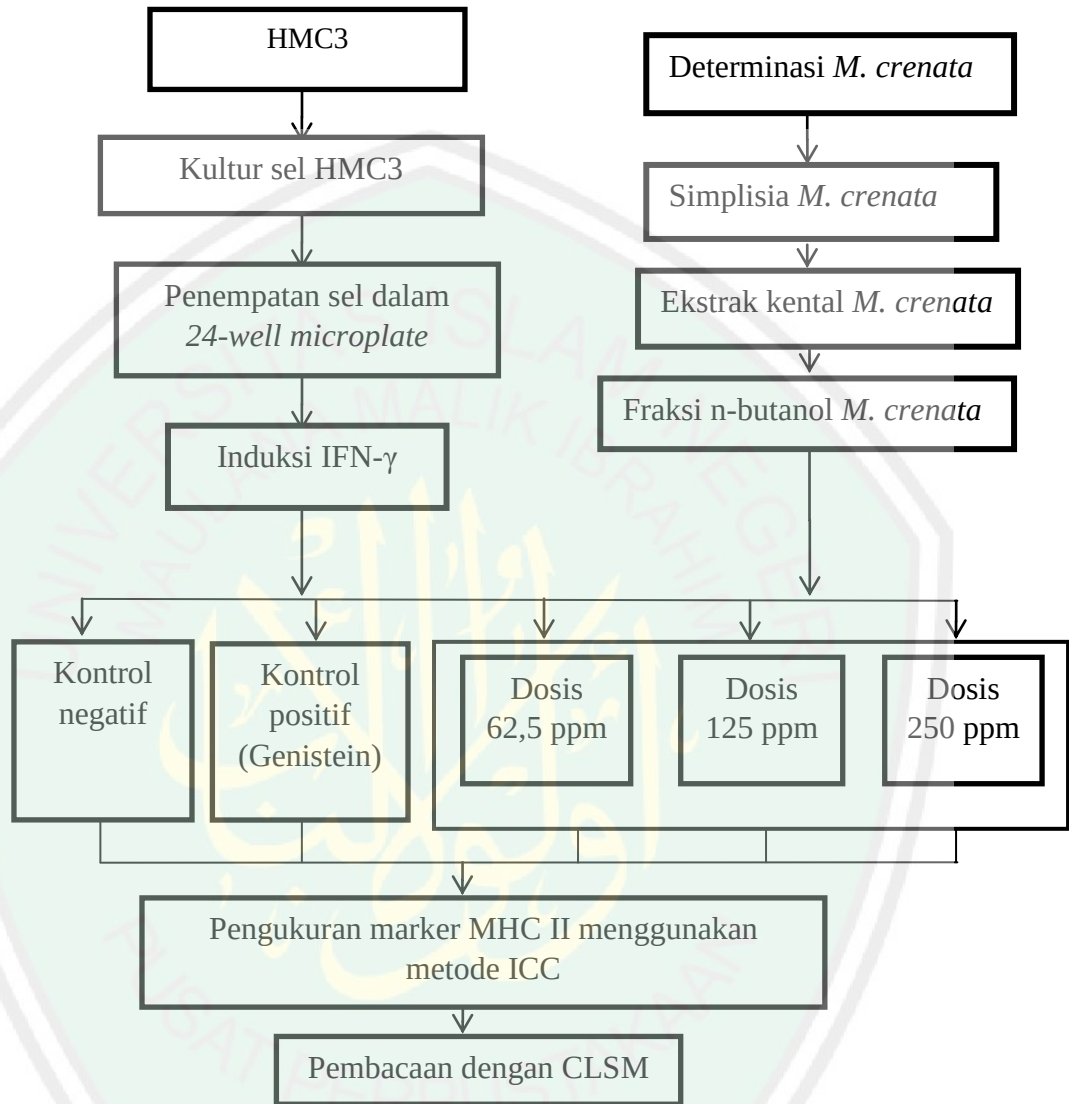
1. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi 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.
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. Namun, jika tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*.
3. Uji Korelasi : bertujuan untuk mengetahui hubungan antara variable bebas dengan variable terikat dan tingkat kekuatan korelasinya. Jika data memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas, maka uji korelasi yang digunakan yaitu pearson. Namun, jika tidak memenuhi uji normalitas dan homogenitas maka uji korelasi yang digunakan yaitu uji korelasi non parametrik menggunakan *Spearman Rho*.
4. Uji LSD : bertujuan 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 panalisa dapat dilanjutkan dengan uji probit.

5. Uji Probit dilakukan untuk mengetahui ED_{50} dari data yang memberikan aktivitas penurunan MHC II dan peningkatan flouresensi sebesar 50% terhadap sel uji.



4.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman dan Preparasi Sampel

Daun *M.crenata* yang digunakan pada penelitian diambil dan dipanen dari persawahan di daerah Benowo, Kota Surabaya, Jawa Timur pada bulan September 2017 dan diidentifikasi di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur (Putra, 2018). Identifikasi tumbuhan merupakan suatu cara agar dapat memastikan bahwa tumbuhan tersebut benar sesuai dengan jenis dan familinya, metode yang digunakan dengan menggunakan kunci determinasi dimana setiap tumbuhan akan digolongkan secara bertahap dari kindom hingga spesies (Abidin, 2006; Zulkifli, 2009). Hasil identifikasi daun *M.crenata* sebagai berikut: 1a-17b-18a-1 (Putra, 2018).

Daun yang diperoleh kemudian dibuat dalam bentuk serbuk simplisia untuk mengurangi ukuran dari bahan sehingga lebih mudah dikerjakan dalam tahapan selanjutnya seperti dalam proses penyarian senyawa aktif (ekstraksi) (Banu dan Catherine, 2015). pembuatan serbuk dilakukan di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur (Putra, 2018).

Tabel 5.1 Jumlah Daun *M.crenata* (Putra, 2018)

Daun <i>M.crenata</i>	Berat
Daun <i>M.crenata</i> basah	4 kg
Daun <i>M.crenata</i> kering	1,8 kg
Serbuk Daun <i>M.crenata</i> kering	1,7 kg

5.2 Analisis Kadar Air Simplisia *M. crenata*

Analisis kadar air adalah uji yang dilaksanakan untuk mengetahui nilai kadar air yang terkandung dalam simplisia yang diuji. Semakin kecil nilai kadar air suatu simplisia maka efektifitas penarikan senyawa aktif oleh pelarut semakin tinggi. Kadar air yang aman untuk suatu bahan kering adalah 10-12% dan kadar air yang baik adalah dibawah 10% (Dirjen POM,2000). Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan *moisture analyzer*. Penggunaan *moisture analyzer* dalam penentuan kadar air lebih praktis dan lebih cepat daripada penentuan kadar air dengan menggunakan oven (Adawiyah, 2007).

Hasil yang didapat dari pengukuran nilai kadar air terhadap simplisia kering daun *M.crenata* menggunakan *moisture content analyzer* adalah adalah 8,6% (tabel 5.2), nilai tersebut menunjukkan bahwa serbuk simplisia daun *M.crenata* memiliki nilai kadar air yang baik yaitu dibawah 10%. Hal ini dikarenakan proses pengeringan yang dilakukan secara optimal, serta penyimpanan serbuk yang disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak terkena sinar matahari langsung (Putra, 2018).

Tabel 5.2 Nilai kadar air serbuk simplisia kering daun *M.crenata*

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

5.3 Prosedur Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* dilakukan dengan menggunakan metode ultrasonik. Salah satu metode ekstraksi ini menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-20.000 kHz dan memiliki kemampuan yang dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga timbul fraksi interfase (Ma'arif, 2012; Banu dan Catherine, 2015; Medina-Torres *et al.*, 2017).

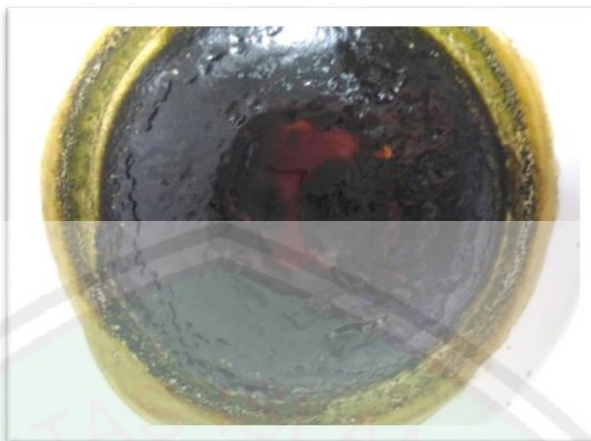
Proses pertama yang dilakukan yaitu dengan menimbang simplisia sebanyak 30 gram yang akan dilarutkan dalam 500 ml etanol 96%. Jumlah tersebut didasarkan dalam perbandingan simplisia dengan pelarut yang digunakan yaitu 1:16 (b/v). Pemilihan perbandingan tersebut dikarenakan untuk efisiensi simplisia dan pelarut yang digunakan. Alasan pemilihan pelarut etanol 96% yaitu karena pelarut tersebut merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa polar dan nonpolar serta aman digunakan terutama dalam pembuatan ekstrak bahan baku sediaan *herbal medicine* (Arifianti *et al.*, 2014).

Daun *M.crenata* yang telah dilarutkan dalam pelarut etanol 96% kemudian diultrasonikasi selama 3x2 menit, hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan hasil ekstrak. Alasan penggunaan metode ekstraksi ultrasonik yaitu dapat meningkatkan hasil dari senyawa target, tergolong ekstraksi yang selektif, efisien dalam waktu pengerjaan dan mampu mencegah degradasi panas selama proses berlangsung yang disebabkan adanya pengadukan ekstrak dan transfer energi yang efektif (Azmir *et al.*, 2013; Ngaha Njila *et al.*, 2017). Hal tersebut berkaitan dengan proses terjadinya mekanisme ekstraksi metode ini yang diawali dengan terjadi

perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitasi. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Escalapez *et al.*, 2011; Mukhairini, 2014; Sani *et al*, 2014).

Setelah proses ekstraksi selesai, akan diperoleh filtrat yang selanjutnya dilakukan proses penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dengan residunya. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada pengaturan suhu 50°C dengan kecepatan putaran 70 rpm dan tekanan 175 Psi. Hal ini dilakukan untuk memperoleh ekstrak yang pekat dan memisahkan senyawa aktif dari pelarut yang digunakan. Sesuai dengan dengan prinsip kerja dari *rotary evaporator* yaitu metode pemisahan pelarut dengan ekstrak menggunakan prinsip penurunan tekanan dengan percepatan putaran labu bulat dengan pemanasan sehingga pelarut dapat menguap pada suhu dibawah titik didih pelarut sehingga senyawa tidak ikut rusak (Nisa *et al*, 2014).

Proses pemisahan pelarut menggunakan *rotary evaporator* dihentikan apabila pelarut sudah tidak lagi menetes pada labu alas bulat penampung pelarut. Selanjutnya filtrat yang telah dipisahkan dari pelarut dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C sampai diperoleh hasil ekstrak kental.



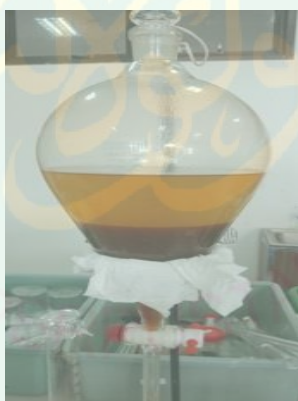
Gambar 5.1 Hasil ekstrak kental etanol 96% daun *M.crenata*

5.4 Prosedur Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik dan dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar dan polar (Soebagio *et al.*, 2007). Proses Pembuatan Fraksi dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair menggunakan corong pisah. Prinsip metode fraksinasi cair-cair menggunakan corong pisah yaitu didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Sebagian komponen larut dalam fase pertama dan sebagian larut dalam fase kedua (Khopkar, 2008). Pemilihan metode fraksinasi cair-cair menggunakan corong pisah ini dikarenakan penggunaannya yang sederhana dan memiliki selektifitas yang tinggi dalam proses pemisahan berdasarkan tingkat kepolarannya.

Tahapan awal dimulai dari ekstrak etanol 96% sebanyak 70 gram dilarutkan terlebih dahulu dalam air yaitu 10 gram dalam 100 ml air dan diaduk

perlahan sampai semua ekstrak larut, dan diulangi hingga ekstrak habis dengan perbandingan yang sama. Hal ini dilakukan untuk membentuk 2 fase sehingga dapat mempercepat proses partisi ketika dilakukan fraksinasi dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran ekstrak etanol 96% dan air dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:1, dimana volume pelarut n-heksana sebanyak 700 ml. Proses fraksinasi dilakukan dengan pengocokan corong pisah selama 15 menit dan kemudian didiamkan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Hasil dari fraksi n-heksana berada di lapisan atas karena memiliki massa jenis ($0,655 \text{ g/cm}^3$) yang lebih kecil daripada massa jenis air ($0,997 \text{ g/cm}^3$). Selanjutnya hasil fraksi n-heksana disimpan dan fase air ditambahkan n-heksana 700 ml kemudian difraksinasi lagi di dalam corong pisah.



Gambar 5.2 Proses fraksinasi n-Butanol dalam corong pisah

Proses fraksinasi berlanjut sampai fase air terlihat bening, selanjutnya difraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda dengan fase air yang diperoleh ditambahkan 700 ml Etil Asetat dalam corong pisah dan dilakukan pengocokan corong pisah selama 15 menit dan kemudian didiamkan corong pisah sampai

terbentuk 2 lapisan. Hasil dari fraksi Etil Asetat berada di lapisan atas karena memiliki massa jenis ($0,902 \text{ g/cm}^3$) lebih kecil daripada massa jenis air. Hasil Fraksi Etil Asetat disimpan dan fase air ditambahkan Etil Asetat 700 ml kemudian difraksinasi lagi di dalam corong pisah. Perlakuan ini berlanjut sampai residu terlihat bening dan dilanjutkan fraksinasi menggunakan pelarut n-Butanol. Penggunaan fraksi n-butanol didasarkan pada skrining aktivitas dan golongan fitoestrogen yang merupakan kelompok senyawa isoflavon sehingga diharapkan dapat ditarik oleh pelarut n-butanol yang bersifat polar. Fase air ditambahkan pelarut n-Butanol sebanyak 700 ml dan dilakukan pengocokan selama 15 menit, kemudian didiamkan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Hasil dari fraksi n-Butanol berada di lapisan atas karena memiliki massa jenis ($0,81 \text{ g/ml}$) lebih kecil daripada massa jenis air. Hasil dari fraksi n-Butanol disimpan dan fase air ditambahkan n-Butanol 700 ml kemudian difraksinasi lagi di dalam corong pisah. Perlakuan ini berlanjut sampai fase air terlihat bening. Setelah bening, proses fraksinasi dihentikan dan fraksi n-Butanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* kemudian dimasukkan dalam oven untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa dan memekatkan fraksi. Fraksi yang pekat kemudian ditimbang dan dihitung nilai rendemennya.



Gambar 5.3 Fraksi n-Butanol

Tabel 5.3 Tabel berat ekstrak, fraksi dan % rendemen fraksi n-Butanol *M.crenata*

Berat Ekstrak awal	70 gram
Berat Fraksi	5,9733 gram
% Rendemen (b/b)	8,5332%

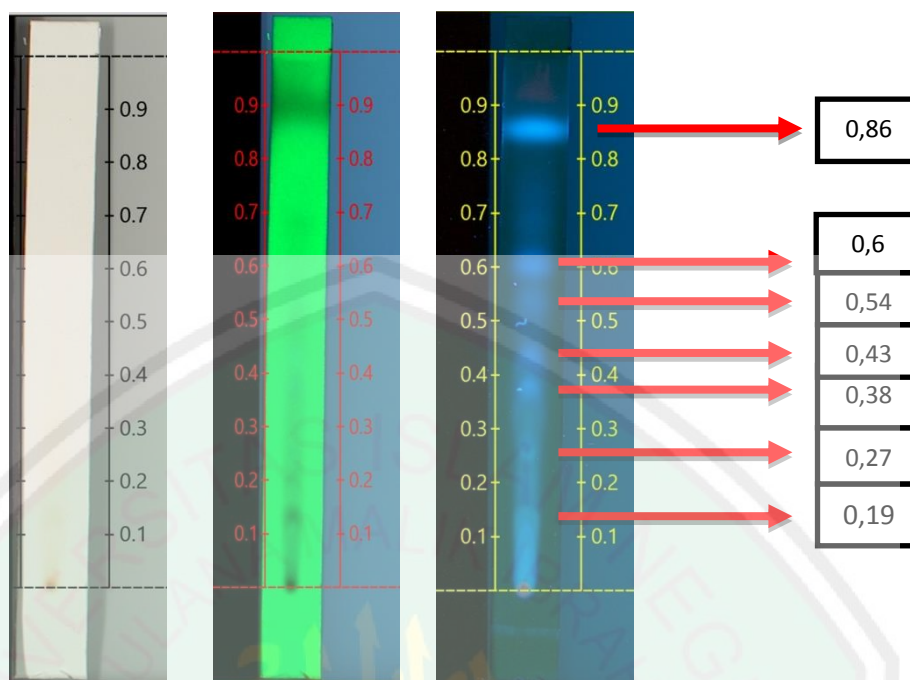
5.5 Identifikasi senyawa dengan KLT

Identifikasi senyawa dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi n-butanol daun *M. crenata*. Identifikasi senyawa dilakukan menggunakan KLT yang divisualisasikan dengan menggunakan TLC *Visualizer*. Prinsip kerja dari KLT yaitu adsorpsi dan partisi pada sampel yang dipisahkan berdasarkan perbedaan polaritas antara fase gerak dan fase diam (Dirjen POM, 1979).

Tahapan pertama yaitu fraksi n-Butanol dari daun *M. crenata* ditotolkan pada plat silica gel F_{254} dengan ukuran plat 1,5 x 10 cm menggunakan pipa

kapiler 2 μ L. Selanjutnya plat dimasukkan kedalam chamber yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan. Fase gerak yang digunakan berdasarkan hasil optimasi yaitu n-Butanol dan Air dengan perbandingan 1:1 sebanyak 10 ml. Plat dieluasi dalam chamber sampai fase gerak naik hingga tanda batas pada plat. Plat yang telah dieluasi dikeluarkan dalam chamber dan dilakukan pengamatan menggunakan *TLC Visualizer* pada lampu cahaya putih, lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui dan mengidentifikasi spot yang dihasilkan dari pemisahan senyawa dalam plat yang telah dieluasi, sehingga dapat diketahui golongan-golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi n-Butanol daun *M. crenata*.

Tahapan selanjutnya, setelah dilakukan pengamatan, plat disemprot dengan penampak noda H₂SO₄ 10% di lemari asam dan dipanaskan diatas *TLC Heater* dengan suhu 105°C selama 5 menit. Penggunaan H₂SO₄ sebagai penampak noda karena bersifat reduktor yang dapat memutuskan ikatan rangkap sehingga panjang gelombang bertambah dan warna noda dapat terlihat. Selain itu juga gugus OH pada H₂SO₄ berfungsi sebagai ausokrom yang menyebabkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang pada cahaya tampak (Gandjar, 2007). Setelah dilakukan penyemprotan dan pemanasan pada plat, kemudian diamati kebalikan dengan *TLC Visualizer* dengan menggunakan lampu cahaya putih dan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm.



Keterangan : 1 : Visualisasi plat KLT pada cahaya putih
 2 : Visualisasi plat KLT pada lampu UV panjang Gelombang 254 nm
 3 : Visualisasi plat KLT pada lampu UV panjang Gelombang 366 nm

Gambar 5.4 Visualisasi Identifikasi senyawa dengan *TLC Visualizer*

Hasil pengamatan pada plat KLT menggunakan *TLC Visualizer* diperoleh terdapat 7 titik spot warna yang muncul dan dapat diidentifikasi, rincian data tertera pada tabel berikut ini:

Tabel 5.4 Rincian Profil KLT Fraksi n-Butanol daun *M. crenata*

Fraksi	No	Rf	Warna	Golongan
Fraksi n-Butanol daun <i>M. crenata</i>	1	0,86	Biru	Flavonoid
	2	0,6	Biru	Flavonoid
	3	0,54	Biru	Flavonoid
	4	0,43	Biru	Flavonoid
	5	0,38	Biru	Flavonoid
	6	0,27	Biru	Flavonoid
	7	0,19	Biru	Flavonoid

Flavonoid mengandung fenol dan gugus asam karboksilat yang membentuk zona fluoresensi berwarna biru (Wagner, 1996). Spot warna yang muncul bergantung dari beberapa jenis flavonoid. Pada sinar UV 366 nm dengan noda fluoresensi biru muda hingga biru tua merupakan jenis flavonoid isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas (Markham, 1988).

5.6 Kultur Sel HMC3

Sel HMC3 yang datang dari ATCC pada perlakuan pertama dilakukan thawing sel. Thawing sel merupakan proses penumbuhan sel yang sebelumnya dibekukan. Sel di bekukan untuk penyimpanan yang lama, sehingga untuk menumbuhkannya lagi perlu dilakukan proses thawing sel.

Tahapan thawing sel dilakukan dengan dipanaskan *vial cell* dengan *waterbath* $37^{\circ}\text{C}/ \leq 2$ menit. Alasan pemanasan ini yaitu untuk mencairkan sel yang sebelumnya dibekukan sehingga dapat ditumbuhkan kembali. Setelah sel dalam vial terlihat mencair dipindahkan sel dengan *micropipet* ke dalam *conical tube* yang telah berisi media dan di *mix gentle*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm dengan waktu 7 menit. Hal ini berfungsi untuk memisahkan sel dari residunya. Selanjutnya, dibuang supernatan dan diambil *pellet* sel yaitu lapisan paling bawah, kemudian dimasukkan dalam *conical tube* yang telah berisi media steril. Campuran media dan sel dari *conical tube* dipindahkan ke dalam *flask culture* dan selanjutnya diberi label yaitu nama sel dan tanggal thawing kemudian diamati di mikroskop *inverted* untuk memastikan bahwa sel tidak terkontaminasi bakteri. Selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C dengan CO_2 5%. Setelah sel konfluen 70-85%, sel siap dipanen (pasase). Konfluen 70-85%

berarti bahwa sel telah tumbuh menyebar dan seluruh media yang ada dalam *flash culture* telah ditumbuhi oleh sel. Pasase merupakan panen sel dimana sel kemudian ditumbuhkan menjadi 2 flask. Penggantian media dilakukan jika media di dalam *flash culture* mengalami perubahan warna dari merah menjadi orange. Hal itu menunjukkan bahwa nutrisi di dalam media telah habis dan harus di ganti dengan media baru untuk kebutuhan nutrisi pada sel.



Gambar 5.5 gambar sel HMC3 yang telah konfluen 70-85%

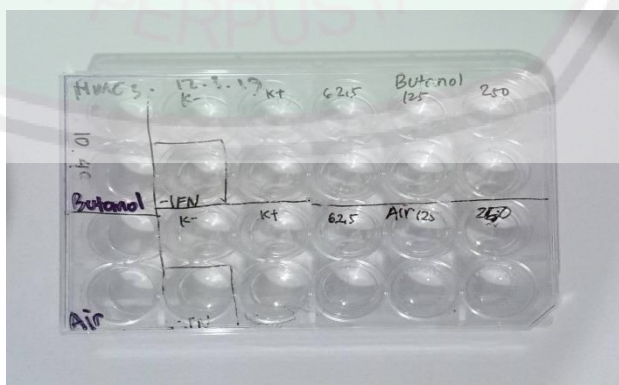
5.7 Uji Aktivitas Antineuroinflamasi metode *Immunocytochemistry*

Pembuatan sampel fraksi n-Butanol daun *M.crenata* dilakukan dengan membuat larutan induk sebesar 5000 ppm yaitu dengan ditimbang 50 mg fraksi n-Butanol dalam gelas beker kemudian ditambahkan 50 μ L tween 80 untuk meningkatkan kelarutan fraksi, diaduk dengan batang pengaduk dan selanjutnya ditambahkan 1 mL DMSO 0,5% sebagai pelarut kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dimasukkan fraksi n-Butanol tersebut ke dalam labu ukur dan ditambahkan DMSO ad 10 ml dalam labu ukur, dihomogenkan kemudian dipindahkan larutan fraksi n-Butanol 5000 ppm dalam *conical tube*. Setelah itu, disterilkan fraksi dengan menggunakan mikrofilter dan dipindahkan di *conical*

tube steril. Fraksi n-Butanol 5000 ppm kemudian diencerkan dan dilakukan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm.

Kontrol Positif digunakan yaitu Genistein yang merupakan salah satu kelompok fitoestrogen yang telah diketahui dan memiliki aktivitas estrogenik. Genistein yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan konsentrasi 50 mM.

Perlakuan sel dilakukan dengan terlebih dahulu diambil media dalam *flask culture* kemudian dicuci *flask culture* dengan PBS sebanyak 2 kali. PBS berfungsi sebagai larutan buffer yang dapat mempertahankan pH dan osmolaritas. Selanjutnya ditambahkan Tripsin-EDTA 2 mL yang berfungsi untuk melepaskan sel yang menempel didasar flask dan dihomogenkan perlahan kemudian dilakukan *scraper* selama 2 menit sehingga sel yang menempel ikut terangkat. Selanjutnya ditambahkan media 5 mL dalam *flask* dan dipindahkan dalam *conical tube*, kemudian disentrifugasi 800 rpm selama 7 menit, yang berfungsi untuk memisahkan sel (*pellet*) dengan residunya (*supernatan*). Selanjutnya, dibuang *supernatan* dan diambil *pellet* sel kemudian ditambahkan media 6 mL ke dalam *pellet* sel, ditanam pada 24 well plate dan diberi label nama fraksi.



Gambar 5.6 Plating fraksi n-Butanol

Sel HMC3 di induksi IFN- γ untuk memberikan gambaran terjadinya neuroinflamasi. Induksi IFN- γ dapat mengaktifkan sel HMC3 pada dosis 10 ng/ml dalam masing-masing well plate selama 24 jam (ATCC, 2017). Pemberian induktor IFN- γ dalam penelitian ini cukup beralasan karena dalam sistem imun, IFN- γ berperan sebagai aktivator makrofag dalam hal ini sel mikroglia HMC3 untuk memperkuat respon imunitas dalam tubuh (Endang, 2016). Plate dikeluarkan dari inkubator kemudian media diambil dari plate yang selanjutnya diberikan IFN- γ pada masing-masing well plate dan diinkubasi kembali dalam inkubator 37°C dengan CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan penambahan fraksi n-Butanol dalam 24-well plate dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm dan diinkubasi dalam inkubator 37° C dengan CO₂ 5% selama 24 jam.

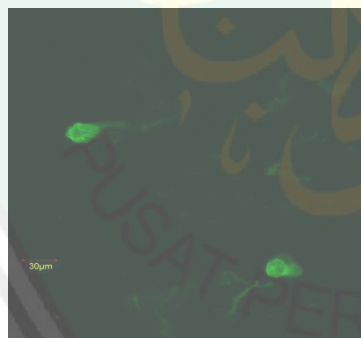
Perlakuan selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan metode ICC dengan menggunakan antibodi primer dan antibodi sekunder yang berikatan secara spesifik terhadap protein target dalam sel. Antibodi primer memungkinkan visualisasi protein setelah berikatan lebih lanjut dengan antibodi sekunder yang sudah terkonjugasi dengan gugus fluorochrome dimana salah satunya adalah FITC (Ma'arif *et al.*, 2018). Metode ICC dipilih dalam penelitian ini karena metode tersebut dapat mengevaluasi keadaan sel dengan mengekspresikan antigen yang diinginkan dalam hal ini MHC II (Taylor dan Rudbeck, 2013). Adapun prosesnya yaitu terlebih dahulu sel dalam well plate di fiksasi dengan PFA 4% yaitu dengan mengeluarkan well plate dari inkubator dan diambil media dalam well plate kemudian dicuci PBS sebanyak 2 kali, ditambahkan PFA 4% sebanyak

250 μ L dalam masing-masing well plate kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak 2 kali dan ditambahkan PBS 200 μ L dan selanjutnya diinkubasi dalam suhu 4°C. Fungsi fiksasi dalam hal ini yaitu untuk menghentikan metabolisme sel dan mengawetkan sel HMC3 sehingga dapat mencegah kerusakan sel maupun protein yang ada didalamnya.

Tahapan selanjutnya yaitu pewarnaan dengan penambahan antibodi. Pewarnaan pertama yaitu penambahan antibodi primer dengan tahapan well plate dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan 0,1% Triton X-100 dalam PBS. Fungsi penggunaan 0,1% Triton X-100 yaitu untuk permeabilitas sel yang dapat membantu proses lisis sel dengan cara menghilangkan molekul-molekul lipid sehingga, dapat merusak dinding sel. Hal tersebut bertujuan agar protein-protein yang ada di dalam sel dapat terwarnai dengan baik. Selanjutnya dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali dan kemudian diinkubasi dengan 1% BSA dalam PBS 30 menit. Penggunaan 1% BSA sebagai *blocking buffer* yang digunakan sebelum pemberian antibodi untuk mendeteksi antigen atau protein spesifik. Sehingga, dapat mencegah protein non spesifik yang berkompetisi dalam mengikat antibodi yang akan diberikan. Selanjutnya dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya, diinkubasi dengan antibodi primer (Anti-Rb MHC II) 300 μ L/well dengan perbandingan 1:200 selama 24 jam. Penggunaan antibodi primer berfungsi untuk mengikat protein MHC II dalam sel. Setelah 24 jam, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan diinkubasi dengan antibodi sekunder (Anti-Rb FITC) 300 μ L/well dengan perbandingan 1:500 selama 1 jam dalam ruangan gelap. Penggunaan antibodi sekunder berfungsi untuk mengikat antibodi

primer yang telah terkonjugasi dengan *fluorescein* FITC sehingga protein target dapat berfluoresensi dan diamati dibawah mikroskop fluoresensi.

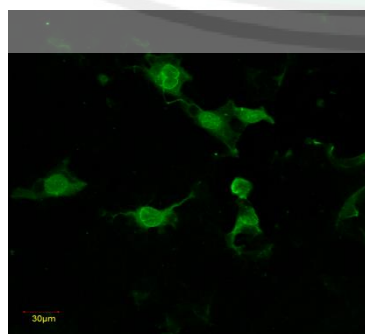
Pengamatan sel dilakukan menggunakan instrument CLSM yaitu jenis mikroskop fluorosensi yang memiliki keunggulan kedalaman fokus yang tinggi dan dapat menyajikan gambar tiga dimensi dengan bantuan fokus dari komputer dengan pendar sampel setelah dikenai laser dengan panjang gelombang tertentu (Lattante *et al.*, 2014). Tahapan pengamatannya yaitu diambil *coverslip* dalam well plate. Fungsi dari *Coverslip* yaitu sebagai tempat menempelnya sel. Selanjutnya diletakkan dikaca preparat secara terbalik kemudian ditetaskan sedikit PBS dan diamati menggunakan CLSM. Pengamatan dilakukan berurutan yaitu perlakuan dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm, Kontrol negatif dan Kontrol positif.



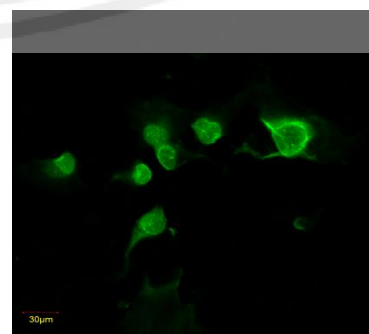
A



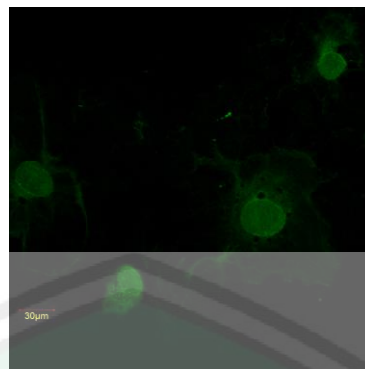
B



C



D



E

Gambar 5.7 Intensitas Fluoresensi MHC II pada sel Mikroglia HMC3 (A). Kontrol negatif (B). Kontrol Positif (C). 62,5 ppm (D). 125 ppm (E). 250 ppm.

Gambar di atas menunjukkan hasil pengamatan sel HMC3 menggunakan instrument CLSM. Terlihat bahwa terdapat warna hijau yang mengartikan pendaran warna dari protein MHC II dalam sel HMC3. Semakin pekat warna hijau maka semakin banyak MHC II yang ada dalam sel HMC3 sehingga sel tersebut sedang mengalami neuroinflamasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan neuroinflamasi pada sistem saraf secara spesifik dapat muncul karena terjadinya kenaikan mikroglia teraktivasi sehingga meningkatkan ekspresi marker spesifik seperti MHC II yang kemudian memicu munculnya mediator peradangan lainnya (Jantaratnotai *et al.*, 2013; Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015).

Pada gambar terlihat bahwa pendaran warna Kontrol negatif memiliki pendaran yang kuat dan Kontrol Positif memiliki pendaran warna yang lemah. Hal ini membuktikan bahwa Kontrol positif memiliki sedikit kandungan MHC II pada sel mikroglia HMC3 akibat pemberian larutan genistein sebagai salah satu kelompok fitoestrogen, sedangkan untuk kontrol negatif memiliki pendaran warna yang kuat yang artinya mengandung banyak MHC II. Hal ini sejalan karena pada

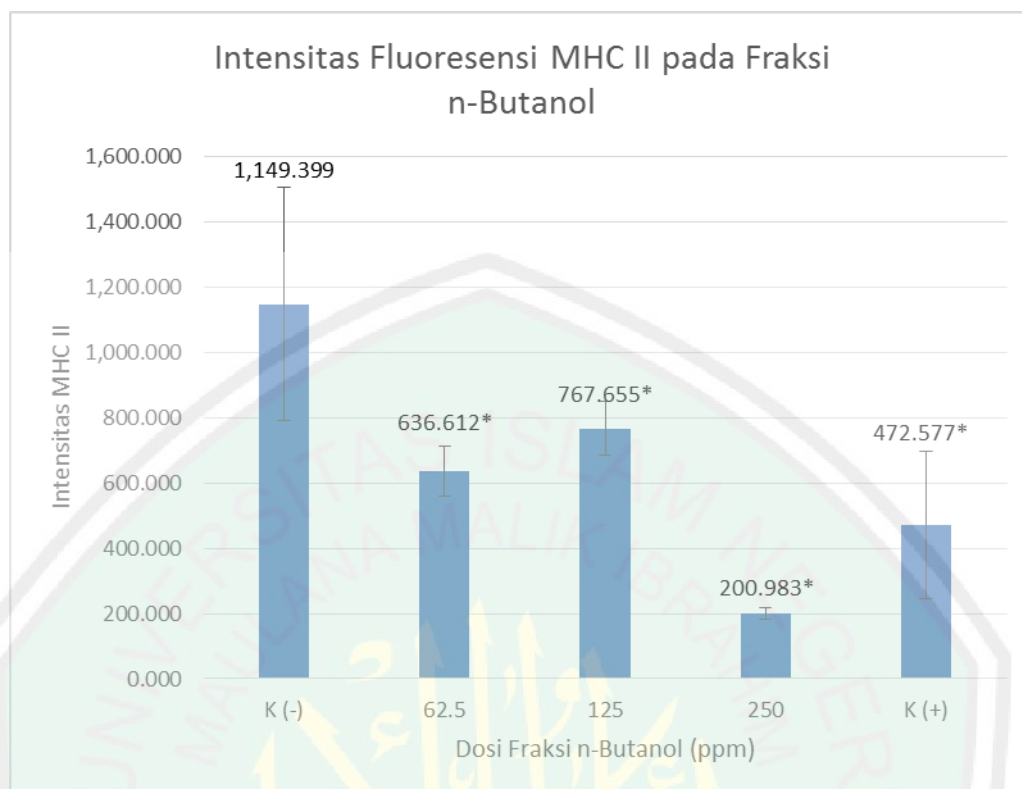
kontrol negatif tidak diberikan perlakuan apapun, sehingga sel mikroglia HMC3 tetap dalam keadaan aktif yang banyak mengekspresikan protein proinflamasi yaitu MHC II. Pada kelompok perlakuan menggunakan fraksi n-Butanol yaitu pada dosis 62,5 ppm dan 125 ppm pendaran warna masih kuat meskipun tidak sekuat kontrol negatif, namun pada dosis 250 ppm pendaran warna lemah yang dapat diartikan bahwa pada dosis 250 ppm kandungan MHC II lebih sedikit dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

Tabel 5.5 Intensitas fluoresensi MHC II pada Fraksi n-Butanol

Dosis Perlakuan	Intensitas dari MHC II (AU) $\pm$ SD
Kontrol positif	472.577 $\pm$ 226.701
Kontrol negative	1,149.399* $\pm$ 355.810
Dosis 62,5 ppm	636.612 $\pm$ 77.005
Dosis 125 ppm	767.655 $\pm$ 83.159
Dosis 250 ppm	200.983 $\pm$ 17.309

Keterangan : *p < 0.05

Untuk mempermudah pembacaan tabel 5.4 dapat dibuat grafik Intensitas MHC II pada tiap dosis perlakuan terhadap sel uji.



Keterangan : *p < 0.05

Gambar 5.8 Intensitas MHC II terhadap kontrol negatif pada Fraksi n-Butanol

Berdasarkan kedua grafik di atas dapat diketahui bahwa pada perlakuan dengan fraksi n-Butanol terhadap kontrol negatif (Gambar 5.7) terlihat adanya penurunan intensitas fluoresensi MHC II seiring meningkatnya dosis dan memiliki perbedaan signifikan dari kelompok perlakuan dengan fraksi terhadap kontrol negatif. Hal itu berarti bahwa pemberian fraksi memiliki potensi penyembuhan sebagai efek antineuroinflamasi terhadap sel dibandingkan dengan kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan apapun. Perlakuan dengan fraksi n-Butanol terhadap kontrol positif juga terlihat bahwa terdapat penurunan intensitas fluoresensi MHC II dan pada dosis 62,5 ppm, 250 ppm tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kontrol positif. Hal tersebut berarti bahwa semua

kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi memiliki potensi yang serupa dengan kontrol positif sebagai efek antineuroinflamasi.

5.8 Analisis Data Fluoresensi MHC II

Analisis data terhadap hasil yang didapat dari dari ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3 metode *immunocytochemistry* (ICC) dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan suatu data dinyatakan dalam (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95% dari *software* IBM SPSS Statistic 24. Nilai uji normalitas dan homogenitas akan menentukan uji komparasi dan uji korelasi yang akan digunakan.

Uji normalitas dilakukan untuk menguji apakah dalam model regresi variabel independen dan variabel dependen atau keduanya mempunyai distribusi normal atau tidak. Apabila variabel tidak berdistribusi secara normal maka hasil uji statistik akan mengalami penurunan (Ghozali, 2016). Uji normalitas data dapat dilakukan dengan menggunakan *Shapiro-Wilk* yaitu dengan ketentuan apabila nilai signifikan diatas 0,05 maka data terdistribusi normal. Sedangkan jika hasil *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai signifikan dibawah 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Berikut data hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* ditunjukan pada tabel 5.5 sebagai berikut :

Tabel 5.6 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Signifikansi
Kontrol Negatif	0,529
Kontrol Positif	0,471
Dosis 62,5 ppm	0,245
Dosis 125 ppm	0,362
Dosis 250 ppm	0,411

Berdasarkan data pada tabel 5.5 diperoleh nilai signifikansi pada keempat kelompok perlakuan lebih besar dari 0,05 yang berarti bahwa semua data dari masing-masing kelompok yang didapat adalah berdistribusi normal. Kemudian, setelah didapat data pada uji normalitas berdistribusi normal, selanjutnya data yang diperoleh dilanjutkan dengan uji homogenitas. Uji homogenitas pada data ini, menggunakan *Levene's test*. Uji homogenitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama (Sugiyono, 2013). Jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama. Jika nilai signifikansi $> 0,05$, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama. Berikut data hasil uji homogenitas *Levene's test* ditunjukkan pada tabel 5.6 sebagai berikut :

Tabel 5.7 Hasil Uji Homogenitas *Levene's test*

<i>Levene's test</i>	Signifikansi
6,754	0,015

Berdasarkan dari uji homogenitas yang ditunjukkan pada tabel 5.6 menunjukkan bahwa dari semua distribusi data dengan nilai signifikansi 0,015. Nilai signifikansi yang didapat lebih kecil dari 0,05, maka varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama.

Analisis data dilanjutkan dengan uji korelasi menggunakan jenis korelasi non parametrik karena data tidak memiliki varian yang sama. Uji korelasi yang bertujuan untuk mengetahui hubungan suatu variabel dengan variabel lainnya (Syaodih, 2007). Uji korelasi yang digunakan yaitu *Spearman rank* untuk mengkaji hubungan atau pengaruh variabel bebas (dosis fraksi n-Butanol) dengan variabel terikat (Intensitas fluoresensi MHC II). Hasil uji korelasi *Spearman rank* terdapat pada tabel 5.7 sebagai berikut:

Tabel 5.8 Uji Korelasi Spearman Rank

		Perlakuan	Intesitas
Perlakuan	Correlation Coefficient	1,000	-0,562*
	Sig. (2-tailed)	.	0,023
	N	16	16
Intensitas	Correlation Coefficient	-0,562*	1,000
	Sig. (2-tailed)	0,023	.
	N	16	16

Berdasarkan hasil uji *spearman rank* didapatkan nilai korelasi 0,562 maknanya adalah terdapat korelasi dengan kategori sedang antara dosis perlakuan dengan ekspresi MHC II yang didapat (Sugiyono, 2013). Tanda negatif (-) pada (-0,562*) menyatakan bahwa adanya arah yang berlawanan (linear) antara dosis perlakuan yang diperoleh terhadap ekspresi MHC II yang dihasilkan. Sementara

itu nilai signifikansi yang diperoleh $0,023 < 0,050$, maka terdapat korelasi yang signifikan antara dosis perlakuan dengan ekspresi MHC II (H_0 ditolak). Sehingga, dari uji korelasi di atas dapat dinyatakan bahwa fraksi n-Butanol memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi melalui pengukuran ekspresi marker MHC II.

Selanjutnya, untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki potensi yang serupa dengan kelompok standar atau kontrol positif, dilakukan uji komparasi yaitu menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Uji *Kruskal-Wallis* adalah uji non-parametrik yang digunakan untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok data sampel. Uji *Kruskal-wallis* digunakan ketika asumsi normalitas tidak terpenuhi atau nilai varians tidak sama. Terdapat perbedaan yang signifikan jika signifikansi $< 0,05$ (H_0 ditolak) (Hidayat dan Istiadah, 2011). Berikut data hasil Uji *Kruskal-Wallis* ditunjukkan pada tabel 5.8 sebagai berikut :

Tabel 5.9 Hasil Uji Beda *Kruskal-Wallis test*

<i>Kruskal-Wallis test</i>	Signifikansi
12,790	0,012

Berdasarkan uji *krusial-wallis* tersebut didapatkan nilai signifikansi 0,012 yang berarti kurang dari 0,05, maka terdapat perbedaan signifikan dari nilai *mean* intensitas fluoresensi MHC II antar dosis perlakuan (H_0 ditolak). Selanjutnya dilakukan uji *Least Significant Difference* (LSD) yang bertujuan untuk mengetahui secara detail signifikansi perbedaan dari data pengukuran intensitas fluoresensi MHC II tiap dosis perlakuan yang didapat. Hasil nilai yang didapat dari intensitas fluoresensi MHC II dinyatakan signifikan dengan kelompok lain

apabila nilai yang diperoleh memiliki signifikansi $< 0,05$. Hasil Uji LSD dapat diamati pada tabel 5.9 sebagai berikut :

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

Kelompok	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	Dosis 62,5 ppm	Dosis 125 ppm	Dosis 250 ppm
Kontrol Positif		0,001*	0,277	0,081	0,104
Kontrol Negatif	0,001*		0,004*	0,030*	0,000*
Dosis 62,5 ppm	0,277	0,004*		0,381	0,011*
Dosis 125 ppm	0,081	0,030*	0,381		0,004*
Dosis 250 ppm	0,104	0,000*	0,011*	0,004*	

Keterangan : * $p < 0,05$

Hasil uji LSD yang terdapat pada tabel 5.8 menyatakan bahwa Kontrol positif terhadap variasi dosis dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm tidak berbeda signifikan. Hal itu ditandai dengan nilai pada kedua dosis diatas 0,05, karena nilai beda signifikansi $< 0,05$. Sedangkan, kelompok kontrol negatif terhadap kontrol positif dinyatakan berbeda signifikan yang dapat dilihat dari nilai kelompok tersebut di bawah 0,05. Sehingga, dari ketiga kelompok perlakuan menggunakan fraksi n-Butanol, dosis 62,5 ppm dapat memberikan efek serupa dengan kontrol positif, karena nilai yang dihasilkan tidak berbeda signifikan. Artinya, dosis 62,5 ppm memiliki potensi aktivitas serupa dengan kontrol positif yaitu genistein.

Tabel 5.11 Hasil Uji Chi-Square

		Chi-Square	df	Signifikansi
PROBIT	<i>Pearson Goodness-of-Fit Test</i>	3175.193	14	0,000*

*Nilai signifikansi <0,05, faktor heterogenitas digunakan sebagai acuan kalkulasi nilai limit

Hasil Uji Chi-Square pada tabel 5.9 menunjukkan bahwa nilai dari data yang diperoleh pada perlakuan tiap dosis fraksi n-Butanol daun semanggi yaitu signifikan, karena < 0,05. Selanjutnya untuk melihat nilai dosis efektif (ED₅₀) dilakukan uji probabilitas yang ditampilkan pada tabel 5.11 sebagai berikut :

Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas Uji *Chi-Square*

Probability	Estimate
0,400	3,107
0,450	2,653
0,500	2,205
0,550	1,758
0,600	1,303

Hasil nilai Probabilitas Uji *Chi-Square* yang ditunjukkan pada tabel 5.11 yaitu nilai ED₅₀ yaitu 2,205 ppm. Nilai ED₅₀ yang menunjukkan nilai dosis efektif yang dapat diberikan yaitu sebesar 2,205 ppm. Nilai signifikansi yang bermakna dari keseluruhan kelompok uji menunjukan bahwa kandungan senyawa fitoestrogen yang diduga terdapat pada fraksi n-Butanol daun semanggi memiliki aktivitas farmakologi sebagai antineuroinflamasi.

5.9 Mekanisme aktivitas fitoestrogen antineuroinflamasi fraksi n-Butanol daun *M.crenata*

Wanita pascamenopause yang mengalami defisiensi estrogen akan meningkatkan faktor terjadinya penyakit neurodegeneratif. Hal tersebut dapat terjadi karena defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause akan mengaktivasi sel mikroglia secara berlebihan. Sel mikroglia merupakan sel imun yang ada di otak, dimana ketika aktif merupakan tanda terjadinya neuroinflamasi. Neuroinflamasi yang berlangsung lama akan mengakibatkan kerusakan sel neuron yang berakhir pada gangguan kognitif dan menjadi faktor terjadinya penyakit-penyakit neurodegeneratif.

Pada penelitian ini, dilakukan secara *in vitro* sehingga untuk mengkondisikan sel mikroglia HMC3 mengalami defisiensi estrogen diberikan induksi IFN- γ . Induksi IFN- γ berfungsi untuk mengaktifkan sel mikroglia HMC3 yang secara patofisiologis akan memasuki mikroglia melalui *Toll Like Receptor 4* (TLR4) sehingga mengaktifkan NF- κ B untuk mendekati inti sel mikroglia karena terjadi pergantian isomer senyawa protein dari monomer menjadi oligomer dan kemudian mempengaruhi sintesis protein sel (Tang dan Le, 2015; Villa *et al.*, 2016). Sintesis protein sel yang terganggu kemudian akan merubah bentukan sel dan akan mengekspresikan marker tertentu dan salah satunya yaitu MHC II (Azcutia *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2015; Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016). Alasan pemilihan Marker MHC II dikarenakan marker ini merupakan marker awal proinflamasi. Dalam sistem imun adaptif, IFN- γ memiliki peran mengaktivasi mikroglia dan meningkatkan ekspresi molekul MHC II dengan berperan sebagai aktivator transkripsinya. MHC II berperan pada presentasi

antigen eksogen yang mengalami fagositosis oleh APC yaitu mikroglia terhadap sel T helper. Selanjutnya antigen yang dipresentasikan tersebut akan mengaktifasi sel T helper melalui reseptornya. Sel T helper yang teraktivasi tersebut kemudian akan mensekresikan sejumlah sitokin dan interleukin untuk pengaturan respon imun (Endang, 2016).

Sel HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ akan mengalami perubahan morfologi yaitu dari *ameboid* menjadi *activated* dimana keadaan *ameboid* yaitu ketika sel mikroglia mengalami pertumbuhan dan *activated* ketika mikroglia mendapatkan stimulus secara fisiologis maupun stimulus secara patologis seperti IFN- γ (Patro *et al.*, 2016).



Gambar 5.9 (A). Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ (B). Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ dan pemberian fraksi n-Butanol daun *M.crenata*.

Setelah sel diinduksi dengan IFN- γ yang artinya sel sedang aktif dan mengalami neuroinflamasi, maka selanjutnya sel HMC3 diberikan perlakuan pemberian fraksi n-Butanol dari daun *M.crenata* sebagai antineuroinflamasi. Aktivitas Antineuroinflamasi pada fraksi n-Butanol daun *M.crenata* terlihat pada perubahan morfologi sel HMC3 yang kembali dalam keadaan *ameboid*.

Selain itu, diperkuat dari hasil Intensitas fluoresensi MHC II (Gambar 5.6). Pemberian fraksi n-Butanol dapat menurunkan intensitas marker MHC II. Hal tersebut dapat terjadi karena dalam fraksi n-Butanol mengandung senyawa fitoestrogen. Namun, pada grafik diatas peningkatan perlakuan dosis tidak disertai dengan penurunan intensitas MHC II. Hal ini terjadi karena adanya *Non Monotonic Dose Responses* (NMDR) pada sel HMC3 dengan pemberian fraksi n-Butanol daun *M.crenata*.

Karakteristik dari respon NMDR ditunjukkan oleh nilai *slope* yang bervariasi pada beberapa titik dalam rentang dosis yang diberikan. NMDR sering terjadi dalam penelitian dengan pengobatan hormon atau sampel yang digunakan sebagai pengganti hormon. Dalam hal ini, senyawa fitoestrogen yang ada di dalam fraksi n-Butanol daun *M. crenata*. Perbedaan tingkat afinitas antara hormon atau sampel pengganti hormon dengan reseptor pada reseptor target dan reseptor non-target dalam sel akan menyebabkan kesulitan dalam memprediksi respon yang akan muncul seiring meningkatnya dosis (Ma'arif *et al.*, 2018).

Respon NMDR pada senyawa fitoestrogen dari fraksi n-Butanol daun *M. crenata* dapat terjadi karena adanya perbedaan afinitas dan selektivitas reseptor. Pada dosis rendah fitoestrogen dalam fraksi n-Butanol akan mengikat reseptor estrogen β (ER- β) dengan afinitas yang besar, menghasilkan respon aktivitas yang besar juga. Namun, dengan dosis yang lebih tinggi, kemungkinan fitoestrogen dalam fraksi n-Butanol dapat mengikat reseptor lain selain ER- β yang juga terdapat dalam sel mikroglia HMC3, sehingga dapat menyebabkan

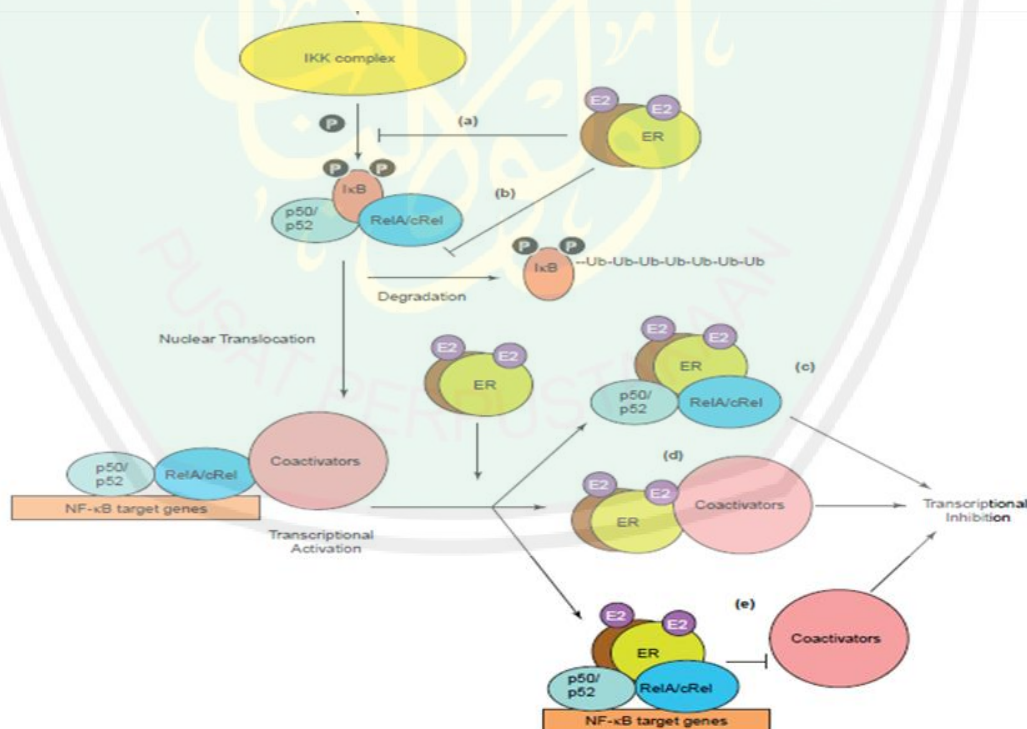
penurunan respon aktivitas yang dihasilkan dari efek antagonis antara dua reseptor yang berbeda (Moriyama *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2012).

Berdasarkan uji KLT dapat diketahui bahwa Fraksi n-Butanol memiliki senyawa golongan flavonoid yang ditandai dengan spot berwarna biru pada plat KLT. Flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat aktivasi dari sel mikroglia penyebab terjadinya neuroinflamasi melalui penghambatan aktivasi NF- κ B (Jeremy, *et al.*, 2012). Beberapa senyawa dari golongan flavonoid yang diduga memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi yaitu dari kelas flavon adalah baicalein sedangkan dari kelas flavonol yaitu fisetin, dari kelas isoflavon yaitu genistein dan dari kelas flavanol yaitu catechin (Jeremy, *et al.*, 2012). Beberapa jenis senyawa dari golongan flavonoid memiliki aktivitas sebagai fitoestrogen dimana terdapat struktur dan afinitas yang mirip dengan estrogen, sehingga dapat menggantikan ikatannya dengan ER, khususnya ER- β yang ada di sel mikroglia. ER- β merupakan ER yang banyak terdapat di otak khususnya di sel mikroglia yang berfungsi sebagai regulator dalam otak, sedangkan ER- α banyak terdapat pada hipotalamus dimana reseptor tersebut dominan terhadap fungsi reproduktivitas (Varshney and Nalvarte, 2017).

Pendugaan jalur masuk Fitoestrogen dalam fraksi n-Butanol daun *M.crenata* yang dapat berikatan dengan ER- β melalui jalur *ER-dependent nuclear-initiated estrogen signaling classical dan nonclassical*. Pada jalur *classical*, ER teraktivasi masuk ke nukleus akan berikatan dengan EREs yang merupakan bagian dari DNA dan mengekspresikan protein-protein tertentu. Sedangkan pada jalur *nonclassical* ER teraktivasi tidak berikatan dengan EREs,

namun berikatan dengan faktor-faktor transkripsi dan mempengaruhi aktivitasnya seperti faktor transkripsi *stimulating protein-1* (SP-1), *activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor κ B* (NF- κ B), and c-jun. Selanjutnya berikatan dengan Promotor DNA dan terjadi proses transkripsi menghasilkan protein (Cui *et al.*, 2013).

Peran dari ER teraktivasi yaitu dapat menghambat aktivitas NF- κ B sebagai faktor transkripsi DNA respon inflamasi (Kalaitzidis dan Gilmore, 2005). Jalur penghambatan ER teraktivasi terhadap faktor transkripsi NF- κ B kemungkinan dapat melalui dua lokasi yaitu ER teraktivasi yang menghambat pembentukan NF- κ B oleh IKK Kompleks di sitoplasma dan juga ER teraktivasi dapat berikatan langsung dengan NF- κ B yang terikat pada DNA untuk menghambat aktivasi transkripsional dari NF- κ B (Kalaitzidis dan Gilmore, 2005).



Gambar 5.10 Mekanisme penghambatan aktivasi NF- κ B oleh ER teraktivasi

Pada saat aktivasi Nf-κB dihambat oleh ER teraktivasi, maka proses sintesis protein tidak akan menghasilkan protein-protein proinflamasi yang salah satunya yaitu MHC II. Oleh karena itu, peran dari fitoestrogen yang dapat mengganti fungsi estrogen dalam ikatannya dengan ER dapat meningkatkan ER* dalam tubuh, sehingga dapat menghambat terjadinya proses neuroinflamasi melalui hambatan dari faktor inflamasi Nf-κB yang dapat menekan terjadinya neuroinflamasi.

5.10 Aktivitas Antineuroinflamasi fraksi n-Butanol daun *M. crenata* dalam Perspektif Islam

Siklus reproduksi wanita akan mengalami perubahan-perubahan apabila telah memasuki masanya. Saat remaja dan dewasa, siklus reproduksi wanita ada pada masa subur karena organ-organ reproduksi seperti ovarium masih bekerja dengan baik, namun memasuki usia 45-55 tahun wanita mulai kehilangan fungsi kerja organ-organ reproduksinya dan akan banyak mengalami gangguan-gangguan penyakit pada masa pomenopause. Allah SWT telah menjelaskan tentang hal ini jauh sebelum dilakukannya penelitian-penelitian tentang fungsi-fungsi kerja organ reproduksi oleh para ilmuwan sekarang dalam al-Qur'an surah Ar-Ruum (30) : 54 berikut ini:

﴿اللَّهُ الَّذِي خَلَقَكُمْ مِنْ ضَعْفٍ ثُمَّ جَعَلَ مِنْ بَعْدِ ضَعْفٍ قُوَّةً ثُمَّ جَعَلَ مِنْ

بَعْدِ قُوَّةٍ ضَعْفًا وَشَيْبَةً يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ وَهُوَ الْعَلِيمُ الْقَدِيرُ ﴿٥٤﴾

Artinya : Allah, Dialah yang menciptakan kamu dari keadaan lemah, kemudian Dia menjadikan (kamu) sesudah keadaan lemah itu menjadi kuat, kemudian Dia menjadikan (kamu) sesudah kuat itu lemah (kembali) dan beruban. Dia menciptakan apa yang dikehendaki-Nya dan Dialah yang Maha Mengetahui lagi Maha Perkasa (Ar-Ruum : 54).

Tafsir kalimat **مِنْ بَعْدِ قُوَّةٍ ضَعْفًا** dalam kitab tafsir Al-Qurthubi bermakna tua, yaitu fase setelah seseorang berada pada masa subur dan sudah kehilangan fungsi kerja organ-organ reproduksinya dengan baik. Fase ini disebut dengan masa menopause. Kata **ضَعْفًا** menurut Syaikh Imam (2009) adalah lawan kuat. Kata tersebut dapat memiliki arti lemah pada fisik dan juga lemah pada akal. Hal ini seperti keadaan ilmiah yang sering terjadi pada wanita yang memasuki masa menopause, secara bertahap akan mengalami kemunduran fungsi respon atau melemahnya fungsi kerja baik secara fisik dan mentalnya. Allah berfirman dalam Surat An-Nahl (16) : 70 sebagai berikut:

وَاللَّهُ خَلَقَكُمْ ثُمَّ يَتَوَقَّعُكُمْ وَمِنْكُمْ مَنْ يُرَدُّ إِلَى أَرْذَلِ الْعُمُرِ لَكُمْ لَا يَعْلَمُ
بَعْدَ عِلْمٍ شَيْئًا إِنَّ اللَّهَ عَلِيمٌ قَدِيرٌ ﴿٧٠﴾

Artinya : “Allah menciptakan kamu, kemudian mewafatkan kamu dan di antara kamu ada yang dikembalikan kepada umur yang paling lemah (pikun), supaya dia tidak mengetahui lagi sesuatupun yang pernah diketahuinya. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui lagi Maha Kuasa”.

Kata “*Ardzali*” dalam ayat tersebut bermakna kelemahan yang tidak dapat kembali, berupa melemahnya indra, serta kemampuan berbicara dan berpikir. Hal tersebut dapat dialami oleh orang yang sudah lanjut usia khususnya pada masa pascamenopause, yang mengalami penurunan fungsi kognitif. Penurunan fungsi kognitif ini terjadi akibat defisiensi estrogen di dalam tubuh saat wanita sudah kehilangan fungsi ovarium sebagai penghasil utama hormon estrogen, yang artinya saat wanita tersebut memasuki masa pascamenopause. Pada Masa pascamenopause terjadinya penurunan produksi estrogen yang dipengaruhi salah satunya yaitu kegagalan apoptosis sel dan terjadinya perubahan aktivitas estrogen pada sistem saraf yang dipengaruhi oleh peningkatan usia (Ji dan Yu, 2015). Salah satu gejala akibat defisiensi estrogen yaitu adanya gangguan pada daerah otak sehingga menyebabkan terjadinya penyakit neurodegeneratif (Baziad, 2003). Namun, Rasulullah SAW Bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

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

Hadist tersebut menjelaskan bahwa Allah tidak akan menurunkan suatu penyakit tanpa menurunkan pula obatnya. Saat ini, tanaman merupakan salah satu pengobatan alternatif yang banyak digunakan oleh masyarakat. Tanaman-tanaman di Indonesia beraneka ragam dengan berbagai macam manfaatnya khususnya di bidang kesehatan. Allah SWT berfirman dalam surah Al-An'am (06) : 99 berikut ini:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ انْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ 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” (QS. Al-An’am (06) : 99).

Ayat diatas menyatakan bahwa Allah telah menumbuhkan beraneka ragam tanaman yang baik, indah dan bermanfaat. Salah satu tanaman yang memiliki manfaat dalam kesehatan yaitu *M. crenata*. Penelitian-penelitian mengenai aktivitas *M. crenata* sebagai fitoestrogen untuk terapi alternatif pada wanita pascamenopause, terus dikembangkan. Fitoestrogen pada *M. crenata* juga diduga memiliki peran sebagai agen antineuroinflamasi dengan menghambat intensitas fluoresensi marker spesifik MHC II yang diekspresikan oleh sel mikroglia HMC3

sebagai sel imun di otak. Penelitian ini dilakukan sebagai dasar awal fitoestrogen pada *M. crenata* dapat bertindak sebagai neuroprotektor yang dapat menghambat terbentuknya mikroglia teraktivasi penyebab neuroinflamasi.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

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

1. Fraksi n-Butanol daun *M.crenata* memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi pada sel HMC3 dengan penurunan intensitas fluoresensi MHC II.
2. Fraksi n-Butanol daun *M.crenata* memiliki nilai ED₅₀ sebesar 2,205 ppm sebagai agen antineuroinflamasi.

6.2 Saran

Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai marker neuroinflamasi lainnya pada sistem imun selain MHC II untuk penegakan yang lebih pasti pada *M.crenata* sebagai antineuroinflamasi. Selain itu, dapat dilanjutkan ke tahap penelitian model *in vivo* dengan hewan coba sehingga dapat lebih mempertegas hasil dari efek antineuroinflamasi dari fraksi n-Butanol daun *M.crenata*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeliovich, A dan Gitler, A. D. 2016. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature*. 539,. 207-216.
- Abidin, Z. 2006. *Dasar Pengetahuan Ilmu Taksonomi*. Bandung: Angkasa
- Abidin, Z. 2011. Analisa Pengukuran Kadar Larutan Temulawak Menggunakan Metode TLC (Thin Layer Chromatography) . *Skripsi*. Surabaya: Jurusan Teknik Fisika, Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Adityara, R. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula femur mencit betina. *Skripsi* : Universitas Airlangga.
- Afriantini, Lusiana, Rice Disi Oktarina, Idha Kusumawati. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinentesis dalam Ekstrak *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. Vol.2, No.1
- Afriastini, J. 2003. *Marsilea crenata* C. Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI.
- Agoes. G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: Penerbit ITB
- Allredge, B. K., Corelli, R. L., Ernst, M. E., Guglielmo, B. J., Jacobson, P. A., Kradjan, W. A., Williams, B. R. 2013. *Applied Therapeutics*. PA : Lippincot Williams Dan Wilkins.
- Amran, R., Abadi A, Theodorus, Widiastuti, E. 2012. Phytoestrogen genistein and black cohosh and marker of bmd in menopausal women. *M Med Indonesia*.
- Aryani, Benita. 2013. Penentuan Faktor dan *Setting* Parameter Optimal untuk Meminimalkan Jumlah Cacat Roti Smeer dengan Desain Eksperimen. *Skripsi*. Yogyakarta: Program Studi Teknik Industri, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Atma Jaya

- Asl, S. Z., Khaksari, M., Khachki, A. S., Shahrokhi, N and Nourizade, S. 2013. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 119:353–361.
- Astuti, F. 2013. Analisis fitokimia dan aktivitas antibakteri semanggi air *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- ATCC. *HMC 3* (ATCC® CRL-3304™) American Type Culture Collection. www.atcc.org.
- Au, A., Feher, A., McPhee, L., Jessa, A., Oh, S., Einstein, G. 2016. Estrogens, inflammation and cognition. *Front Neuroendocrinol.* 2016 Jan;40:87-100. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.01.002. Epub 2016 Jan 12.
- Azcutia, V., Abu-Taha, M., Romacho, T., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Luscinskas, F. W, *et al.* 2009. Inflammation Determines the Pro-Adhesive Properties of High Extracellular D-Glucose in Human Endothelial Cells *In Vitro* and Rat Microvessels *In Vivo*. *PLoS ONE* 5(4): e10091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010091>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M. A., Mohamed., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering.* Vol 117, pp, 426–436.
- Banjarnahor, S dan Artanti, N. 2014. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia.* Vol 23 (4). 239-244. doi:10.13181/mji. v23i4.1015.
- Banu, K. S dan Chathrine, L. 2015. General Tecniques Involved in Phytochemical Analysis. *Internasional Journal of Advanced Research in Chemical Science.* Vol 2 (5).
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Beral, V. 2003. Breast Cancer and Hormone-replacement Therapy In The Million Women Study. *Lancet.* pp: 362. 419–427.

- Bertram, L. dan Rudolph, E. T. 2005. The Genetic Epidemiology of Neurodegenerative Disease. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Bhat, S. V., B. A. Nagasampagi dan S. Meenakshi. 2009. Natural Products : Chemistry and Application. *Narosa Publishing House*. New Delhi : India.
- Block, M. L., Zecca, L dan Hong, Jau-Shyong. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews . Neuroscience*. Vol 8. Doi:10.1038/Nrn2038
- Canter, R. G., Penney, J. dan Tsai, L.-H. 2016. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*. 539. 187-196.
- Cersosimo, G., Eduardo, M., Benarroch, E. 2015. Estrogen Actions In The Nervous System. *Neurology*. Vol 85.
- Chamniansawat A,S., Chongthammakun, S. 2015. Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis By Reactive Microglia Leads to Downregulation of Synaptic Protein Expression. *Neurotoxicology* 46. 25–34.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Abert-vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem*. Vol 34, pp, 540–560.
- Chemat, F., Tomao, V dan Viot, M., 2008. In: Otles, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*. CRC Press, pp. 85–94.
- Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. 2010. Laser Scanning Confocal Microscopy. *Der Hautarzt*.
- Cos, P., Bruyne, T. D., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., Vlietinck, A. J. 2003. A Review : Phytoestrogen Recent Developments.
- Czarniecki, C. W., Sonnenfeld, G. 2006. *Clinical Applications of Interferon-gamma*. In: Meager A, editor. *The Interferons: Characterization and Application Edited by Anthony Meager*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co;p. 309-31.

- Dahlan, S. 2014. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan Edisi 6*. Jakarta : Salmba Medika.
- D, Farfara., V. Lifshitz., D. Frenkel. 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of *Alzheimer's disease*. *J. Cell Mol. Med.* 12(3), 762-780.
- Depkes, RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dey, P. M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I. USA: Academic Press. Halaman 81-82.
- Dirjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Cetakan Pertama)*. Jakarta : Departemen Kesehatan.
- Dwek, A. C. 2006. Isoflavones, Phytohormones and Phytosterols. 2006. *J. Appl. Cosmetol.* 24. Pp: 17-32
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev.* Vol 3 (2). Pp : 108–120. doi: 10.1007/s12393-011-9036-6.
- El Khoury, J dan Luster, A. D. 2008. Mechanisms of microglia accumulation in *Alzheimer's disease*: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci.* 29(12), 626-632.
- Endang W, L. 2016. *Imunitas sarana organ beraktivitas*. Sandira: Surabaya
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., Simpkins, J. W. 2016. Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Progress in Neurobiology*, Elsevier.
- Eyo, U. B dan Long-JunWu. 2013. Bidirectional Microglia-Neuron Communication in the Healthy Brain. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/456857>.

- Febriyani dan Sundari, P. R. 2016. Hubungan indeks massa tubuh dengan kejadian hipertensi pada perempuan postmenopause di kecamatan denpasar barat. *E-jurnal medika*. Vol 5 (12).
- Ghozali, I. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Grimholt, U. 2015. MHC and Evolution in Teleosts. *Biology*. Vol 5 (6).
- Gundersen, V., Storm-Mathisen, J dan Bergerse, L. H. 2015. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*. No 95.
- Handa, S. S. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. 22. UNIDO : Italy.
- Hanna, S., Etzioni A. 2014. MHC Class I and II Deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. Vol 134 (2).
- Harborne, J. B. 1987. Uji Fitokimia. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Harry, G. J., McPherson, C. A., Wine, R. N., Atkinson, K. dan Lefebvre d'Hellencourt, C. 2004. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotox. Res*. 5. 623–627.
- Hutapea, J. R., 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. p. 141-142. Astuti F. 2013. Analisis fitokimia dan aktivitas antibakteri semanggi air *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ismail,A., Nawaz, Z. 2005. Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: an update. *IUBMB Life*. 57:483–490.
- Iswahyuni, N. 2011. Pemberian Ekstrak Plasenta Meningkatkan Estradiol dan FSH serta Mengurangi Gejala Menopause. *Tesis*. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar.
- Jantaratnotai A, N., Utaisincharoen B, P., Sanvarinda A, P., Thampithak C, A., Sanvarinda, Y. 2013. Phytoestrogens Mediated Anti-Inflammatory Effect

Through Suppression Of IRF-1 and PSTAT 1 Expressions in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology* 17 : 483–488.

Jeremy P.E. Spencer, J. P. E., Vafeiadou, K., Williams, R. J., Vauzour, D. 2012. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action: A review. *Molecular Aspects of Medicine*. Vol 33, pp: 83-97.

Kalaitzidis, D dan Gilmore, T. D. 2005. Review: Transcription Factor Cross-Talk: The Estrogen Receptor And NF-kB. *Trends In Endocrinology And Metabolism*. Vol.16 No.2. Doi:10.1016/J.Tem.2005.01.004.

Kettenmann, H dan Verkhratsky, A. 2013. *Neurosciences in The 21st Century*. Singapore: Springer Science+Business Media.

Khaksari, M., Soltani, Z., Shahrokhi, N., Moshtaghi, G., Asadikaram, G. 2011. The role of estrogen and progesterone, administered alone and in combination, in modulating cytokine concentration following traumatic brain injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 89:31–40.

Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. (Alih bahasa: A.Saptorahardjo). Jakarta: Ui Press.

Kim J, Park Y, Lee S, Park Y. 2013. Trans-10, cis-12 Conjugated linoleic acid promotes bone formation by inhibiting adipogenesis by peroxisome proliferator activated receptor- γ -dependent mechanisms and by directly enhancing osteoblastogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells. *Elsevier: Journal of Nutritional Biochemistry*. 24 : 627-679.

Kovacs, G. G. 2014. Current Concepts of Neurodegenerative Diseases. *Emj Neurol*. 1:78-86.

Kovacs, G. G. 2016. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning Towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.*. 17, 189.

Kulkarani, A., Ganesan, P., dan O'donnel, L. A. 2016. Interferon Gamma: Influence on Neural Stem Cell Function in Neurodegenerative and Neuroinflammatory Disease. *Libertas Academica*. 9 (S1).

- Kumar, S dan Pandey, A. K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Hindawi Publishing Corporation. Article ID 162750, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Kuntana, Y. P., Gani, Y. Y., Alipin, K. 2009. *Respon Pemberian Phytoestrogen Berasal dari Tepung Kedelai pada Kelinci (Oryctolagus cuniculus) Luas Jaringan Interstitial, permatogenesis dan Kualitas Sperma*. <http://bionatura.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2014/10/3-yasm>.
- Kusmana, C dan Hikmat, A. 2015. Keanekaragaman Hayati Flora di Indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. Vol 5 (2), pp 187-198.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47 (2).
- Lattante, S., Perulli, A., Anni, M. 2014. Characterization by Confocal Laser Scanning Microscopy of the Phase Composition at Interfaces in Thick Films of Polymer Blends. *Journal of Polymers*. 541248.
- Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H., Chen, C-P., Wang, P-H. 2013. Hormone therapy for postmenopausal women And unanswered issue. Elsevier : *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol 2.
- Lewis, D. K., Johnson, A. B., Stohlgren, S., Harms, A., Sohrabji, F. 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol*. 195:47–59.
- Lisak, R. P., Bealmear, B., Benjamins, J. A. 2016. Schwann cell differentiation inhibits interferon-gamma induction of expression of major histocompatibility complex class II and intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Neuroinflammation*. 295–296. 93–99.
- Ma'arif, B., Agil, M., Laswati, H. 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *J App Pharm Sci*. 8 (03): 55-59.

- Ma'arif, B., Agil, M., Laswati, H. 2016. Phytochemical assessment on *n*-hexane extract and fractions of *Marsilea crenata* Presl. leaves through GC-MS. *Trad. Med. J.* 21 (2) :77-85.
- Ma'arif, B. 2015. Aktivitas Ekstrak *n*-Heksana dan Fraksi Hasil Pemisahan Daun *Marsilea crenata* Presl. Terhadap Diferensiasi Sel Preosteoblas MC3T3-E1 melalui Pengukuran Alkaline Phosphatase In Vitro. *Tesis*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Ma'arif, B. ZA. 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid Dari Ekstrak *n*-Heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. (isolasi ekstrak *n*-heksana dengan Rf 0,33 pada fase gerak *n*-heksana : etil asetat {4:1}). *Skripsi*. Surabaya : Departemen Farmakognosi Dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ; Hal 4-6.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid, Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata*. ITB: Bandung.
- Matt, S. M., dan Johnson, R.W. 2015. Neuro-Immune Dysfunction During Brain Aging: New Insights in Microglial Cell Regulation. *Current Opinion In Pharmacology*. 26 : 96–101.
- Mayeux, R dan Stern, Y. 2012. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 : 10.1101/cshperspect.a006239
- Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L. 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med.* 79, 514–532.
- Medina-Torres, N., Ayora Talavera, T. Espinosa Andrews, H., Sanchez, A., Pacheco, N. 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. Vol 7 (47).
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., Pfaff, D. W., Ogawa, S., Rohrer, S. P., Schaeffer, J. M., McEwen, B. S., Alves, S. E. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 144: 2055–2067.

- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., and Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 8:112. doi: 10.3389/fncel.2014. 00112.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:5185–5190.
- Mojic, M., Takeda, K., Hayakawa, Y. 2018. The dark side of IFN- γ : Its role in promoting cancer immune-evasion. *Int J Mol Sci.* 19(1): 89. <http://doi.org/10.3390/ijms19010089>
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Makasar : Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar.
- Nakagawa, Y dan Chiba, K. 2015. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 154, 21–35. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.06.010.
- Nantasomsaran, P., Nakornsri, K., Rujirapongchai, P. 2013. *Utilization of Weeds in Thailand*. Thailand: The 4th Tropical Weed Science Conference.
- Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Lembe, D. M., Nde, Z., Nyonseu. D. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 2017. *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Nisa, G. K., Nugroho, W. A., Hendrawan, Y. 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. Vol.2 (1).
- Nugroho, Y. P. 2013. Hubungan antara stadium Menopause dengan perubahan Seksual wanita Menopause di Posyandu Lansia Srikandi Kelurahan Summersari Kota Malang. *Jurnal Keperawatan*. Vol 4 (1). 75-76.

- Nurjanah., Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan. 1 (3): 152-158.
- Nursalam. 2003. *Konsep & Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan: Pedoman Skripsi, Tesis, dan Instrumen Penelitian Keperawatan*. Jakarta. Salemba Medik
- Odugbemi, T. 2008. *A textbook of medicinal plants from nigeria*. Yoba-Lagos, Nigeria: University of Lagos Press.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., dan Harry, G. J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665. doi: 10.1111/bph.13139.
- Ososki, A. L., Kennelly, E. J. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research*. Vol 17. Page 845-869
- Paracha, H., Hussain, T., Tahir, M. Z., Yasmeen, A., Pervez, M. T., Sheik, A. A., Haider, A., Ali, R., Khan, W. A. 2015. Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene, as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review. *Journal of Infection and Molecular Biology*. Vol 3 (1).
- Paterni, I, Granchi, C, Katzenellenbogen, J. A, Minutolo, F., 2014. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. pii S0039-128X (14), 00151–00152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.0122>.
- Putra, K. H. P. 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea Crenata* Presl.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus Musculus*) Jantan. *Skripsi*. Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Quthb, S. 2008. *Tafsir fii Zhilalil Qur'an (Edisi Bahasa Indonesia, Penerjemah : As'ad Yasin, dkk)*. Depok : Gema Insani.

- Rahmawati, A dan Widya, P. 2013. The Characteristic of Pamellofruit Peel Extract Used Ultrasonic Bath Assisted Method (Study of Blanching and Extraction Time). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. (1).
- Raymond, M., Welsh, K. B., Heather, D., Marshall., Stina, L. Urban. 2012. *Type 1 Interferons and Antiviral CD8 T-Cell Responses Volume 8*. Department of Pathology and Program in Immunology and Virology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America.
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*.
- Rietjens, I. M., Sotoca, A. M., Vervoort, J., Louisse, J. 2013. Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Mol. Nutr. Food Res*. 57: 100–113.
- Rindawati. 2015. *Eksistensi Bakul Semanggi Gendong (Studi Tentang Kelembagaan Ekonomi Keluarga Dan Migrasi Khas Bakul Semanggi Gendong Di Kota Surabaya)*. Disertasi. Universitas Airlangga.
- Roy. J., Gritter, J. M., Bobbit, A E. S. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung : Penerbit ITB
- Rukiana. 2018. Metabolite profiling ekstrak daun *Marsilea crenata* Presl. menggunakan UPLC-QTOF-ms/ms dengan variasi pelarut. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim : Malang.
- Saifudin, A., Rahayu, A., Teruna, H. Y. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. 2. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Sarker, S. D., Latif, Z., dan Gray, A. I. 2006. Natural products isolation. editors. Natural Products Isolation. 2nd ed. Totowa (New Jersey). *Humana Press Inc*. hal. 6-10, 18.
- Sarwono, J. 2006. *Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. Yogyakarta : Graha Ilmu.

- Schreiber, G. H., Schreiber, R. D. 2003. *Interferongamma*. In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook*. 1. Fourth ed. California-USA: Academic Press- Elsevier;p. 567-602.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta : Lentera Hati.
- Shih, R., Wang, Chen-Yu dan Yang, Chuen-Mao. 2015. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Vol (8):. 77. doi: 10.3389/fnmol.2015.00077
- Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P. dan Rivest, S. 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 49. 489–502.
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung : ITB Press.
- Sirotkin, A. V., Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogen And Their Effects. *European Journal Of Pharmacology* 741 : 230–236.
- Slone, E. 1994. *Anatomy and Physiology*. Jakarta: EGC.
- Soebagio, B., Rusdiana, T., dan Kairudin. 2007. Pembuatan gel dengan aqupec HV-505 dari ekstrak umbi bawang merah (*Allium cepa*, L.) sebagai antioksidan. *Prosiding Seminar Penelitian Dosen Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran (12p)*. Bandung, Indonesia: Unpad.
- Sosa-Ortiz, A. L., Acosta-Castillo, I., Prince, M. J. 2012. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 43: 600–608. 7: 137–152.
- Speroff, L., Fritz, M. A. 2005. *Menopause and the Perimenopausal Transition*. New York : Lippincott Williams & Wilkins.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi, Edisi terjemahan (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro)*. ITB press: Bandung.
- Surdjadi. 2007. *Kimia farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Suzumura, A. 2013. Neuron-Microglia Interaction in Neuroinflammation. *Current Protein and Peptide Science*, 2013, 14, 16-20.
- Syukur dan Hernani. 2001. *Budi Daya Tanaman Obat Komersial*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya. Hal. 76.
- Tang, Y dan Le, W. 2015. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. New York : Springer Science and Business Media.
- Taylor, C. R., dan Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako Denmark : IHC Handbook sixth edition.
- Taylor, J. P., Brown, R. H., Jr dan Cleveland, D. W. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 539. 197-206
- Titisari, Nurina. Fauzi, Ahmad. Adyana, Anom. Trisunawati, Pratiwi. 2016. The Effects of Water Clover (*Marsilea Crenata*) Extract against Estrogen, Progesterone And Uterine Histology on Rat (*Rattus norvegicus*). *International Journal of PharmTech Research*. Vol. 09 (6). pp. 165-171.
- Tiyaningsih, D.A., 2007. Studi Makroskopis, Mikroskopis dan Sk.rining Fitokimia *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Treml, J., dan Smejkal, K. 2016. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15. 720-738. doi: 10.1111/1541- 4337.12204.
- Trisunuwati, P. 2017. Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Against Blood EstrogenProgesterone Balance, Blood Calcium Levels and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Rattus novergicus*). *Research Journal of Life Science*. Vol. 04 (1).
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, Duk-Hee., Shioda, T. et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*. Vol 33 (3). Pp: 378–455. Doi: 10.1210/Er.2011-1050.

- Venn, R.F. 2008. *Principles and Practices of Bioanalysis*. Edisi kedua. Prancis: Taylor and Francis Group Ltd. Halaman 23-25.
- Verkhatsky, A dan Parpura, V. 2014. Neurological and Psychiatric Disorders as a Neuroglial Failure. *National Institutes of Health*. No 116 (2).
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., Hubinger, M. D. 2013. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *J. Food Eng.* Vol 119. pp, 196–204.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. 2008. *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry : A review*. *Innov Food Sci Emerg*. Vol 9 (2). pp:161–169. doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Society*.
- Villiers, T. J. 2009. Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Elsevier : Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 23. Page 73-85.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Terjemahan : S. Noerono. Gadjah Mada University Press. Indonesia.
- Wagner dan bladt. 1996. *Plant Drug Analysis*. German: Springer.
- Wells. G.B., Dipiro, J.T., Scwhinghammer, T.L., Dipiro, C.V. 2015. *Pharmacotherapy Handbook*. NY : Mcgraw Hil.
- Widiasari, F. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula vertebra mencit betina. Skripsi : Universitas Airlangga.
- Wilkinson, B., Koenigsnecht-Talboo, J., Grommes, C., Lee, C. Y. & Landreth, G. 2006. Fibrillar β -amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J. Biol. Chem.* 281. 20842–20850.

- Whitney, N. P., Eidem, T. M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J. C. 2009. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* Vol 108 (6):1343-59.
- Wyss-Coray, T. 2016. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature.* 539. 180-186.
- Xiong, X. Y., Liu, L., dan Yang, Q. W. 2016. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog. Neurobiol.* 142, 23–44. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.05.001.
- Xu, Y., Wang, L., Buttice, G., Sengupta, P. K., Smith, B. D. 2003. Interferon gammarepression of collagen (COL1A2) transcription is mediated by the RFX5 complex. *J Biol Chem.* 278:49134–49144.
- Yacoeb, A. M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., Kristiono, S. S. 2010. Deskripsi histologis dan perubahan komposisi kimia daun dan tangkai semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia XII* (2):81-95.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 51.
- Younes, M, Honma, N., 2011. Estrogen receptor β . *Arch Pathol. Lab Med.* 135, 63–66.
- 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.
- Zuraid. , Sulistiyani., Sajuthi , D., dan Suparto, I. R. 2017. Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia Scholaris* R.Br). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*. Vol. 35 (3). ISSN: 0216-4329. Doi: 10.20886/Jphh.2017.35.3.211-219.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman *M.crenata*

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU

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

KOTA BATU

65313

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

Memenuhi permohonan saudara :

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

1. Perihal determinasi tanaman semanggi air
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Divisi : Pteridophyta (paku-pakuan)
 - Kelas : Pteridopsida
 - Ordo : Salviniales
 - Famili : Marsileaceae
 - Genus : Marsilea
 - Spesies : *Marsilea crenata* Presl
 - Sinonim : *Marsilea quadrifolia* Bl. ; *M. minuta* L.
 - Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi
 - Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1
2. Morfologi : Habitus ; Semak, menjalar, panjang $\pm$ 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang $\pm$ 2 cm, lebar $\pm$ 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, lepas/berdiri sendiri, kelopak dua, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serabut, putih kotor.
3. Nama Simplisia : *Marsileae crenatae folium* / Daun semanggi air.
4. Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol
5. Penggunaan : Penelitian
6. Daftar Pustaka :
 - Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/> salam, Diakses 14 Februari 2007
 - Anonim, <http://www.plantamor.com/semanggi> , diakses 11 Desember 2010
 - Steenis, CGGJ Van Dr , *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
 - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

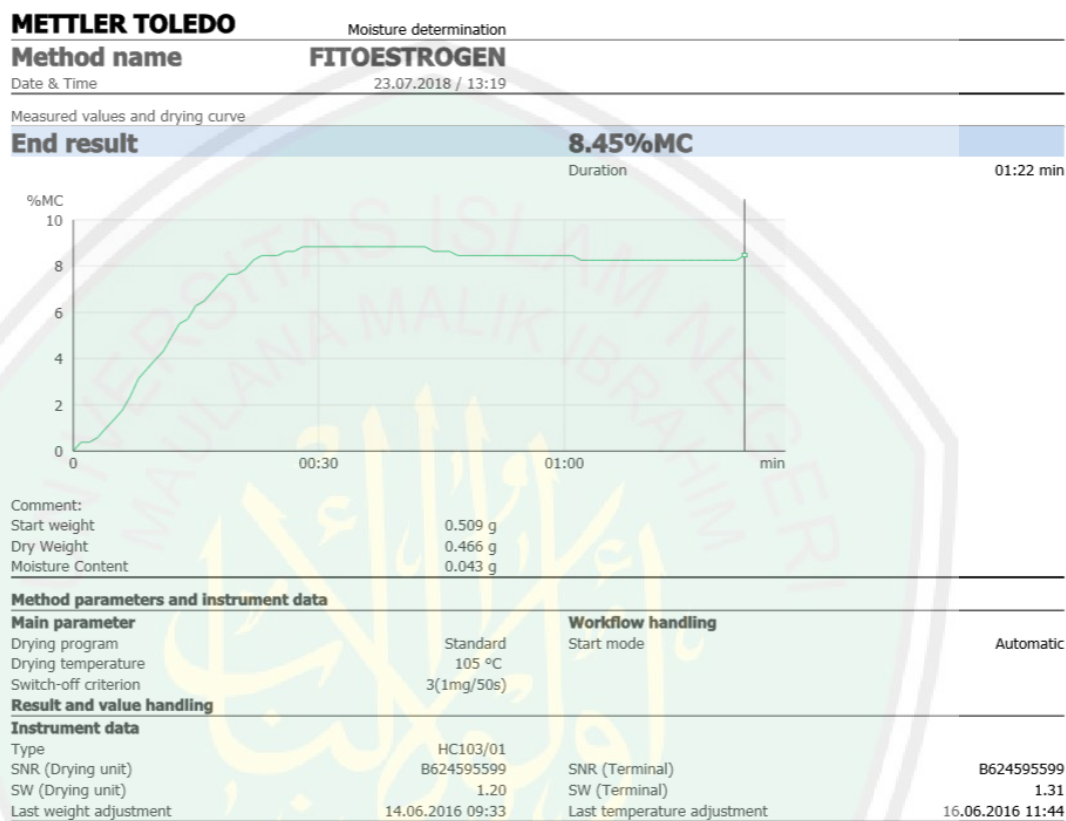
Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 05 Oktober 2017
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.
NIP.19611102 199103 1 003

Lampiran 2. Hasil Uji *Moisture Content* Serbuk Simplisia Daun *M.crenata*

A. Replikasi 1



B. Replikasi 2

METTLER TOLEDO

Moisture determination

Method name**FITOESTROGEN**

Date & Time

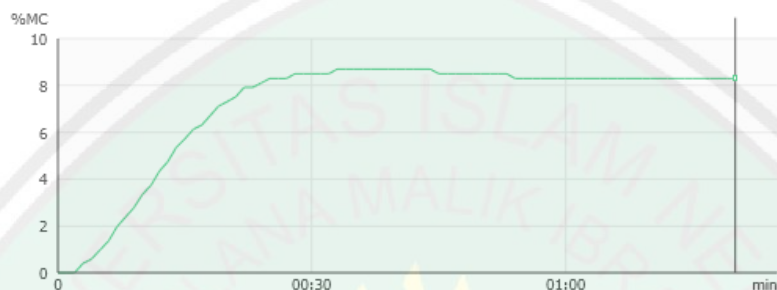
23.07.2018 / 13:24

Measured values and drying curve

End result**8.30%MC**

Duration

01:20 min



Comment:

Start weight

0.506 g

Dry Weight

0.464 g

Moisture Content

0.042 g

Method parameters and instrument data**Main parameter**

Drying program

Standard

Drying temperature

105 °C

Switch-off criterion

3(1mg/50s)

Workflow handling

Start mode

Automatic

Result and value handling**Instrument data**

Type

HC103/01

SNR (Drying unit)

B624595599

SNR (Terminal)

B624595599

SW (Drying unit)

1.20

SW (Terminal)

1.31

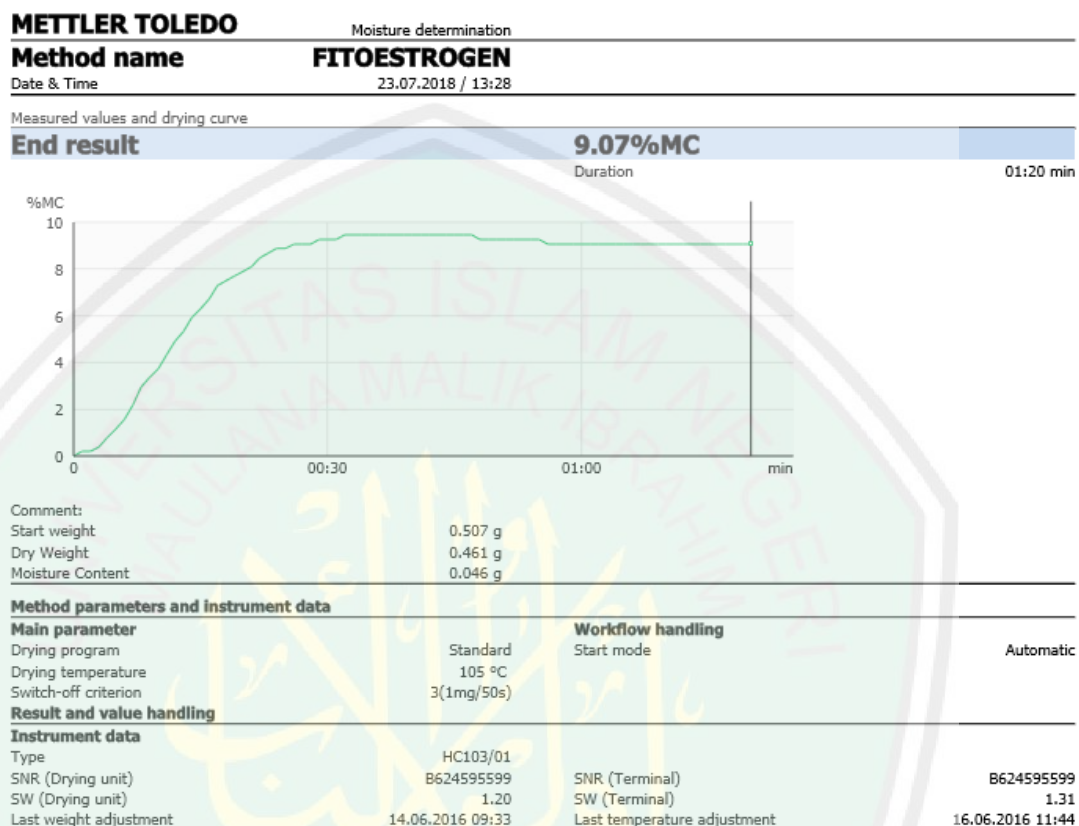
Last weight adjustment

14.06.2016 09:33

Last temperature adjustment

16.06.2016 11:44

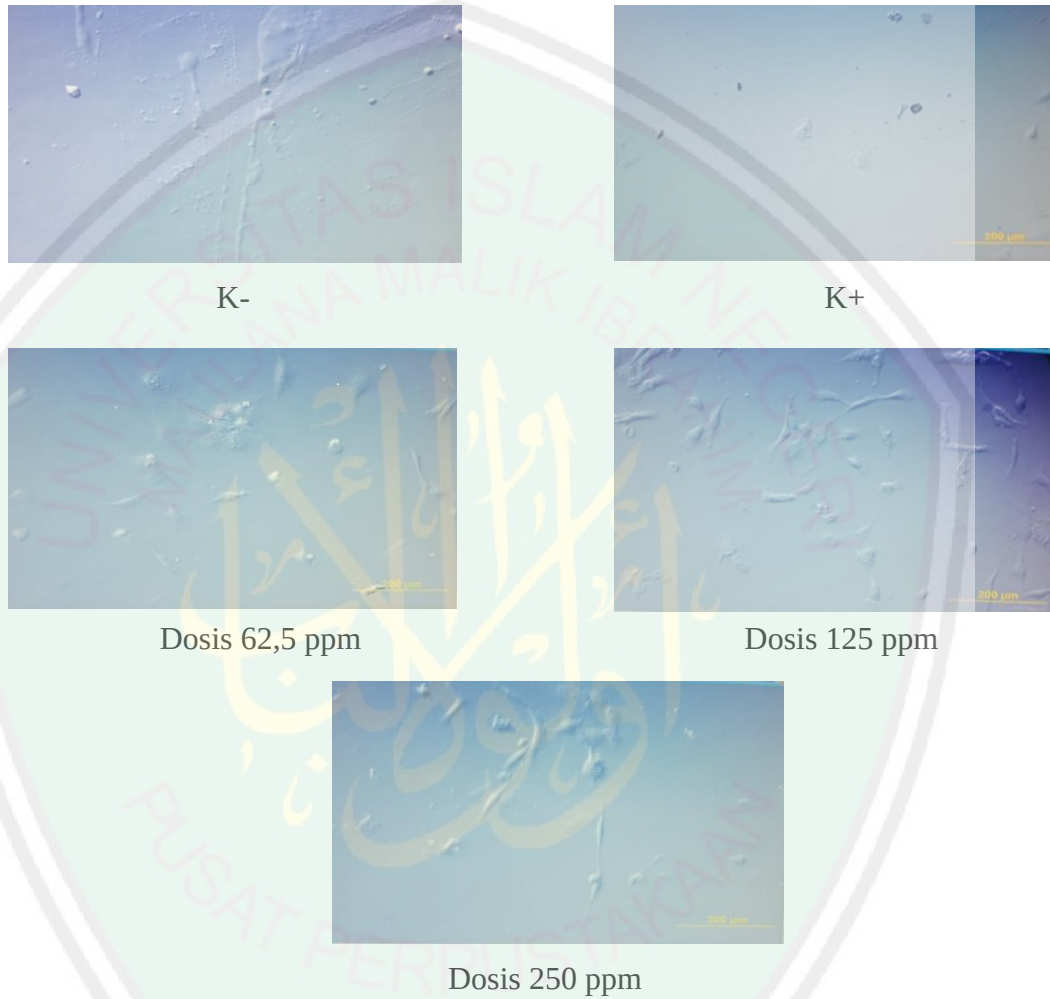
C. Replikasi 3

D. Rerata nilai kadar air serbuk simplisia Daun *M.crenata*

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

Lampiran 3. Hasil perlakuan uji aktivitas metode ICC

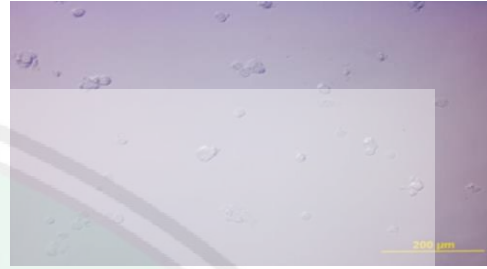
A. Pengamatan sel HMC3 setelah pemberian IFN- γ



B. Pengamatan sel HMC3 setelah pemberian IFN- γ



K-



K+



Dosis 62,5 ppm

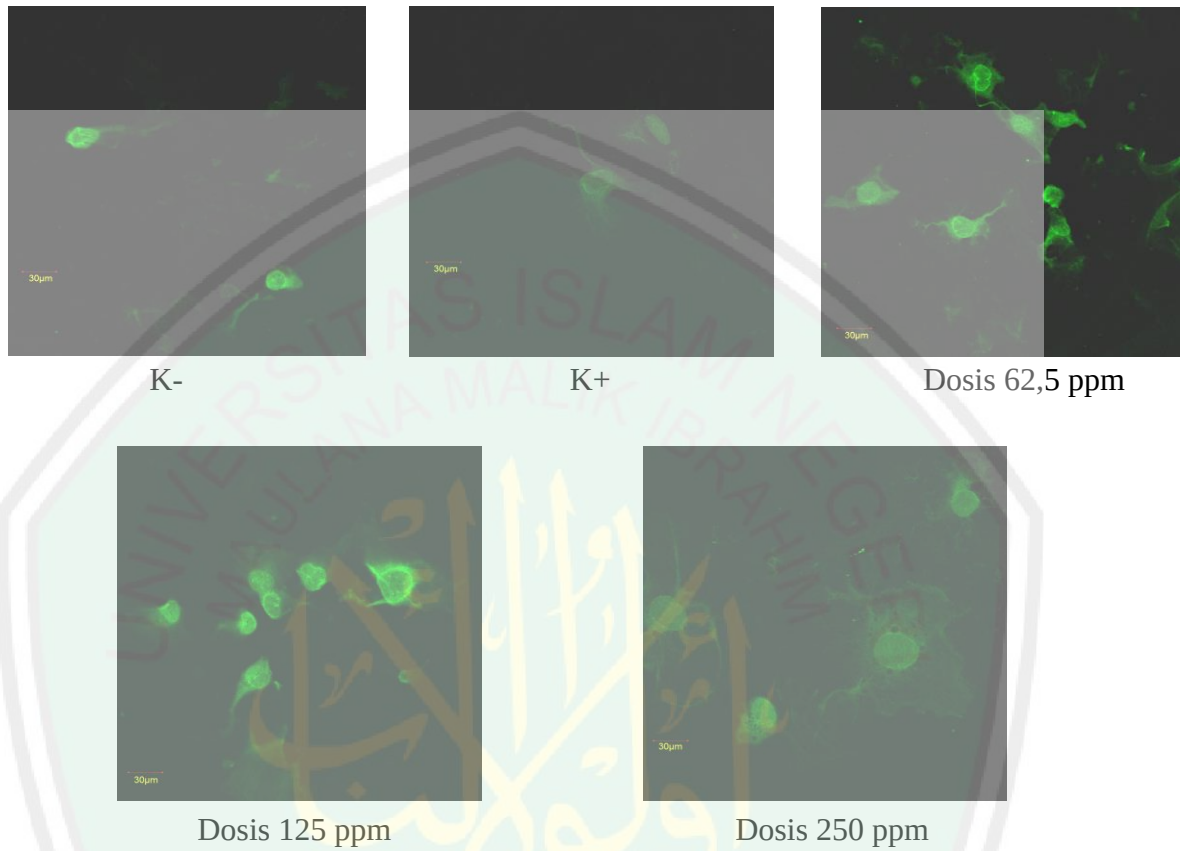


Dosis 125 ppm



Dosis 250 ppm

C. Pengamatan sel HMC 3 pada CLSM



Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel

A. Pembuatan Media Kultur (untuk satu *flask culture*)

1. Disiapkan *conical tube* ukuran 15 mL
2. Diambil FBS 10% dalam 5 mL yaitu 0,5 mL atau 500 μ L
3. Diambil Penstrep 1% dalam 5 mL yaitu 0,05 mL atau 50 μ L
4. Di tambahkan Media EMEM sampai 5 mL

B. Pembuatan Media Perlakuan

@well plate = 300 μ L x 10 *well-microplate*

$$= 3000 \mu\text{L}$$

$$= 3 \text{ ml}$$

C. Pengenceran IFN- γ 1 μ g/ mL

1. Induksi IFN- γ = 9 well plate x 300 μ L = 2700 μ L = 2,7 mL = 3 mL
2. Stok IFN- γ 1 μ g/mL = 1000 ng/mL
3. IFN- γ 10 ng/mL (dosis literatur)

$$V1. M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 \text{ ng/ mL} = 3 \text{ mL}. 10 \text{ ng}$$

$$V1 = 0,03 \text{ mL}$$

$$V1 = 30 \mu\text{L}$$

D. Pembuatan dan pemberian larutan IFN- γ ke dalam well plate

1. Diambil Media kultur sebanyak 3 mL, dikurangi 30 μ L
2. Ditambahkan dengan IFN- γ 30 μ L dari hasil pengenceran 10 ng/mL

3. Di *mix gentle*
4. Diambil well plate dari inkubator
5. Diambil media dari well plate
6. Dimasukkan IFN- γ pada masing-masing well plate
7. Diinkubasi kembali dalam inkubator 37° C

E. Perhitungan Pengenceran fraksi n-Butanol

1. Fraksi n-butanol konsentrasi 62,5 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 125 \text{ ppm} = 700 \mu\text{L}. 62,5 \text{ ppm}$$

$$V1 = 350 \mu\text{L}$$

2. Fraksi n-butanol konsentrasi 125 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 250 \text{ ppm} = 1100 \mu\text{L}. 125 \text{ ppm}$$

$$V1 = 550 \mu\text{L}$$

3. Fraksi n-butanol konsentrasi 250 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 5000 \text{ ppm} = 1250 \mu\text{L}. 250 \text{ ppm}$$

$$V1 = 62,5 \mu\text{L}$$

F. Pembuatan fraksi n-butanol

1. Fraksi n-butanol konsentrasi 62,5 ppm

a. Diambil 350 μL fraksi 125 ppm

b. Ditambah media 350 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan

2. Fraksi n-butanol konsentrasi 125 ppm
 - a. Diambil 550 μL fraksi 125 ppm
 - b. Ditambah media 550 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan
3. Fraksi n-butanol konsentrasi 250 ppm
 - a. Diambil 62,5 μL fraksi 125 ppm
 - b. Ditambah media 1187,5 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan



Lampiran 5. Hasil Analisis Data

A. Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Intensitas	K (-)	.278	3	.	.940	3	.529
	K (+)	.290	3	.	.925	3	.471
	62,5 ppm	.295	4	.	.856	4	.245
	125 ppm	.314	3	.	.892	3	.362
	250 ppm	.304	3	.	.908	3	.411

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.071	4	11	.015

C. Uji Korelasi Non Parametrik dengan menggunakan *Spearman Rank*

Correlations

		Perlakuan	Intensitas	Total
Spearman's rho	Perlakuan	Correlation Coefficient	1.000	-.562*
		Sig. (2-tailed)	.	.023
		N	16	16
	Intensitas	Correlation Coefficient	-.562*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.023	.
		N	16	16
	Total	Correlation Coefficient	.	.
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	16	16

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

D. Uji Komparasi Non Parametrik menggunakan *Kruskal Wallis*

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
	Perlakuan	N	Mean Rank	Intensitas	
Intensitas	K (-)	3	14.67	Chi-Square	12.790
	K (+)	3	6.00	df	4
	62,5 ppm	4	8.25	Asymp. Sig.	.012
	125 ppm	3	11.67	a. Kruskal Wallis Test	
	250 ppm	3	2.00	b. Grouping Variable:	
	Total	16		Perlakuan	

E. Uji *Least Significant Different* (LSD)

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Intensitas						
LSD						
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
K (-)	K (+)	676.822000*	153.387509	.001	339.21837	1014.42563
	62,5 ppm	512.787250*	143.480877	.004	196.98797	828.58653
	125 ppm	381.744333*	153.387509	.030	44.14070	719.34796
	250 ppm	948.416333*	153.387509	.000	610.81270	1286.01996
K (+)	K (-)	-676.822000*	153.387509	.001	-1014.42563	-339.21837
	62,5 ppm	-164.034750	143.480877	.277	-479.83403	151.76453
	125 ppm	-295.077667	153.387509	.081	-632.68130	42.52596
	250 ppm	271.594333	153.387509	.104	-66.00930	609.19796
62,5 ppm	K (-)	-512.787250*	143.480877	.004	-828.58653	-196.98797
	K (+)	164.034750	143.480877	.277	-151.76453	479.83403
	125 ppm	-131.042917	143.480877	.381	-446.84220	184.75636
	250 ppm	435.629083*	143.480877	.011	119.82980	751.42836
125 ppm	K (-)	-381.744333*	153.387509	.030	-719.34796	-44.14070
	K (+)	295.077667	153.387509	.081	-42.52596	632.68130
	62,5 ppm	131.042917	143.480877	.381	-184.75636	446.84220

	250 ppm	566.672000*	153.387509	.004	229.06837	904.27563
250 ppm	K (-)	-948.416333*	153.387509	.000	-1286.01996	-610.81270
	K (+)	-271.594333	153.387509	.104	-609.19796	66.00930
	62,5 ppm	-435.629083*	143.480877	.011	-751.42836	-119.82980
	125 ppm	-566.672000*	153.387509	.004	-904.27563	-229.06837

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

F. Uji Analisa Probit (ED₅₀)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	3175.193	14	.000 ^a

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

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

Confidence Limits

95% Confidence Limits for Perlakuan

	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	10.489	7.242	29.887
	.020	9.518	6.665	26.451
	.030	8.903	6.297	24.273
	.040	8.439	6.019	22.636
	.050	8.062	5.792	21.305
	.060	7.742	5.597	20.174
	.070	7.460	5.426	19.183
	.080	7.209	5.271	18.296
	.090	6.980	5.130	17.491

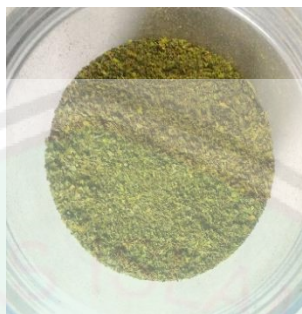
.100	6.769	4.999	16.750
.150	5.896	4.446	13.695
.200	5.202	3.984	11.289
.250	4.607	3.554	9.259
.300	4.073	3.113	7.490
.350	3.577	2.601	5.956
.400	3.107	1.914	4.699
.450	2.653	.945	3.788
.500	2.205	-.287	3.171
.550	1.758	-1.684	2.718
.600	1.303	-3.185	2.340
.650	.833	-4.781	1.993
.700	.338	-6.489	1.653
.750	-.197	-8.348	1.304
.800	-.792	-10.432	.927
.850	-1.486	-12.870	.497
.900	-2.358	-15.948	-.033
.910	-2.569	-16.692	-.161
.920	-2.798	-17.501	-.298
.930	-3.050	-18.391	-.449
.940	-3.331	-19.385	-.618
.950	-3.652	-20.520	-.809
.960	-4.029	-21.853	-1.034
.970	-4.492	-23.493	-1.309
.980	-5.108	-25.675	-1.674
.990	-6.079	-29.114	-2.247

a. A heterogeneity factor is used.

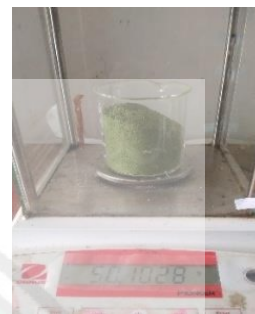
Lampiran 6. Dokumentasi Alat dan Penelitian



(1)
Proses Pengeringan Daun
M.crenata



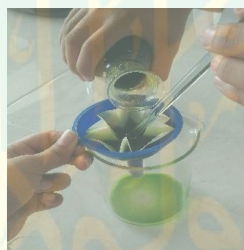
(2)
Proses Grinding
Simplisia menjadi
serbuk daun *M.crenata*



(3)
Proses Penimbangan
simplisia daun *M.crenata*



(4)
Proses Ultrasonifikasi
Daun *M.crenata*



(5)
Proses Penyaringan Filtrat
dan Residu Daun *M.crenata*



(6)
Proses Pemisahan Pelarut dari
ekstrak menggunakan *Rotary
Evaporator*



(7)
Proses Pengovenan Ekstrak
Etanol 96% Daun
M.crenata



(8)
Penimbangan ekstrak
etanol 96% daun
M.crenata



(9)
Pembuatan suspensi air pada
ekstrak etanol 96% daun
M.crenata



(10)
Proses Fraksinasi ke-1
Fraksi n-Butanol



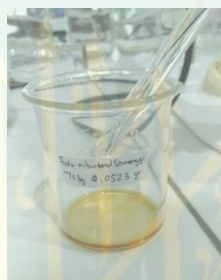
(11)
Proses Fraksinasi ke-6
Fraksi n-Butanol



(12)
Proses Penguapan pelarut
pada fraksi n-Butanol



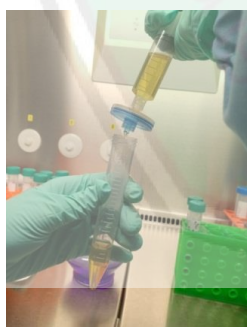
(13)
Penimbangan
fraksi n-Butanol



(12)
Penambahan tween 80% dan
DMSO pada fraksi n-Butanol



(13)
Pembuatan larutan induk
5000 ppm fraksi n-Butanol



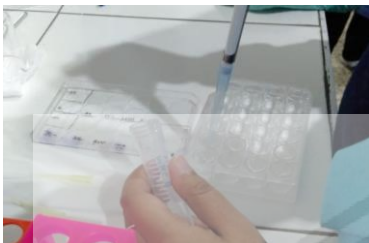
(14)
Sterilisasi fraksi
n-Butanol



(15)
Pengenceran sampel
fraksi n-Butanol 62,5
ppm, 125 ppm dan 250



(16)
Pemberian larutan Triton-X
untuk permeabilitas
membran membran pada sel



(17)
Pemberian antibodi primer
pada *well-microplate*



(18)
Pencucian dengan PBS
sebelum diberikan antibodi
Sekunder



(19)
Well-microplate n-Butanol



(20)
Analisa menggunakan
instrument CLSM

الحسنة، معقة. ٢٠١٩. نشاط مضادة التهاب الدماغ للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية (*Marsilea Crenata C. Presl*) خارج الحيوية (*In Vitro*) في الخلية الدبقية الصغيرة *HMC3*. البحث الجامعي، قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: عارف سورباديناتا. المخبر: ويكا سيدا بغاوان الماجستير.

الكلمات الرئيسية: الفيتواستروجين، السراخس المائية، مضادة التهاب الدماغ، من مجمع التوافق النسيجي الثاني، و الخلية الدبقية الصغيرة.

يؤدي نقص الاستروجين إلى حدوث التهاب الدماغ بسبب التنشيط المرضي للخلايا الصغيرة، بحيث يمكن أن يكون عاملاً مسبباً من حدوث أمراض التنكس العصبي (*neurodegeneratif*). تعتبر الفيتواستروجين (*Fitoestrogen*) مركب له وظيفة أو بنية مثل الاستروجين. تظن أن ورقة السراخس المائية (*Marsilea Crenata C. Presl*) تحتوي على مركب الفيتواستروجين الذي يمكن أن تحل محل الاستروجين في الجسم. والهدف من هذا البحث هو معرفة نشاط و الجرعة الفعالة (ED_{50}) للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية لتخفيض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) في الخلية الدبقية الصغيرة *HMC3*. تم اختبار النشاط من خلال إعطاء الجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية بالجرعات التالية: ٦٢.٥ فغم، ١٢٥ فغم و ٢٥٠ فغم على الخلية الدبقية الصغيرة *HMC3* بعد خلطها مع الإنترفيرون ٧ لمدة ٢٤ ساعة كمقياس للالتهابات وإعطاء جينيستين ٥٠ كعامل التحكم الإيجابي. تحليل كثافة الفلورية من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) باستخدام طريقة الكيمياء النسيجية المناعية (*Immunocytochemistry*) بمساعدة أداة مجهر ليزر ماسح (CLSM). التحليل الإحصائي باستخدام الاختبار الارتباطي لسيفرمان (*spearman rho*) رو بالارتباط المعتدل مما يدل عليه درجة الارتباط المبينة ٠.٥٦٢. واختبار الخلاف لكروشكال-واليس (*Kruskal-wallis*) مما أظهر درجة الأهمية ٠.٠١٢. ($p > ٠.٠٥٠$)، فتعني أن هناك اختلاف كبير في جميع المجموعات العلاجية. وأظهرت نتائج اختبار ثنائي إيثيل أميد حمض الليسرجيك (LSD) وجود اختلاف كبير في كل المجموعة العلاجية بالجرعات المختلفة على عامل التحكم السليبي بالدرجة ف > ٠.٠٥٠. وأشارت نتائج هذا البحث إلى أن إعطاء جرعات للجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية يخفض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) والدرجة من الجرعة الفعالة (ED_{50}) المحسولة منها هي ٢.٢٠٥ فغم، حيث أن الجزء الصغير من ن- بوتانول في ورقة السراخس المائية له نشاط كمضادة التهاب الدماغ في تخفيض كثافة الفلورية (*fluoresensi*) من مجمع التوافق النسيجي الثاني (MHC II) في الخلية الدبقية الصغيرة *HMC3* بالجرعة ٢٥٠ فغم.

Penerjemah,



M. Mubasysyir Munir, MA
NIDT: 19860513201802011215

Tanggal

Validasi Kepala PPB,



M. Abdul Hamid, MA
NIP: 19730201 1998031007

