

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

SKRIPSI

Oleh :
NOVYANANDA SALMASFATTAH
NIM. 15670020



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

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

SKRIPSI

Oleh:
NOVYANANDA SALMASFATTAH
NIM. 15670020

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

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI ETIL ASETAT
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Pres) SECARA *IN VITRO* PADA
SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh:
NOVYANANDA SALMASFATTAH
NIM. 15670020

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 07 Mei 2019

Pembimbing I



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

Pembimbing II



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

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi




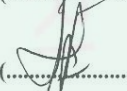
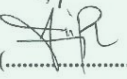
Dr. Rohatul Muti'ah, M. Kes., Apt.
NIP. 19800203 200912 2 003

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

SKRIPSI

Oleh:
NOVYANANDA SALMASFATTAH
NIM. 15670020

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 07 Mei 2019

Ketua Penguji : Weka Sidha Bhagawan, M. Farm., Apt. (.....) 
NIP. 19881124 20160801 1 085
Anggota Penguji : Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm., Apt. (.....) 
NIP. 19900221 201801 1 001
drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. (.....) 
NIP. 19850720 200912 1 003
Hajar Sugihatoro, M.P.H, Apt. (.....) 
NIP. 19851216 20160801 1 086

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi




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

LEMBAR PERSEMBAHAN

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT beserta shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW sehingga bisa terselesainya skripsi ini. Dengan rasa syukur yang mandalam, penulis persembahkan tulisan karya sederhana ini kepada :

Kedua orang tua, ayahanda tercinta Mas'ud dan ibunda tercinta Nuryani yang senantiasa menyebut nama penulis dalam setia doa yang dipanjatkan, memberi motivasi, dukungan dalam segala bentuk, semangat dan kasih sayang yang tak pernah putus sehingga penulis dapat menempuh pendidikan sarjana dengan lancar.

Ketiga adik tercinta Syendriva Zeptian Zenmas yang selalu mendukung, mendoakan selama ini, dan juga sebagai teman diskusi tentang kehidupan.

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

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

Novyananda Salmasfattah / 15670020

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Novyananda Salmasfattah
NIM : 15670020
Jurusan : Farmasi
Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Judul Penelitian : Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) secara *In Vitro* pada Sel Mikroglia HMC3

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

Malang, 07 Mei 2019

Yang membuat pernyataan,



Novyananda Salmasfattah
NIM. 15670020

MOTTO

*“You can’t wait for inspiration.
You have to go after it with a
club.”*

“Anda tidak bisa menunggu
inspirasi. Anda harus
mengejarinya dengan giat.”

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

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

1. Prof. Dr. Abdul Harris, M. Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. Dr. Bambang Pardjanto, Sp. B, Sp. BP- RE: (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universita Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Burhan Ma'arif Z A,S Farm., M. Farm., Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis demi terselesainya skripsi ini.
4. Dr. Rohatul Muti'ah, M Kes. Apt selaku ketua jurusan yang memberi saran kepada peneliti.
5. drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, bimbingan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.

6. Weka Sidha Bhagawan, M. Farm., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan, bimbingan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini
7. Hajar Sugihatoro, M.P.H, Apt selaku dosen penguji agama yang telah mengingatkan peneliti tentang bidang agama.
8. Seluruh Dosen Pengajar di Jurusan Farmasi yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama di UIN Malang.
9. Semua rekan - rekan "PHYTOESTROGEN PROJECT" yaitu, Pace, Mamen, Udin, Denis, Annisa, Dila, dan Kiba yang telah sudi untuk berdiskusi kapanpun dan dimanapun.


Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini.

Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi dan dapat dilaksanakan sebagai mana mestinya untuk penelitian yang lain. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 07 Mei 2019

Penulis


Novyananda Salmasfatah
15670020

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
LEMBAR PERSEMBAHAN	
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	
MOTTO	
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
ABSTRAK	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan.....	7
1.4 Manfaat.....	8
1.5 Batasan Masalah.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tinjauan Tentang Semanggi	9
2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi Semanggi	9
2.1.2 Morfologi Semanggi.....	10
2.1.3 Manfaat dan Kandungan Semanggi.....	11
2.2 Tinjauan Tentang Fitoestrogen.....	12
2.3 Tinjauan Tentang Estrogen.....	14
2.4 Tinjauan Tentang Neuroinflamasi.....	15
2.5 Tinjauan Fitoestrogen sebagai Antineuroinflamasi.....	15
2.6 Tinjauan Tentang Ekstraksi.....	17
2.6.1 Definisi Ekstraksi	17
2.6.2 Ekstraksi Metode UAE.....	18
2.6.3 Definisi Fraksinasi Cair-cair.....	18
2.7 Tinjauan <i>Mayor Histocompatibility Complex</i> class II (MHC II)	19

2.8 Tinjauan Tentang Sel Mikroglia HMC3.....	20
2.9 Tinjauan Tentang <i>Immunocytochemistry</i>	22
2.10 Tinjauan <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>	23
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	25
3.1 Bagan Kerangka Konseptual	25
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	26
3.3 Hipotesis Penelitian	27
BAB IV METODE PENELITIAN	28
4.1 Jenis Penelitian	28
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	28
4.3 Populasi dan Sampel.....	28
4.3.1 Populasi	28
4.3.2 Sampel	28
4.3.3 Teknik Pengambilan Sampel.....	29
4.4 Variabel Penelitian	29
4.4.1 Variabel Bebas.....	29
4.4.2 Variabel Tergantung.....	29
4.4.3 Variabel Terkontrol	29
4.4.4 Definisi Operasional.....	29
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	31
4.5.1 Alat	31
4.5.2 Instrumen	31
4.5.3 Bahan.....	32
4.6 Prosedur Penelitian	32
4.6.1 Determinasi Semanggi.....	32
4.6.2 Penyiapan Bahan	32
4.6.3 Prosedur Ekstraksi	32
4.6.4 Fraksinasi dengan Pelarut Etil Asetat.....	33
4.6.5 Uji Aktivitas secara <i>In Vitro</i>	34
4.7 Alur Penelitian.....	39
4.6.4 Uraian Alur Penelitian.....	39
4.6.5 Kerangka Alur Penelitian	41
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	42
5.1 Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman.....	42

5.2 Pengukuran Nilai Kadar Air	43
5.3 Pembuatan Ekstrak	44
5.4 Pembuatan Fraksi Etil Asetat	46
5.5 Skrining Fitokimia Menggunakan UV <i>Cabinet</i>	49
5.6 Perlakuan dan Preparasi Sampel.....	53
5.7 Analisa Data Intensitas Fluoresensi MHC II.....	60
5.8 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen	65
5.9 Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi dalam Perspektif Islam	67
BAB VI PENUTUP	68
6.1 Kesimpulan.....	68
6.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA.....	69
LAMPIRAN-LAMPIRAN	75



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 <i>Microplate 24-well</i>	36
Tabel 5.1 Jumlah Daun Semanggi.....	42
Tabel 5.2 Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering Daun Semanggi.....	43
Tabel 5.3 Hasil Ekstraksi Daun Semanggi	46
Tabel 5.4 Hasil Perhitungan % Rendemen.....	49
Tabel 5.5 Rincian Profil KLT Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi	52
Tabel 5.6 Intensitas Fluoresensi MHCII Tiap Dosis Perlakuan	59
Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	61
Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's Test</i>	60
Tabel 5.9 Hasil Uji Korelasi <i>Spearman Rho</i>	62
Tabel 5.10 Hasil Uji <i>Least Significant Difference (LSD)</i>	63
Tabel 5.11 Hasil Uji Beda <i>Kruskal-Wallis</i>	64
Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman Semanggi	10
Gambar 2.2	Struktur Estradiol.....	14
Gambar 2.3	Jalur ikatan antara estradiol (E2) dengan <i>estrogen receptors</i> (ERs).....	17
Gambar 2.4	Pengamatan SEM dan CLSM.....	24
Gambar 2.5	Diagram CLSM	24
Gambar 3.1	Skema kerangka konseptual	25
Gambar 4.1	Alur Penelitian.....	41
Gambar 5.1	Hasil Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi	45
Gambar 5.2	Pemisahan Fase Air dan Fase Etil Asetat	47
Gambar 5.3	Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi.....	48
Gambar 5.4	Visualisasi Skrining Fitokimia dengan UV <i>Cabinet</i>	51
Gambar 5.5	<i>Microplate 24-well</i> setelah difiksasi.....	56
Gambar 5.6	Pemberian Triton x-100 0,1 %	56
Gambar 5.7	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Dosis 62,5 ppm.....	58
Gambar 5.8	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Dosis 125 ppm.....	58
Gambar 5.9	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Dosis 250 ppm.....	58
Gambar 5.10	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Kontrol (-).....	58
Gambar 5.11	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Kontrol (+).....	58
Gambar 5.12	Intensitas Fluoresensi MHC II pada Fraksi Etil Asetat	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Semanggi	76
Lampiran 2. Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Serbuk Simplisia Daun Semanggi.....	77
Lampiran 3. Hasil perlakuan uji aktivitas metode pewarnaan ICC.....	79
Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel	80
Lampiran 5. Hasil Analisa Data	82
Lampiran 6. Ekstraksi dan Fraksinasi	85
Lampiran 7. Skrining Fitokimia dengan KLT.....	90



DAFTAR SINGKATAN

ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BSC	: <i>Bio Safety Cabinet</i>
CCL2	: <i>C-C Motif Ligand 2</i>
CCL5	: <i>C-C Motif Ligand 5</i>
CLSM	: <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
ED ₅₀	: <i>Effective Dose 50</i>
EMEM	: <i>Eagle's Minimum Essential Media</i>
ERs	: <i>Estrogen Receptors</i>
ER- β	: <i>Estrogen Receptor β</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
GAS	: <i>IFN-Gamma-Activated Sequence</i>
GFAP	: <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HMC3	: <i>Human Microglial Clone 3 Cell Line</i>
HRT	: <i>Hormonal Replacement Therapy</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
IFN- γ	: <i>Interferon Gamma</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
iNOS	: <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LSD	: <i>Least Signifikan Different</i>
MHC II	: <i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>

PFA	: <i>Paraformaldehyd</i>
ppm	: <i>part per million</i>
RIA	: <i>Radioimmunoassay</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	: <i>Standar Deviasi</i>
STAT1	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th1	: <i>Sel T Helper 1</i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TSH	: <i>Terapi sulih hormon</i>
UAE	: <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>
UV-Vis	: <i>Ultraviolet Visualizer</i>



ABSTRAK

Salmasfattah, Novyananda. 2019. **Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi Etil Asetat 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 Z.A, M. Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Penguji: Weka Sidha Bagawan, M. Farm., Apt.

Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur dan fungsi yang sama seperti estrogen. Daun semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) diduga mengandung senyawa fitoestrogen yang dapat berkhasiat sebagai antineuroinflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas dan ED₅₀ dari fraksi etil asetat daun semanggi terhadap intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3. Penelitian ini dilakukan dengan pemberian fraksi etil asetat daun semanggi 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm ke sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ 10 ng selama 24 jam agar mengalami neuroinflamasi, dan pemberian genistein 50 μ M sebagai kontrol positif. Analisa intensitas fluoresensi MHC II menggunakan metode pewarnaan ICC dan instrumen CLSM untuk memvisualisasikan intensitas fluoresensi MHC II. Analisa statistik menggunakan uji beda *kruskal-wallis* menunjukkan nilai signifikansi $0,011 < 0,050$, maka terdapat perbedaan signifikan pada masing-masing dosis perlakuan dan uji korelasi *spearman rho* memiliki korelasi yang sangat kuat, ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi 0,821. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat dapat menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada semua dosis perlakuan, dimana pada dosis 62,5 ppm menjadi dosis optimal yang menyamai kontrol positif dan ED₅₀ yang didapat yaitu 1,436 ppm. Dari hasil penelitian tersebut, fraksi etil asetat daun semanggi memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi yang ditunjukkan dengan penurunan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3.

Kata Kunci : *Marsilea crenata* C. Presl, Intensitas Fluoresensi, Sel Mikroglia HMC3

ABSTRACT

Salmasfattah, Novyananda. 2019. **Antineuroinflammation Activity of Ethyl Acetate Fractions Semanggi Leaves (*Marsilea crenata* C. Presl) *In Vitro* on HMC3 Microglia Cells.** *Essay*. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim Malang State Islamic University. Mentors: (I) Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Consultant: Weka Sidha Bagawan, M. Farm., Apt.

Phytoestrogens are compounds that have the same structure and function as estrogen. Semanggi leaves (*Marsilea crenata* C. Presl) is suspected contain phytoestrogens compounds which can be efficacy as antineuroinflammation. The purpose of this study was to determine the activity and ED₅₀ of the ethyl acetate fractions of semanggi leaves to intensif of MHC II fluorescence on HMC3 microglia cells. This research was carried out by giving semanggi leaves of ethyl acetate fractions 62.5 ppm, 125 ppm, and 250 ppm to HMC3 microglia cells that had been induced by IFN- γ 10 ng for 24 hours to experience neuroinflammation, and administration of genistein 50 μ M as a positive control. Intensity of MHC II fluorescence analysis using the ICC to staining method and using the CLSM instrument to visualize MHC II. Statistical analysis using the *kruskal-wallis* difference test showed a significance value of $0.011 < 0.050$, so there were significant differences in each dose of treatment and the *spearman rho* correlation test had a very strong correlation, indicated by the correlation coefficient value 0.821. The results showed that administration of ethyl acetate fraction can reduce the intensity of MHC II fluorescence at all treatment doses, where at a dose of 62.5 ppm the optimal dose equals positive control and the ED₅₀ obtained was 1.436 ppm. From the results of these studies, the ethyl acetate fractions of semanggi leaves has activity as an antineuroinflammation which is indicated by a decrease in the intensity of MHC II fluorescence in HMC3 microglia cells.

Keywords: *Marsilea crenata* C. Presl, Fluorescence Intensity, HMC3 Microglia Cells

المستخلص

سلمسفتاح، نوفياناندا. 2019. نشاطة معادي نيوروينفلاماتوري كسر أسيتات الإثيل من ورقة برسيم (*Marsilea crenata C. Presl*) في الزجاج بريقيات خلايا HMC3. بحث جامعي. قسم الصيدلية كلية الطب وعلوم الصحية، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: (1) برهان معارف، الماجستير؛ (2) د. عارف سورياديناتا؛ المناقش: ويكا سيدا باغاوان، الماجستير

الاستروجين النباتي هو المركب ذو نفس المكونات والوظائف مع استروجين. اختلال استروجين يؤدي إلى نشأة الأمراض التنكسية العصبية مثل نيوروينفلاماتوري بدليل ارتفاع MHC II في بريقيات خلايا HMC3. وتعتبر من ورقة برسيم (*Marsilea crenata C. Presl*) تحتوي على مركب الاستروجين النباتي كمعادي نيوروينفلاماتوري. يهدف هذا البحث إلى تعيين نشاطة وED₅₀ من كسر أسيتات الإثيل من ورقة برسيم إلى كثافة فلورة MHC II في بريقيات خلايا HMC3. وأقيم هذا البحث بمنح كسر أسيتات الإثيل من ورقة برسيم 62,5 جزء بالمليون، 125 جزء بالمليون، و 250 جزء بالمليون إلى بريقيات خلايا HMC3 التي يتم تحريضها بـ IFN- γ 10 النانوغرام لمدة 24 ساعة لتصاب بنيوروينفلاماتوري، ومنح جينستين 50 μ M كالمحكم الموجب. ويتم تحليل كثافة فلورة MHC II باستخدام طريقة تلوين الرعاية التاجية المركزة وأدوات CLSM لعرض كثافة فلورة MHC II. ويدل التحليل الإحصائي باستخدام اختبار التخلف لكروسكال-واليس على نتيجة الاعتداد $0,011 > 0,050$ ، فيوجد هناك الفرق البعيد بين الجرعات واختبار التعالق رماح رو وله ارتباط وطيد، بدليل نتيجة ارتباط المعامل 0,821. ونتائج البحث تدل على أن منح كسر أسيتات الإثيل من ورقة برسيم يخفض كثافة فلورة MHC II في جرعة 62,5 جزء بالمليون، وعدد ED₅₀ المكتسبة هي 1,436 جزء بالمليون. انطلاقاً من هذه النتيجة، يعتبر أن كسر أسيتات الإثيل من ورقة برسيم له نشاطة كمعادي نيوروينفلاماتوري بدليل تدهور كثافة فلورة MHC II في بريقيات خلايا HMC3.

الكلمات الأساسية: *Marsilea crenata C. Presl*، كثافة الفلورة، بريقيات خلايا HMC3

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penelitian epidemiologi diketahui bahwa penurunan hormon estrogen pada wanita *menopause* meningkatkan resiko penyakit neurodegeneratif, karena hormon ini diketahui memegang peranan penting dalam memelihara fungsi otak (Czlonkowska, 2003). Namun, menurut Kasdu (2004) menyatakan bahwa pada masa *premenopause*, hormon *estrogen* dan *progesteron* masih tinggi, tetapi semakin rendah ketika memasuki masa *perimenopause* dan *postmenopause*. Masa *menopause* merupakan bagian dari *perimenopause*. *Postmenopause* merupakan masa yang berlangsung kurang lebih 3-5 tahun setelah *menopause*. Masa ini biasanya terjadi pada usia 50-55 tahun. Sejalan dengan bertambahnya usia, proses penuaan pada perempuan *postmenopause* disertai dengan proses degenerasi, antara lain terjadi perubahan fisik dan penurunan produksi hormon (Baziad, 2003). Reseptor estrogen telah ditemukan dalam area otak yang berperan dalam fungsi belajar dan memori, seperti hipokampus. Penelitian lain juga diketahui ada hubungan antara, hormon seks dengan sistem memori otak yaitu berkaitan dengan sistem syaraf dan mekanisme neurobiologi (Janowsky, 2000).

Pada usia lanjut terjadi penurunan fungsi sel otak, yang menyebabkan penurunan daya ingat jangka pendek, sulit berkonsentrasi, melambatnya proses informasi sehingga dapat mengakibatkan kesulitan berkomunikasi (Mubarok *et al.*, 2010). Seiring bertambahnya usia, tubuh akan mengalami proses penuaan, termasuk otak. Otak akan mengalami perubahan fungsi, termasuk fungsi kognitif

berupa sulit mengingat kembali, berkurangnya kemampuan dalam mengambil keputusan dan bertindak (lebih lamban). Fungsi memori merupakan salah satu komponen intelektual yang paling utama, karena sangat berkaitan dengan kualitas hidup. Banyak lansia mengeluh kemunduran daya ingat yang disebut sebagai mudah lupa. Gangguan kognitif pada wanita *postmenopause* diduga disebabkan oleh kekurangan hormon estrogen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa estrogen bersifat sebagai neuroprotektor, sehingga dengan menurunnya kadar estrogen dapat menyebabkan gangguan kognitif. Hormon estrogen bersifat sebagai neuroprotektor dengan mencegah terjadinya penyumbatan pembuluh darah yang berbahaya. Aterosklerosis dapat menyebabkan terjadinya kelainan vaskuler, gangguan pembuluh darah serebral dan lesi parenkim pada otak, yaitu jika pada area ventral hipokampus terjadi gangguan, sehingga menyebabkan gangguan kognitif pada wanita *menopause* (Cutter, 2003).

Penurunan kadar estrogen di dalam tubuh akan mempengaruhi semua fungsi fisiologis hormon tersebut akan menjadi terganggu. Perubahan fisiologis sindroma kekurangan estrogen akan menampilkan gambaran klinis berupa gangguan neurovegetatif, gangguan psikis, gangguan somatik dan gangguan siklus haid. Dalam jangka pendek, pada masa *premenopause* dan *postmenopause*, turunnya kadar estrogen menyebabkan timbulnya suatu kelompok gejala yang disebut sebagai sindroma defisiensi estrogen yang terdiri dari keluhan vasomotor (gejolak panas, banyak berkeringat, berdebar-debar, pusing, sulit tidur), psikologis (mudah tersinggung, lesu, emosi labil, pelupa, libido menurun), urogenital (vagina kering, nyeri senggama, keluhan uretra), kulit (kulit kering, rambut kering, kuku rapuh), mata. Kekurangan estrogen dapat menyebabkan gangguan pada beberapa organ,

seperti terjadinya penurunan aliran darah ke otak dan mempengaruhi neurotransmitter yang ada di otak (Proverawati dan Sulistyawati, 2010).

Defisiensi estrogen menyebabkan timbulnya penyakit neurodegeneratif. Neurodegeneratif merupakan suatu kondisi patologis pada sel saraf pusat dimana sel saraf pusat tersebut mengalami kehilangan struktur atau fungsi sebenarnya secara progresif (Przedborski *et al.*, 2003). Neurodegeneratif dapat terlihat dari adanya sel-sel saraf pusat yang mengalami degeneratif, yaitu mengalami tahapan-tahapan menuju apoptosis. Kondisi tersebut akan direspon oleh sel saraf pusat dengan munculnya sistem imun saraf pusat berupa aktivasi mikroglia. Munculnya mikroglia pada saraf pusat akan menyebabkan peradangan, dimana kondisi ini disebut neuroinflamasi. Neuroinflamasi didefinisikan sebagai respon inflamasi di dalam otak. Peradangan ini dimediasi oleh produksi sitokin, kemokin (CCL2, CCL5, dan CXCL1), tumor *necrosis factor*, *reactive oxygen species* dan *secondary messengers*. *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC II) merupakan agen proinflamasi utama yang berperan dalam neuroinflamasi, hal ini dikarenakan MHC II hanya dapat pada sel saraf pusat, dimana aktivasinya distimulasi oleh sel CD4+ (Huang, 2004). Mediator ini diproduksi oleh sel saraf pusat meliputi, mikroglia, sel endotel, dan berasal dari perifer sel imun. Pengobatan neuroinflamasi telah banyak dilakukan terutama dengan pengembangan pada pengobatan herbal untuk menekan efek samping dari terapi sulih hormon (TSH) seperti penggunaan senyawa fitoestrogen yang telah terbukti dapat mengurangi keluhan *menopause* dan *postmenopause* (Ghani, 2009).

Fitoestrogen adalah substansi derivat dari tanaman yang secara struktur maupun fungsional sama seperti estradiol, tetapi efek estrogennya lemah (Baziad,

2003). Fitoestrogen dapat bekerja seperti hormon dalam tubuh sehingga dapat mempengaruhi produksi atau pemecahan estrogen oleh tubuh dan kadar estrogen yang di bawa dalam aliran darah. Manusia perlu memperhatikan tanaman yang tumbuh dengan baik untuk dijadikan bahan obat yang bermanfaat bagi kesehatannya, sebagaimana yang telah diterangkan dalam Al-qur'an :

أَوْ لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Pada tafsir ini diartikan bahwa tumbuhan yang baik yaitu yang tumbuh subur dan memiliki manfaat (Shihab, 2002). Terdapat berbagai tanaman yang bermanfaat sebagai obat-obatan. Salah satunya adalah tanaman semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl). Tanaman semanggi merupakan salah satu jenis tanaman air yang termasuk dalam tumbuhan paku-pakuan dan banyak ditemukan di pematang sawah, kolam, danau, rawa dan sungai. Tanaman ini memiliki morfologi yang sangat khas yaitu bentuk daunnya menyerupai payung yang tersusun dari empat kelompok anak daun yang berhadapan (Laswati, 2011; Nurjanah dan Abdullah, 2012). Kandungan tanaman semanggi adalah fitokimia seperti, steroid, karbohidrat, dan flavonoid. Flavonoid juga memiliki khasiat sebagai antibakteri, antiinflamasi, antitumor, dan mencegah osteoporosis (Yacoeb, 2010). Salah satu senyawa fitoestrogen yang berpotensi sebagai antineuroinflamasi adalah flavonoid. Menurut Ma'arif *et al* (2018) fraksi n-heksana semanggi dapat meningkatkan pembentukan tulang melalui induksi sel osteobas MC3T3-E1 dalam proses diferensiasi yang didapat dari peningkatan *Alkaline Phosphatase* (ALP)

melalui pengukuran intensitas fluoresensi ALP dengan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Kelompok senyawa fitoestrogen yang berperan dalam meningkatkan pembentukan tulang melalui induksi sel osteoblas MC3T3-E1 dalam proses diferensiasi adalah asam palmitat.

Pengamatan intensitas fluoresensi MHC II dilakukan pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ . Penginduksian IFN- γ bertujuan agar sel mikroglia HMC3 teraktivasi dan mengeluarkan *antigen presenting cell* (APC) yaitu MHC II, sehingga sel mikroglia HMC3 mengalami neuroinflamasi. IFN- γ mengurangi ekspresi gen kolagen dan mengaktifkan gen MHC II (Xu, 2003). Hal ini dikarenakan IFN- γ mampu mengaktifasi faktor transkripsional yaitu NF- κ B yang dapat menstimulasi sejumlah ezim pengaktivasi mikroglia. Senyawa fitoestrogen yang terdapat pada fraksi etil asetat tanaman semanggi diberikan ke sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ . 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. Pelarut etil asetat merupakan pelarut semipolar yang banyak digunakan untuk menggolongkan senyawa-senyawa yang bersifat semipolar (Kresnawaty *et al.*, 2008). Diharapkan dengan pemberian fraksi etil asetat tersebut MHC II sebagai agen proinflamasi akan mengalami penurunan intensitas fluoresensi, dimana *estrogen reseptor* (ER) akan berikatan dengan senyawa fitoestrogen.

Penurunan intensitas fluoresensi dari MHC II tersebut dapat diamati menggunakan instrumen CLSM, dengan instrumen tersebut peneliti dapat

mengetahui letak dan intensitas fluoresensi dari MHC II pada sel mikroglia HMC3 secara tiga dimensi (3D). Metode yang digunakan adalah *Immunocytochemistry* (ICC), hal ini dikarenakan objek berupa sel yang dapat dilakukan pewarnaan dengan *fluorochrome* FITC. *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 (Ma'arif, 2018).

Berdasarkan ulasan tersebut sangat penting dilakukan penelitian ini untuk mengatasi dan mengurangi defisiensi estrogen pada wanita karena bertambahnya usia. Hormon estrogen merupakan hormon yang penting bagi fisiologis organ tubuh pada wanita. Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil dosis efektif (ED₅₀) dari fraksi etil asetat tanaman semanggi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti menyusun beberapa rumusan masalah :

1. Apakah terdapat hubungan antara fraksi etil asetat daun semanggi yang diberikan terhadap intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 melalui metode *immunocytochemistry* (ICC) dengan menggunakan instrumen CLSM ?
2. Berapakah nilai *effective dose* (ED₅₀) fraksi etil asetat daun semanggi yang mampu menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi IFN- γ ?

1.3 Tujuan

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti menyusun beberapa tujuan penelitian :

1. Mengetahui potensi dan hubungan antara dosis fraksi etil asetat daun semanggi terhadap intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ .
2. Mengetahui nilai *effective dose* (ED₅₀) fraksi etil asetat daun semanggi yang mampu menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi IFN- γ .

1.4 Manfaat

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dapat memberikan manfaat, antara lain :

1.4.1 Manfaat Aplikatif

1. Menambah pengetahuan masyarakat akan manfaat tanaman semanggi.
2. Menyadarkan masyarakat untuk melestarikan tanaman semanggi agar tidak punah.
3. Memperkaya dunia kesehatan terkait kandungan fitoestrogen pada tanaman semanggi agar dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan neurodegeneratif.

1.4.2 Manfaat Teoritis

1. Mengetahui aktivitas dan ED₅₀ tanaman semanggi sebagai antineuroinflamasi.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini, anantara lain :

1. Bagian tanaman semanggi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun yang memiliki warna hijau muda yang diperoleh dari Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur.
2. Fraksi yang digunakan adalah fraksi etil asetat. Fraksi tersebut diperoleh dari fraksinasi dengan pelarut n-heksana, pelarut asetat, pelarut n-butanol, dan pelarut air.
3. Parameter yang diukur adalah penurunan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang diamati menggunakan CLSM.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Semanggi

2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi Semanggi

Menurut Herlina dan tim Solusi Alternatif (2011), Semanggi memiliki nama latin "*Marsilea crenata* C. Presl". Tanaman bernama latin *Marsilea crenata* C. Presl ini oleh masyarakat Indonesia umumnya dikenal dengan nama daerah sebagai tanaman tapak itik (Setijati dan Johar, 1985). Semanggi merupakan tumbuhan yang banyak terdapat di lingkungan air tawar seperti, sawah, kolam, danau, dan sungai. Semanggi sering dianggap sebagai gulma pada tanaman padi, namun memiliki nilai kegunaan yang beraneka ragam. Tanaman ini biasanya tumbuh dengan jenis-jenis tumbuhan air lainnya seperti eceng kecil, genjer, rumput air, serta teki alit. Semanggi memiliki beberapa nama lain seperti jukut calingcingan (Sunda), tapak itek (Malaysia), upat-upat (Filipina), chutul phnom (Kamboja), pak vaen (Laos), phak waen (Thailand), dan *water clover fern* (Inggris) (Afriastini, 2003). Semanggi tumbuh tersebar di Asia Tenggara di 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). Berikut merupakan klasifikasi semanggi yang diperoleh dari *United States Department of Agriculture*:

Klasifikasi Semanggi:

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Filicopsida

Ordo : Hydropteridales

Famili : Marsileaceae

Genus : *Marsilea* L.

Spesies : *Marsilea crenata* C. Presl



Gambar 2.1 Tanaman Semanggi

(Sumber: Dokumentasi Afriastini, 2003)

2.1.2 Morfologi Semanggi

Semanggi tumbuh merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm. Daun semanggi memiliki 4 helai anak daun dengan ukuran rata-rata panjang 2,5 cm dan lebar 2,3 cm. Daun tersebut tipis dan lembut berwarna hijau gelap. Akar pada tanaman semanggi tertanam dalam substrat di dasar perairan. *Sporocarps* yang merupakan struktur reproduksi berbentuk panjang dan bulat pada bagian ujung, terdapat sebanyak 1 sampai 6 buah dengan ukuran 3-4 mm, dan panjang tangkai *sporocarps* 5 mm. Tangkai pada *sporocarps* tidak bercabang, di ujung yang

berbentuk melingkar terdapat seperti gigi kecil dan ditutupi dengan rambut *caducous* berhimpitan dan tegak lurus dengan tangkai (Afriastini, 2003).

2.1.3 Manfaat dan Kandungan Semanggi

Masyarakat Jawa memanfaatkan daun semanggi muda sebagai bahan pangan. Semanggi muda banyak digunakan sebagai campuran pecel di daerah Surabaya. Pemanfaatan semanggi tidak hanya sebagai bahan pangan saja, daun dan batang semanggi juga dapat digunakan sebagai peluruh air seni (Afriastini 2003). Kandungan flavonoid pada tanaman ini juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiradang, antitumor, dan mencegah osteoporosis (Yacoeb, 2010). Semanggi memiliki rasa manis sedikit pedas dan sejuk. Khasiatnya untuk menghilangkan bengkak, antiradang, peluruh air seni, antibiotika, penurun panas, menetralkan racun, dan peluruh dahak (Kusuma, 2005).

Daun dan batang semanggi mengandung saponin dan polifenol (Herlina, 2011). Menurut Yacoeb *et al.* (2010) menyatakan bahwa pada tanaman semanggi segar terdapat kandungan fitokimia semanggi tanaman air tawar seperti gula, steroid, karbohidrat, dan flavonoid. Flavonoid juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiinflamasi, antitumor, alergen, dan mencegah osteoporosis. Menurut Ma'arif (2016) ekstrak n-heksana dan fraksi daun semanggi mengandung beberapa senyawa diterpenoid seperti neophytadiene yang memiliki aktivitas sebagai antipiretik, analgesik, antiinflamasi, antimikroba, dan antioksidan; *dihydroactinidiolide* yang berfungsi sebagai *fragrance* atau pheromon pada hewan; phytol memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, dan diuretik; senyawa asam lemak seperti asam palmitat yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, hipokolesterolemik, antiandrogenik, dan inhibitor 5- α

reduktase; asam oleat memiliki aktivitas sebagai pencegah kanker dan antiandrogenik; asam elaidik yang memiliki aktivitas sebagai antikolesterol dan LDL rendah; dan juga senyawa lain yang tidak dikenal. Studi lain menunjukkan bahwa ekstrak semanggi 0,8 gram ditambah 10 mg vitamin B1 sekali sehari dapat signifikan meningkatkan konsentrasi estrogen pada wanita *postmenopause* (Putra, 2011). Menggunakan *radioimmunoassay* (RIA), konsentrasi senyawa seperti estradiol di daun *semanggi* terdeteksi cukup tinggi dan memiliki potensi dalam menunda peningkatan ketidakseimbangan proses remodeling tulang pada wanita pascamenopause (Laswati, 2011; Yang *et al.*, 2012; Ososki *et al.*, 2003).

2.2 Tinjauan Tentang Fitoestrogen

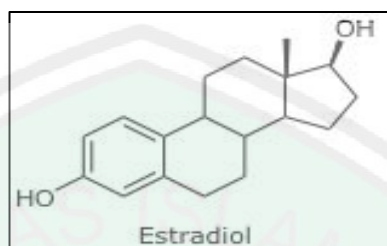
Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini. Salah satunya adalah fitoestrogen, fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover dan Assinder, 2006). Menurut Jefferson, *et al.* (2002) fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti *hormonal replacement therapy* (HRT). Fitoestrogen merupakan alternatif pengganti estrogen yang potensial tanpa memiliki efek samping yang berbahaya dan senyawa fitoestrogen pada tanaman semanggi juga memiliki aktivitas antiosteoporosis (Ososki dan Kennelly, 2003; Villiers, 2009; Yang *et al.*, 2012).

Fitoestrogen sendiri merupakan golongan senyawa berasal dari tumbuhan yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan reseptor

estrogen (*estrogen like substance*), selain mudah didapatkan senyawa golongan fitoestrogen juga dilaporkan mempunyai khasiat untuk meningkatkan massa tulang. 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 estradiol (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 estradiol (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 and Kennelly, 2003; Dweck, 2006; Villiers, 2009).

Pada tanaman dikenal ada beberapa kelompok fitoestrogen yaitu; isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti *flavones*, *chalcones*, *diterpenoids*, *triterpenoids*, *coumarins* dan *acyclics* . Pada kelompok fitoestrogen tersebut isoflavon merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, dikarenakan kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi. Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman. Senyawa yang diindikasikan memiliki fungsi antifertilitas antara lain fitoestrogen. Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen atau dapat berinteraksi dengan reseptor

estrogen (Biben, 2012). Fitoestrogen banyak ditemukan pada tanaman kelompok biji-bijian, buah-buahan dan sayuran. Secara struktur dan fungsional, fitoestrogen serupa dengan estradiol (17β -estradiol) dan merupakan senyawa difenolik non-steroid (Kuntana, 2005).



Gambar 2.2 Struktur Estradiol (Ososki dan Kennelly, 2003)

2.3 Tinjauan Tentang Estrogen

Estrogen merupakan hormon golongan steroid yang memiliki banyak fungsi yakni untuk pertumbuhan dan diferensiasi dan fungsi lain di beberapa jaringan dan merupakan faktor penting dalam pemeliharaan kesehatan tulang (Enmark *et al.*, 1997). Estrogen yang terdapat secara alamiah adalah 17β -estradiol, estron dan estriol, dimana 17β -estradiol adalah yang paling dominan. Zat-zat ini adalah steroid C_{18} . Hormon-hormon ini disekresikan oleh teka interna dan sel granulosa folikel ovarium, korpus luteum dan plasenta. Hampir semua estrogen berasal dari ovarium dan terdapat dua puncak sekresi yaitu: pada saat sebelum ovulasi dan selama fase *midluteal* (Sherwood L., 2004).

Estrogen mempengaruhi proses pembongkaran tulang dengan cara menghambat pematangan osteoklas sehingga bisa menghambat resorpsi tulang. Pada keadaan normal estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti: Interleukin-1 (IL-1),

Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang. Di lain pihak estrogen meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), yang merupakan satu-satunya faktor pertumbuhan yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat lubang tulang yang telah diserap oleh sel osteoklas. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen, untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin seperti tersebut diatas, sekalipun secara tidak langsung maupun secara langsung juga berpengaruh pada sel osteoklas (Waters *et al.*, 1999).

2.4 Tinjauan Tentang Neuroinflamasi

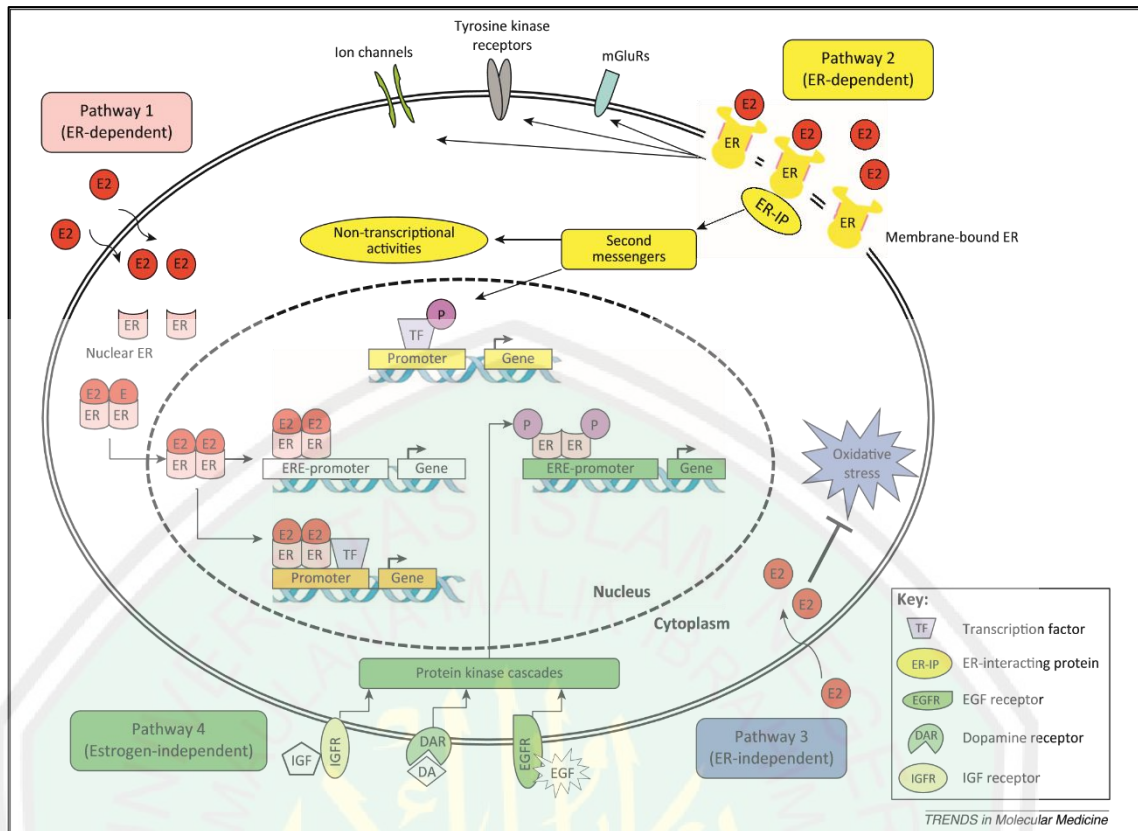
Neuroinflamasi pada sistem saraf pusat secara spesifik dapat muncul karena terjadinya kenaikan mikroglia teraktivasi sehingga meningkatkan ekspresi marker spesifik seperti *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) yang kemudian memicu munculnya mediator peradangan seperti *Interleukin 1*, *Interleukin 6*, TNF- α maupun mediator peradangan lainnya (Chamniansawat dan Chongthammakun, 2015; Matt, 2016; Jantaratnotai *et al.*, 2013). Kenaikan mikroglia teraktivasi ini sendiri secara genetik dapat muncul karena terjadinya defisiensi estrogen pada wanita yang telah memasuki masa *postmenopause* (Lee *et al.*, 2013).

2.5 Tinjauan Fitoestrogen sebagai Antineuroinflamasi

Fitoestrogen merupakan alternatif senyawa untuk mengatasi defisiensi estrogen yang dipercaya dapat mengurangi efek samping penggunaan HRT dengan memberikan tingkat keamanan yang lebih baik namun dengan aktifitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015). Fitoestrogen merupakan senyawa dari tanaman yang memiliki struktur mirip dengan estrogen (17 β -estradiol) seperti senyawa golongan isoflavon, triterpenoid, steroid dan isosterol (Ososki dan

Kennelly, 2003) maupun dapat menggantikan fungsi estrogen dalam tubuh (Sirotkin dan Harrath, 2014).

Aktivitas antineuroinflamasi muncul ketika senyawa fitoestrogen dalam daun semanggi menggantikan fungsi estrogen baik melalui mekanisme *ER-dependent* maupun *ER-independent*, dan pada proses ini terjadi aktivasi sel mikroglia HMC3 pada *alternative pathway* menjadi *M₂ polarity*, dimana sel mikroglia HMC3 aktif bersifat antiinflamasi dan dilakukan pengukuran Arg 1 (Cherry *et al.*, 2014; Mizuno, 2015). Peningkatan ikatan fitoestrogen–ER pada jalur *ER-dependent nuclear-initiated estrogen signaling* dapat mengaktivasi ER pada sitoplasma untuk bertranslokasi dalam nukleus dan menghambat aktivasi faktor transkripsi inflamasi *nuclear factor kappa–light–chain–enhancer of activated B cells* (NF-κB), yang selain menyebabkan penurunan produksi sitokin inflamasi IL- 1, IL-6, TNF-α, NO, dan MHC II (Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016). Pada jalur *ER-dependent* lain yaitu *membrane-initiated estrogen signaling*, senyawa fitoestrogen berikatan dengan ER ataupun reseptor lain pada membran sel. Mekanisme *cross talk* antar reseptor memungkinkan ER dapat teraktivasi meskipun fitoestrogen berikatan dengan reseptor selain ER, begitu pula sebaliknya (Cui *et al.*, 2013). Meskipun aktivitas biologis seringkali dimediasi oleh ER, pada jalur *ER-independent*, fitoestrogen juga memiliki aktivitas antioksidan dengan penghambatan sintesis *reactive oxygen species* (ROS) pada sel, sehingga menghambat apoptosis sel (Haas *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 Jalur Ikatan antara Estradiol (E2) dengan *Estrogen Receptors* (ERs)
(Cui, 2013)

2.6 Tinjauan Tentang Ekstraksi

2.6.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan peristiwa pemindahan massa zat aktif yang semula berada dalam sel ditarik oleh pelarut sehingga terjadi larutan zat aktif dalam pelarut tersebut. Ekstraksi merupakan proses pembuatan ekstrak bahan alam dimana ekstraksi ini dilakukan untuk menarik komponen kimia pada bahan alam (Harborne 1987). Ada beberapa metode ekstraksi diantaranya perkolasi, sokletasi, dan maserasi. Metode ekstraksi yang umum digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dengan pelarut yang cocok untuk senyawa yang akan dicari dan dilakukan berulang-ulang hingga

senyawa tersebut habis dari sampel yang ditandai dengan warna pelarut yang berubah menjadi bening setelah perendaman.

Pada umumnya ekstraksi akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut makin luas. Dengan demikian, makin halus serbuk simplisia, seharusnya makin baik ekstraksinya. Tetapi dalam pelaksanaannya tidak selalu demikian karena ekstraksi masih tergantung juga pada sifat fisik dan kimia simplisia yang bersangkutan (Ahmad, 2006). Ekstraksi biasanya berkaitan dengan pemindahan zat terlarut diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Proses ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen - komponen aktif (Nielsen, 2003).

2.6.2 Ekstraksi Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Pada penelitian ini menggunakan *ultrasonic assisted extraction* (UAE). Metode ultrasonik menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz. Ultrasonik bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi. Salah satu kelebihan metode ekstraksi ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi, dibandingkan dengan ekstraksi termal atau ekstraksi konvensional, metode ultrasonik ini lebih aman, lebih singkat, dan meningkatkan jumlah rendemen kasar. Ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak yang tidak tahan panas, sehingga cocok untuk diterapkan pada ekstraksi senyawa bioaktif tidak tahan panas (Zou, 2014).

2.6.3 Definisi Fraksinasi Cair-cair

Fraksinasi merupakan proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair. 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 dengan ekstraksi cair-cair dilakukan dengan pengocokan. Prinsip pemisahan pada proses fraksinasi adalah didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi (Liza *et al.*,2016) . Fraksinasi ini umumnya dilakukan dengan menggunakan metode corong pisah atau kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan salah satu metode pemurnian senyawa dengan menggunakan kolom. Corong pisah merupakan peralatan laboratorium yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran antara dua fase pelarut yang memiliki massa jenis berbeda yang tidak tercampur. Ekstrak yang telah disuspensikan dalam air, nantinya akan dimasukkan ke dalam corong pisah dan dicampur dengan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Setelah itu corong pisah dikocok. Setelah dikocok, 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.

2.7 Tinjauan *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC II)

MHC II merupakan bagian dari molekul *major histocompatibility complex* (MHC) yang biasanya ditemukan hanya pada *antigen-presenting cell* seperti sel dendritik, fagosit mononuklear (makrofag), beberapa sel endotel, sel epitel timus, dan sel B. Sel-sel ini penting dalam memulai respons imun. Antigen yang

dipresentasikan oleh peptida kelas II berasal dari protein ekstraselular (tidak bersifat sitosolik seperti pada kelas MHC I). Pemuatan molekul MHC kelas II terjadi oleh fagositosis (dalam hal ini sel mikrobial); protein ekstraselular endositik, yang dicerna pada lisosom, dan fragmen peptida epitopik yang dihasilkan dimasukkan ke molekul MHC kelas II sebelum migrasi ke permukaan sel. *Major histocompatibility complex* merupakan marker penanda aktivasi sel mikroglia HMC3 dari *steady state* ke bentuk ameboid, sehingga apabila nilai MHC II yang terukur kecil, maka dapat dikatakan terjadinya efek neuroprotektif (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016).

2.8 Tinjauan Tentang Sel Mikroglia HMC 3

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 ini melepaskan substansi larut seperti faktor neurotropik yang mempengaruhi tingkat proliferasi dari sel neural progenitor (Choi, 2008). Hal ini akan meningkatkan respon cedera pada otak dan meningkatkan neurogenesis dan atau proliferasi progenitor yang terjadi pada penyakit seperti epilepsi, stroke, neuroinflamasi maupun penyakit neurodegeneratif lainnya (Kettenmann *et al.*, 2011).

Sel mikrobial yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sel mikroglia HMC3 (ATCC® CRL-3304™) dengan spesifikasi :

- Organisme Asal : *Homo sapiens* (manusia)
- Jaringan : Otak
- Tipe Sel : Mikroglia
- Usia : Embrio

- Morfologi : Makrofag
- Sifat Pertumbuhan : Melekat
- Penggunaan : Sel mikroglia manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglia primer. Seringkali digunakan untuk analisis biokimia terkait fungsi sel mikroglia di dalam otak, seperti dalam mekanisme neuroinflamasi.
- Sumber : ATCC

Sel glia pada otak terdiri atas oligodendroglia, astroglia, dan mikroglia. Mikroglia merupakan makrofag dalam sistem susunan saraf pusat. Sel ini berasal dari mesodermal atau mesenkimal dan bermigrasi ke seluruh sistem susunan saraf pusat, kemudian menyebar ke daerah parenkim otak. Melalui *signaling pathways* sel mikroglia berkomunikasi dengan neuron dan sistem kekebalan tubuh. Astrosit merupakan sel glial utama pada sistem saraf pusat dan berperan penting dalam fungsi fisiologis otak. Neuron astrosit berperan dalam mempertahankan homeostasis pada sistem saraf pusat melalui pelepasan faktor neurotropik dan kemungkinan bertindak sebagai sel imunokompeten pada otak (Dong dan Benveniste, 2001). Astrosit terlibat aktif dalam transmisi sinaps antar neuron. Pada respons terhadap kerusakan otak dan neurodegenerasi, astrosit mengalami perubahan secara morfologi dan fungsi.

Sel glia dan astrosit serta mikroglia berperan penting dalam pembentukan *senile* plak (Griffin *et al.*, 1997). Astrosit menghasilkan substansi neurotoksik setelah teraktivasi dan meningkatkan level *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) sebagai *marker* protein untuk astrogliosis (Eng *et al.*, 1994). Aktivitas astrosit atau astrogliosis dipicu oleh hambatan *proteosome* dari peptida β amiloid. Mikroglia dan

astrosit adalah sel kekebalan utama di *central nervous system* (CNS). Sebagai makrofag penghuni *central nervous system*, sel mikroglia bertindak sebagai bentuk aktif pertama dan utama pertahanan kekebalan (Filiano *et al.*, 2015). Mikroglia yang telah aktif dapat menjalankan banyak fungsi seperti fagositosis, melepaskan sitokin, melakukan perbaikan pada sel dan berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) (Morales *et al.*, 2014). Mikroglia memiliki dua fenotipe yang memiliki perbedaan dalam aktivasinya, yaitu M1 dan M2. Mikroglia dapat mengalami polarisasi M1 dan M2 setelah aktivasi di otak, yang melibatkan pada proses neurodegenerasi (Nakagawa dan Chiba, 2015; Xiong *et al.*, 2016). Fenotipe M1 disebut juga aktivasi klasik, terkait dengan besar respon inflamasi yang dilepaskan yaitu IL-1 β , TNF- α dan mengekspresikan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). M2 disebut juga jalur alternatif dan memiliki peran sebagai anti-inflamasi. Aktivasi dari M2 akan menghasilkan IL-4 atau IL-13 dan mengatasi peradangan dan perbaikan jaringan. M2 berperan pada penonaktifan sel apoptosis atau paparan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan mengubah faktor pertumbuhan-b (TGF-b) dan meredakan peradangan akut (Orihuela *et al.*, 2016; Tang dan Le, 2016).

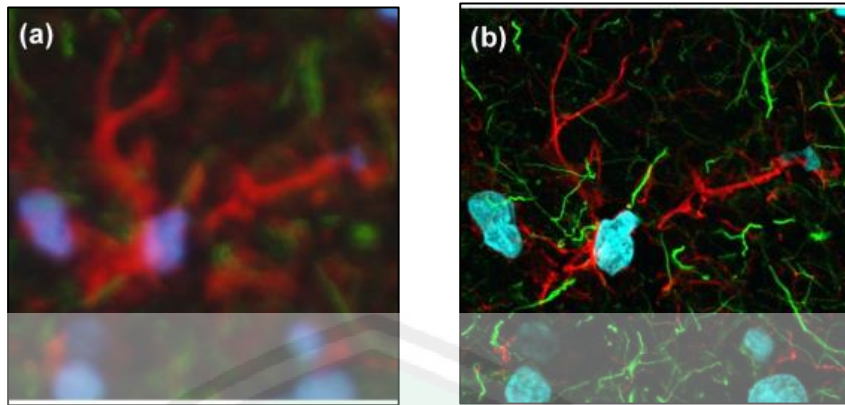
2.9 Tinjauan Tentang *Immunocytochemistry*

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 fluorofor dimana salah satunya adalah FITC (Ma'arif *et al.*, 2018). *Immunocytochemistry* (ICC)

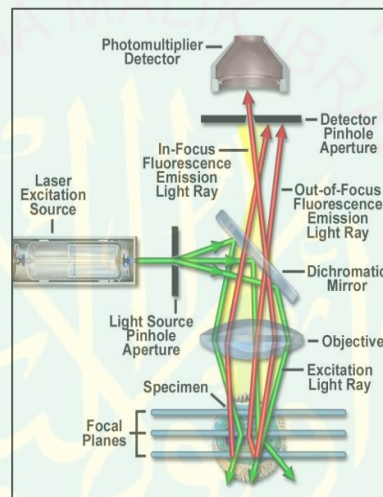
memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi apakah sel dalam sampel tertentu dapat mengekspresikan antigen yang diinginkan (Taylor dan Rudbeck, 2013). Perbedaan dasar ICC dengan *immunohistochemistry* (IHC) terletak pada sampel atau objek yang digunakan, pada ICC sampel yang digunakan berupa sel utuh yang 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).

2.10 Tinjauan *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 memiliki mekanisme kerja yang sedikit rumit untuk menghasilkan hasil yang luar biasa yang dapat diamati pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 (a) Pengamatan SEM (b) Pengamatan CLSM
(Claxton et al., 2010)

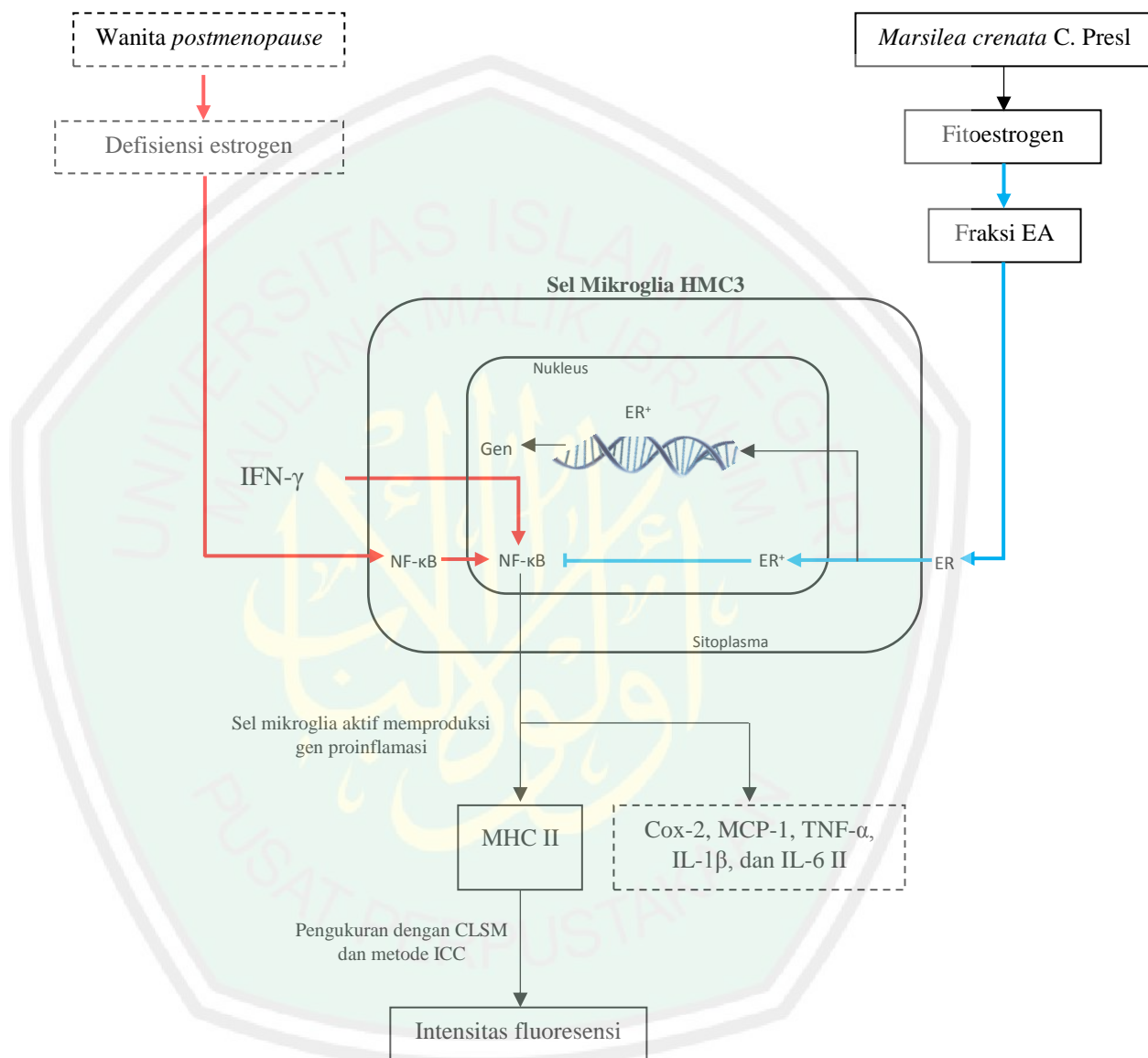


Gambar 2.5 Diagram CLSM (Claxton et al., 2010)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Bagan Kerangka Konseptual



Keterangan :

- = Variabel yang diteliti
- = Variabel lain
- = Alur penelitian
- = Menginduksi
- = Menghambat

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Defisiensi estrogen akan menyebabkan kondisi patologis pada sel saraf pusat dan akan kehilangan struktur atau fungsinya. Keadaan tersebut akan direspon sistem imun di saraf pusat berupa teraktivasinya mikroglia. Munculnya mikroglia pada sistem saraf pusat akan menyebabkan peradangan, dimana kondisi ini disebut neuroinflamasi. Teraktiasinya mikroglia juga distimulasi oleh faktor transkripsional NF- κ B yang mensekresi sejumlah enzim peangaktivasi makrofag (mikroglia). Peradangan ini dimediasi oleh produksi sitokin, kemokin (CCL2, CCL5, dan CXCL1), tumor necrosis factor, *reactive oxygen species* dan *secondary messengers*. MHC II merupakan agen proinflamasi utama yang berperan dalam neuroinflamasi, hal ini dikarenakan MHC II dapat ditemukan pada sel saraf pusat, dimana aktivasinya distimulasi oleh sel CD4⁺ (Huang dan Wange, 2004). Pada penelitian ini sel dibuat dalam kondisi inflamasi dengan penginduksian IFN- γ . IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi mikroglia dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam *cell mediated immunity* (Abbas, 2012). IFN- γ memiliki peran mengaktivasi makrofag dan meningkatkan ekspresi molekul MHC II dengan berperan sebagai aktivator transkripsi MHC. MHC II berperan pada 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* yang teraktivasi tersebut kemudian akan mensekresikan sejumlah sitokin untuk pengaturan respon imun (Endang, 2016).

Pada penggunaan fraksi etil asetat diduga terdapat senyawa – seyawa yang sudah tergolongkan dan sederhana, dibandingkan dengan penggunaan ekstrak yang masih terdapat *multi compounds*. Senyawa fitoestrogen yang terdapat dalam fraksi

etil asetat daun semanggi, akan berikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat pada nukleus, sehingga akan menghasilkan gen spesifik dan menghambat aktivitas dari faktor transkripsional NF- κ B. Terhambatnya aktivitas dari faktor transkripsional NF- κ B, akan menurunkan sekresi mediator proinflamasi seperti MHC II, Cox-2, MCP-1, TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 (Glass, 2010; Amor, 2010). Ekspresi MHC II sebagai mediator inflamasi utama, hal ini dikarenakan MHC II hanya terdapat dalam sel saraf. Pengukuran intensitas fluoresensi dari MHC II menggunakan instrumen CLSM dan metode ICC.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis peneliti yaitu fraksi etil asetat daun semanggi memiliki aktivitas antineuroinflamasi dan dapat menurunkan intensitas fluoresensi dari MHC II pada sel mikroglia HMC3.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *experimental research* yaitu penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti (Hadi, 1985) . Terdapat dua hal yang perlu diperhatikan yaitu pemilihan populasi dan sampel. Populasi dalam penelitian ini menggunakan semanggi yang tumbuh di Indonesia dan sampel pada penelitian ini adalah semanggi yang berasal dari Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Proses penelitian ini dilakukan pada pertengahan Bulan Januari 2019 sampai Bulan April 2019 di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya untuk melakukan uji *in vitro* fraksi etil asetat daun semanggi pada sel mikroglia HMC3. Sementara untuk preparasi fraksi etil asetat dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Gedung D, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah semanggi yang tumbuh di Indonesia.

4.3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah semanggi yang berasal dari Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur.

4.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik yang dipilih untuk pengambilan sampel adalah *probability sampling*. *Probability sampling* adalah teknik pengambilan sampel yang memberikan peluang yang sama bagi setiap unsur (anggota) populasi untuk dipilih menjadi sampel dengan cara yang dipiliha adalah *simple random sampling*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Fraksi etil asetat yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% daun semanggi.

4.4.2 Variabel Tergantung

Intensitas fluoresensi pada sel mikroglia HMC3 setelah diberi fraksi etil asetat daun semanggi.

4.4.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu, lama inkubasi sel mikroglia HMC3, dan *eagle's minimum esential media* (EMEM).

4.4.4 Definisi Operasional

1. Populasi adalah keseluruhan dari semua variabel yang menyangkut masalah yang diteliti (Nursalam, 2003). Populasi dalam penelitian ini adalah populasi pada penelitian ini adalah 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 semanggi yang berasal dari Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur.
3. Fraksi etil asetat daun semanggi diperoleh dari proses ekstraksi menggunakan etanol 96% dengan menggunakan metode *ultrasonic assisted extraction*.

Fraksi etil asetat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan sisa pelarut etil asetat. Hasilnya didapatkan fraksi etil asetat daun semanggi berwarna coklat dan kental.

4. Sel mikroglia HMC3 dikondisikan pada keadaan inflamasi dengan menginduksikan IFN- γ pada sel. Perlakuan ini akan menyebabkan respon imun pada sel mikroglia aktif dan sel akan mengalami inflamasi. Menurut Schreiber (2003) dan Czarniecki (2006) IFN- γ disekresikan oleh sel-sel yang telah mendapatkan rangsangan dari berbagai stimulus inflamasi maupun reaksi imun lainnya. Menurut Raymond (2012) menyatakan bahwa indikasi peran imunoregulasi IFN tipe 1 (α dan β) dapat meregulasi intensitas dari MHC I. Sedangkan, IFN- γ dapat mengaktifkan gen MHC II (Xu, 2003).
5. Pengukuran intensitas MHC II menggunakan instrumen *Confocal Laser Scanning Microscope*. Instrumen ini mampu melihat aktivitas sel mikroglia HMC 3 melalui intensitas fluoresensi pada sel. Jika intensitas fluoresensi terang, maka ekspresi MHC II pada sel tinggi. Namun, sebaliknya jika intensitas fluoresensinya rendah, maka ekspresi MHC II pada sel menurun.
6. Dosis adalah jumlah atau takaran obat yang diberikan kepada pasien dalam satuan berat, isi (volume) atau unit. Dosis obat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efek farmakologi obat. Pada penelitian ini dosis dimaksudkan untuk mengetahui dosis efektif yang ditandai dengan penurunan jumlah MHC II. Masing-masing dosis tersebut dilakukan replikasi sebanyak 2 kali. Replikasi bertujuan untuk melakukan studi penelitian yang sama untuk kedua kalinya dengan kelompok lain untuk melihat apakah hasil yang diperoleh sama. Replikasi menggambarkan sebuah hal yang penting

tentang penelitian ilmiah yaitu, bahwa peneliti harus menghindari menarik kesimpulan luas berdasarkan hasil penelitian tunggal karena selalu ada kemungkinan bahwa hasil dari studi tertentu merupakan suatu penyimpangan.

7. Jalur *estrogen receptors* (ERs) yang digunakan adalah jalur *dependent*, dimana senyawa estrogen akan berikatan dengan *estrogen receptors* (ERs) di permukaan dinding sel kemudian akan bertranslokasi menuju nukleus untuk mempengaruhi transkripsi.
8. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah genistein. Genistein memiliki efek antiinflamasi yang dapat menghambat ekspresi dan pelepasan sitokin proinflamasi (Jeong, 2014).

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

Alat – alat yang digunakan untuk menunjang jalannya penelitian ini adalah gunting, blender, ayakan 60 mesh, *Ultrasonic bath*, spatula, batang pengaduk, labu erlenmeyer 500 ml, *aluminium foil*, gelas ukur 100 ml, *beaker glass* 100 ml, kertas saring, *rotary evaporator*, oven, corong gelas, kaca arloji, pipet volume, labu alas bulat, ThermoScientific Hera Safe KS *Bio Safety Cabinet* (BSC), L W C5 *Centrifuge*, ThermoScientific Hera Cell 150i *CO₂ Incubator*, ThermoScientific Aquabath 18022AQ *Waterbath*, cawan porselen, *conical tube* 15 ml, *conical tube* 50 ml, *micropipet* 1000 µl, *culture flask*, spuit 10 ml, *microfilter* 0,22 µm, *blue tip*, pipet volume, dan *scraper* .

4.5.2 Instrumen

CLSM dan Olympus IX 71 *Inverted Microscope*.

4.5.3 Bahan

1. Bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah semanggi yang diperoleh dari Benowo, Kota Surabaya, Jawa Timur.

2. Bahan kimia

Bahan penelitian yang digunakan untuk uji aktivitas adalah media kultur *eagle's minimum essential media*, *Fetal Bovine Serum* 9% (FBS), Pen-Strep 1%, Trypsin, Na-EDTA, IFN- γ , PBS, dan alkohol 70%.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Determinasi Semanggi

Determinasi semanggi akan dilakukan di Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Balai Materia Medica (BMM), Kota Batu, Jawa Timur. Semanggi dibawa ke BMM Kota Batu untuk dilakukan determinasi. Hasil determinasi tersebut akan dipergunakan untuk pedoman bahwa tanaman tersebut merupakan semanggi.

4.6.2 Penyiapan Bahan

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

4.6.3 Prosedur Ekstraksi

Proses ekstraksi simplisia daun semanggi dilakukan menggunakan metode UAE dengan pelarut etanol 96%, hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga kental. Langkah-langkah ekstraksi yang dilakukan adalah ditimbang simplisia daun semanggi masing-masing 30 gram. Masing-masing

simplisia dimasukkan kedalam gelas *beaker* dan ditambahkan 200 ml etanol 96%. Diatur waktu untuk proses ekstraksi yaitu 3 x 2 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya. Hasil ekstraksi kemudian disaring, residu ditambahkan kembali dengan pelarut sebanyak 2 x 150 ml. Filtrat yang terkumpul dimasukkan labu *rotary evaporator*, suhu diatur 50°C dengan kecepatan pemutaran 70 rpm. Ekstrak hasil *rotary evaporator* diuapkan kembali (dikeringkan) dalam oven pada suhu 40°C agar diperoleh ekstrak kering.

4.6.4 Fraksinasi dengan Pelarut Etil Asetat

Ekstrak difraksinasi dengan teknik partisi cair-cair. Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan komponen-komponen senyawa aktif dari ekstrak yang telah dihasilkan agar lebih tergolongkan. Pemisahan secara partisi cair-cair harus memiliki perbedaan kelarutan antara pelarut dan zat terlarut serta kedua pelarut yang digunakan tidak saling bercampur. Pelarut yang digunakan adalah air dan etil asetat dengan perbandingan volume 1:1. Ditimbang ± 70 gram ekstrak etanol 96% semanggi dengan menggunakan neraca analitik. Ekstrak yang sudah ditimbang disuspensikan dengan air sebanyak ± 700 ml, setelah larut kemudian dimasukan kedalam corong pisah. Kemudian ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak ± 700 ml dikocok sampai merata dengan sekali-kali membuka kran corong pisah. Setelah dikocok, corong pisah didiamkan sampai terjadi pemisahan dari fase air dan fase etil asetat, dipisahkan fase air dan fase etil asetat. Fase air dimasukan kembali ke dalam corong pisah dan diekstraksi lagi dengan pelarut etil asetat sebanyak ± 700 ml dan dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat yang diperoleh dari beberapa penyarian disatukan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*. Setelah didapatkan ekstrak kental, kemudian disimpan dalam oven 40°C.

4.6.5 Uji Aktivitas secara *In Vitro*

4.6.5.1 Subkultur Sel Mikroglia HMC3

Subkultur sel mikroglia menggunakan tabung dengan ukuran 75 cm² sebagai wadahnya. Tabung yang dipilih adalah merek *Corning*® T75 flask. Langkah subkultur yaitu diambil dan dipisahkan sel dengan medianya. Kemudian dibilas *culture flask* dengan Trypsin-EDTA yang memiliki fungsi untuk menghilangkan serum yang mengandung *inhibitor trypsin*. Selanjutnya ditambahkan 2-3 ml larutan Trypsin-EDTA ke dalam *culture flask*, kemudian diamati dengan mikroskop *inverted* untuk mengetahui aktivitas sel (terdispersi), durasi pengamatan yaitu 5-5 menit. Diusahakan tidak menekan dan tidak menggoyangkan *culture flask* agar tidak terjadi penggumpalan. Jika sel sulit terdispersi maka dapat di inkubasi terlebih dahulu dengan suhu 37°C. Langkah selanjutnya adalah pemberian media EMEM sejumlah 6-8 ml sebagai media tumbuh sel mikroglia, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C.

4.6.5.2 Peletakan Sel pada *Microplate 24-well*

Plate yang digunakan adalah *microplate 24-well* yang mempunyai ukuran 2 cm² dan memiliki volume 1,5-2,2 ml. Peletakan sel pada *microplate 24-well* harus mengetahui jumlah sel pada setiap sumuran pada *microplate 24-well*, yaitu dipipet suspensi sel 100µl dengan menggunakan mikropipet dan *yellow tip* (20 µl- 200 µl). Selanjutnya sel ditanam pada *microplate 24-well* dan ditambahkan dengan media EMEM sesuai perhitungan kedalaman *microplate 24-well* dan diinkubasi kembali selama 48 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Setelah 48 jam, dilakukan penambahan IFN-γ 10 ng sebanyak 300 µl pada masing-masing *well*, kemudian diinkubasi kembali dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam.

4.6.5.3 Preparasi Suspensi Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi

Perhitungan dosis yang digunakan pada penelitian ini, yaitu dosis 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm dengan larutan induk 5.000 ppm, sehingga perhitungan dosis yang digunakan :

1. Pembuatan larutan induk 5.000 ppm

- 5.000 ppm = 50 mg / 0,01 Liter
- Maka ditimbang 50 mg fraksi disuspensikan kedalam 10 ml DMSO 0,5% dan *tween* 80 secukupnya pada labu erlenmeyer 10 ml.

2. Dosis 62,5 ppm

- $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$
- $V_1 \cdot 125 \text{ ppm} = 700 \mu\text{l} \cdot 62,5 \text{ ppm}$
- $V_1 = 350 \mu\text{l}$ (dari dosis 125 ppm diambil 350 μl dan ditambah 350 μl media).

3. Dosis 125 ppm

- $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$
- $V_1 \cdot 250 \text{ ppm} = 1100 \mu\text{l} \cdot 125 \text{ ppm}$
- $V_1 = 550 \mu\text{l}$ (dari dosis 250 ppm diambil 550 μl dan ditambah 550 μl media).

4. Dosis 250 ppm

- $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$
- $V_1 \cdot 5000 \text{ ppm} = 1250 \mu\text{l} \cdot 250 \text{ ppm}$
- $V_1 = 62,5 \mu\text{l}$ (dari dosis 5000 ppm diambil 62,5 μl dan ditambah 1.187,5 μl media).

Tabel 4.1 *Microplate 24-well*

	1	2	3	4	5	6
A	Kontrol (-)	Kontrol (+)	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	<i>cadangan</i>
B	Kontrol (-)	Kontrol (+)	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	<i>cadangan</i>
C	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>
D	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>	<i>cadangan</i>

4.6.5.4 Preparasi Pengamatan dengan CLSM

1. Pembuatan larutan 5 ml PBS dalam *water for injection* (WI)

- Dipipet 5000 μl PBS dengan mikropipet dan dimasukkan kedalam *conical tube* 50 ml.
- Lalu di tambahkan WI sampai 50 ml.
- Setelah itu di homogenkan.

2. Pembuatan triton x-100

- Dimasukan 3600 μl PBS dari larutan 5 ml PBS dalam WI, kedalam *conical tube* 15 ml.
- Lalu diambil 3,6 μl PBS dari *conical tube* 15 ml, lalu dibuang.
- Dipipet larutan triton x-100 sebanyak 3,6 μl .
- Lalu dimasukan kedalam *conical tube* 15 ml.

3. Pembuatan *buffer blocking*

- Ditimbang kristal BSA sebanyak 0,075 gram dengan neraca analitik.
- Dimasukan 7500 μl larutan PBS dari larutan 5 ml PBS dalam WI.

- Dimasukan kristal BSA kedalam larutan PBS 7500 μ l.
- Lalu digojog sampai homogen.

4. Pewarnaan MHC II

- Sel difiksasi dengan PFA 4% selama 10 menit.
- Dicuci dengan PBS 3 x 5 menit.
- Permeabilisasi membran dengan 0,1 Tritonx-100 dalam PBS lalu diinkubasi selama 10 menit.
- Dicuci dengan PBS 3 x 5 menit.
- Diinkubasi dengan *blocking buffer* 1 % BSA dalam PBS selama 30 menit.
- Di inkubasi antibodi primer Rb MHC II (1:200) selama 24 jam dalam suhu 4°C.
- Dicuci dengan PBS 3 x 5 menit.
- Diinkubasi dengan antibodi sekunder anti Rb FITC (1:500) selama 1 jam.
- Dicuci dengan PBS 3 x 5 menit.
- Diamati intensitas fluoresensi MHC II dengan CLSM.

4.6.5.5 Analisis Data

Analisis hasil menggunakan IBM SPSS *Statistics* 24. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji normalitas *Saphiro - Wilk* untuk melihat distribusi data dan dianalisis dengan uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen ($P\text{ value} > 0,05$) maka dilanjutkan dengan metode parametrik yaitu *One Way ANOVA* . Jika pada uji ANOVA diperoleh $P\text{ value} < 0,05$ maka terdapat perbedaan intensitas fluoresensi MHC II yang signifikan antar kelompok perlakuan. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *post hoc* yaitu uji beda nyata terkecil/LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda

signifikan dengan kelompok perlakuan lainnya. Apabila $P\text{ value} > 0,05$ berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan maka hipotesis ditolak (Dahlan, 2004). Selain itu, nilai efektifitas dosis 50% (ED_{50}) dihitung berdasarkan analisis probit penurunan intensitas fluoresensi MHC II dilanjutkan dengan analisis menggunakan program IBM SPSS *statistics* 24. Berikut uji statistik yang akan dilakukan pada penelitian ini :

1. Uji Normalitas : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal, digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji nonparametrik.
2. Uji Homogenitas : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *Kruskal-wallis* : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikansi, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau lebih dikenal dengan uji *Least Significance Different* (LSD).

4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Apabila P value $< 0,05$ berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.
5. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara dosis perlakuan dengan intensitas MHC II yang dihasilkan.

4.7 Alur Penelitian

4.7.1 Uraian Alur Penelitian

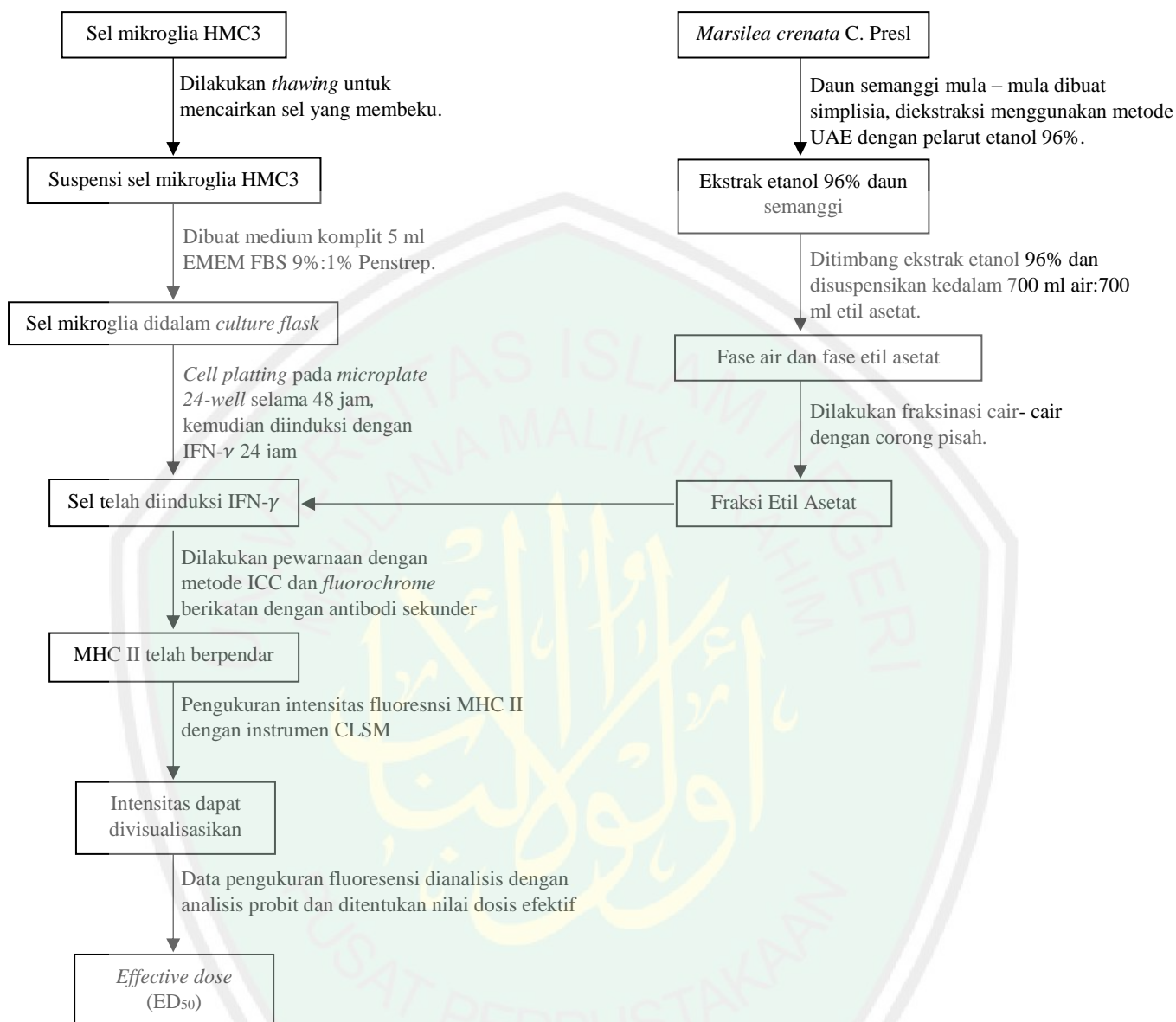
Penelitian ini dimulai dari pengambilan dan pengumpulan semanggi di daerah Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya. Selanjutnya semanggi akan dideterminasi di Balai Materi Medika di Kota Batu, hal ini dilakukan untuk menentukan apakah tanaman yang dimaksud sesuai yang diinginkan oleh peneliti. Bagian Tanaman semanggi yang digunakan adalah tangkai sampai daun dengan ciri-ciri berwarna hijau muda. Bagian inilah yang akan dibuat sebagai simplisia. Setelah simplisia semanggi diperoleh, langkah selanjutnya adalah diekstrak dengan menggunakan metode UAE selama 3 x 2 menit dengan pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Selanjutnya filtrat dipisahkan dengan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh akan disimpan pada oven dengan suhu 40°C . Langkah berikutnya adalah fraksinasi cair-cair, yaitu dengan menggunakan 2 pelarut yang tidak saling campur, yaitu air dan etil asetat. Kemudian, setelah fraksi etil asetat didapatkan akan dibuat kedalam beberapa variasi dosis untuk diujikan aktivitas antineuroinflamasinya pada sel mikroglia HMC3.

Preparasi sel diawali dengan proses kultur sel mikroglia HMC3 pada media EMEM, setelah konfluensinya mencapai 80-90 % maka akan dilakukan pemanenan sel dan penanaman sel kedalam *microplate 24-well* untuk pengujian aktivitas

antineuroinflamasi fraksi etil asetat daun semanggi. Selanjutnya setelah 48 jam, dilakukan preparasi sel dengan metode *Immunocytochemistry* (ICC). *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. Perlakuan selanjutnya adalah menginduksi sel mikroglia dengan IFN- γ , tujuan dari perlakuan tersebut agar sel mikroglia dapat mengalami inflamasi. Setelah keadaan tersebut tercapai, maka dilakukan *treatment* pada sel mikroglia dengan pemberian fraksi etil asetat yang telah dipreparasi.

Pengamatan aktivitas sel dilakukan dengan instrumen CLSM. Parameter yang diukur adalah penurunan intensitas fluoresensi MHC II yang dihasilkan sel-sel mikroglia yang telah mengalami neuroinflamasi. Sehingga, melalui intensitas tersebut peneliti mendapatkan data tentang nilai intensitas yang akan diolah dengan *software IBM SPSS Statistics 24* dan selanjutnya untuk menentukan nilai ED₅₀.

4.7.2 Kerangka Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman

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

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

Tabel 5.1 Jumlah Daun Semanggi

Daun Semanggi	Berat
Daun semanggi basah	4 kg
Daun semanggi kering	1,8 kg
Serbuk daun semanggi kering	1,7 kg

5.2 Pengukuran Nilai Kadar Air

Kadar air merupakan pemegang peranan penting, kecuali temperatur maka aktivitas air mempunyai tempat tersendiri dalam proses pembusukan dan ketengikan. Kerusakan simplisia pada umumnya merupakan proses mikrobiologis, kimiawi, enzimatik atau kombinasi antara ketiganya. Kadar air yang aman untuk suatu bahan kering adalah 10-12% dan kadar air yang baik adalah dibawah 10% (BPOM, 2000).

Hasil yang didapat dari pengukuran nilai kadar air terhadap simplisia kering daun semanggi menggunakan *moisture content analyzer* adalah sebagaimana yang terdapat pada tabel 5.2. Nilai rerata kadar air yang diperoleh adalah 8,6 % yang mana nilai tersebut menunjukkan bahwa serbuk simplisia Daun semanggi 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 Semanggi

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

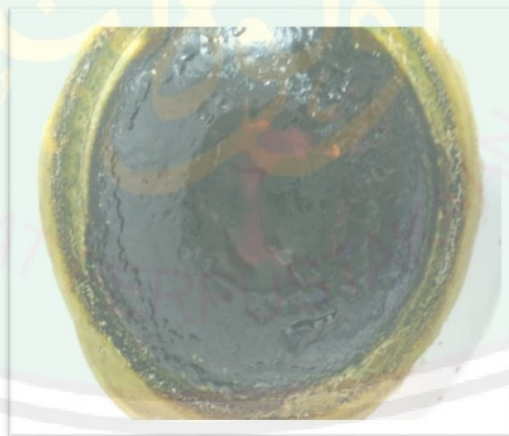
5.3 Pembuatan Ekstrak

Proses pembuatan ekstrak etanol 96 % daun semanggi dilakukan dengan menggunakan metode UAE. Pemilihan dalam penggunaan metode UAE ini karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu selain mempercepat proses ekstraksi, metode ini juga merupakan salah satu upaya peningkatan efisiensi hasil ekstrak dari metode-metode konvensional. Proses pertama yang dilakukan yaitu dengan menimbang dan mengukur perbandingan antara simplisia dengan pelarut etanol 96 %, perbandingan yang digunakan yaitu 1:16 (b/v) dimana jumlah simplisia yang digunakan yaitu 30 gram dalam 500 ml. Jumlah tersebut dipilih untuk mengoptimalkan jumlah pelarut dan simplisia yang digunakan. Alasan pemilihan penggunaan pelarut etanol 96% karena pelarut tersebut merupakan pelarut semipolar dan aman digunakan terutama dalam pembuatan ekstrak bahan baku sediaan *herbal medicine* (Arifianti *et al*, 2014; Putra, 2018).

Serbuk daun yang telah dilarutkan dalam pelarut etanol 96% kemudian di UAE selama 3 x 2 menit, hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan hasil ekstrak. Prinsip kerja dari metode ini yaitu terjadinya kavitasi dimana terbentuknya suatu gelembung *micro* karena meningkatnya tekanan dari gelombang *ultrasonic*, gelembung-gelembung ini tidak stabil sehingga mudah pecah, ketika volume gelembung tersebut tidak cukup menyerap energi pecahan gelembung menghasilkan energi yang besar menghasilkan efek panas yang membuat membuat reaksi antara pelarut dan dinding sel yang mengakibatkan kerusakan pada dinding sel dan metode ini dapat meningkatkan hasil ekstraksi menjadi lebih maksimal (Mukhairini, 2014; Sani *et al*, 2014). Selanjutnya dilakukan proses penyaringan

filtrat dengan menggunakan kertas saring agar filtrat dengan residu dapat dipisahkan.

Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 70 rpm dan tekanan 175 psi. Hal ini dilakukan agar mendapatkan hasil ekstrak yang pekat dan memisahkan senyawa aktif dari pelarut yang digunakan. Hal ini sesuai dengan prinsip kerja dari *vacum rotary evaporator* dimana pemisahan pelarut dengan ekstrak menggunakan prinsip penurunan tekanan dengan percepatan putaran labu bulat (pemanasan) sehingga pelarut segera menguap pada suhu dibawah titik didih pelarut sehingga senyawa tidak ikut rusak (Nisa *et al*, 2014). Proses ekstraksi dihentikan apabila pelarut sudah tidak lagi menetes pada labu alas bulat penampung pelarut. Kemudian filtrat yang telah dipisahkan dari pelarut dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C sampai diperoleh hasil ekstrak (Putra, 2018).



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi

(Sumber: Dokumentasi Putra, 2018)

Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen berdasarkan perhitungan berat akhir (berat ekstrak) dibagi berat awal (berat serbuk simplisia) dikalikan 100%. Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, 2013; Sani, 2014).

Tabel 5.3 Hasil Ekstraksi Daun Semanggi

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

5.4 Pembuatan Fraksi Etil Asetat

Pembuatan fraksi etil asetat daun semanggi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Prinsip pemisahan pada proses fraksinasi adalah didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi (Liza, 2016). Proses pertama yang dilakukan yaitu pembuatan suspensi ekstrak etanol 96% daun semanggi dengan menimbang 70 gram ekstrak etanol 96% dan disuspensikan kedalam 700 ml air dengan perbandingan yaitu 1:10 (b/v). Jumlah tersebut dipilih untuk mengefisienkan jumlah pelarut dan ekstrak yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan 4 (empat) pelarut, yaitu pelarut n-heksana, pelarut etil asetat, pelarut n-butanol, dan pelarut air. Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semipolar, sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar, memiliki toksisitas rendah, dan mudah diuapkan.

Selanjutnya, dimasukkan kedalam corong pisah 2 (dua) liter dan ditambahkan pelarut etil asetat ± 700 ml dan dilakukan pengocokan selama ± 15 menit. Pengocokan bertujuan memperluas area permukaan kontak di antara pelarut air dan pelarut etil asetat sehingga pendistribusian ekstrak tersuspensi di antara keduanya dapat berlangsung dengan baik.

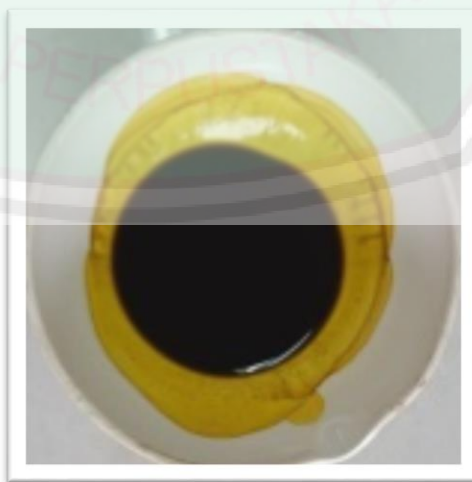


Gambar 5.2 Pemisahan Fase Air dan Fase Etil Asetat

Selanjutnya corong pisah didiamkan sampai terdapat pemisahan fase air dan fase etil asetat selama ± 10 menit. Pemisahan fase tersebut dikarenakan faktor kepolaran dan massa jenis (ρ). Pelarut air memiliki massa jenis yang lebih besar daripada pelarut etil asetat yaitu berturut – turut 997 kg/m^3 : 902 kg/m^3 , sehingga pelarut etil asetat akan berada diatas. Faktor kepolaran juga berpengaruh dalam distribusi senyawa dimana, senyawa yang bersifat polar akan tertarik kedalam pelarut yang bersifat polar, begitu juga dengan senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar. Jika telah terdapat pemisahan masing-masing fase, dipisahkan dan diambil fase etil asetat, kemudian dipekatkan filtrat etil asetat dengan menggunakan alat *rotary evaporator* suhu 50°C dengan kecepatan putaran 70 rpm dan tekanan

175 psi. Hal ini dilakukan agar mendapatkan hasil fraksi yang pekat dan memisahkan senyawa dari pelarut yang digunakan.

Pada penelitian ini dipilih metode *thin layer chromatography* (TLC) untuk mengetahui keberadaan senyawa pada fraksi yang didapat. Fraksi yang didapat kemudian ditotolkan ke plat silika gel F₂₅₄ 1 x 6 cm, plat tersebut dapat mengadakan fluoresensi, sehingga senyawa-senyawa organik yang terikat dapat diamati dengan sinar UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, pada panjang gelombang 254 nm plat silika akan berfluoresensi, sehingga noda akan berwarna gelap, sedangkan pada panjang gelombang 366 nm noda akan berfluoresensi dan akan terdapat perbedaan warna, hal ini dilakukan untuk melihat apakah masih terdapat senyawa pada proses pengocokan pertama, jika masih terdapat noda yang tampak, maka pelarut etil asetat (*redest*), dituang kembali kedalam corong pisah. Proses fraksinasi dihentikan pada pengocokan ke-4 karena noda pada plat silika gel tidak terlihat pekat pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm dan 254 nm. Kemudian filtrat yang telah dipisahkan dengan pelarut dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40° C. Berikut fraksi etil asetat daun semanggi pada gambar 5.3 :



Gambar 5.3 Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi

Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen berdasarkan berdasarkan perhitungan berat akhir (berat fraksi) dibagi berat awal (berat ekstrak) dikalikan 100%. Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak fraksi atau ekstrak yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, 2013; Sani, 2014). Perhitungan % rendemen dapat dilihat pada tabel 5.4 sebagai berikut:

Tabel 5.4 Hasil Perhitungan % Rendemen

No	Fraksi	% Rendemen
1	Fraksi n-Heksana	17,00%
2	Fraksi Etil Asetat	3,03%
3	Fraksi n-Butanol	8,53%
4	Fraksi Air	39,58%

Hasil perhitungan % rendemen memperlihatkan bahwa hasil % rendemen yang paling banyak terdapat pada fraksi air sebesar 39,58%, sementara yang paling sedikit terdapat pada fraksi etil asetat sebesar 3,03%. Perbedaan jumlah rendemen yang didapat kemungkinan dipengaruhi oleh kelarutan senyawa pada masing-masing fraksi daun semanggi terhadap kepolaran pelarut yang digunakan.

5.5 Skrining Fitokimia dengan Metode KLT

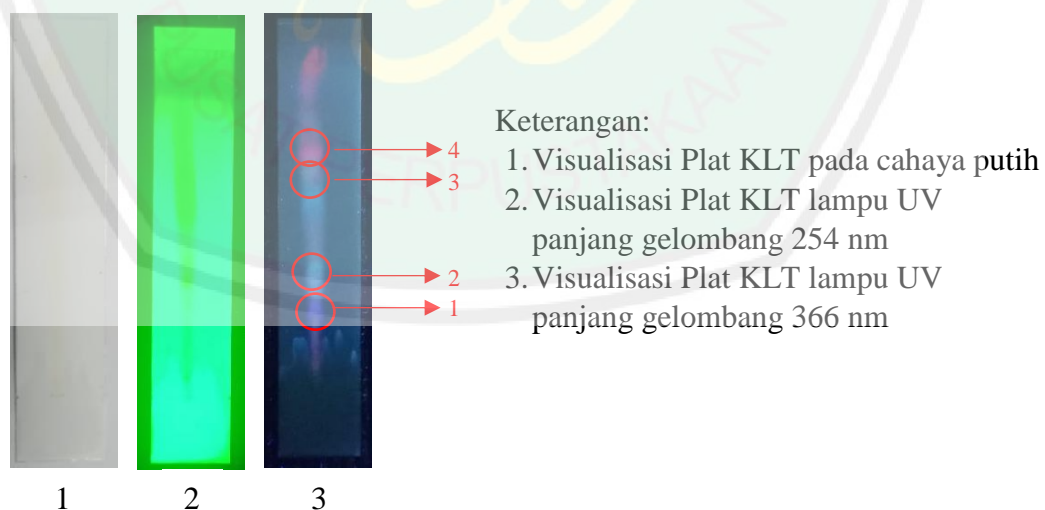
Skrining fitokimia dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dini kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat daun semanggi. Skrining fitokimia yang dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang divisualisasikan dengan menggunakan UV *Cabinet*. Skrining fitokimia dengan KLT ini berprinsip pada sistem adsorpsi dan partisi dimana sampel akan berpisah berdasarkan kepolaran antara fase diam dan fase geraknya (Dirjen POM, 1979).

Prosedur skrining fitokimia dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu optimasi eluen, skrining dengan eluen dan pengamatan dengan UV *Cabinet*. Prosedur optimasi eluen hal pertama yang dilakukan yaitu fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam pelarut etil asetat sebanyak 1 ml. Fraksi yang telah larut kemudian ditotolkan pada plat KLT silica gel F₂₅₄ yang memiliki sifat polar dengan ukuran plat 2 x 10 cm menggunakan pipet mikro 2 μ l. Eluen yang digunakan yaitu berupa campuran n-butanol dan air dengan perbandingan 8:2 dan n-heksan dengan etil asetat 6:4 masing-masing sebanyak 10 ml dan dimasukkan kedalam *chamber* hingga kondisi menjadi jenuh. Selanjutnya plat KLT dimasukkan kedalam *chamber* yang telah jenuh dan dibiarkan sampai fase gerak mencapai tanda batas yang ditentukan, dilakukan pengamatan dari masing-masing hasil optimasi pada lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Hasil eluen yang baik dilihat dari hasil pemisahan golongan senyawa yang baik.

Setelah dilakukan optimasi, kemudian dilakukan skrining fitokimia dengan eluen campuran n-butanol dan air dengan perbandingan 8:2 sebanyak 10 ml, ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam etil asetat sebanyak 1 ml. Fraksi yang telah larut kemudian ditotolkan pada plat KLT silica gel F₂₅₄ dengan ukuran plat 2 x 10 cm menggunakan pipet mikro 2 μ l. Selanjutnya plat dimasukkan kedalam *chamber* yang berisi eluen yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluen bergerak naik sampai tanda batas. Plat KLT yang telah dieluenisasi diangkat guna mencegah rusaknya plot yang muncul, plat KLT divisualisasi dengan menggunakan UV *Cabinet* pada lampu cahaya putih dan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, pengamatan pada lampu UV ini bertujuan agar dapat mengetahui dan mengidentifikasi spot pemisahan dari golongan senyawa yang

terdapat pada fraksi etil asetat daun semanggi. Penggunaan cahaya putih dilakukan agar dapat mengidentifikasi warna yang muncul dari spot pemisahan tersebut. Dilakukan pengamatan dari hasil visualisasi UV *Cabinet* yang pertama. Selanjutnya plat disemprot dengan menggunakan penampak noda H₂SO₄ 10% di lemari asam dan dipanaskan diatas TLC *Heater* dengan suhu 105⁰C selama beberapa menit.

Penggunaan penampakan noda H₂SO₄ 10% karena bersifat reduktor yang dapat memutuskan ikatan rangkap hingga panjang gelombangnya bertambah dan warna noda dapat dilihat. Mekanisme penampakan noda ini dapat disebabkan juga karena gugus OH yang dimiliki H₂SO₄ sehingga berfungsi sebagai ausokrom, dimana ausokrom ini dapat menyebabkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang pada cahaya tampak (Gandjar, 2007). Setelah dilakukan penyemprotan dan pemanasan plat KLT, kemudian dilakukan pengamatan visualisasi kembali dengan UV *Cabinet* dengan penggunaan lampu cahaya putih dan lampu UV hanya pada panjang gelombang 366 nm.



Gambar 5.4 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan UV *Cabinet*

Hasil pengamatan pada visualisasi plat KLT dengan UV *cabinet* terdapat beberapa noda tampak yang dapat diamati. Pada visualisasi lampu cahaya putih dan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm hasil spot yang diberikan berbeda-beda, dengan demikian digunakan data hasil pengamatan pada plat KLT yang telah diderivatisasi, karena hasil yang lebih bagus dan penampakan noda spot jauh lebih jelas dibandingkan yang belum diderivatisasi. Hasil yang diperoleh yaitu terdapat 4 titik spot warna yang muncul dan dapat diidentifikasi, rincian data tertera pada tabel 5.5:

Tabel 5.5 Rincian Profil KLT Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi

Fraksi	No	Nilai Rf	Warna	Golongan
Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi	1	0,287	Biru	Flavonoid
	2	0,350	Hijau	Steroid
	3	0,737	Jingga	Alkaloid
	4	0,837	Merah	Antrakuinon

Hasil identifikasi golongan senyawa dengan menggunakan metode KLT dapat dilihat pada tabel 5.5. Golongan senyawa yang muncul pada plat KLT menandakan bahwa golongan senyawa flavonoid, steroid, alkaloid, dan antrakuinon kemungkinan memiliki aktivitas antineuroinflamasi yang akan dibuktikan dengan uji *in vitro* pada sel mikroglia HMC3. Warna yang muncul mutlak menandakan golongan senyawa yang spesifik, karena pada eluen yang berbeda (n-butanol dengan air dan n-heksana dengan etil asetat) muncul warna yang sama dengan nilai Rf yang berbeda, tetapi untuk nilai Rf tidak mutlak menandakan golongan senyawa yang spesifik. Hal tersebut dikarenakan nilai Rf yang muncul dipengaruhi oleh perbandingan eluen yang yang dipakai.

5.6 Perlakuan dan Preparasi Sampel

Jenis penelitian yang digunakan yaitu *in vitro*, dimana peneliti memberikan perlakuan berupa dosis fraksi etil asetat pada sel mikroglia HMC3 yang menggunakan metode pewarnaan ICC dan memvisualisasikan intensitas fluoresensi dari MHC II dengan menggunakan instrumen CLSM. Tahapan perlakuan dimulai dari kultur sel, metode pewarnaan ICC, dan visualisasi MHC II dengan instrumen CLSM.

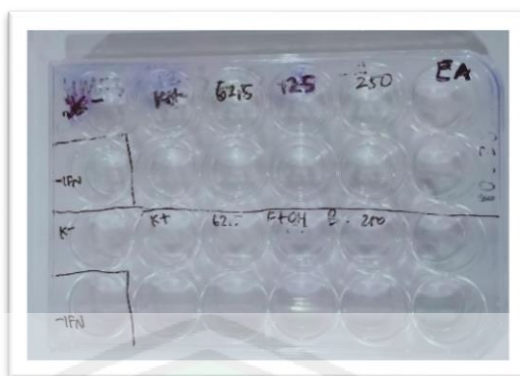
Tahapan kultur sel mikroglia HMC3 menggunakan medium dasar EMEM, FBS 9 %, dan *penisilin streptomycin* 1 % yang disebut medium komplet didalam *culture flask*. Sel mikroglia HMC3 dipilih karena, pada kondisi *resting state* sel ini belum mensekresi MHC II, sehingga peneliti dapat memberikan lingkungan yang terkendali dengan dengan IFN- γ agar sel dapat mensekresi MHC II. Penggunaan medium dasar EMEM pada sel mikroglia HMC3 dapat memberikan nutrisi utama pada sel. EMEM mengandung 12 jenis asam amino non-esensial, *glutamine*, 8 vitamin dan beberapa garam anorganik (Liu, et al., 2016). Pemberian FBS menjadi faktor yang mempengaruhi kondisi lingkungan sel berupa hormon pertumbuhan, nutrisi, mineral, dan lainnya dalam kultur sel. Sementara itu, penambahan antibiotik *penicillin-streptomycin* berfungsi untuk mencegah kultur sel terkontaminasi bakteri dan antimikotik mencegah kontaminasi jamur. Setelah sel dikultur di dalam *culture flask*, sel akan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%. Tujuan inkubasi sel pada inkubator CO₂ 5% yaitu diperlukan kondisi lingkungan yang lembab agar sel mampu tumbuh dan berkembang. Perkembangan sel mikroglia diamati setiap hari dan medium komplet diganti setiap dua hari sekali. Hal tersebut dilakukan agar

peneliti mengetahui konfluensi sel dan meminimalisir terjadinya kontaminasi di dalam *culture flask*. Jika konfluensi sel telah mencapai 80-90%, maka akan dilakukan *plating* pada *microplate 24-well*. Alasan pemilihan konfluensi tersebut, karena jika ditunggu sampai 100%, maka sel akan mengalami nekrosis karena terbatasnya tempat tertempelnya sel di dasar *culture flask* yang mengakibatkan sel akan terapung di permukaan medium komplit.

Perlakuan *plating* sel diawali dengan pemberian PBS yang berperan sebagai *buffer* untuk membantu sel mikroglia mempertahankan konstan pH (7-8), mekanisme *buffer* mempertahankan osmolaritas sel mikroglia karena garam mengandung ion, yang menyeimbangkan jumlah ion garam di dalam sel mikroglia. Jika sel mikroglia berdada di dalam lingkungan yang memiliki terlalu banyak garam ion, air akan bocor keluar dari sel dan menyebabkan sel menyusut. Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA lalu di *scrapping* agar sel terlepas dari dasar *culture flask*. Alasan penggunaan tripsin yaitu sebagai enzim proteolitik untuk merusak ikatan peptida pada sel dan EDTA digunakan untuk meningkatkan aktivitas dari tripsin, larutan ini digunakan untuk mengangkat sel yang melekat pada dasar *culture flask* agar mudah dipindahkan ke *microplate 24-well*. Setelah sel mikroglia tersuspensi, maka akan dipipet ke dalam ke dalam *conical tube* 15 ml. Selanjutnya *conical tube* 15 ml dimasukkan ke dalam *centrifuge* dan diatur kecepatan 800 rpm selama 7 menit, alat ini bertujuan untuk memisahkan antara medium komplit dengan sel mikroglia. Suspensi sel mikroglia kemudian di *plating* ke dalam *microplate 24-well* yang telah diberikan *coverslip* di masing-masing sumuran. *Coverslip* tersebut berfungsi sebagai tempat menempelnya sel mikroglia, sehingga akan mempermudah pengambilan sel pada saat visualisasi dengan instrumen

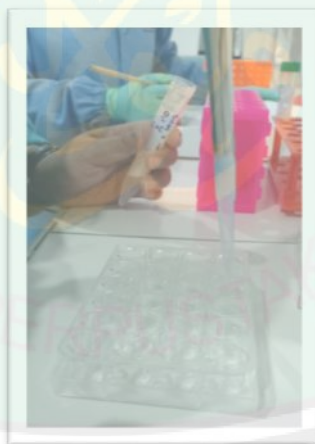
CLSM. Kemudian, sel akan diinkubasi selama 48 jam pada inkubator CO₂ 5%. Penginkubasian 48 jam bertujuan agar sel mikroglia menempel pada *coverslip* secara optimal. Selanjutnya, masing–masing sumuran pada *microplate 24-well* diinduksi IFN- γ , hal ini bertujuan agar sel mikroglia mampu mensekresi MHC II sebagai faktor neuroinflamasi. Intensitas fluoresensi dari gen MHC II dapat meningkat ketika terdapat faktor penginduksi inflamasi, khususnya sitokin IFN- γ yang dapat merangsang transkripsi gen MHC II. Penginduksian dilakukan selama 24 jam pada inkubator CO₂ 5%, selanjutnya dilakukan pemberian dosis perlakuan kontrol (+) genistein, kontrol negatif (-), dosis 62,5 ppm, dosis 125 ppm, dan dosis 250 ppm pada setiap sumuran dan diinkubasi 24 jam pada inkubator CO₂ 5%.

Tahap berikutnya adalah metode pewarnaan dengan ICC, ICC memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi apakah sel dalam sampel tertentu dapat mengintensitas fluoresensikan antigen yang diinginkan (Taylor dan Rudbeck, 2013). Dalam hal ini antigen yang diinginkan adalah MHC II. Protokol ICC terbagi menjadi 3 tahap yaitu preparasi sampel (fiksasi, *permeabilization*, *buffer blocking*), *Immunostaining*, *Analysis* (menggunakan CLSM). Pada Fiksasi (pada gambar 5.3) ini digunakan PFA 4 %, tujuan fiksasi adalah mencegah enzim proteolitik yang dapat menyebabkan nekrosis pada sel dan pembusukan sel mikroglia, selain itu fiksasi juga mampu mempertahankan morfologi dan struktur sel dengan *crosslinking protein* melalui gugus amina dan membentuk hubungan intermolekuler dengan protein antigen. Setelah proses fiksasi selesai, kemudian sel diinkubasi kedalam inkubator 4°C.



Gambar 5.5 Microplate 24-well setelah difiksasi

Proses dilanjutkan pada tahap *permeabilization* dengan menggunakan triton x-100 0,1 %. Dalam kondisi normal, berat molekul antibodi primer MHC II terlalu tinggi untuk melewati membran sel mikroglia, dengan menggunakan *permeabilization* memungkinkan antibodi primer MHC II untuk melewati membran seluler. Triton x-100 dipilih karena mampu menembus *lipid bilayer* termasuk nukleus.

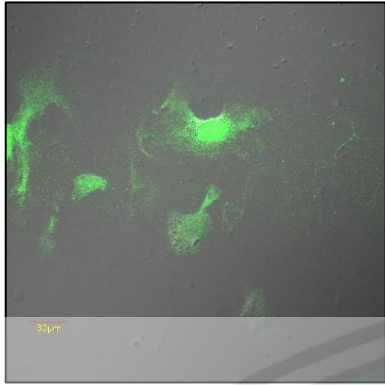


Gambar 5.6 Pemberian Triton x-100 0,1 %

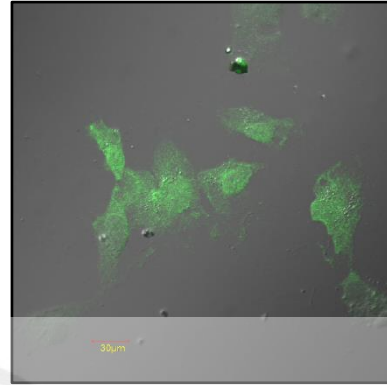
Perlakuan selanjutnya adalah *buffer blocking* yaitu dengan menggunakan BSA 1 %. Tujuan *buffer blocking* yaitu untuk meminimalkan antibodi non-spesifik MHC II berikatan dengan MHC II, sehingga antibodi spesifik MHC II mampu berikatan dengan antigen MHC II. Tahap selanjutnya adalah *Immunostaining* dengan *indirect*

(antibodi primer dan antibodi sekunder), alasan pemilihan *indirect* karena lebih sensitif daripada metode *direct*, sehingga interaksi antara antibodi primer MHC II dengan antigen MHC II akan optimal. Pada tahap ini diawali dengan pemberian antibodi primer MHC II pada masing–masing sumuran selama. Tujuan penambahan antibodi primer MHC II agar dapat mengenali antigen MHC II pada sel mikroglia. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian antibodi sekunder MHC II berlabel *fluorochrome* (FITC) pada masing–masing sumuran, pemberian antibodi sekunder ini akan menyebabkan MHC II berpendar yang akan divisualisasikan dengan CLSM.

Tahap visualisasi menggunakan CLSM untuk memvisualisasikan antigen MHC II pada sel. *Coverslip* pada setiap sumuran akan diambil dan diletakan pada kaca preparat, kemudian dimasukan kedalam tempat spesimen pada CLSM. Kemudian diatur perbesaran 40x, pada instrumen ini antibodi sekunder FITC akan berpendar ketika dikenai laser dengan panjang gelombang 30 μm yang merupakan antigen MHC II. Pendaran yang terang memperlihatkan intensitas fluoresensi MHC II yang tinggi, sebaliknya jika pendaran terlihat redup memperlihatkan intensitas fluoresensi MHC II yang rendah. Hasil intensitas tersebut akan berupa data angka dan memiliki satuan *arbitrary unit* (AU).



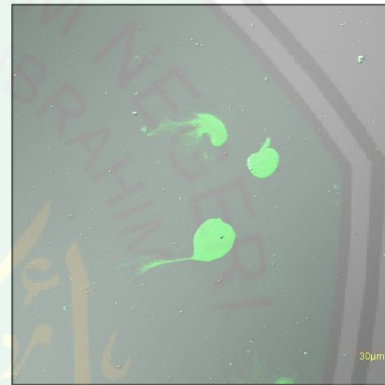
Gambar 5.7 Intensitas Fluoresensi
MHC II pada Dosis 62,5 ppm



Gambar 5.8 Intensitas Fluoresensi
MHC II pada Dosis 125 ppm



Gambar 5.9 Intensitas Fluoresensi
MHC II pada Dosis 250 ppm



Gambar 5.10 Intensitas Fluoresensi
MHC II pada Kontrol (-)



Gambar 5.11 Intensitas Fluoresensi
MHC II pada Kontrol (+)

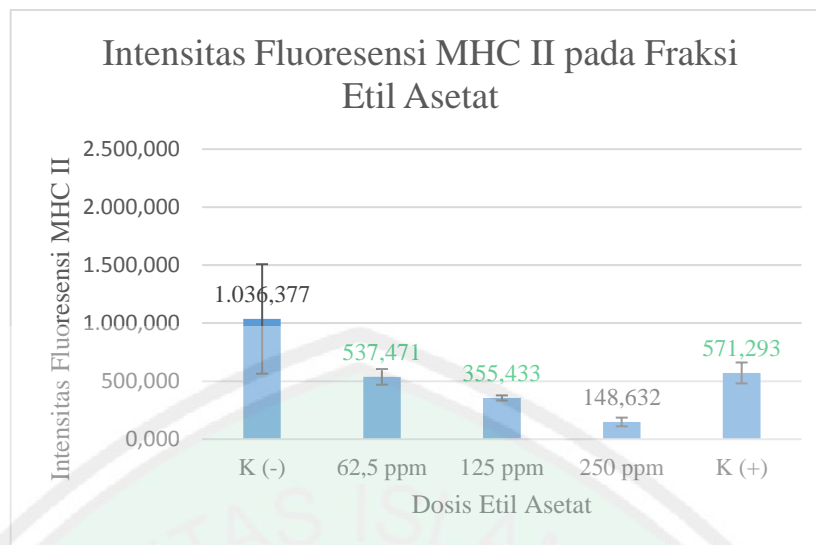
Hasil dari pengukuran intensitas fluoresensi MHC II dari setiap dosis fraksi etil asetat yang kemudian dibandingkan dengan kontrol (+) untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas dari fraksi etil asetat daun semanggi sebagai antineuroinflamasi. Hasil pengukuran intensitas MHC II didapat sebagaimana yang terdapat pada tabel 5.6 :

Tabel 5.6 Intensitas Fluoresensi MHCII Tiap Dosis Perlakuan

Dosis Perlakuan	Intensitas dari MHC II (AU) \pm SD
Kontrol (+)	571,293 \pm 90,16*
Kontrol (-)	1.036,377 \pm 471,74
Dosis 62,5 ppm	537,471 \pm 67,53*
Dosis 125 ppm	355,433 \pm 22,17*
Dosis 250 ppm	148,632 \pm 37,63

*Tidak berbeda signifikan dengan kontrol (+)

Pada tabel 5.6 terlihat bahwa dosis 62,5 ppm dan 125 ppm tidak berbeda signifikan dengan kontrol (+). Hal ini diduga pada kedua dosis tersebut memiliki aktivitas yang mirip dengan kontrol (+) yaitu aktivitas antineuroinflamasi. Aktivitas tersebut dibuktikan dengan kemampuan pada kedua dosis tersebut yang memiliki intensitas fluoresensi MHC II tidak berbeda jauh dengan kontrol (+). Berikut adalah gambar 5.12 yang merupakan grafik dari intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 :



*Tidak berbeda signifikan dengan K (+)

Gambar 5.12 Intensitas Fluoresensi MHC II pada Fraksi Etil Asetat

Pada gambar 5.12 terlihat perbedaan intensitas yang didapat pada masing-masing perlakuan, dimana warna hijau pada dosis 62,5 ppm dan 125 ppm pada fraksi etil asetat daun semanggi, memiliki nilai intensitas fluorensi MHC II yang tidak jauh berbeda dengan kontrol (+).

5.7 Analisa Data Intensitas Fluoresensi MHC II

Analisa data terhadap hasil yang didapat dari intensitas fluorensi MHC II pada sel mikroglial HMC3 metode *immunocytochemistry* (ICC) dengan menggunakan uji normalitas. Menurut Ghozali (2016) 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. 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* ditunjukkan pada tabel 5.7 sebagai berikut :

Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Signifikansi
Kontrol (-)	0,592
Dosis 62,5 ppm	0,451
Dosis 125 ppm	0,454
Dosis 250 ppm	0,515

Berdasarkan data pada tabel 5.6 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 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 5.8 sebagai berikut :

Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas *Levene's Test*

<i>Levene's test</i>	Signifikansi
6,754	0,005

Berdasarkan dari uji homogenitas yang ditunjukkan pada tabel 5.7 menunjukkan bahwa dari semua distribusi data dengan nilai signifikansi 0,014. Nilai signifikansi

yang didapat lebih kecil dari 0,05, maka varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama. Sehingga, analisa data yang sesuai digunakan adalah uji korelasi nonparametrik. Analisa data dilanjutkan dengan uji korelasi yang bertujuan untuk mengetahui hubungan suatu variabel dengan variabel lainnya (Syaodih, 2007). Uji korelasi *Spearman rho* digunakan untuk mengkaji hubungan atau pengaruh variabel bebas (dosis fraksi etil asetat) dengan variabel terikat (Intensitas fluoresensi MHC II). Hasil uji korelasi *Spearman rho* pada tabel 5.9 sebagai berikut :

Tabel 5.9 Hasil Uji Korelasi *Spearman Rho*

		Perlakuan	Intensitas
Perlakuan	<i>Correlation Coefficient</i>	1,000	-0,821**
	Sig. (2-tailed)	-	0,000
	N	15	15
Intensitas	<i>Correlation Coefficient</i>	-0,821**	1,000
	Sig. (2-tailed)	0,000	-
	N	15	15

Berdasarkan hasil uji *spearman rho* didapatkan nilai korelasi 0,821 maknanya adalah terdapat korelasi yang sangat kuat antara dosis perlakuan dengan intensitas fluoresensi MHC II yang didapat. Tanda negatif (-) pada -0,821**) menyatakan bahwa adanya arah yang negatif antara dosis perlakuan yang diperoleh terhadap intensitas fluoresensi MHC II yang dihasilkan. Sementara itu nilai signifikansi yang diperoleh $0,000 < 0,050$, maka terdapat korelasi yang signifikan antara dosis perlakuan dengan intensitas fluoresensi MHC II.

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 5.10 sebagai berikut :

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

Kelompok	Kontrol (+)	Kontrol (-)	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	Keterangan
Kontrol (+)		0,024	0,850	0,245	0,036	Dosis 62,5 ppm dan 125 ppm memiliki nilai signifikansi $> 0,05$, maka dosis tersebut tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol (+).
Kontrol (-)	0,024		0,017	0,003	0,000	
62,5 ppm	0,850	0,017		0,322	0,050	
125 ppm	0,245	0,003	0,322		0,264	
250 ppm	0,036	0,000	0,050	0,264		

Hasil uji LSD yang terdapat pada tabel 5.10 menyatakan bahwa pada dosis 62,5 ppm dan 125 ppm memiliki nilai signifikansi $> 0,05$, maka pada kedua dosis tersebut tidak memiliki perbedaan dengan dengan kontrol (+). Sehingga pada kedua dosis tersebut tidak berbeda dengan kontrol (+) dalam hal menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3. Sedangkan pada dosis 250 ppm memiliki perbedaan dengan kontrol (+), karena nilai signifikansi $< 0,05$. Namun tidak berarti pada dosis 250 ppm tidak terjadi penurunan intensitas fluoresensi MHC II. Hal ini dikarenakan selisih penurunan intensitas MHC II antara dosis 250 ppm dengan kontrol (+) sangat jauh (Grafik 5.11). Jika sudah diketahui antara dosis dengan intensitas fluoresensi memiliki hubungan, maka dilakukan uji beda non-parametrik dengan 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. H_0 dalam Uji *Kruskal-Wallis* adalah bahwa sampel berasal dari populasi yang sama. Dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan jika nilai signifikansi $< 0,05$ (H_0 ditolak) (Hidayat dan Istiadah, 2011). Berikut data hasil Uji *Kruskal-Wallis* ditunjukkan pada tabel 5.11 sebagai berikut:

Tabel 5.11 Hasil Uji *Kruskal-Wallis*

<i>Kruskal-Wallis test</i>	Signifikansi
12,993	0,011

Berdasarkan Uji *Kruskal-Wallis* tersebut didapatkan nilai signifikansi kurang dari 0,05, maka terdapat perbedaan signifikan dari nilai intensitas fluoresensi MHC II antar dosis perlakuan. Selanjutnya untuk melihat nilai dosis efektif (ED_{50}) dilakukan uji probabilitas yang ditampilkan pada tabel 5.12 sebagai berikut:

Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas

<i>Probability</i>	<i>Estimate</i>
0,400	2,318
0,450	1,873
0,500	1,436
0,550	0,998
0,600	0,553

Hasil nilai Probabilitas Uji *Chi-Square* yang ditunjukkan pada tabel 5.12 yaitu nilai ED_{50} yaitu 1,436. Pentingnya ED_{50} yaitu untuk menentukan dosis yang dapat menimbulkan efek terapi pada 50% populasi. Nilai signifikansi yang bermakna dari keseluruhan kelompok uji menunjukan bahwa kandungan senyawa fitoestrogen yang

diduga terdapat pada fraksi etil asetat daun semanggi memiliki aktivitas farmakologi dalam antineuroinflamasi.

5.8 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen

Aktivitas fitoestrogen dalam menurunkan intensitas MHC II pada sel mikroglia HMC3 menunjukkan bahwa semakin besar dosis perlakuan yang diberikan, maka intensitas MHC II pada sel mikroglia akan semakin menurun, hal ini disebabkan senyawa fitoestrogen fraksi etil asetat pada semanggi dapat berikatan dengan ER- β pada sel mikroglia HMC3 dan akan mencegah proses transkripsi dari NF- κ B, sehingga MHC II yang diintensitas fluoresensikan akan menurun. Dari berbagai mekanisme ikatan estrogen dengan reseptor estrogen, jalur *ER-dependent*, *membrane-initiated estrogen signaling* yang memiliki kemungkinan dilalui oleh senyawa estrogen pada semanggi, hal ini dikarenakan jalur tersebut terjadi pada sistem saraf dan juga mempengaruhi transkripsional gen. Transkripsional gen yang dipengaruhi terutama adalah NF- κ B, dimana NF- κ B inilah yang akan bertanggungjawab terhadap sistem kekebalan dan respons inflamasi (Galien *et al.*, 1997). Peran NF- κ B sangat penting dalam regulasi patogenesis penyakit terkait neuroinflamasi. Berlimpahnya faktor transkripsi NF- κ B dan aktivasi konstitutif di otak memiliki beragam fungsi diantara neuron, glia, dan pembuluh darah otak. Teraktivasinya NF- κ B di sel neuron akan meningkatkan intensitas fluoresensi dari MHC II sebagai agen proinflamasi, ER yang teraktivasi akan menghambat aktivasi dari NF- κ B, sehingga akan mencegah neuroinflamasi karena intensitas fluoresensi MHC II akan menurun. MHC II adalah molekul lipoprotein yang berada di permukaan sel yang sangat penting untuk mengatur respons imun dari patogen ekstraseluler ke Sel Limfosit T CD4⁺. Intensitas fluoresensi dari gen MHC II dapat

meningkat ketika terdapat faktor penginduksi inflamasi, khususnya sitokin IFN- γ yang dapat merangsang transkripsi gen MHC II.

Interferon- γ (IFN- γ) merupakan satu-satunya interferon tipe 2 yang memiliki sifat imunomodulator. Aktivasi IFN- γ akan berkaitan dengan subunit reseptor Jak1 dan Jak2, aktivasi dari keduanya akan menghasilkan fosforilasi reseptor, sehingga dapat mengikat *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) dan akan mempengaruhi translokasi di nukleus. Ketika berada di nukleus, STAT1 akan berikatan dengan *IFN-gamma-activated sequence* (GAS) dipromotor gen, hal ini bertujuan untuk mengatur proses transkripsinya dan intensitas fluoresensi gen lainnya. Akibat dari pensinyalan IFN- γ tersebut, jalur pensinyalan NF- κ B untuk mengatur intensitas fluoresensi gen Sel Limfosit T CD4+ akan teraktivasi yang berperan sebagai sistem imun spesifik seluler. Munculnya Sel Limfosit T CD4+ akan mengaktifkan sel *T helper 1* (Th1) yang selanjutnya akan memediasi agen proinflamasi MHC II sebagai *antigen presenting cell* (APC) ke sel mikroglia. Sel Th1 bertanggung jawab untuk kekebalan terhadap patogen intraseluler terutama melalui sekresi IFN- γ (Hyunju and Ghosh, 2013).

Senyawa fitoestrogen pada fraksi etil asetat akan berikatan dengan ER- β melalui jalur *ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling*, ER- β memiliki sifat dominan dalam konsep pensinyalan estrogen. Sementara itu, ER- β berperan sebagai modulator penting dari beberapa sistem neurobiologis non-reproduksi, seperti pada kondisi biologis tubuh (Arteaga-Lopez *et al.*, 2003). Pada jalur ini ER- β yang teraktivasi akan mengaktifkan *second messenger* pada sitoplasma, kemudian terkativasinya *second messenger* akan mempengaruhi transkripsional gen pada nukleus. Transkripsional gen yang dipengaruhi adalah NF-

κ B, yang berpengaruh pada proses terjadinya neuroinflamasi. NF- κ B yang teraktivasi akan melepaskan sitokin proinflamasi yaitu MHC II, peran ER- β yang teraktivasi akan mencegah proses transkripsi dari NF- κ B, sehingga MHC II yang diintensitas fluoresensikan akan menurun. Dengan demikian, senyawa fitoestrogen pada semanggi dapat dikatakan sebagai senyawa yang memiliki khasiat antineuroinflamasi.

5.9 Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan anugerah khusus yang Allah SWT berikan kepada manusia. Beberapa kali di dalam Alqur'an menyebutkan peran tumbuhan sebagai makanan dan obat manusia. Manusia mendapatkan banyak manfaat dari tumbuhan, dari keteduhan hingga ketersediaan daun, buah, bunga, dan lainnya. Hijaunya pepohonan membangkitkan rasa nyaman di hati manusia, hal ini seharusnya ada pada diri mereka yang beriman kepada Allah SWT. Berikut adalah ayat yang menjelaskan mengenai penciptaan tumbuhan dan manfaatnya bagi manusia (Rahman, 1996). Diantara ayat-ayat Alqur'an yang menjelaskan mengenai tumbuhan terdapat dalam QS: Asy-Syu'ara'(07) :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Kuasa Allah SWT telah dijelaskan pada ayat diatas yang menciptakan berbagai jenis tumbuhan di bumi yang diperuntukkan bagi manusia dan makhluk lainnya. Semua bagian tumbuhan yang baik dapat dimanfaatkan oleh manusia terutama

untuk menjaga kesehatan. Hal ini dijelaskan dalam firman Allah SWT dalam QS: Asy-Syu'ara':07. Kebenaran tentang firman Allah SWT mengenai “*Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik*” dapat dibuktikan pada penelitian ini dimana aktivitas antineuroinflamasi yang terdapat pada fraksi etil asetat daun semanggi dapat menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 setelah diinduksi IFN- γ , dengan kata lain tanaman semanggi ini dapat dijadikan sebagai obat antineuroinflamasi. Hal ini menegaskan bahwa penyakit dapat disembuhkan dengan obat, sebagaimana yang dijelaskan dalam hadits shahih riwayat Imam Bukhari, bahwa Rasulullah SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya : Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya. (HR Bukhari).

Hadist tersebut mengandung makna bahwa Allah SWT menurunkan penyakit kepada manusia pasti disertai dengan penawarnya (obat). Tetapi, tidak semua orang tepat dalam proses penyembuhannya, sehingga tidak kunjung sembuh. Kemudian, ada orang yang mungkin memahami, namun tidak mempraktikkan dengan benar. Disinilah pentingnya bagi manusia untuk menanyakan suatu hal kepada ahlinya, sebagaimana yang diterangkan dalam QS: An-nahl (43) :

فَسَلُّوا أَهْلَ الذِّكْرِ إِنْ كُنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ

Artinya :... maka bertanyalah kepada orang yang mempunyai pengetahuan jika kalian tidak mengetahui.

Ayat tersebut berlaku umum dalam segala urusan, termasuk dalam hal berobat. Manusia harus menanyakan tentang obat untuk suatu penyakit kepada ahlinya yaitu apoteker, dengan demikian manusia tersebut dapat terpenuhi kebutuhan akan

obatnya dan dengan pengobatan yang telah disarankan oleh ahlinya, maka kesembuhannya akan tercapai.

Penting bagi manusia untuk sadar dan memberikan perhatian terhadap ciptaan Allah SWT terutama dengan adanya tumbuhan yang baik di bumi bagi manusia yang ingin berfikir, maka akan terdorong untuk meningkatkan ilmu pengetahuan terutama pada bidang obat herbal, dimana selama ini manusia mayoritas menggunakan obat kimia yang dalam jangka waktu lama akan berdampak negatif pada kesehatannya. Apoteker sebagai ahli dalam bidang pengobatan harus memiliki wawasan yang luas dan melakukan inovasi terhadap pengembangan obat baru.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

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

1. Fraksi etil asetat daun semanggi memiliki hubungan aktivitas antineuroinflamasi dalam menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ yang ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi 0,821 pada uji korelasi *spearman rho*, dimana tingkat hubungannya adalah sangat kuat.
2. Dosis efektif dari fraksi etil asetat daun semanggi yang dapat menurunkan intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ dari hasil uji probabilitas menunjukkan nilai ED₅₀ 1,436 ppm.

6.2 Saran

Penelitian ini perlu dilakukan sampai tahap isolasi pada kelompok pelarut etil asetat, hal tersebut bertujuan agar pada kelompok pelarut etil asetat didapatkan senyawa tunggal yang memiliki aktivitas sebagai antineuroinflamasi dan juga penelitian secara *in silico* perlu dilakukan sebagai data pendukungnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Litchman AH, Pillai S.2007. Chapter 12 Cytokines. Chapter 13 Effector mechanism of cell-mediated immunity. Chapter 14 Effector mechanism of humoral immunity. *Celluler and molecular Immunology*. 21 ed. Philadelphia.
- Abidin. 2006. *Dasar Pengetahuan Ilmu Taksonomi*. Bandung: Angkasa
- 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 JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI.
- Ahmad, M.M.2006. Anti Inflammatory Activities of *Nigella sativa* Linn (Kalongi, black seed), (Online), (<http://lailanurhayati.multiply.com/journal>, diakses 13 November 2007).
- 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.
- Amor, S., F. Puentes, D. Baker, and P. van der Valk.2010.Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154-69.
- Arteaga-Lopez, Paola, Handal-Silva, Anabella y Morán-Perales, José Luis. 2003. Differential cholinergic system regulation of mRNA ex-pression of estrogen receptors in the hypothalamus of the female rat. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*.
- 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.
- 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.
- Baziad A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Edisi ke-1. Jakarta. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Hal 75-81.
- Biben, H.A.2012. *Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan keamanan penggunaannya. Estrogen sebagai sumber hormon alami*. Seminar ilmiah.
- 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.
- Cherry, J., Olschowka, J., and O’banion, Kerry. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* . <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>.
- Choi, E. M. 2012. Liquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* stimulates osteoblast function in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Elsevier : *International Immunopharmacology*. Vol 12. Page 139-143.
- 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*.
- Cui L, Zahedi P, Saraceno J, Bristow R, Jaffray D, Allen C. 2013. Neoplastic cell response to tiopronin-coated gold nanoparticles. *Nanomedicine*. Vol 9(2):264-73. doi: 10.1016/j.nano.2012.05.016.
- Cutter WJ, Norbury R, Murphy DGM. 2003. Oestrogen, brain function, and neuropsychiatric disorders, *J NEUROL Neurosurg Psychiatry*; 74: 837-40.
- Czarniecki CW, 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.
- Czlonkowska, A., Ciesielka, A. and Joniec, H. 2003. Influence of Estrogen on Neurodegenerative Processes, *Med Sci Monit*, 9(10):247-256).
- Dahlan, S. 2004. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Uji Hipotesis*. Jakarta: Bina Mitra Press.
- Dong, Y. and Benveniste, E.N. 2001. *Immune function of astrocytes*. *Glia*. 36:180-190.
- Dweck, A. C. 2006. Isoflavones, Phytohormones and Phytosterols. *Journal Application Cosmetol*. Vol 24. Page 17-33.
- Endang W, L. 2016. *Imunitas sarana organ beraktivitas*. Sandira: Surabaya
- Eng, L.F., A.C. Yu, and Y.L. Lee. 1992. Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res*. 94:353-365.
- 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.
- Enmark E, Huikko MP, Grandien Kaj Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fied G, Nordenskjold dan Gustafsson JA. 1997. "Human Estrogen Receptor Beta Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Patten." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 62 (12):4258–65.
- Filiano, A. J., Gadani, S. P., and Kipnis, J. 2015. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res*. 1617, 18–27. doi: 10.1016/j.brainres.2014.07.050.
- Galien, Alvero AB, Silasi DA, Kelly MG, Fest S, Visintin I, Leiser A, Schwartz PE, Rutherford T, Mor G. 1997. Regulation of IKK β by miR-199a affects NF- κ B activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 27:4712–4723.
- Gandjar, Ibnu Gholib. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Ghani, Lannywati. 2009. *Seluk Beluk Manopause*. (Journal)Media Peneliti dan pengembangan Kesehatan. Volume 19 No. 4. *Puslitbang Biomedis dan Farmasi*
- Ghozali, Imam. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang : UNDIP
- Glass, Christopher K., Kaoru Saijo, Beate Winner, Maria Carolina Marchetto, and Fred H. Gage. 2010. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934.
- Glover A. and Assinder S.J. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc*. 189: 565-573.

- Griffin, W.S.T., J.G. Sheng, and R.E. Mark. 1997. Inflammatory Pathways : Implications in Alzheimer's Disease. In *Molecular Mechanisms of Dementia*. Wasco, W. and R.E. Tanzi (Eds.). *Human Press*, Totowa NJ, USA.
- Haas, Brian., Tessandra, Stewart., and Zhang, Jing. 2012. Premotor biomarkers for Parkinson's disease - a promising direction of research. *Translational Neurodegeneration* 2012 **1**:11. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-11>.
- Hadi, S. 1985. *Metodologi Research Jilid 4*. Yogyakarta: Yayasan Penerbit Fakultas Psikologi UGM.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. diterjemahkan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*, Bandung: Penerbit ITB, page : 27-34, 123-124, 147-157.
- Herlina, W. 2011. *Kitab Tanaman Obat Nusantara*. Yogyakarta: Medpres (Anggota IKAPI).
- Huang Y, Wange RL. 2004. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J Biol Chem*; 279(28):28827-30.
- Hyunju, Oh., and Ghosh, Sankar. 2013. NF- κ B: roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. *Immunological Reviews*. Department of Microbiology and Immunology, Columbia University, New York, NY.
- Janowsky, J and Chavez, B..2000. Sex Steroids Modify Working Memory, *Journal of Cognitive Neuroscience*, 12(3):407-414.
- Jantarantotai 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.
- Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Clark G., and Newbold R.R. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *Journal of Chromatography. B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 777(1-2):179189.
- Kasdu. 2004. *Kiat sehat & bahagia di usia menopause*. Puspaswara. Jakarta: Gramedia.
- Kettenmann, H., Hanisch, UK., Noda, M., and Verkhratsky, A. 2011. *Physiology of microglia*. *Physiol. Rev.* 91, 461-553.
- Kresnawaty I, Susanti I, Siswanto, Panji T. 2008. *Optimasi produksi biogas dari limbah lateks cair pekat dengan penambahan logam*. *J Menara Perkebunan* 76 (1) : 23-35
- Kuntana, YP., Gani, YY., Alipin, K. 2005. Respon Pemberian Phytoestrogen Berasal dari Tepung Kedelai pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Luas Jaringan Interstitial, permatogenesis dan Kualitas Sperma.
- Kusuma, F.R., dan Zaky, M. 2005. *Tanaman liar berkhasiat obat*. Agromedia : Cianjur.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47 (2).
- Laswati, H., Mangestuti, A., dan Retno, W. 2015. Efek Pemberian *Spilantes acmella* dan Latihan Fisik terhadap Jumlah Sel Osteoblas Femur Mencit

- yang Diinduksi Deksametason. Surabaya : Universitas Airlangga, Vol. 25 No.1 halaman 43-50.
- 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.
- Liza ,P., Achmad.,F, Ronny,M., Suwidjiyo, P. 2016. Ethanol Extract, Ethyl Acetate Extract, Ethyl Acetate Fraction, and n-Heksan Fraction Mangosteen Peels (*Garcinia mangostana* L.) As Source of Bioactive Substance Free-Radical Scavengers. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 01, 71 – 82.
- Ma'arif,B., Agil, M., dan Laswati,H. 2016. Analisis Fitokimia Ekstrak N-Heksana dan Fraksi Daun *Marsilea crenata* Presl. dengan GC-MS. *Trad. Med. J*. Vol. 21(2), P 77-85.
- Ma'arif,B., Agil, M., dan Laswati,H. 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol 8 (3).
- 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.
- Mizuno M, Noto D, Kaga N, Chiba A, Miyake S.2017.The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS ONE* 12(2): e0173032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173032>.
- 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.
- Mubarok, W., Chayatin, N., dan Santoso, B.2009. *Ilmu Keperawatan Komunitas Konsep dan Aplikasi*. Jakarta : Salemba Medika.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Makasar : Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar
- Nakagawa, Y., and 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.
- Nielsen, S. S. 2003. Food Analysis 3rd edition. Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, USA.
- Nisa, Ghallisa Khoirun, Wahyunanto Agung Nugroho, Yusuf Hendrawan. 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. Vol.2, No.1
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1. (3).

- Nursalam. 2003. Konsep & Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan: Pedoman Skripsi, Tesis, dan Instrumen Penelitian Keperawatan. Jakarta. Salemba Medik.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., and 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.
- Proverawati, A. & Sulistyawati, E. 2010. *Menopause dan sindrom premenopause*. Yogyakarta: Muha Medika.
- Przedborski, S, Vila M, Jackson-Lewis V. 2003. *Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?* *J Clin Invest.*, 111(1), 3–10.
- Putra, HL. 2011. Green Clover Potentiates Delaying The Increment Of Imbalance Bone Remodeling Process In Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana* Vol. 47 No. 2 April - June 2011 : 112117
- Putra, Kurniawan Hidayat Perdana. 2018. *Skripsi*. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahman, Doi. 1996. *Muamalah Syariah III*. Jakarta: PT. Raja Grafindo
- Raymond M. Welsh, Kapil Bahl, 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.
- Sani, Robby Nasrul, Fithri Choirun Nisa, Ria Dewi Andriani, Jaya Mahar Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut Tetraselmis chunii. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.2, No.2, hal.121-126
- Schreiber GH, Schreiber RD. 2003. Interferon gamma. In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook*. 1. Fourth ed. California-USA: *Academic Press- Elsevier*; p. 567-602.
- Setijati dan Johar Jumiati Afriastini. 1985. Kerabat Paku. Bogor: Proyek Studi Potensi SDA Indonesia Studi Potensi Sumber Daya Nabati Lembaga Biologi Nasional-LIPI.
- Sherwood L. 2004. *Human Physiology From Cells to Systems*. Australia: Thomson.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan, dan Keserasian AlQur'an*. Jakarta: Lentera Hati .
- Sirotkin, A.V., Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogen And Their Effects. *European Journal Of Pharmacology* 741 : 230–236.
- Sugiyono. 2011. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Afabeta
- Tang, Y., and Le, W. 2016. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.

- Taylor, C. R., and Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods. Dako Denmark : IHC Handbook* sixth edition.
- Villiers, T. J. 2009. *Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. Elsevier : Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* Vol. 23. Page 73-85.
- Warsono, Agus Wasisto Dwi Doso.2013. *Proses Pembelajaran & Penilaian.* Yogyakarta: Graha Cendekia
- Waters KM, Gebhart JB, Rickard DJ. 1999. Potential Roles of Estrogen Receptor- α and - β in the Regulation of Human Oteoblast Functions and Gene Expression. The Menopause at the Millenium. *In The Proceeding of the 9th International Menopause Society World Congress on Menopause.* Yokohama, Japan.
- Wells. G.B., Dipiro, J.T., Scwhinghammer, T.L., Dipiro, C.V. 2015. *Pharmacotherapy Handbook.* NY : Mcgraw Hil.
- Xiong, X. Y., Liu, L., and 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 PK, Smith BD.2003. Interferon gammarepression of collagen (COL1A2) transcription is mediated by the RFX5 complex. *J Biol Chem.*;278:49134–49144.
- Yacoeb AM, Nurjanah, Arifin M, Sulistiono W, Kristiono SS. 2010. Deskripsi histologis dan perubahan komposisi kimia daun dan tangkai semanggi (*Marsilea crenata Presl.*, Marsileaceae) akibat eribusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia XII(2)*:81-95.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.* Vol. 51. Page 229-235.
- Zou, T.B., Xia, E.Q., He, T.P., Huang, M.Y., Jia, Q., and Li, H.W.2014. Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology, *Molecules Journal*, 19, 1411-1421.
- Zulkifli. 2009. Eksplorasi dan Studi Keragaman *Garcinia L.* Berdasarkan Sumber Kunci Determinasi Bagi Perkuliahan Botani Tumbuhan Tinggi. *Jurnal Biologi Indonesia.* Vol.9(2): 52-65.

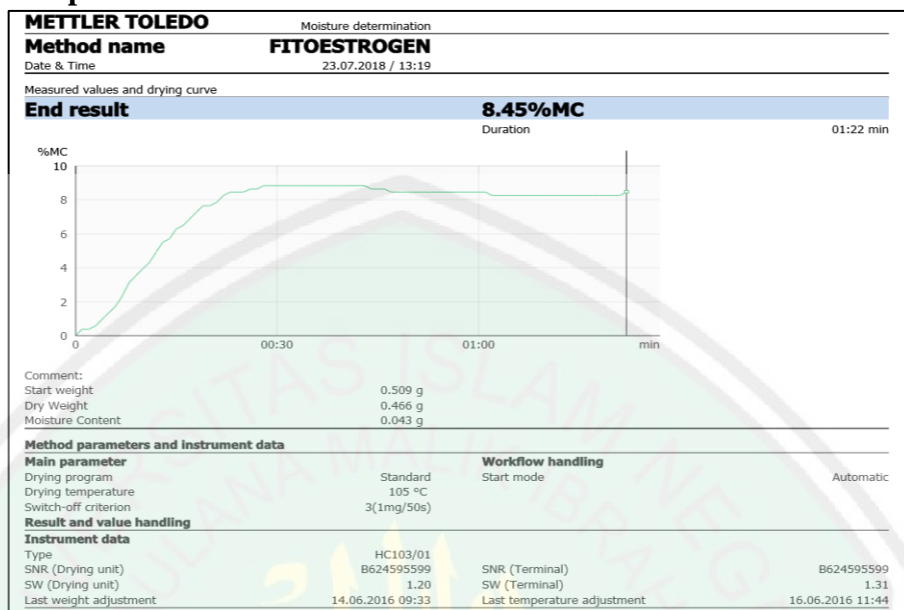
LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl)

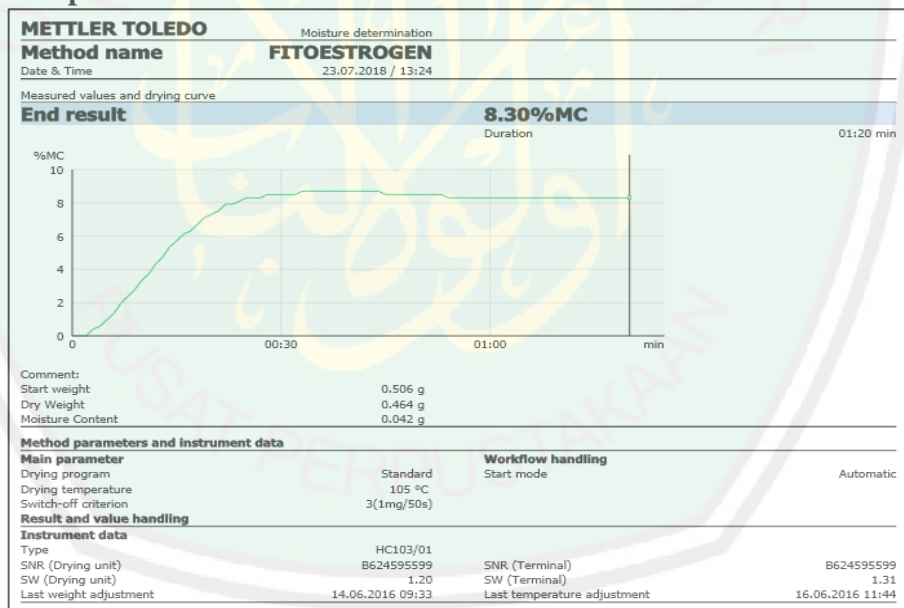
	
PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR DINAS KESEHATAN UPT MATERIA MEDICA BATU Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396 KOTA BATU	
65313	
Nomor	: 074 / 368 / 102.7 / 2017
Sifat	: Biasa
Perihal	: Determinasi Tanaman Semanggi Air
Memenuhi permohonan saudara :	
Nama	: BURHAN MA'ARIF Z.A., M.Farm.,Apt.
NIDT	: 19900221 201701011 124
Instansi	: JURUSAN FARMASI, FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
1. Perihal determinasi tanaman semanggi air	
Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Pteridophyta (paku-pakuan)
Kelas	: Pteridopsida
Ordo	: Salviniiales
Famili	: Marsileaceae
Genus	: Marsilea
Spesies	: <i>Marsilea crenata</i> Presl
Sinonim	: <i>Marsilea quadrifolia</i> Bl. ; <i>M. minuta</i> L.
Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi	
Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1	
2. Morfologi : Habitus ; Semak, menjalar, panjang ± 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang ± 2 cm, lebar ± 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, lepas/berdiri sendiri, kelopak dua, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serabut, putih kotor.	
3. Nama Simplisia : Marsileae crenatae folium / Daun semanggi air.	
4. Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol	
5. Penggunaan : Penelitian	
6. Daftar Pustaka :	
<ul style="list-style-type: none">• 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 , <i>FLORA</i>, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta• Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia I</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 Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl)

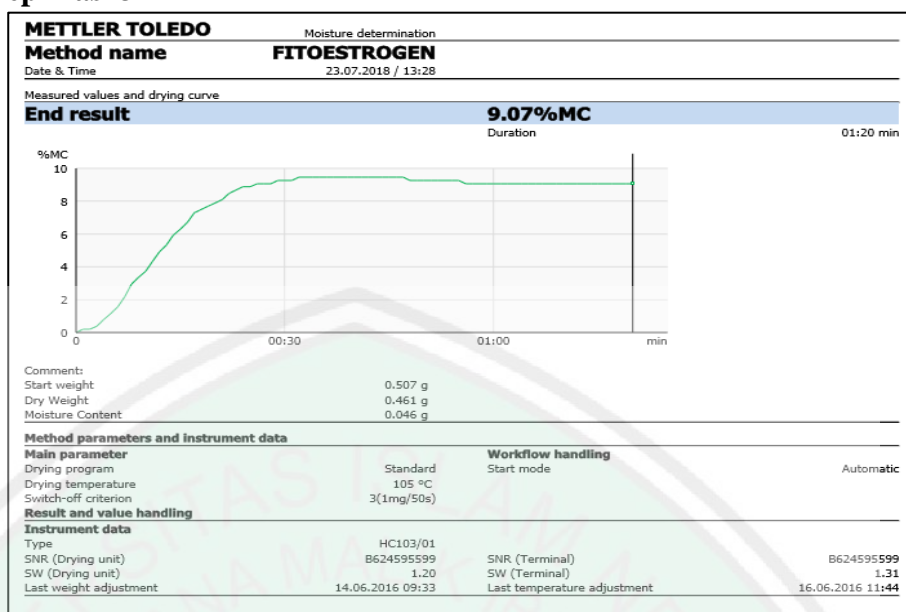
a. Replikasi 1



b. Replikasi 2

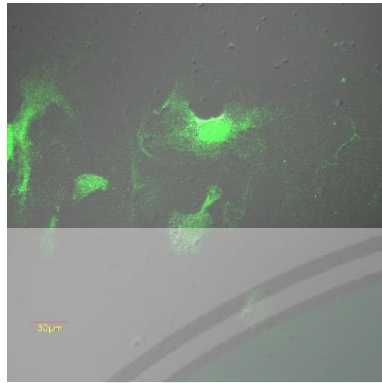


c. Replikasi 3

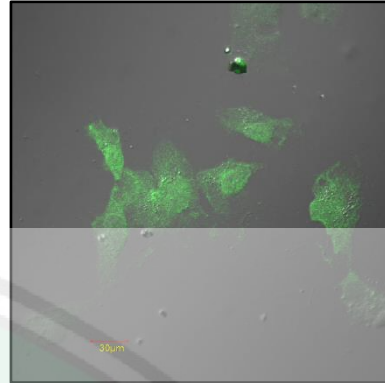


d. Rerata Nilai Moisture Content

Nama Sampel	Replikasi	Berat Awal	Berat Akhir	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Serbuk kering simplisia herba <i>Semanggi</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 pewarnaan ICC

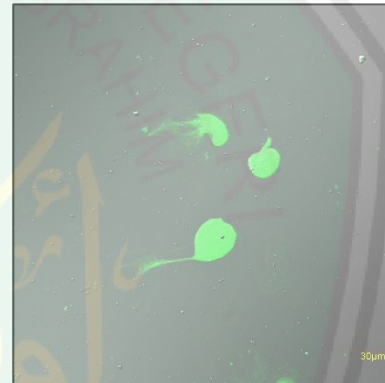
Intensitas fluoresensi
MHC II pada dosis 62,5 ppm



Intensitas fluoresensi
MHC II pada dosis 125 ppm



Intensitas fluoresensi
MHC II pada dosis 250 ppm



Intensitas fluoresensi
MHC II pada kontrol (-)



Intensitas fluoresensi
MHC II pada kontrol (+)

Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel

a. Pembuatan Medium Kultur EMEM (satu *culture flask*)

- 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 Medium Perlakuan

$$\begin{aligned} \text{Microplate 24-well} &= 300 \mu\text{L} \times 10 \text{ well} \\ &= 3000 \mu\text{L} \\ &= 3 \text{ ml} \end{aligned}$$

c. Pengenceran IFN- γ 1 μ g/ml

- 1) Induksi IFN- γ = 9 *well* 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)

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

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

d. Pembuatan dan pemberian larutan IFN- γ ke dalam *Microplate 24-well*

- 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 *microplate 24-well* dari inkubator
- 5) Diambil media dari *microplate 24-well*
- 6) Dimasukkan IFN- γ pada masing-masing *well*

7) Diinkubasi kembali dalam inkubator 37° C

e. Perhitungan dan pengenceran fraksi etil asetat

1) Fraksi etil asetat 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 etil asetat 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 etil asetat 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 etil asetat

1) Fraksi etil asetat konsentrasi 62,5 ppm

a. Diambil 350 μL fraksi 125 ppm

b. Ditambah media 350 μL dalam eppendorf, dihomogenkan

2) Fraksi etil asetat konsentrasi 125 ppm

a. Diambil 550 μL fraksi 125 ppm

b. Ditambah media 550 μL dalam eppendorf, dihomogenkan

3) Fraksi etil asetat konsentrasi 250 ppm

a. Diambil 62,5 μL fraksi 125 ppm

b. Ditambah media 1.187,5 μL dalam eppendorf, dihomogenkan

Lampiran 5. Hasil Analisa Data

a. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality ^a							
	Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Intensitas	K (-)	,263	3	.	,955	3	,592
	62,5 ppm	,295	3	.	,920	3	,451
	125 ppm	,294	3	.	,921	3	,454
	250 ppm	,281	3	.	,937	3	,515
a. Intensitas is constant when Dosis = K (+). It has been omitted.							
b. Lilliefors Significance Correction							

b. Uji Homogenitas *Levene's*

Test of Homogeneity of Variances			
Intensitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,157	4	10	,005

c. Uji Korelasi *Spearman Rho*

Correlations				
			Dosis	Intensitas
Spearman's rho	Dosis	Correlation Coefficient	1,000	-,821**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	15	15
	Intensitas	Correlation Coefficient	-,821**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

d. Uji Beda *Kruskal-Wallis*

Test Statistics ^{a,b}	
	Intensitas
Chi-Square	12,993
df	4
Asymp. Sig.	,011
a. Kruskal Wallis Test	
b. Grouping Variable: Dosis	

e. Uji LSD

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Intensitas						
LSD						
(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (+)	K (-)	-465,083667*	174,743755	,024	-854,43702	-75,73032
	62,5 ppm	33,822000	174,743755	,850	-355,53135	423,17535
	125 ppm	215,859667	174,743755	,245	-173,49368	605,21302
	250 ppm	422,660667*	174,743755	,036	33,30732	812,01402
K (-)	K (+)	465,083667*	174,743755	,024	75,73032	854,43702
	62,5 ppm	498,905667*	174,743755	,017	109,55232	888,25902
	125 ppm	680,943333*	174,743755	,003	291,58998	1070,29668
	250 ppm	887,744333*	174,743755	,000	498,39098	1277,09768
62,5 ppm	K (+)	-33,822000	174,743755	,850	-423,17535	355,53135
	K (-)	-498,905667*	174,743755	,017	-888,25902	-109,55232
	125 ppm	182,037667	174,743755	,322	-207,31568	571,39102
	250 ppm	388,838667	174,743755	,050	-,51468	778,19202
125 ppm	K (+)	-215,859667	174,743755	,245	-605,21302	173,49368
	K (-)	-680,943333*	174,743755	,003	-1070,29668	-291,58998
	62,5 ppm	-182,037667	174,743755	,322	-571,39102	207,31568
	250 ppm	206,801000	174,743755	,264	-182,55235	596,15435
250 ppm	K (+)	-422,660667*	174,743755	,036	-812,01402	-33,30732
	K (-)	-887,744333*	174,743755	,000	-1277,09768	-498,39098
	62,5 ppm	-388,838667	174,743755	,050	-778,19202	,51468
	125 ppm	-206,801000	174,743755	,264	-596,15435	182,55235

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

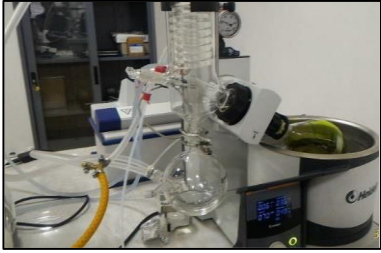




f. Probit Analysis

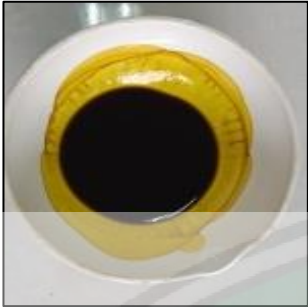

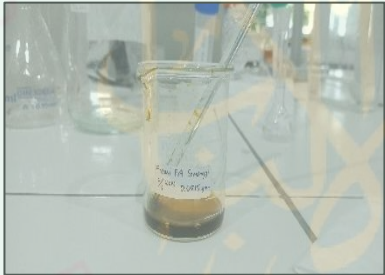
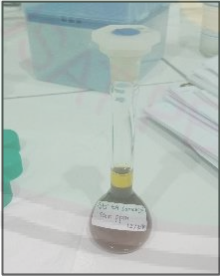
Confidence Limits				
	Probability	95% Confidence Limits for Dosis		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	,010	9,541	6,594	27,760
	,020	8,591	6,029	24,278
	,030	7,988	5,667	22,072
	,040	7,535	5,392	20,415
	,050	7,166	5,167	19,069
	,060	6,853	4,974	17,925
	,070	6,577	4,803	16,923
	,080	6,331	4,649	16,028
	,090	6,107	4,507	15,215
	,100	5,901	4,375	14,468
	,150	5,047	3,806	11,398
	,200	4,368	3,305	9,007
	,250	3,786	2,792	7,039
	,300	3,263	2,173	5,430
	,350	2,778	1,318	4,220
	,400	2,318	,167	3,412
	,450	1,873	-1,186	2,869
	,500	1,436	-2,640	2,458
	,550	,998	-4,156	2,108
	,600	,553	-5,729	1,786
,650	,093	-7,376	1,473	
,700	-,391	-9,124	1,157	
,750	-,914	-11,021	,826	
,800	-1,497	-13,142	,465	
,850	-2,175	-15,620	,051	
,900	-3,029	-18,745	-,463	
,910	-3,236	-19,501	-,586	
,920	-3,460	-20,322	-,719	
,930	-3,706	-21,226	-,866	
,940	-3,981	-22,235	-1,029	
,950	-4,295	-23,386	-1,215	
,960	-4,664	-24,739	-1,433	
,970	-5,117	-26,403	-1,701	
,980	-5,720	-28,616	-2,055	
,990	-6,669	-32,106	-2,613	


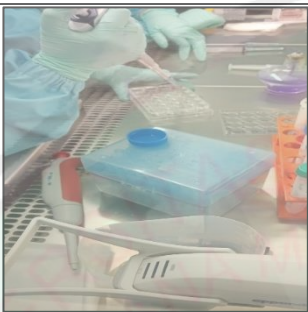
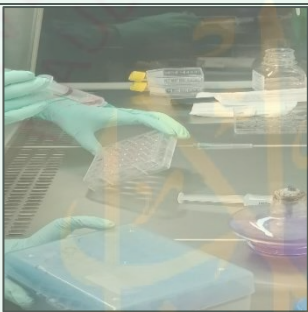

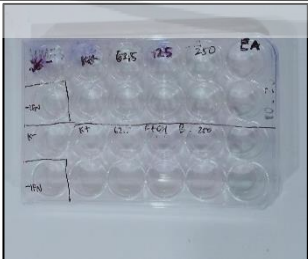
a. A heterogeneity factor is used.

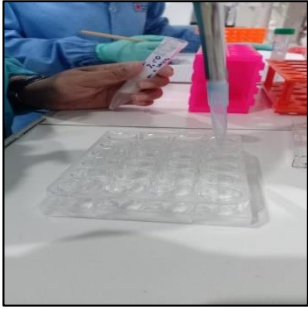


Lampiran 6. Ekstraksi dan Fraksinasi

NO	GAMBAR	KETERANGAN
1		Proses pengeringan daun semanggi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl)
2		Proses grinding simplisia menjadi serbuk daun semanggi
3		Proses Penimbangan simplisia daun semanggi
4		Proses ekstraksi dengan UAE daun semanggi
5		Proses penyaringan filtrat dan residu daun semanggi

6		Proses pemisahan pelarut dari ekstrak menggunakan <i>rotary evaporator</i>
7		Proses pengovenan ekstrak etanol 96% daun semanggi
8		Penimbangan ekstrak etanol 96% daun semanggi
9		Pembuatan suspensi air pada ekstrak etanol 96% daun semanggi
10		Proses fraksinasi pelarut etil asetat

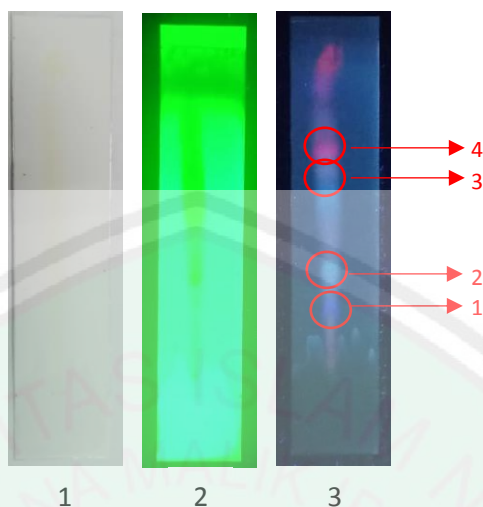
11		Fraksi etil asetat daun semanggi setelah di oven 40°C
12		Penimbangan fraksi etil asetat $\pm 0,05$ gram
13		Penambahan tween 80% dan DMSO pada fraksi etil asetat
14		Pembuatan larutan induk 5.000 ppm

15		Sterilisasi fraksi etil asetat
16		Platting sel mikroglia HMC3
17		Pemberian IFN- γ pada <i>microplate</i> 24-well
18		Pemberian fraksi etil asetat pada <i>microplate</i> 24-well
19		Fiksasi dengan PFA 4%

20		Pemberian larutan Triton-X untuk permeabilitas membran membran pada sel
21		Pemberian antibodi primer pada <i>microplate 24-well</i>
22		Analisa menggunakan instrument CLSM

Lampiran 7. Skrining Fitokimia dengan KLT

a. Eluen n-butanol : air (8:2)

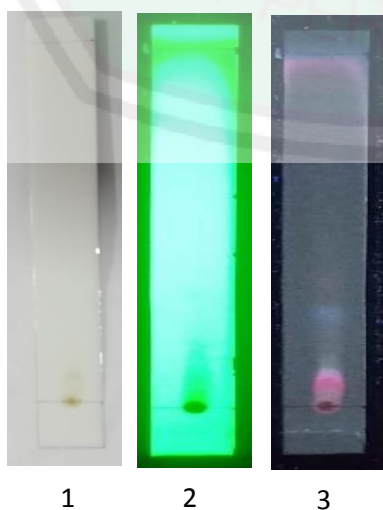


Keterangan:

1. Visualisasi Plat KLT pada cahaya putih
2. Visualisasi Plat KLT lampu UV panjang gelombang 254 nm
3. Visualisasi Plat KLT lampu UV panjang gelombang 366 nm

Fraksi	No	Nilai Rf	Warna	Golongan
Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi	1	0,287	Biru	Flavonoid
	2	0,350	Hijau	Steroid
	3	0,737	Jingga	Alkaloid
	4	0,837	Merah	Antrakuinon

b. Eluen n-heksana : etil asetat (6:4)



Keterangan:

1. Visualisasi Plat KLT pada cahaya putih
2. Visualisasi Plat KLT lampu UV panjang gelombang 254 nm
3. Visualisasi Plat KLT lampu UV panjang gelombang 366 nm