

**STUDI *IN SILICO* DAN *IN VITRO* AKTIVITAS  
ANTINEUROINFLAMASI EKSTRAK ETANOL 96%  
DAUN *Marsilea crenata* C Presl.**

**SKRIPSI**

Oleh :

**DENIS MERY MIRZA**

**NIM. 15670040**



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

**2019**

**STUDI *IN SILICO* DAN *IN VITRO* AKTIVITAS  
ANTINEUROINFLAMASI EKSTRAK ETANOL 96%  
DAUN *Marsilea crenata* C Presl.**

**SKRIPSI**

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

**Oleh :**

**DENIS MERY MIRZA**

**NIM. 15670040**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

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

**2019**

**STUDI *IN SILICO* DAN *IN VITRO* AKTIVITAS  
ANTINEUROINFLAMASI EKSTRAK ETANOL 96%  
DAUN *Marsilea crenata* C Presl.**


SKRIPSI


Oleh :  
**DENIS MERY MIRZA**  
NIM. 15670040

Telah disetujui oleh:

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

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

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

Tanggal 29 April 2019

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Farmasi



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

**STUDI *IN SILICO* DAN *IN VITRO* AKTIVITAS  
ANTINEUROINFLAMASI EKSTRAK ETANOL 96%  
DAUN *Marsilea crenata* C. Presl.**

**SKRIPSI**

Oleh :

**DENIS MERY MIRZA**

**NIM. 15670040**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S. Farm)  
Tanggal: 29 April 2019

**Susunan Dewan Penguji**

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

**Anggota Penguji** : Burhan Ma'arif ZA., M. Farm., Apt.  
NIP. 19900221 201801 1 001  
drg. Arief Survadinata, Sp. Ort.  
NIP. 19850720 200912 1 003  
Hajar Sugihantoro, MPH., Apt.  
NIDT. 19851216 20160801 1 083

**Tanda Tangan**

(Reel)  
( )  
( )  
( )

Mengetahui,

Ketua Jurusan Farmasi



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

**PERNYATAAN  
KEASLIAN PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Denis Mery Mirza

NIM : 15670040

Fakultas/ Jurusan : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan/ Farmasi

Judul Penelitian : Studi *In silico* dan *In vitro* Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* C. Presl.

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

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

Malang, 29 April 2019  
Yang Membuat Pernyataan,



Denis Mery Mirza  
NIM. 15670040

## MOTTO HIDUP

In your life you must think  
***“EVERYTHING HAPPEN FOR A REASON AND MIRACLE HAPPENS TO THOSE WHO BELIEVE IN THEM CAUSE MIRACLE IS THE OTHER NAME OF HARDWORK”***

In your life you must do  
*“ CARPE DIEM, QUAM MINIMUM CREDULA POSTERO”*  
 and  
*“PER ASPERA AD ASTRA”*

In your life you must believe  
***NOT THEY WEAKENED AND NOT THEY GAVE IN. AND ALLAH LOVES THE PATIENT ONES - QS. 3:146***



## PERSEMBAHAN

Syukur selalu terpanjatkan dengan kerendahan dan ketulusan hati, hamba bersujud syukur atas segala nikmat, taufik, rahmat dan hidayah-Mu yang tidak mungkin terhitung selama hamba mulai menjalani hingga proses menuntut ilmu dapat selesai dengan baik.

Karya sederhana ini saya persembahkan kepada sosok “pahlawan” hidupku, bapak Djanis Yohannes dan Ibu Suyati yang selalu mendukung, mendoakan serta memberikan motivasi untuk terus maju dan bergerak menuju arah yang lebih baik. Tidak lupa, terimakasih kepada Mas Kapten Tek. Yugo Hantoro, S.Pd, Mbak Iffung Nisdiawatie, S.E dan calon penerbang tempurku M. Dzakwan Rafif Hantoro atas segala dukungan yang telah diberikan sehingga diri ini dapat menyelesaikan program sarjana dengan baik dan lancar. Tanpa adanya keberadaan kalian, diri ini bukanlah seorang yang hebat dan mampu melewati semuanya dengan baik. Diri ini hanya mampu membalas dengan berdo'a dengan tulus ikhlas semoga kita semua selalu diberikan umur serta rizki yang barokah dan dapat bahagia di dunia maupun bersama sama di akhirat kelak.

Ucapan terimakasih yang tak terhitung saya sampaikan kepada para dosen serta karyawan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang lebih khusus jurusan Farmasi yang tidak pernah lelah membimbing dan membentuk karakter insan yang ulul albab.

**Ucapan terimakasih juga saya haturkan kepada pihak-pihak yang telah mendukung jalannya penelitian. Bu Choirunil Chotimah, M.Si dan Bu Helly Nurul Karima, M.P yang memberikan motivasi dan pengarahan serta kepada teman-teman fitoestrogen UIN Malang 2015 yang telah memberikan semangat dan canda tawa selama perjalanan menuntut ilmu berlangsung.**

Ucapan terimakasih tidak lupa terucapkan kepada teman-teman Pharmajelly, *Big Family*, sahabat Kimia Indonesia, Fitoestrogen UIN Malang 2014 dan UNAIR 2013. Semoga Allah SWT selalu membimbing dalam setiap langkah kita untuk mencapai ridho-Nya sehingga dapat meraih kesuksesan di dunia maupun di akhirat kelak. Amin.....

## KATA PENGANTAR

### **Assalamu'alaikum Wr. Wb.**

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

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



Jurusan Farmasi yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.

9. Keluargaku Bapak Djanis Yohannes dan Ibu Suyati, Mas Kapten Tek. Yugo Hantoro, S.Pd, Mbak Iffung Nisdiawatie, S.E dan calon penerbang tempurku M. Dzakwan Rafif Hantoro atas doa dan dukungan kepada penulis.

10. Teman teman Fitoestrogen UIN 2015 Muakib, Eka, Malik, Nanda, Dila, Menara dan Udin. Serta tidak lupa teman teman Fitoestrogen UIN 2014 dan teman teman Semanggi UNAIR 2013 atas pengalaman serta motivasinya kepada penulis

11. Teman temanku dari *PHARMAJELLY*, *Big Family* dan Sahabat Kimia Indonesia.

12. Serta semua pihak yang berpartisipasi dan membantu dalam menyelesaikan skripsi baik berupa moril maupun materiil.

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

**Wassalamu'alaikum Wr. Wb.**

Malang, 29 April 2019  
Penulis

Denis Mery Mirza  
15670040

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>HALAMAN PENGAJUAN</b>	
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b>	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN</b>	
<b>MOTTO</b>	
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b>	
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
<b>DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN</b> .....	ix
<b>ABSTRAK</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>مستخلص البحث</b> .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	6
1.3. Tujuan .....	7
1.4. Manfaat .....	7
1.5. Batasan Masalah .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Tinjauan Semanggi .....	9
2.1.1. Penyebaran dan Klasifikasi .....	9
2.1.2. Kegunaan dan Manfaat .....	10
2.2. Tinjauan Metode Ekstraksi .....	11

2.2.1. Definisi Ekstraksi.....	11
2.2.2. Jenis Ekstraksi .....	12
2.3. Tinjauan Fitoestrogen.....	19
2.4 Tinjauan Estrogen .....	20
2.5 Tinjauan <i>Estrogen Receptor</i> $\beta$ .....	22
2.6 Tinjauan dan Aplikasi Penunjang Studi <i>In Silico</i> .....	23
2.6.1. Definisi Studi <i>In Silico</i> .....	23
2.6.2. Aplikasi Penunjang.....	26
2.7. Tinjauan Neuroglia, Makroglia dan Mikroglia .....	29
2.7.1. Neuroglia .....	29
2.7.2. Makroglia.....	30
2.7.3. Mikroglia .....	31
2.8. Tinjauan Neurodegeneratif.....	33
2.9. Tinjauan Neuroinflamasi.....	34
2.10. Tinjauan Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ).....	35
2.11. Tinjauan <i>Major Histocompatibility Complex</i> II (MHC II) .....	35
2.12. Tinjauan <i>Immunocytochemistry</i> (ICC) .....	36
2.13. Tinjauan <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM) .....	37
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL</b>	
3.1. Kerangka Konseptual .....	39
3.2. Uraian Kerangka Konseptual dan Hipotesis .....	40
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	43
4.1.1 Jenis Penelitian .....	43
4.1.2 Rancangan Penelitian.....	43
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian .....	43
4.3. Sampel Penelitian.....	44
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	44
4.4.1 Variabel Bebas.....	44

4.4.2 Variabel Tergantung .....	45
4.4.3 Variabel terkontrol.....	45
4.4.4 Definisi Operasional .....	45
4.5. Alat dan Bahan Penelitian.....	47
4.5.1 Alat .....	47
4.5.2 Bahan .....	48
4.6. Prosedur Penelitian.....	49
4.6.1 Determinasi Tanaman dan Preparasi Simplisia Daun <i>M. crenata</i> .....	49
4.6.2 Prosedur Ekstraksi .....	50
4.6.3 Preparasi Sampel <i>In Silico</i> .....	51
4.6.4 Penambatan Ligan-Protein.....	52
4.6.5 Preparasi Cell Line Human Microglia Clone (HMC3).....	52
4.6.6 Uji Aktivitas Antineuroinflamasi dengan Menggunakan ICC .....	53
4.7. Analisis Data <i>In vitro</i> dengan Analisis <i>Probit</i> .....	54
4.8. Skema Penelitian.....	55
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1. Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman .....	56
5.2. Preparasi Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M. crenata</i> .....	58
5.3. Preparasi Sampel <i>In silico</i> .....	60
5.4. Penambatan Ligan-Protein .....	65
5.5. Preparasi <i>Cell Line</i> HMC3 .....	69
5.6. Uji Aktivitas Antineuroinflamasi dengan Menggunakan ICC.....	70
5.7. Analisis Data <i>In Vitro</i> dengan Analisis <i>Probit</i> .....	73
5.8. Potensi Ekstrak Etanol 96% <i>M. crenata</i> menjadi Agen Antineuroinflamasi .....	79
5.9. Integrasi Penelitian dengan Kajian Al Qur'an .....	85
<b>BAB VI PENUTUP</b>	
6.1 Kesimpulan .....	90
6.2 Saran.....	90

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b> <i>Marsilea crenata</i> Presl. ....	10
<b>Gambar 2.2.</b> Skema <i>Ultrasound Assisted Extraction</i> (UAE) .....	18
<b>Gambar 2.3.</b> Proses Mekanisme Ekstraksi UAE .....	18
<b>Gambar 2.4.</b> Mekanisme Pemberian Efek Hormon Estrogen.....	22
<b>Gambar 2.5.</b> Tampilan Autodock Vina dengan pemetaan <i>Autogrid</i> .....	27
<b>Gambar 2.6.</b> Tampilan Avogadro dengan Optimalisasi Geometri .....	28
<b>Gambar 2.7.</b> Tampilan <i>Boiled EGG</i> dan SwissADME.....	29
<b>Gambar 2.8.</b> Kaitan Neuron dan Neuroglia .....	30
<b>Gambar 2.9.</b> Sel <i>Microglia</i> HMC 3 diamati dengan <i>Inverted Microscope</i> .....	33
<b>Gambar 2.10.</b> Perbandingan SEM dan CLSM.....	38
<b>Gambar 2.11.</b> Diagram CLSM.....	38
<b>Gambar 3.1.</b> Skema Kerangka Konseptual.....	39
<b>Gambar 4.1.</b> Protein <i>X Ray</i> dengan <i>ligand</i> 17 $\beta$ dengan ID 3OLS .....	52
<b>Gambar 4.2.</b> Skema Penelitian.....	56
<b>Gambar 5.1.</b> Ekstrak Peekat Etanol 96% daun <i>M. crenata</i> .....	60
<b>Gambar 5.2.</b> Protein <i>X Ray</i> dengan <i>ligand</i> 17 $\beta$ dengan ID 3OLS .....	61
<b>Gambar 5.3.</b> Optimasi Geometri Senyawa Uji Penambatan.....	63
<b>Gambar 5.4.</b> Analisis Gugus Farmakofor .....	68
<b>Gambar 5.5.</b> <i>Boiled egg</i> .....	69
<b>Gambar 5.6.</b> Sel line HMC3 mencapai <i>confluence</i> 80-90% .....	70
<b>Gambar 5.7.</b> Pengamatan CLSM .....	73
<b>Gambar 5.9.</b> Penghambatan Aktivitas NF $\kappa$ B.....	83

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 5.1</b> Jumlah Daun <i>M. crenata</i> .....	56
<b>Tabel 5.2</b> Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering <i>M. crenata</i> .....	57
<b>Tabel 5.3</b> Hasil Ekstraksi Daun <i>M. crenata</i> .....	60
<b>Tabel 5.4</b> Senyawa Kandidat Agen Antineuroinflamasi .....	64
<b>Tabel 5.5</b> Hasil Validasi Internal Autodock Vina .....	66
<b>Tabel 5.6</b> Senyawa Inklusi Sebagai Senyawa Fitoestrogen dan Antineuroinflamasi.....	66
<b>Tabel 5.7</b> Intensitas MHC II Dosis Perlakuan Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M. crenata</i> .....	74
<b>Tabel 5.8</b> Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> .....	75
<b>Tabel 5.9</b> Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's Test</i> .....	75
<b>Tabel 5.10</b> Uji Korelasi <i>Spearman Rho</i> .....	76
<b>Tabel 5.11</b> Hasil Uji Beda <i>Kruskal Wallis Test</i> .....	77
<b>Tabel 5.12</b> Hasil Uji <i>Chi-Square</i> .....	78
<b>Tabel 5.13.</b> Hasil Nilai Probabilitas Uji <i>Chi-Square</i> .....	78
<b>Tabel 5.14</b> Hasil Uji <i>Least Significant Difference (LSD)</i> .....	79

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran 1</b> Data Determinasi Tanaman <i>M. crenata</i> .....	100
<b>Lampiran 2</b> Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Serbuk Simplisia Daun <i>M. crenata</i> ...	101
<b>Lampiran 3</b> Hasil Penambatan Molekular .....	104
<b>Lampiran 4</b> Hasil Perlakuan Uji Aktivitas metode ICC .....	105
<b>Lampiran 5</b> Perhitungan dan Preparasi Sampel .....	108
<b>Lampiran 6</b> Hasil Analisa Data SPSS .....	110
<b>Lampiran 7</b> Dokumentasi Alat dan Penelitian .....	113



## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gamma
$\kappa$	: Kappa
Å	: Angstrom
cm	: Centimeter
°C	: derajat celsius
kHz	: kilo herzt
UAE	: <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>
ER- $\beta$	: Estrogen Receptor beta
E1	: Estron
E2	: Estradiol
E3	: Estriol
..%	: Persen
TNF $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor</i> alfa
Il-1 $\beta$	: Interleukin 1 beta
Il-6	: Interleukin 6
PDB	: <i>Protein Data Bank</i>
TPSA	: <i>Topological Polar Surface Area</i>
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
RMSD	: <i>Root Mean Square Deviation</i>
LSIH	: Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
UPLC QToF:	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight</i>
MHC II	: <i>Major Histocompatibility Complex II</i>
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>



TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
HMC3	: <i>Human Microglial Clone 3</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon gamma</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
CLSM	: <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
ED <sub>50</sub>	: <i>Effective Dose 50</i>
EMEM	: <i>Eagles Modified Essential Medium</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyde</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumine</i>
ng	: nanogram
mg	: miligram
$\mu$ g	: mikrogram
$\mu$ L	: mikrogram
mL	: mililiter



## ABSTRAK

Mirza, Denis Mery. 2019. **Studi In Silico Dan In Vitro Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* C Presl.** *Skripsi*. Jurusan Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing (I) Burhan Ma'arif ZA, M. Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Penguji : Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.

*Marsilea crenata* C Presl merupakan sumber senyawa fitoestrogen serta diduga dapat menghambat proses neurodegeneratif. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antineuroinflamasi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* secara *in silico* dan *in vitro*. Senyawa hasil *metabolite profiling* UPLC QToF MS/MS ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dilakukan skrining menggunakan SwissADME dengan parameter TPSA dan BBB *permeant*. Senyawa inklusi dilakukan penambatan molekuler terhadap protein 3OLS menggunakan Autodock Vina. Sel mikroglia HMC3 diinduksi dengan IFN  $\gamma$  sebagai model neuroinflamasi selama 48 jam dan kemudian dibagi kedalam kelompok kontrol positif, kontrol negatif serta kelompok sel yang diberikan perlakuan dosis 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm ekstrak etanol 96% *M. crenata* dan kemudian diamati menggunakan metode ICC dengan bantuan CLSM. Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* mengandung fitoestrogen dengan adanya 3 senyawa yang berinteraksi agonis  $17\beta$  estradiol terhadap 3OLS diantaranya *Prochlorperazine*; *1-methyl -2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl] benzimidazol- 5-amine*; *11-Aminododecanoic acid* serta hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok 250 ppm perlakuan dosis terhadap kontrol negatif dengan nilai  $p < 0,05$  dengan  $ED_{50}$  3,795 ppm. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki senyawa fitoestrogenik sebagai agen antineuroinflamasi yang dapat mengurangi ekspresi MHC II sel mikroglia HMC3 dengan menggunakan dosis 250 ppm

**Kata Kunci:** *M. crenata*, Fitoestrogen, Antineuroinflamasi, Penambatan Molekuler, MHC II, HMC3

## ABSTRACT

Mirza, Denis Mery. 2019. **In Silico and In Vitro Studies of Antineuroinflammation Activity of 96% Ethanol Extract Marsilea crenata C Presl Leaves**. Essay. Department of Pharmacy. Faculty of Medicine and Health Sciences. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Advisor (I) Burhan Ma'arif ZA, M. Farm., Apt. (II) drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. Examiner: Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt.

Marsilea crenata C Presl is a source of phytoestrogen compounds and predict to inhibit neurodegenerative processes. The purpose of this study was to determine the antineuroinflammation activity of 96% ethanol extract M. crenata leaves in silico and in vitro. Metabolite profiling compounds of 96% ethanol extract of M. crenata leaves from UPLC QToF MS / MS were screened using SwissADME with TPSA and BBB permeant parameters. Inclusion compounds were carried out molecular docking of 3OLS proteins using Autodock Vina. HMC3 microglia cells were induced with IFN  $\gamma$  as a neuroinflammatory model for 48 hours and then divided into positive control groups, negative controls and cell groups given a dose of 62.5 ppm; 125 ppm; 250 ppm 96% ethanol extract M. crenata and then observed using the ICC method with CLSM. 96% ethanol extract of M. crenata leaves containing phytoestrogens in the presence of 3 compounds that interact  $17\beta$  estradiol agonists against 3OLS including Prochlorperazine; 1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl] benzimidazol-5-amine; 11-Aminododecanoic acid and LSD test results showed that there was a significant difference in the 250 ppm group in the treatment of doses against negative controls with a value of  $p < 0.05$  with  $ED_{50}$  value 3.795 ppm. The results showed 96% ethanol extract of M. crenata leaves had phytoestrogenic compounds as antineuroinflammation agents that can reduce the expression of MHC II HMC3 microglia cells using a dose of 250 ppm

**Keywords:** M. crenata, Phytoestrogens, Antineuroinflammation, Molecular docking, MHC II, HMC3

### مستخلص البحث

ميرزا ، دينيس ميري. 2019. في سيليكو وفي الدراسات المختبرية النشاط المضاد للالتهاب 96٪ استخراج الإيثانول **Marsilea crenata C Presl** أوراق اشجار البحث الجامعي، قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: عارف سورباديناتا. . المخبر: الدكتور. روهاتال مطيع

Marsilea crenata C Presl هو مصدر مركبات الاستروجين النباتي وتوقع أن تمنع neurodegeneratif العمليات كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد نشاط مضاد للالتهاب العصبي من 96٪ استخراج الإيثانول M. crenata أوراق اشجار سيليكو وفي الدراسات، المستقلب التنميط مركبات 96٪ استخراج الإيثانول M. crenata أوراق اشجار من عند UPLC QToF MS / MS تم فحصها باستخدام SwissADME مع TPSA و BBB permeant و TPCSA المعلومات نفذت مركبات التضمين molecular docking 3OLS استخدام البروتينات Autodock Vina , HMC3 كانت مستحقة مع IFN  $\gamma$  كنموذج للالتهاب العصبي لمدة 48 ساعة ثم تنقسم إلى مجموعات المراقبة الإيجابية ، والضوابط السلبية ومجموعات الخلايا تعطي جرعة من 62.5 فقم، 125 فقم و 250 فقم 96٪ استخراج الإيثانول M. crenata ثم لوحظ باستخدام ICC مع CLSM 96٪ استخراج الإيثانول M. crenata أوراق اشجار تحتوي على فيتويستروغنز في وجود 3 مركبات تتفاعل منبهات استرايول  $17\beta$  ضد OLS3 بما في ذلك 1-methyl-2-Prochlorperazine; 11-Aminododecanoic acid - [(4-methylpiperazin-1-yl) methyl] benzimidaol-5-amine; p < 0.05 أظهرت نتائج اختبار LSD أن هناك فرق كبير في المجموعة 250 فقم في معالجة الجرعات مقابل عناصر التحكم السلبية بقيمة p < 0.05 بقيمة ED50: 3.795 فقم وأظهرت النتائج 96٪ استخراج الإيثانول M. crenata كانت الأوراق تحتوي على مركبات استروجينية نباتية كعوامل مضادة للالتهاب العصبي التي يمكن أن تقلل من التعبير عن الخلايا الدبقية الصغيرة HMC3 MHC II باستخدام جرعة من 250 جزء في المليون

الكلمات المفتاحية: M. crenata ، فيتويستروغنز ، التهاب مضادات الالتهاب ، الالتحام الجزيئي ، MHC II ، HMC3

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Wanita mengalami penuaan seiring dengan berjalannya waktu dan akan disertai dengan terjadinya fenomena *postmenopause* yang ditandai dengan terjadinya defisiensi estrogen. Defisiensi estrogen dapat diartikan sebagai keadaan terjadinya penurunan aktivitas hormon estrogen yang dapat diamati dengan deaktivasi estradiol menjadi estron dan estriol serta terjadinya sulfasi menjadi senyawa yang memiliki daya ikat lebih rendah dengan reseptor estrogen (Cui *et al.*, 2013). Selain itu menurut Ji dan Yu (2015), selama keadaan defisiensi estrogen berlangsung terjadi penurunan produksi dari hormon estrogen yang memiliki dampak merugikan karena dalam proses fisiologis, hormon estrogen berperan dalam menjaga homeostatis tubuh (Villa *et al.*, 2016). Peranan penting yang diberikan oleh estrogen pada wanita untuk melakukan regulasi maupun sirkulasi memiliki dampak yang merugikan salah satunya adalah ketidakstabilan homeostatis sistem saraf pusat yang mengakibatkan terjadinya Neurodegeneratif (Rettberg *et al.*, 2013; Varshney dan Nalvarte, 2017).

Neurodegeneratif dapat diterjemahkan menjadi keadaan patologis yang dialami oleh seseorang secara progresif ditandai dengan hilangnya kemampuan kognitif dan memori karena hilangnya kemampuan fisiologis sel pada sistem saraf (Kovac, 2014). Keadaan ini diprediksi akan mengalami peningkatan dari tahun ke tahun dimana pada tahun 2030, akan terjadi kenaikan hingga 74,7 juta penderita mengalami neurodegeneratif dengan sindrom yang beragam dan pada 2050

diprediksi akan terjadi peningkatan hingga meningkat hampir 2 kali lipat serta diprediksi akan didominasi oleh wanita (Prince *et al.*, 2015). Dominasi penderita oleh wanita dalam penjelasan sebelumnya memiliki alasan kuat seperti meningkatnya usia harapan hidup wanita. Namun keadaan ini tidak diimbangi dengan keadaan defisiensi estrogen yang meningkat dan pada akhirnya menimbulkan kerugian dimana wanita akan menghabiskan sisa hidupnya dalam keadaan neurodegeneratif. Neurodegeneratif secara detail dan mendalam dapat terjadi karena munculnya neuroinflamasi pada sistem saraf pusat (Chamniansawat dan Chongtamakun, 2015).

Neuroinflamasi dapat terjadi secara fisiologis untuk menjaga regulasi dari sel pada sistem saraf pusat serta dapat terjadi secara patologis karena terjadinya ketidakseimbangan aktivitas sel dalam sistem saraf tersebut. Namun kejadian tersebut secara spesifik dapat muncul karena terjadinya kenaikan mikroglia teraktivasi sehingga meningkatkan ekspresi *marker* spesifik seperti *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) (Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015; Matt dan Johnson, 2016). Kejadian ini kemudian memicu munculnya mediator peradangan seperti *Interleukin 1 $\beta$* , *Interleukin 6*, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  maupun mediator peradangan lainnya (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Terapi untuk mengatasi terjadinya neuroinflamasi yang paling umum dan sering digunakan oleh banyak kalangan karena dianggap memiliki efektifitas yang tinggi adalah terapi sulih hormon (Yang *et al.*, 2012). Terapi sulih hormon ini secara simultan mengganti estrogen yang tidak diproduksi dalam tubuh penderita. Penggunaannya yang dianggap efektif ini dikemudian hari malah memunculkan permasalahan baru ketika digunakan dalam jangka waktu yang lama. Salah satu

efek merugikan yang dapat muncul karena terapi ini adalah terjadinya peningkatan kanker endometrium, kanker payudara, emboli bahkan stroke yang berujung pada kematian (Lee *et al.*, 2013; Jantaratnotai *et al.*, 2013). Penggunaan terapi ini akhirnya menjadi perdebatan hingga sekarang sehingga perlunya dilakukan penggantian terapi yang dinilai lebih aman dengan efikasi yang hampir sama (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Terapi yang diajukan dapat menjadi pengganti dari terapi sulih hormon adalah penggunaan senyawa fitoestrogen yang terdapat dalam senyawa tumbuhan (Alldredge *et al.*, 2013). Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur senyawa bahkan aktivitas yang menyerupai dengan estrogen maupun estradiol yang ditemukan dalam mamalia (Sirotkin dan Harrath, 2014). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, *black cohosh*, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al.*, 2013). Penggalan informasi tentang pemanfaatan tanaman sebagai sumber fitoestrogen ini sesuai dengan Q.S. Asy Syura ayat 7

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

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

Ayat diatas yang lebih menekankan dalam kalimah *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* dimana memiliki arti tumbuh tumbuhan yang baik. Kalimat tersebut menjelaskan bahwa salah satu tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang dapat memberikan manfaat dalam kehidupan manusia dimana salah satunya adalah tumbuhan berkhasiat obat. Penjelasan tafsir untuk penggalan ayat diatas ditambah pada tafsir as Showi dimana ditemukan kalimah *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* yang mengindikasikan Allah menciptakan

berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat sehingga mendatangkan suatu kebaikan (Lajnah, 2009). Selain itu penggalian manfaat tumbuhan sebagai sumber fitoestrogen ini juga bersesuaian dengan hadits Rasulullah SAW

"Berobatlah kamu, karena sesungguhnya Dzat yang membuat penyakit, Dia pula yang membuat obatnya." (Riwayat Ahmad). (Qardhawi, 2008).

Berdasarkan hadits tersebut sebagai praktisi kesehatan perlu melakukan kajian kajian tentang pengobatan dengan memanfaatkan berbagai nikmat yang telah diberikan oleh Allah SWT baik berupa alam sekitar maupun kecerdasan akal. Hadits tersebut membahas bahwa obat bukan muncul dari "langit" namun kita sebagai perantara harus memaksimalkan apa yang telah dimiliki untuk mengembangkan pengetahuan sehingga didapatkan obat untuk suatu penyakit.

Aktifitas fitoestrogen sendiri didalam otak memiliki beberapa manfaat setelah digunakan dalam jangka waktu tertentu seperti meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel sel otak maupun menghambat pembentukan NF- $\kappa$ B dengan cara menghambat aktifitas *Toll Like Receptors* (TLR) 4 dengan reaksi fosforilasi pada protein p38. Aktifitas untuk menghambat aktifitas TLR ini yang kemudian menjadi dasar awal fitoestrogen dapat bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Salah satu tanaman yang perlu dikembangkan menjadi sumber fitoestrogen yang potensial adalah semanggi (*M. crenata* C Presl.).

*M. crenata* merupakan tumbuhan yang dapat dikembangkan dengan baik dan telah dimanfaatkan sebagai makanan khas tradisional di daerah Surabaya (Rindawati, 2015). Tumbuhan ini perlu dikembangkan karena budidaya yang mudah dan telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan masyarakat namun



mulai langka ditemukan. Hal ini terjadi akibat banyaknya lahan yang telah berubah fungsi maupun banyaknya masyarakat yang mulai beralih ke makanan yang lebih modern (Akbar *et al.*, 2014)

*M. crenata* berpotensi sebagai tumbuhan sumber fitoestrogen berdasarkan penelitian yang dilakukan untuk mencegah terjadinya osteoporosis, karena dalam ekstrak daun yang dilakukan pemeriksaan menggunakan *Radio Immuno Assay* (RIA) didapatkan senyawa estradiol yang tinggi. Selain itu setelah dilakukan penapisan fitokimia dan *metabolit profiling* ekstrak daun semanggi didapatkan senyawa senyawa terpenoid yang dapat menjadi senyawa pencegah terjadi osteoporosis *postmenopause* (Laswati, 2011 ; Ma'arif *et al.*, 2016). Senyawa terpenoid ini cukup berperan juga dalam upaya sebagai senyawa antineuroinflamasi karena menghambat pembentukan mikroglia teraktivasi (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Berdasarkan penjelasan tersebut perlunya dilakukan pengujian secara *in silico* dan *in vitro* untuk mengetahui senyawa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang dapat berinteraksi agonis dengan ER- $\beta$  serta mengetahui aktivitasnya dalam menghambat ekspresi *marker* MHC II pada saat terjadi neuroinflamasi. Pelarut Etanol 96% lebih dipilih karena merupakan pelarut universal yang bersifat non toksik. Pengamatan *in silico* terfokus terhadap interaksi agonis senyawa uji dengan protein 3OLS. Protein ini merupakan salah satu protein reseptor ER- $\beta$  dan menjadi pengamatan karena reseptor ini paling berperan dalam regulasi homeostasis sel saraf (Villa *et al.*, 2016; Muchtaridi *et al.*, 2018). Pendekatan *in silico* perlu dipertegas dengan pengujian secara *in vitro* menggunakan sel mikroglia HMC 3 untuk memvisualisasikan hasil prediksi *in silico*. Fokus pengamatan *in vitro* adalah munculnya ekspresi MHC II karena *marker* tersebut merupakan salah satu *marker*

yang dapat diamati dan merupakan penanda terjadinya neuroinflamasi karena kenaikan jumlah mikroglia teraktivasi (Paracha *et al.*, 2015; Matt and Johnson, 2016; Chamniansawat and Chongtammakun, 2015). Penggambaran terjadinya neuroinflamasi tersebut dilakukan dengan melakukan pemberian IFN  $\gamma$  pada HMC 3 karena induktor ini dapat memberikan gambaran terjadinya neuroinflamasi pada kejadian neurodegeneratif pada wanita *postmenopause*. Marker MHC II diamati dengan menggunakan metode ICC dibantu dengan CLSM (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016). Penelitian ini memiliki harapan agar menjadi langkah awal pengembangan sediaan neuroprotektor serta dapat memberikan motivasi kepada pembaca dan praktisi kesehatan untuk mendalami potensi *M. crenata* sebagai sumber fitoestrogen dan neuroprotektor.

### 1.2. Rumusan Masalah

- 1) Apakah terdapat senyawa fitoestrogen daun *M. crenata* yang berikatan agonis dengan protein 3OLS?
- 2) Apakah ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas menghambat ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC 3?
- 3) Berapa ED<sub>50</sub> ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas menghambat ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC 3?

### 1.3. Tujuan

- 1) Mengetahui senyawa fitoestrogen daun *M. crenata* yang berikatan agonis dengan protein 3OLS ketika diamati secara *in silico* sehingga dapat dikembangkan menjadi agen pengganti terapi sulih estrogen.

- 2) Mengetahui mekanisme ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang memiliki aktivitas menghambat ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC 3.
- 3) ED<sub>50</sub> ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas menghambat ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC 3.

#### 1.4. Manfaat

Manfaat yang ingin diperoleh setelah melakukan penelitian ini diantaranya adalah mengetahui senyawa fitoestrogen yang memiliki interaksi agonis dengan ER- $\beta$ , serta mengetahui mekanisme dan dosis terapi efektif ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* sebagai antineuroinflamasi pada sel Mikroglia HMC 3 yang selanjutnya dapat digunakan sebagai pengembangan sediaan dikemudian hari sebagai sediaan antineuroinflamasi.

#### 1.5. Batasan Masalah

1. Tanaman yang digunakan sebagai sampel adalah *M. crenata* yang didapatkan dari Benowo, Surabaya.
2. Sel yang digunakan adalah sel mikroglia HMC 3 yang didapatkan dari Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawajaya Malang.
3. Protein yang digunakan dalam simulasi berbasis komputer adalah Protein *XRay* dengan ID: 3OLS dari RCSB.
4. *Software* yang digunakan adalah *software virtual docker* seperti Biovia Discovery Studio 2016 *Visualizer*, ChemDraw 15 dan *Autodock Vina*.
5. Interaksi antara ligan dan reseptor yang diamati adalah interaksi agonis
6. Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak adalah Etanol 96%

7. Ekstraksi yang digunakan menggunakan metode UAE
8. *Marker* MHC II diamati dengan ICC dibantu CLSM untuk menentukan dosis efektif dari ekstrak.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Semanggi (*M. crenata* Presl.)

##### 2.1.1. Penyebaran dan Klasifikasi

Semanggi (*M. crenata*) merupakan salah satu jenis tumbuhan air yang sering ditemukan berada di lingkungan air tawar seperti tepian danau, sungai, kolam hingga daerah persawahan yang dapat diamati pada Gambar 2.1. *M. crenata* tumbuh dan tersebar di Asia Tenggara terutama pada daerah dengan ketinggian 900 meter di atas permukaan air laut dan umumnya tumbuh dengan merambat dengan tangkai mencapai 20 cm bahkan lebih dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm. Persebarannya yang cukup luas menyebabkan semanggi memiliki beberapa nama daerah diantaranya adalah calingcingan (Sunda), tapak itek (Malaysia), phak waen (Thailand), chutul phnom (Kamboja), pak vaen (Laos), upat upat (Filipina), dan green clover (Inggris) (Afriastini, 2003). *M. crenata* menurut Zhuang (2013) memiliki taksonomi yang dapat dijabarkan sebagai berikut.

Kingdome : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Pteridopsida

Ordo : Salviniales

Famili : Marsileaceae

Genus : Marsilea

Species : *Marsilea crenata* C Presl.



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

### 2.1.2 Kegunaan dan Manfaat

*M. crenata* sering dimanfaatkan oleh masyarakat luas untuk berbagai keperluan diantaranya seperti bagian daunnya dimanfaatkan sebagai sayuran yang dikonsumsi sehari-hari dan oleh masyarakat bagian daun serta batangnya dimanfaatkan sebagai obat peluruh air seni (Rindawati, 2015). Pemanfaatan daun *M. crenata* paling umum dan terkenal adalah dijadikan makanan khas daerah Surabaya berupa pecel semanggi yang kemudian dijajakan keliling dari satu kampung ke kampung yang lain (Akbar *et al.*, 2014). Pemanfaatan tersebut tidak berhenti dan mulai dikembangkan menjadi bahan yang memiliki khasiat pengobatan berdasarkan penelitian sebelumnya dimana ditemukan bahwa daun *M. crenata* merupakan sumber fitoestrogen yang dapat mencegah terjadinya osteoporosis karena kandungan asam palmitat pada ekstrak maupun fraksi n-Heksana daun *M. crenata* (Ma'arif *et al.*, 2016). Kandungan tersebut pada penelitian selanjutnya dapat meningkatkan proses formasi tulang pada *cell line osteoblast* MC3T3-E1 selama proses diferensiasi (Ma'arif *et al.*, 2018). Penelitian secara *in vivo* memperkuat khasiat *M. crenata* dalam upaya mencegah terjadinya osteoporosis dengan melakukan studi pendekatan aktivitas fraksi Etil Asetat menggunakan trabekular mencit. Hasilnya fraksi Etil Asetat dapat meningkatkan

kepadatan tulang terhadap trabekular femur maupun vertebrae menciit (Adityara, 2017; Widiyasari, 2017).

Manfaat yang beragam tersebut tidak lepas dengan kandungan yang berada dalam *M. crenata* seperti kandungan air yang tinggi sebesar 82,59%, karbohidrat 11,46 %, protein 1,91%, lemak 0,36%, serat kasar 1,96%, dan abu 1,72%. Kandungan tersebut kemudian dipertegas dengan penelitian berikutnya menggunakan ekstrak kasar *M. crenata* dan ditemukan 6 komponen bioaktif seperti karbohidrat, gula pereduksi, asam amino serta ditemukan metabolit sekunder seperti steroid, alkaloid serta flavonoid (Nurjanah *et al.*, 2012; Agil *et al.*, 2017). Penelitian berikutnya menunjukkan bahwa dalam daun *M. crenata* mengandung senyawa yang bersifat volatil dengan analisa GC-MS seperti diterpenoid, monoterpenoid serta beberapa kelompok asam amino yang memiliki aktivitas sebagai bahan berkhasiat obat. Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas tersebut adalah asam palmitat (Ma'arif *et al.*, 2016; Ma'arif *et al.*, 2018). Penelitian tersebut kemudian dikembangkan dengan melakukan penelitian isolasi fraksi n-heksana daun *M. crenata* yang dilanjutkan dengan identifikasi senyawa menggunakan FT-IR serta H-NMR dimana hasilnya terdapat senyawa dengan gugus fungsional C=O, O-H serta C-H (Sari, 2017).

## 2.2. Tinjauan Metode Ekstraksi

### 2.2.1. Definisi Ekstraksi

Ekstraksi memiliki pengertian kegiatan untuk melakukan penarikan kandungan kimia berupa senyawa aktif dari simplisia tertentu dengan pelarut tertentu, kemudian senyawa tersebut dapat larut dan terpisah dari bahan yang tidak

larut dengan pelarut tersebut. Senyawa aktif yang dapat ditarik dari simplisia tersebut, dapat digolongkan menjadi beberapa kategori diantaranya adalah minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lainnya. Manfaat diketahui senyawa aktif yang dikandung dalam suatu simplisia dapat mempermudah dalam pemilihan pelarut maupun metode ekstraksi yang digunakan (Dirjen POM RI, 2000).

Ekstraksi menjadi tahapan penting dan cukup berpengaruh dalam upaya pengembangan obat alam karena digunakan untuk memisahkan senyawa aktif target dari campuran dengan pelarut maupun dalam kondisi sistem yang bersesuaian (Anwar, 1994). Kegiatan ini secara sederhana, menggunakan prinsip *like dissolve like* dimana senyawa non polar akan larut dengan baik pada pelarut atau fase non polar dan begitu juga sebaliknya pada fase polar. Pelarut yang sering dan umum digunakan diantaranya adalah Petroleum Eter, n-Heksana, Etil Asetat, n-Butanol, Etanol, Metanol hingga Air (Ketaren, 1988; Bernasconi, 1995; Ma'arif, 2012).

### 2.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi

Metode ekstraksi pada penjelasan sebelumnya menjelaskan menjadi tahapan yang penting dalam upaya mendapatkan senyawa target secara maksimal (Anwar, 1994). Pemilihan metode yang tepat menjadi faktor kunci dididapatkannya senyawa target karena senyawa target dari bahan alam memiliki struktur maupun sifat fisikokimia yang beragam. Hasil yang didapatkan dari pemilihan metode yang tepat adalah senyawa target yang stabil dan tidak rusak setelah melalui tahapan ekstraksi (Ma'arif, 2012). Metode ekstraksi dari zaman ke zaman telah banyak diperkenalkan dan dikembangkan menjadi metode yang lebih baik serta sempurna. Namun secara garis besar metode ekstraksi tersebut terbagi berdasarkan ada tidaknya pemanasan



selama proses ekstraksi berlangsung (Handa, 2007). Berikut merupakan metode ekstraksi yang sering digunakan untuk memperoleh senyawa target tersebut

### **2.2.2.1. Metode Dingin**

#### **1. Maserasi**

Maserasi merupakan metode paling sederhana dan sering digunakan untuk melakukan ekstraksi senyawa target dengan hanya menggunakan suhu ruang serta menggunakan prinsip sederhana yaitu metode pencapaian konsentrasi pada keadaan setimbang (Abdurahman dan Olalere, 2016). Kelebihan dari metode ini adalah dapat mengambil senyawa target yang memiliki sifat termolabil serta kelebihan lain yang ditawarkan oleh metode ini adalah senyawa yang ingin diambil dari suatu simplisia tidak akan mengalami perubahan struktur secara kimia (Abdurahman dan Olalere, 2016). Metode ini terbagi kembali berdasarkan prosesnya menjadi maserasi kinetik yang dilakukan pengadukan kontinyu (terus menerus) serta remaserasi yang memiliki pengertian dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Dirjen POM, 2000).

#### **2. Perkolasi**

Perkolasi merupakan metode ekstraksi yang mirip dengan maserasi namun terdapat perbedaan dalam penggunaan alat bernama perkolator dan metode ini sering digunakan untuk menghasilkan ekstrak cair maupun *tinctura* (Banu dan Catherine, 2015). Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru namun memiliki kerugian dimana jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu kerugian

metode ini membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Dirjen POM, 2000; Mukhriani, 2014).

#### **2.2.2.2. Metode Panas**

##### **1. Soxhletasi**

Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Dirjen POM, 2000). Soxhletasi dalam prosesnya memanfaatkan bantuan energi panas dan umumnya digunakan apabila simplisia yang akan diekstraksi sangat sulit larut dalam pelarutnya maupun memiliki kemurnian yang sangat kecil dalam pelarut (Banu dan Catherine, 2015).

##### **2. Refluks**

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Dirjen POM, 2000).

##### **3. Digesti**

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C (Dirjen POM, 2000). Alasan penggunaan pemanasan diatas suhu kamar ini menurut Banu dan Catherine (2015), adalah menggunakan pemanasan tersebut menyebabkan penggunaan pelarut semakin efisien.

#### 4. Infus

Metode ini dalam praktiknya hanya dilakukan dengan merendam simplisia rajangan atau serbuk yang dimaserasi menggunakan air panas (Banu dan Catherine, 2015). Suhu yang digunakan secara terukur pada 96-98°C selama waktu tertentu (15 - 20 menit ) (Dirjen POM, 2000).

#### 5. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (~30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Dirjen POM, 2000). Metode ini umumnya digunakan untuk senyawa yang larut air dan memiliki sifat termostabil (Banu dan Catherine, 2015).

#### 6. Distilasi

Metode ini sering digunakan untuk mengekstrak minyak esensial yang terdapat dalam tanaman dan berdasarkan media yang digunakan untuk mengekstrak terbagi menjadi 2 yaitu Hidrodistilasi dan Distilasi uap

##### A. Hidrodistilasi

Metode hidrodistilasi merupakan salah satu metode konvensional yang digunakan untuk mengisolasi senyawa terutama minyak esensial yang menurut Rassem *et al.* (2016) metode ini berdasarkan alat yang digunakan selama proses terbagi menjadi 3 tipe diantaranya

1. Pencelupan
2. Penambahan Uap
3. Pencelupan yang dikombinasi dengan penambahan uap

Keunggulan dari metode ini adalah metode paling sederhana untuk mengisolasi senyawa minyak esensial dibandingkan dengan Superkritis, *Microwave* maupun Sonikasi. Namun kerugian dari metode ini adalah dihasilkan variasi hasil ekstraksi

karena panas yang dihasilkan pada umumnya tidak terkontrol (Abdurahman dan Olalere, 2016).

## **B. Distilasi Uap**

Distilasi uap merupakan metode ekstraksi yang telah lama dikenal dan digunakan untuk mengambil minyak esensial organik dari suatu tanaman (Rassem *et al.*, 2016). Metode ini sedikit berbeda dengan hidrodistilasi dimana simplisia tidak mengalami perendaman namun simplisia diberikan uap dari wadah lain yang dialirkan. Uap yang masuk ini berfungsi untuk membawa minyak esensial dalam simplisia melalui pori pori namun dalam wadah simplisia tersebut tetap dipanaskan sedemikian rupa agar minyak esensial yang telah keluar akan mengalami penguapan, mengalami kondensasi kemudian ditampung (Rassem *et al.*, 2016).

### **2.2.2.3 Metode Lain**

#### **1. Superkritisal Karbondioksida**

Penggunaan prinsip superkritis untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbon dioksida. Variabel tekanan dan temperatur akan memunculkan spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbon dioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Dirjen POM, 2000). Alasan pemilihan karbon dioksida dalam metode ini adalah karena karbon dioksida tidak toksik, tidak mudah terbakar, aman, serta keunggulannya adalah harga yang relatif murah pada bahan yang digunakan (Rassem *et al.*, 2016).

## **2. Microwave Assisted Extraction (MAE)**

Metode ini merupakan salah satu metode baru yang digunakan dengan memanfaatkan gelombang mikro sehingga muncul dua fenomena yang menguntungkan proses ekstraksi yaitu fenomena rotasi dipol dan konduksi ionik. Keunggulan dari metode ini adalah waktu yang relatif pendek, pelarut yang kecil dan menghasilkan ekstrak dengan kemurnian serta rasio hasil tinggi (Abdurahman dan Olalere, 2016).

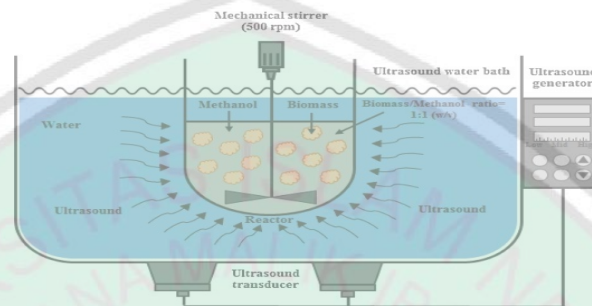
## **3. Pulse Electric Field Extraction (PEFE)**

Metode ini merupakan pengembangan dari penelitian tentang sifat kelistrikan pada membran sel maupun bahan yang akan diekstraksi. Mekanisme sederhana dari metode ini adalah pemberian medan listrik pada membran yang akan mengubah muatan membran sehingga terjadi elektroporasi atau elektropermeabilitas (Lebovka *et al.*, 2012; Azmir *et al.*, 2013). Parameter penting yang perlu diperhatikan saat menggunakan metode ini adalah energi listrik yang digunakan, kekuatan medan listrik yang muncul serta keadaan suhu lingkungan sekitar meskipun energi panas yang timbul selama proses tidak menjadi parameter yang dapat mempengaruhi secara bermakna (Azmir *et al.*, 2013).

## **4. Ultrasound Assisted Extraction (UAE)**

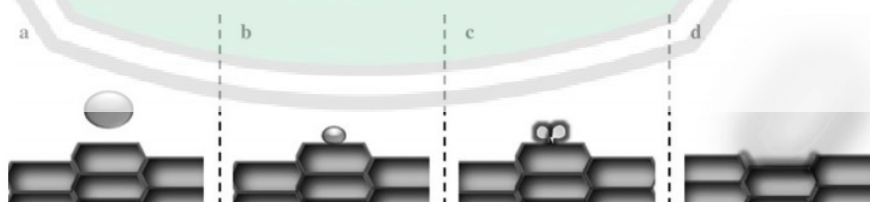
Metode ekstraksi ini memanfaatkan gelombang ultrasonik yang memiliki rentang 20 – 20.000 kHz dengan prinsip kerja meningkatkan permeabilitas dinding sel menggunakan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga timbul fraksi interfase (Ma'arif, 2012; Banu dan Catherine, 2015; Medina-Torres *et al.*, 2017). Metode ekstraksi ini dalam praktiknya diawali dengan maserasi yang telah dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (alat yang memberikan

sinyal dengan frekuensi tinggi/ 20 kHz) dengan kata lain wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic bath* dan skema dari UAE dapat diamati pada gambar 2.2 (Mukhriani, 2014). Parameter penting yang perlu diperhatikan ketika menggunakan metode ini adalah ukuran partikel bahan, *moisture content* dan pelarut yang digunakan (Ngaha Njila *et al.*, 2017).



**Gambar 2.2.** Skema *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

Metode Ultrasonik dimulai dengan terjadinya perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan daya kavitasasi sebagai stres dinamik. Proses selanjutnya adalah munculnya gaya gunting yang cukup tinggi sehingga timbul gelembung yang dapat memperlebar pori permukaan dari bahan. Hasil akhir dari proses tersebut yang dikenal dengan istilah *microjets* yang ditandai dengan keluarnya senyawa secara deras menuju pelarut sehingga senyawa target dapat diambil serta dimanfaatkan. Mekanisme terjadinya metode ini secara sederhana dapat diamati pada gambar 2.3 berikut



**Gambar 2.3.** Proses mekanisme ekstraksi UAE

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

(Esclapez *et al.*, 2011)

Keunggulan metode ini adalah tergolong ekstraksi yang selektif, efisien dalam waktu pengerjaan dan mampu mencegah degradasi karena panas (Azmir *et al.*, 2013). Hal ini cukup beralasan terutama karena selama proses berlangsung, terjadi pengadukan bahan maupun transfer energi yang cukup efektif (Ngaha Njila *et al.*, 2017). Kerugian dari metode ini adalah segi efisiensi biaya yang masih tergolong tinggi dan pada beberapa kasus dapat merubah struktur senyawa aktif dari bahan (Banu dan Catherine, 2015).

### 2.3. Tinjauan Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur senyawa bahkan aktivitas yang menyerupai dengan estrogen maupun estradiol yang ditemukan dalam mamalia (Sirotkin dan Harrath, 2014). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semangi, *black cohosh*, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al.*, 2013). Aktifitas fitoestrogen sendiri didalam otak memiliki beberapa manfaat setelah digunakan dalam jangka waktu tertentu seperti meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel otak maupun menghambat pembentukan NF- $\kappa$ B dengan cara menghambat aktifitas *Toll Like Receptors* (TLR) 4 dengan reaksi fosforilasi pada protein p38. Aktifitas untuk menghambat aktifitas TLR ini yang kemudian menjadi dasar awal fitoestrogen dapat bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Fitoestrogen dipercaya dapat mengurangi efek samping penggunaan terapi sulih hormon dengan memberikan tingkat keamanan yang lebih baik namun dengan aktifitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015).

## 2.4. Tinjauan Estrogen

Estrogen merupakan salah satu hormon steroid yang paling tinggi kadarnya dalam tubuh seorang wanita karena diproduksi pada ovarium serta kelenjar adrenal dan memiliki tiga bentukan diantaranya adalah Estron (E1), Estradiol (E2) dan Estriol (E3). Ketiganya bersinergi menjaga homeostatis tubuh seorang wanita, namun Estradiol merupakan bentukan paling aktif dan memiliki peranan penting dalam sirkulasi maupun regulasi organ seperti otak karena kemampuannya menembus sawar otak maupun organ lain seperti tulang, kardiovaskular, kulit hingga sistem imun (Rettberg *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2018). Namun seiring dengan pertambahan usia, produksi secara umum mengalami penurunan serta diperparah dengan ditemukannya bukti bahwa Estradiol yang memiliki aktivitas tertinggi mengalami deaktivasi menjadi bentukan Estron dan Estriol yang kurang aktif. Selain itu ditemukan bahwa Estradiol mengalami penurunan daya ikat dengan reseptor Estrogen karena mengalami reaksi sulfasi dimana terjadi perubahan struktur menjadi  $17\beta$ -estra-1,3,5-trien-3,17-diol 3-sulfat (Cui *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2016).

Mekanisme pemberian efek hormon estrogen secara umum terbagi menjadi 4 diantaranya adalah

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

Jalur pertama menggambarkan estrogen dapat memberikan efek setelah estrogen menembus membran kemudian berikatan dengan Estrogen Receptor yang berada pada inti sel. Jalur ini memberikan efek secara langsung walaupun memberikan efek estrogen yang tergolong lebih lama. Proses mekanisme dari jalur ini diawali dengan masuknya Estrogen melewati membrane plasma yang kemudian



berikatan dengan ER $\alpha$  dan ER $\beta$  kemudian membentuk ER teraktivasi . Proses selanjutnya, ER teraktivasi akan memasuki 2 jalur proses yaitu secara klasik dan non klasik. Estrogen pada proses klasik akan berikatan dengan ERE yang akan melakukan transkripsi maupun ekspresi DNA sedangkan Estrogen pada proses non klasik, ER teraktivasi akan berikatan dengan faktor transkripsi lain untuk mensintesis protein tertentu (Cui *et al.*, 2013; Vrtacni *et al.*, 2014).

## 2. ER *dependent, membran initiated estrogen signaling*

Jalur ini memberikan gambaran ketika estrogen memberikan efek setelah berikatan dengan ER pada membran serta melibatkan *second messenger*. ER yang telah memberikan sinyal kepada *second messenger* akan memberikan efek diantaranya adalah

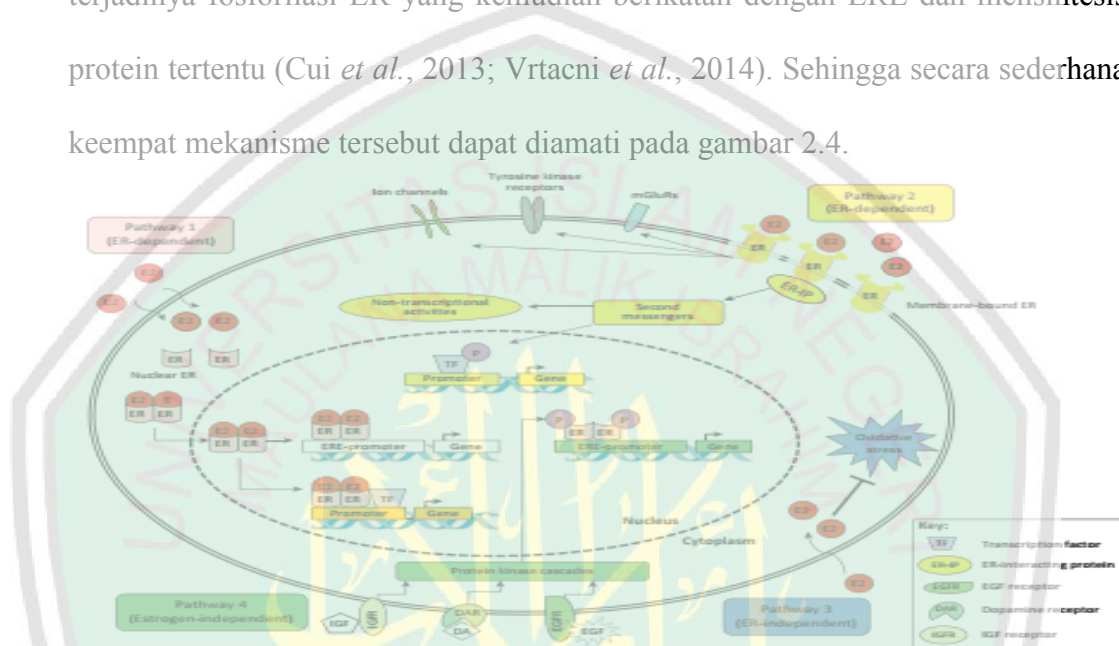
- a. Aktivasi faktor transkripsi dan berpindah ke nukleus kemudian berikatan dengan promoter DNA serta melakukan sintesis protein tertentu.
- b. Aktivasi reseptor membran yang mengakibatkan rangkaian mekanisme dan ekspresi protein.
- c. Aktivasi jalur mekanisme lain yang bersifat non transkripsional (Cui *et al.*, 2013; Vrtacni *et al.*, 2014).

## 3. ER *independent*

Jalur ini memberikan gambaran bahwa estrogen dapat memunculkan aktivitas tanpa berikatan dengan ER. Contoh yang dapat diamati terdapat pada aktivitas enzimatik untuk memunculkan efek antioksidan. Kondisi ini menyebabkan estrogen dapat mencegah terjadinya mekanisme apoptosis (Cui *et al.*, 2013; Vrtacni *et al.*, 2014).

#### 4. Ligand Independent Activation of ER

Jalur ini menjelaskan bahwa ER dapat diaktivasi melalui jalur *cascade* yang diaktivasi berbagai faktor seperti EGF maupun yang lain kemudian senyawa tersebut akan berikatan dengan reseptor masing masing dan diakhiri dengan terjadinya fosforilasi ER yang kemudian berikatan dengan ERE dan mensintesis protein tertentu (Cui *et al.*, 2013; Vrtacni *et al.*, 2014). Sehingga secara sederhana keempat mekanisme tersebut dapat diamati pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Mekanisme pemberian efek hormon estrogen (Cui *et al.*, 2013)

#### 2.5. Tinjauan *Estrogen Receptor Beta* (ER- $\beta$ )

Estrogen pada penjelasan sebelumnya memiliki peranan penting dalam sirkulasi maupun regulasi berbagai sistem organ yang terdapat dalam tubuh seorang wanita (Rettberg *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2018). Namun estrogen tersebut perlu berikatan dengan protein tertentu yang kemudian menghasilkan atau mengekspresikan suatu protein yang dapat mempengaruhi fungsi dari suatu sel bahkan organ. Protein yang dimaksud adalah reseptor estrogen yang akan berikatan dengan estrogen kemudian membentuk kompleks aktif dan mempengaruhi transkripsi gen dari suatu sel (Johan, 2016).

*Estrogen Receptor* pada tubuh manusia memiliki bentukan bergantung dari tempat ditemukannya seperti pada membran sel akan ditemukan reseptor GPR-30 dan reseptor X sedangkan pada nukleus sel akan ditemukan reseptor  $\alpha$  dan reseptor  $\beta$  (Villa et al., 2016). Reseptor yang cukup berperan dalam regulasi aktivitas neuron adalah ER- $\alpha$  dan ER- $\beta$  karena ekspresi dari keduanya dapat menjadi parameter awal terjadinya suatu patogenesis seperti Demensia maupun *Traumatic Brain Injury* (TBI) yang dapat diamati melalui penilaian *Mini Mental State Exam* (MMSE). Apabila ditinjau lebih lanjut, ER- $\beta$  pada aktivitas neuron lebih difokuskan untuk diamati karena ER- $\beta$  memiliki jumlah lebih banyak, lebih sensitif dalam berikatan dengan Estrogen dan akan mengalami penurunan seiring dengan terjadinya penambahan usia (Rettberg et al., 2013; Villa et al., 2016).

## 2.6. Tinjauan dan Aplikasi Penunjang Studi *In Silico*

### 2.6.1. Definisi Studi *In Silico*

Terminologi *in silico* berasal dari salah satu logam penyusun utama perangkat komputer yaitu *chip* atau otak komputer yang terbuat dari Silica (Si) (Noori dan Spanagel, 2013). Secara sederhana *in silico* dapat diterjemahkan sebagai metode untuk mengupayakan pendekatan kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau software tertentu (Suharna, 2012; Johan, 2016). Studi *in silico* pada umumnya lebih dipilih dibandingkan dengan metode lain seperti *in vivo* dan *in vitro* untuk membantu memprediksi serta memberikan hipotesis tentang aktivitas suatu senyawa atau ligan karena proses dari keduanya terkadang sulit menjelaskan secara sederhana terjadinya mekanisme ligan

dan target serta membutuhkan waktu yang lebih panjang dan biaya yang tidak murah (Hardjono, 2013; Noori dan Spanagel, 2013).

Keunggulan dari *in silico* tersebut dikembangkan dalam berbagai bidang ilmu yang berkenaan dengan penggunaan senyawa kimia seperti ilmu pertanian hingga biomedik khususnya farmasi dalam upaya menemukan obat baru. Penggunaan studi ini secara sederhana dalam upaya pengembangan obat diantaranya adalah mengurangi jumlah hewan coba yang dibutuhkan dalam percobaan, memvisualisasikan mekanisme obat terhadap targetnya serta optimasi bentuk senyawa dari obat tersebut (Noori dan Spanagel, 2013). Beberapa obat yang sangat bermanfaat hasil dari pengembangannya melalui tahapan *in silico* yang dijelaskan oleh Sliwoski *et al.* (2014) diantaranya adalah

- a. Dorzolamid sebagai *loop* diuretik
- b. Captopril sebagai obat antihipertensi
- c. Saquinavir dan Indinavir sebagai obat antiretroviral untuk mengatasi HIV

Jangkauan studi *in silico* menurut Suharna (2012) cukup luas diantaranya

1. *Molecular Docking*, pembelajaran komputasi ligan atau obat yang akan berikatan dengan protein target.
2. Bioinformatika, pendekatan target obat yang berasal dari data genom
3. Formasi Kimia, pendekatan antara aktivitas dan struktur kimia dari suatu bahan yang kemudian dikorelasikan menggunakan permodelan statistika.

Jangkauan atau rentang pengamatan *in silico* tidak berhenti dalam 3 kegiatan tersebut, bahkan lebih luas *in silico* menurut Noori dan Spanagel (2013) dapat melakukan beberapa kegiatan lain diantaranya adalah

1. Biofisika dan permodelan neurokimia yang sulit digambarkan dengan metode lain.
2. *Virtual Ligand Screening* untuk menentukan senyawa bermanfaat pada suatu campuran senyawa (Sliwoski *et al.*, 2014).
3. *Virtual Affinity Profiling* untuk memetakan senyawa dengan aktivitas paling stabil pada target (Sliwoski *et al.*, 2014).

Studi *In Silico* secara garis besar menurut Suharna (2012) berdasarkan pengenalan molekuler dan jenis algoritma yang digunakan *in silico* dapat dibagi menjadi 2 bentuk diantaranya adalah

1. *Structure based design*, permodelan yang menitik beratkan prinsip saling melengkapi antara ligan dan makromolekul layaknya gembok dan kunci. Permodelan ini berupaya untuk memberikan gambaran kalkulasi energi interaksi antara ligan pada target yang telah diketahui strukturnya. Penggunaan metode ini umumnya digunakan pada protein target dengan data cukup lengkap dan resolusi tinggi (Sliwoski *et al.*, 2014).
2. *Ligand based design*, permodelan dengan mengasumsikan bahwa ligan yang ditambahkan memiliki aktivitas yang mirip dengan senyawa yang telah dilakukan pengujian secara *in vivo* maupun *in vitro*. Permodelan ini juga dikenal dengan istilah homologi struktur ligan serta *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR) (Sliwoski *et al.*, 2014).

Prinsip dasar pendekatan metode *in silico* adalah melakukan penambatan ligan atau senyawa obat terhadap target berupa makromolekul untuk mendapatkan sifat fisika maupun kimia mulai dari paling optimal hingga terburuk (Waddod *et al.*, 2013). Penjelasan tersebut erat kaitannya dengan pemanfaatan berbagai aplikasi

yang dapat digunakan dalam satu waktu untuk mengurangi hasil kurang memuaskan (Shityakov *et al.*, 2013). Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan mengkorelasikan suatu struktur senyawa kimia bahan dengan Aturan 5 Lipinski (*Lipinski's Rule of Five*) terkait karakter senyawa yang perlu dikembangkan lebih lanjut karena memiliki potensi sebagai bahan berkhasiat dalam pengobatan (Muchtaridi *et al.*, 2018).

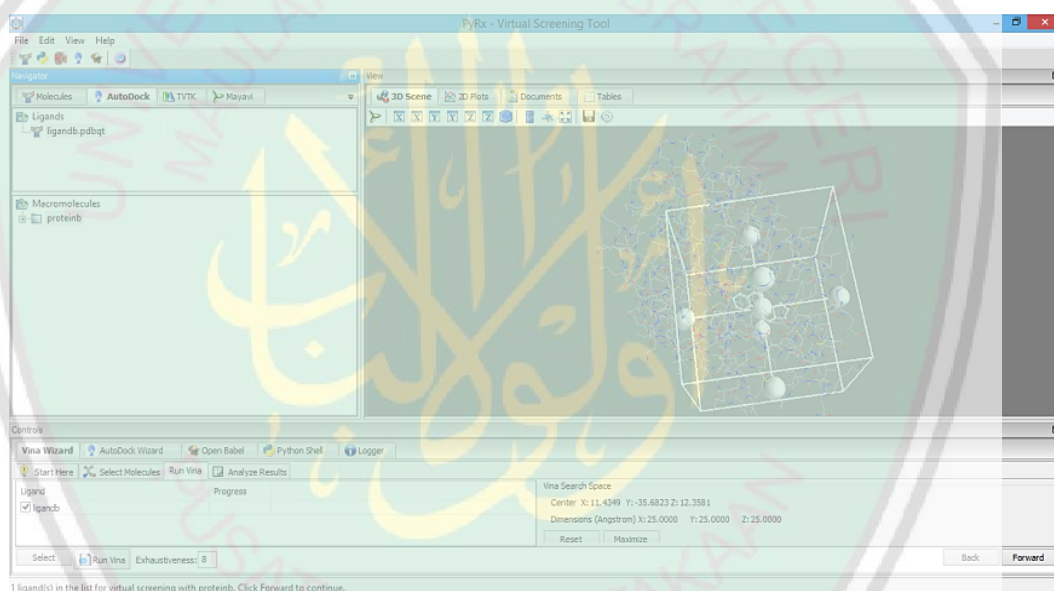
Penggunaan metode *in silico* pada bidang farmasi seperti penjelasan sebelumnya, hanya dapat memprediksi kemungkinan aktivitas yang dimunculkan oleh senyawa. Walaupun pendekatan ini dapat memberikan gambaran secara rinci senyawa tanpa melakukan pengujian *in vitro* dan *in vivo*, pendekatan *in silico* juga perlu dibuktikan dengan melakukan pengujian lain sebagai penguat bukti aktivitas dari senyawa (Noori dan Spanagel, 2013). Penggunaan studi *in silico* bersamaan dengan studi lain akan dapat lebih memperkuat hasil penelitian dimana studi *in silico* dapat menjadi metode penapisan senyawa yang tidak diperlukan dalam tahapan *in vitro* maupun *in vivo*. Hal ini akan lebih mengurangi terjadinya bias antara hasil *in silico* dengan metode lain yang bersifat prediksi (Sliwoski *et al.*, 2014).

## 2.6.2 Aplikasi Penunjang

### 2.6.2.1 Autodock Vina

Autodock Vina merupakan salah satu aplikasi yang memiliki peran dalam melakukan *molecular docking* dan *virtual screening* senyawa. Penggunaan Autodock Vina telah luas digunakan untuk berbagai keperluan dengan tujuan akhir melakukan prediksi konformasi ikatan maupun afinitas senyawa ligan dengan targetnya dalam hal ini reseptor (Muchtaridi *et al.*, 2018). Penjelasan sebelumnya

dapat memberikan gambaran bahwa Autodock Vina sangat bermanfaat di bidang farmasi dalam upaya pengembangan obat baru dengan visualisasi aktifitas senyawa terduga berkhasiat obat. Kemampuan yang dimiliki oleh Autodock Vina merupakan pengembangan dari Autodock sehingga dari penampilan maupun visualisasi senyawa memiliki kemiripan. Namun Autodock Vina sebagai aplikasi pengembangan memiliki keunggulan tersendiri yang terletak pada pemetaan struktur menggunakan *Autogrid* secara cepat dan otomatis untuk menghemat waktu penambatan senyawa terhadap target (Trott dan Olson, 2010). Tampilan dari Autodock Vina dapat diamati pada gambar 2.5.

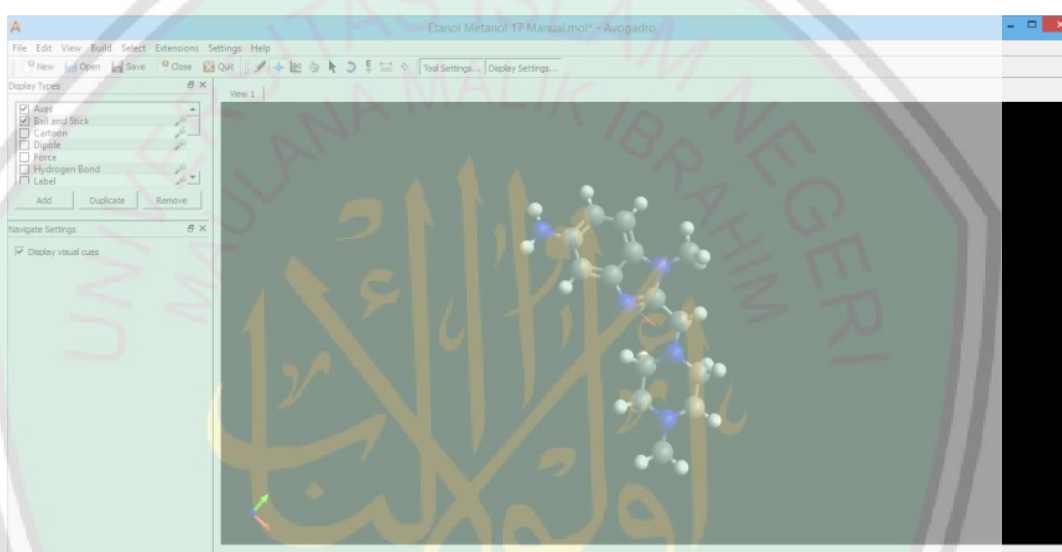


**Gambar 2.5.** Tampilan Autodock Vina dengan pemetaan *Autogrid* (Dokumentasi Pribadi)

### 2.7.2.2 Avogadro

Avogadro mulai dikembangkan mulai tahun 2006 sebagai aplikasi pembuatan struktur 3 dimensi dan memiliki sifat gratis. Penggunaan aplikasi ini seiring berjalannya waktu semakin diminati karena memiliki keunggulan seperti mudah dipahami oleh berbagai kalangan praktisi, pelajar maupun pengajar dalam menjelaskan proses *molecular docking*. Keunggulan lain yang ditawarkan aplikasi

ini adalah selain membentuk struktur kimia secara 3 dimensi, juga dapat dipilih bentuk yang paling stabil dari struktur tersebut sehingga dapat semakin mempermudah mendapatkan data yang valid ketika senyawa uji ditambahkan pada reseptor target. Salah satu pemanfaatan aplikasi adalah membantu aplikasi Autodock untuk menemukan struktur geometri paling stabil dari struktur kimia sebelum dilakukan penambatan senyawa terhadap targetnya (Hanwell *et al.*, 2012). Tampilan dari aplikasi ini dapat diamati pada gambar 2.6



Gambar 2.6. Tampilan Avogadro dengan Optimalisasi Geometri (Dokumentasi Pribadi)

### 2.7.2.3 SwissADME

SwissADME merupakan salah satu aplikasi *online* yang dapat diakses secara gratis dan dikenal sebagai *physicochemical descriptor* yang sering digunakan untuk meramalkan aktivitas dari suatu senyawa berdasarkan strukturnya. Keunggulan ini dimanfaatkan oleh berbagai kalangan terutama dalam pengembangan obat baru dengan membantu memprediksi tidak hanya aktivitasnya berdasarkan sifat fisikokimia bahkan dapat memprediksi sifat dari senyawa tersebut ditinjau dari aspek farmakokinetik maupun farmakodinamik. Keunggulan lain dari



SwissADME adalah cara mempresentasikan hasil prediksi dari banyak senyawa tersebut sehingga lebih mudah dalam tahapan analisisnya dengan menampilkan mode *Boiled EGG* dimana tampilan tersebut dapat menggambarkan secara visual sederhana prediksi kemampuan senyawa dalam terabsorpsi hingga dapat menembus BBB (Daina *et al.*, 2016). Tampilan *Boiled EGG* dan SwissADME secara umum dapat diamati pada gambar 2.7



Gambar 2.7. A) Tampilan SwissADME dengan *Boiled EGG*

B) Tampilan SwissADME sebagai *Physicochemical Descriptor*

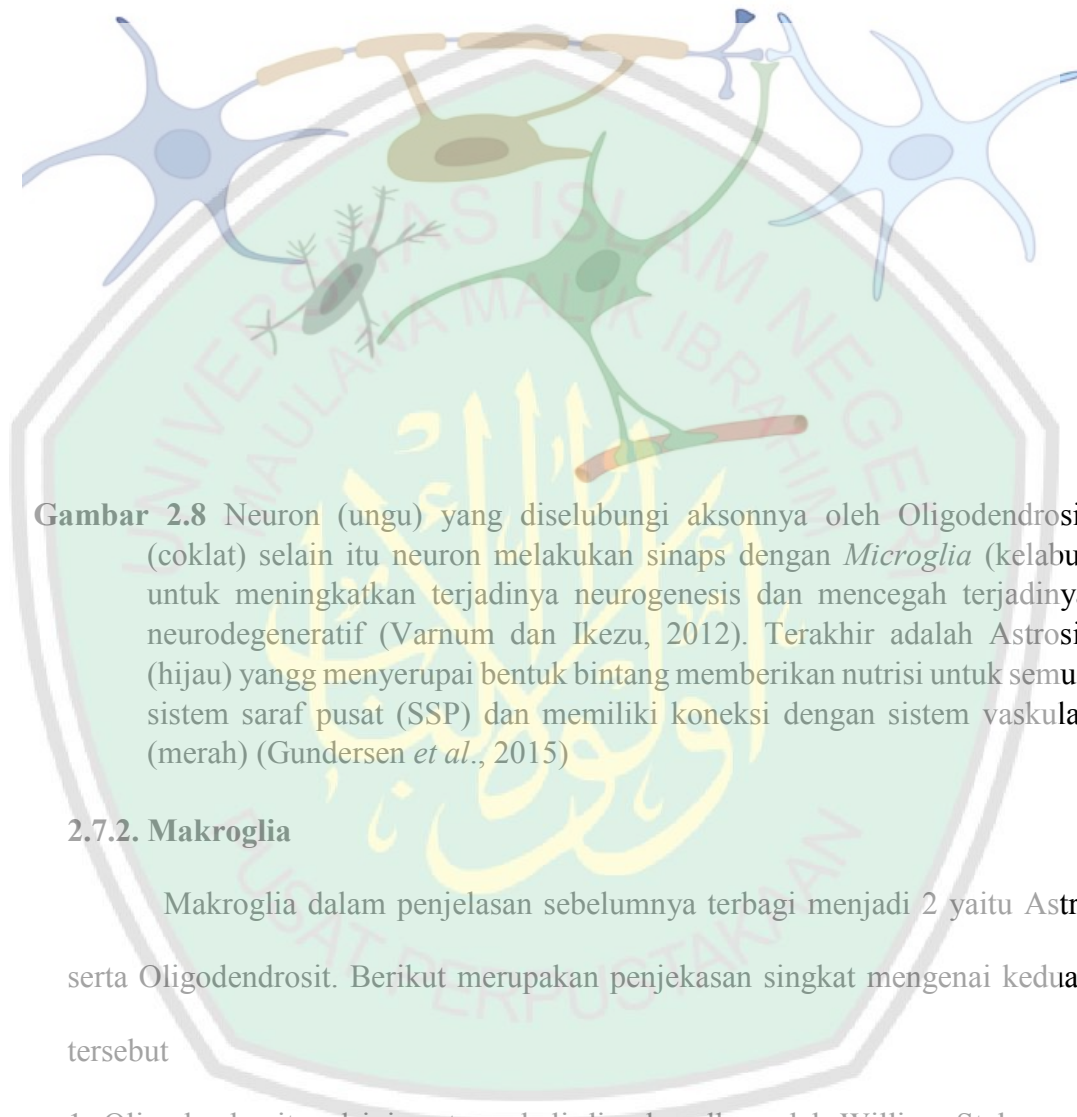
(Daina *et al.*, 2016)

## 2.7. Tinjauan Neuroglia, Makroglia dan Mikroglia

### 2.7.1. Neuroglia

Sistem saraf pusat tersusun atas sel neuron dan sel neuroglia yang berupa kumpulan sel yang memiliki fungsi untuk memberikan nutrisi, pengatur homeostatis, pelindung hingga penunjang sel neuron (Slone, 1994; Verkhatsky dan Parpura, 2014). Sejarah mencatat neuroglia pertama kali diperkenalkan oleh Rudolf Virchow diantara tahun 1856 – 1858 yang kemudian menjadi pijakan penelitian selanjutnya oleh Muller hingga Rio Hortega (Kettenmann dan Verkhatsky, 2013). Kumpulan neuroglia ini terbagi menjadi menjadi mikroglia dan makroglia yang

terbagi lagi menjadi Astrosit dan Oligodendrosit (Slone, 1994; Kettenmann dan Verkhratsky, 2013; Verkhratsky dan Parpura, 2014). Penjelasan mengenai kaitan neuron dan neuroglia sebagai penunjangnya dapat diamati pada Gambar 2.8.



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

### 2.7.2. Makroglia

Makroglia dalam penjelasan sebelumnya terbagi menjadi 2 yaitu Astrosit serta Oligodendrosit. Berikut merupakan penjeakan singkat mengenai kedua sel tersebut

1. Oligodendrosit, sel ini pertama kali diperkenalkan oleh William Stalcup yang kemudian diidentifikasi oleh Rio Hortega (Verkhratsky dan Parpura, 2014). Sel ini berasal dari zona subventrikular dan ventrikel lateral cerebrum atau ventrikel cerebellum dan berperan dalam membentuk selubung myelin yang bersifat insulator

dengan tujuan utama memperlancar transport neurotransmitter saraf pusat (Kettenmann dan Verkhratsky, 2013)

2. Astrosit, sel yang diperkenalkan oleh Michael von Lehnosek ini berasal dari neuroepitelial dengan bentuk morfologi menyerupai bintang (Kettenmann dan Verkhratsky, 2013; Verkhratsky dan Parpura, 2014). Peran Astrosit cukup beragam diantaranya adalah memberikan nutrisi karena sel ini memiliki pendikel yang melekat pada sistem vaskular serta dapat berperan dalam menjaga homeostatis neuron (Slone, 1994). Peran tersebut cukup beralasan karena dalam keadaan Neuropatologi, Astrosit dapat melakukan aktivitas *remodelling* maupun perbaikan pada neuron yang mengalami kerusakan (Kettenmann dan Verkhratsky, 2013).

### 2.8.3. Mikroglia

Mikroglia pertama kali diperkenalkan oleh ilmuwan bernama Nissl pada 1880 yang kemudian diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan pewarnaan perak oleh Pio del Rio Hortega pada tahun 1920 (Patro *et al.*, 2016). Mikroglia secara fisiologis berkisar 16% dari total sel pada sistem saraf pusat (Villa *et al.*, 2016) yang berperan dalam membantu keberlangsungan hidup neuron dengan menjaga homeostatis neuron (Tang dan Le, 2015). Mikroglia memiliki sifat menyerupai makrofag, namun perlu dipahami keduanya memiliki asal yang berbeda dimana mikroglia berasal dari matriks sel neuroektodermal dan sel *yolk sac* sedangkan makrofag berasal dari *hematopoietic stem cell* (Patro *et al.*, 2016; Kanazawa *et al.*, 2017). Mikroglia dalam pembahasan sebelumnya disebutkan berperan menjaga homeostatis neuron dan upaya yang dilakukan mikroglia adalah dengan cara berinteraksi dengan sel lain diantaranya adalah sebagai berikut

1. Mikroglia – Astrosit, sel astrosit mengatur kinerja dari mikroglia dan dapat diartikan sebagai suppresan aktivitas mikroglia secara berlebih. Perlu dicermati, ketika mikroglia memiliki aktivitas berlebih dapat menyebabkan peradangan pada sistem saraf pusat yang dikenal dengan neuroinflamasi (Villa *et al.*, 2016).

2. Mikroglia – Sel Imun (CD4+), mikroglia berperan sebagai *Agent Presenting Cell* untuk melakukan eliminasi terhadap sel yang telah mati maupun senyawa yang dapat mengganggu homeostasis sistem saraf pusat (Villa *et al.*, 2016).

3. Mikroglia – Sel Neuron, koneksi dan komunikasi dari keduanya diperkuat dengan timbulnya sinaps antara CD 200 dengan CD 200R diperantari oleh Interleukin 4 (Varnum dan Ikezu, 2012). Hasil dari sinaps keduanya ini adalah terjadinya neurogenesis serta menekan kemunculan IFN  $\gamma$  dan TNF  $\alpha$  yang dapat mengakibatkan neurodegenerasi (Villa *et al.*, 2016).

#### 2.8.3.1. Tinjauan *Cell Line* HMC3 (ATCC® CRL-3304™)

*Cell Line* HMC3 merupakan sel mikroglia manusia yang telah dikarakterisasi sehingga lebih mudah untuk dikembangkan maupun dilakukan pengamatan. Sel ini memiliki spesifikasi sebagai berikut

Organisme Asal : *Homo sapiens* (manusia)

Jaringan : Otak

Tipe Sel : Mikroglia

Usia : Embrio

Morfologi : Makrofag

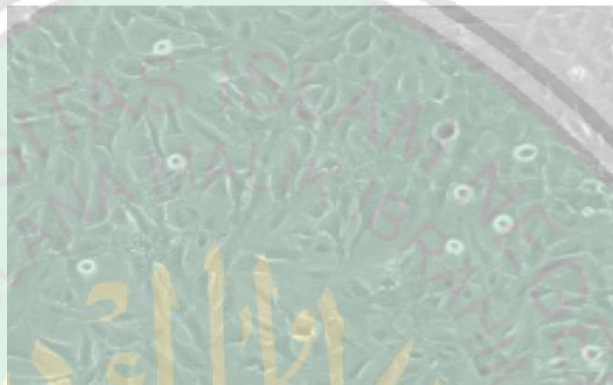
Sifat Pertumbuhan : Melekat

Penggunaan : Sel mikroglial manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglia primer. Seringkali digunakan untuk analisis

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

Sumber : ATCC

Sel ini dalam pengembangannya menggunakan media EMEM dan serum Fetal Bovine Serum (FBS) dengan perbandingan 56 mL untuk 500 mL media (ATCC, 2017) dan bentuk selnya dapat diamati pada gambar 2.9



**Gambar 2.9.** Sel Mikroglia HMC 3 diamati dengan *Inverted Microscope*

## 2.8. Tinjauan Neurodegeneratif

Neurodegeneratif dapat didefinisikan sebagai keadaan patologis pada sel saraf dimana sel tersebut akan mengalami kehilangan fungsinya secara normal karena terjadi perubahan sel saraf secara morfologi maupun anatomi yang berlangsung secara progresif (Kovac, 2014). Keadaan patologis ini sering dikarakterisasi dengan terjadinya penumpukan *beta amyloid* yang berlebihan dimana *beta amyloid* ini bersifat neurotoksik yang menyebabkan kematian sel sel saraf (Tang dan Le, 2015). Neurodegeneratif juga dapat disebabkan oleh beberapa keadaan diantaranya adalah perubahan biokimia, genetik maupun peningkatan radikal bebas yang berujung stress oksidatif serta merujuk pada terjadinya mekanisme neuroinflamasi pada sistem sel saraf (Kovacs, 2016). Proses yang berlangsung secara progresif ini menyebabkan berkurangnya sel sel neuron pada

struktur saraf sehingga penderita pada umumnya mengalami gangguan pada memori maupun kognitif (Bertram, *et al.*, 2005).

Gangguan saraf pada memori dan kognitif ini dapat muncul karena terjadinya defisiensi estrogen pada wanita *postmenopause* (Klempin dan Kempermann, 2007). Prevalensi terjadinya keadaan neurodegeneratif diprediksi akan mengalami kenaikan dimana pada tahun 2030 akan ditemukan penderita 74,7 juta jiwa dan terus meningkat dimana pada tahun 2050 diprediksi akan ditemukan 131,5 juta penderita yang didominasi oleh wanita (Prince *et al.*, 2015). Hal ini berkaitan dengan peningkatan usia harapan hidup wanita dan disertai dengan penurunan produksi estrogen yang memiliki peran sangat penting dalam menjaga kesetimbangan (homeostatis) pada aktifitas otak setelah berikatan dengan reseptornya (Tang dan Le, 2015; Varshney dan Nalvarte, 2017).

## 2.9. Tinjauan Neuroinflamasi

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

## 2.10. Tinjauan Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

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

## 2.11. Tinjauan *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II)

*Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) merupakan bagian dari imun spesifik terutama pada beberapa APC seperti makrofag dan sel B (Paracha *et al.*, 2015). Molekul MHC kelas II juga disebut dengan HLA II merupakan transmembran heterodimer glikoprotein yang memiliki rantai *alfa* dan *beta*. Pada

manusia terdapat 3 isotipe berbeda diantaranya (HLA-DR, HLA-DQ dan HLA-DP) dari kesemuanya mengkodekan dengan jelas bagian A dan B pada lengan pendek kromosom ke 6 (Hanna dan Etzioni, 2014). MHC II memiliki panjang rantai amino 18-20 dimana alurnya secara terbuka disediakan oleh domain Alfa dan Beta. Kompleks dari MHC II-peptida selanjutnya berinteraksi dengan Sel T helper CD4, hingga mempengaruhi respon penurunan aktifitas dengan cara melakukan lokalisasi inflamasi dan pembengkakan dengan cara memanggil fagosit atau mengaktifkan sel B (Grimholt, 2015). Kenaikan molekul MHC II terjadi karena induksi oleh IFN- $\gamma$  dan hal ini penting untuk menyajikan antigen untuk limfosit Sel T *helper* CD4 (Lisak *et al.*, 2016). Beberapa sel tidak selalu mengekspresikan molekul MHC II namun ekspresi tersebut dapat muncul setelah diinduksi beberapa stimuli dimana salah satu yang dikenal dan potensial adalah IFN- $\gamma$ . Molekul MHC II memiliki beberapa peran kunci dalam sistem imun adaptif dimana secara langsung mengembangkan, mengaktifkan dan menjaga keseimbangan dari Sel T *helper* CD-41 (Hanna dan Etzioni, 2014).

### 2.12. Tinjauan *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. 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). ICC memungkinkan peneliti untuk

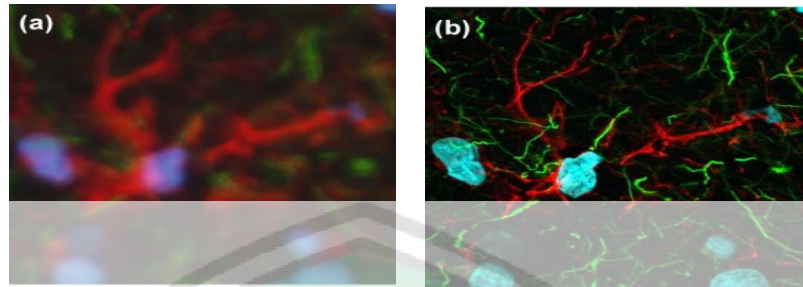


mengevaluasi apakah sel dalam sampel tertentu dapat mengekspresikan antigen yang diinginkan (Taylor dan Rudbeck, 2013). Perbedaan dasar ICC dengan *immunohistochemistry* (IHC) terletak pada sampel atau objek yang digunakan, pada ICC sampel yang digunakan berupa sel utuh yang hampir seluruh matriks ekstraselularnya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

### 2.13. Tinjauan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)

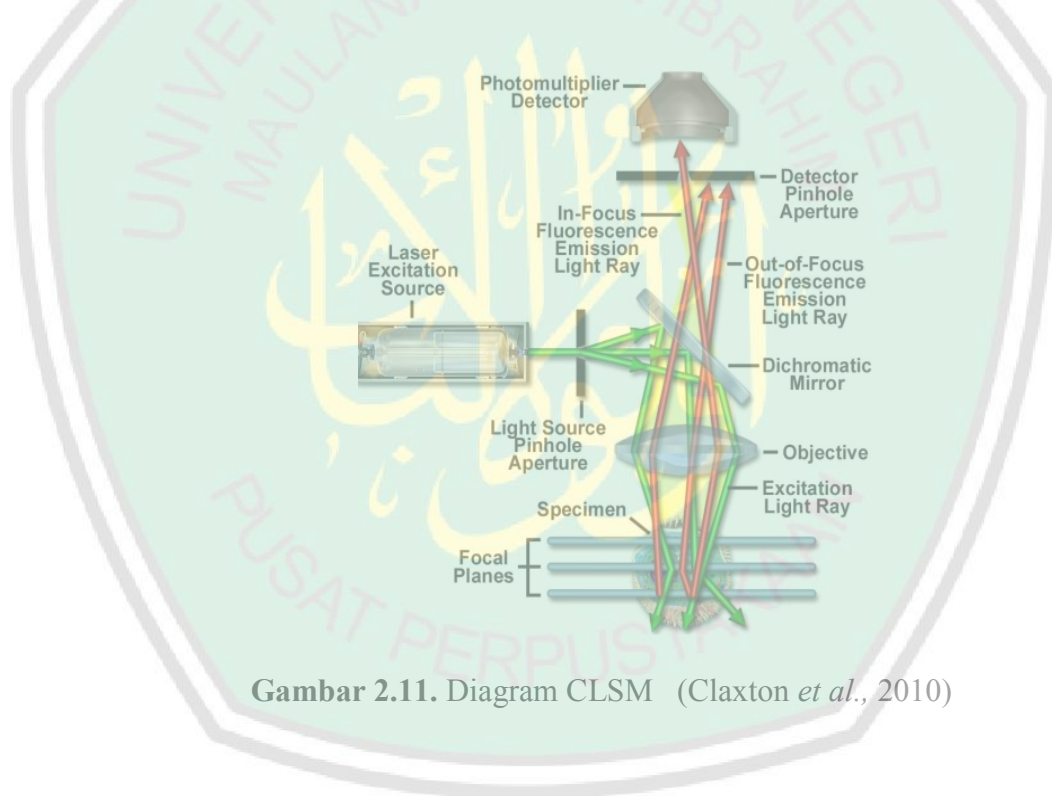
*Confocal Laser Scanning Microscopy* merupakan instrumen yang digunakan untuk mengamati sampel dengan memanfaatkan laser sebagai sumber pengamatan dan menggunakan kamera untuk merekam hasil pengamatan dimana selanjutnya diolah menggunakan software pengolah data yang terdapat pada komputer. Instrumen ini menggunakan 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 otak (Claxton *et al.*, 2010).

Instrumen ini memberikan struktur sel lebih baik dibandingkan dengan SEM maupun TEM yang dapat diamati pada gambar 2.10.



**Gambar 2.10.** (a) pengamatan SEM (b) pengamatan CLSM (Claxton *et al.*, 2010)

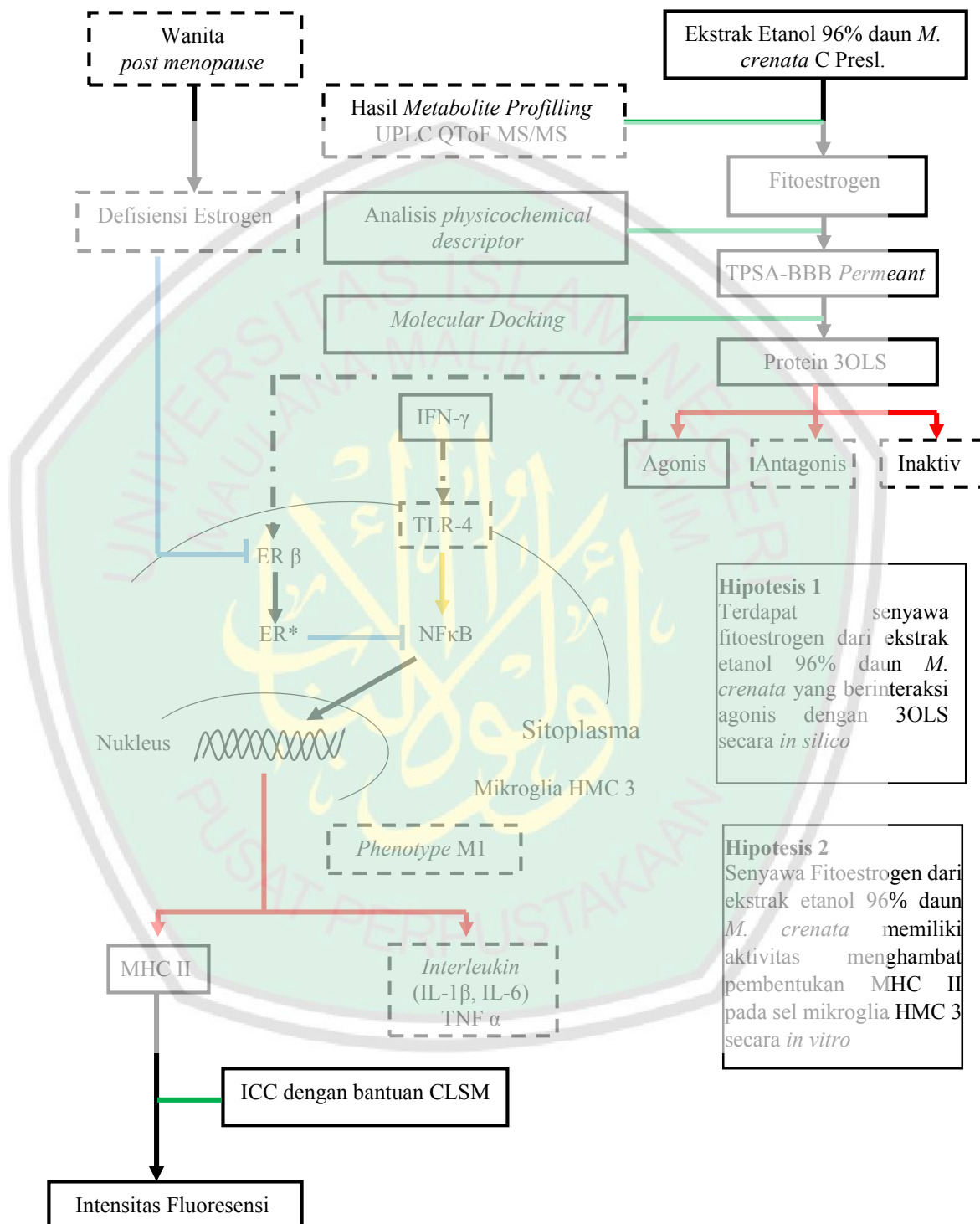
Instrumen ini memiliki mekanisme kerja yang sedikit rumit untuk menghasilkan hasil yang luar biasa yang dapat diamati pada gambar 2.11.



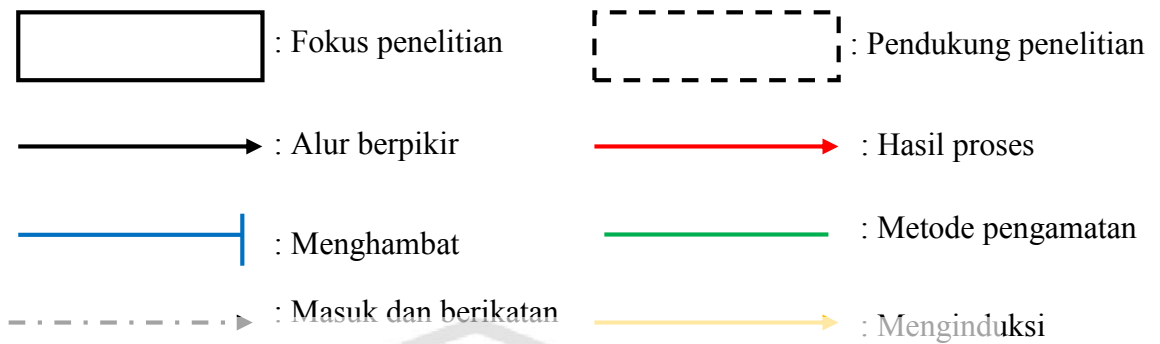
**Gambar 2.11.** Diagram CLSM (Claxton *et al.*, 2010)

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

**3.1. Kerangka Konseptual**



**Gambar 3.1.** Skema Kerangka Konseptual Penelitian



## 3.2. Uraian Kerangka Konseptual dan Hipotesis

### 3.2.1 Uraian Kerangka Konseptual

Wanita seiring dengan berjalannya waktu akan mengalami penuaan disertai dengan fenomena *postmenopause* dan ditandai terjadinya defisiensi estrogen (Yu dan Ji, 2015). Kejadian tersebut selanjutnya mengakibatkan penurunan jumlah Estrogen Receptor teraktivasi (ER\*) salah satunya yang terdapat pada sistem saraf pusat dan akhirnya terjadi peningkatan aktivitas NF-kB yang dapat mempengaruhi transkripsi protein salah satunya pada sel HMC3 (Cui *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2016). Transkripsi gen ini pada akhirnya akan mengaktifkan mikroglia dengan mengkodekan *marker* MHC II yang dapat memicu munculnya mediator peradangan (Jantaratnotai *et al.*, 2013; Patro *et al.*, 2016). Mediator peradangan yang tidak terkendali tersebut, pada akhirnya menyebabkan neuroinflamasi yang merupakan salah satu penyebab terjadinya penyakit neurodegeneratif (Kovacs, 2016).

Terapi terbaru untuk mengatasi terjadinya neuroinflamasi yang diajukan untuk mengganti terapi sulih hormon karena memiliki tingkat keamanan lebih tinggi adalah dengan penggunaan senyawa fitoestrogen yang terdapat dalam senyawa tumbuhan (Alldredge *et al.*, 2013). Kandungan tersebut salah satunya dapat ditemukan dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* berdasarkan dari penelitian sebelumnya menggunakan RIA (Laswati, 2011). Prediksi mengenai

aktivitas senyawa fitoestrogen pada *M. crenata* sebagai agen antineuroinflamasi perlu dilakukan menggunakan pendekatan secara *in silico*.

Pendekatan secara *in silico* digunakan untuk memberikan gambaran awal dan memberikan prediksi secara sederhana dengan mengkorelasikan struktur sifat fisikokimia dengan analisis aplikasi berkaitan dengan potensi sebagai bahan berkhasiat dalam pengobatan (Muchtaridi *et al.*, 2018). Senyawa tersebut akan dilakukan penapisan menggunakan *physicochemical descriptor* agar dapat memberikan efek sebagai agen antineuroinflamasi. Hipotesis yang muncul adalah terdapat senyawa fitoestrogen yang dapat berikatan agonis dengan protein 3OLS sehingga dapat menjadi agen antineuroinflamasi.

Tahapan selanjutnya adalah mempertegas dan menguatkan pendekatan *in silico* dengan pengujian secara *in vitro* tentang mekanisme yang terjadi ketika suatu microglia memunculkan *marker* MHC II. Mekanisme yang memiliki kemiripan dengan keadaan tersebut adalah dilakukan induksi terhadap mikroglia yang diwakili dengan HMC3 menggunakan IFN- $\gamma$  yang terkenal potensial memunculkan *marker* MHC II serta memiliki kemampuan untuk menginduksi transkripsi gen (Kettenmann dan Verkhratsky, 2013; Kulkarani *et al.*, 2016; Patro *et al.*, 2016). Pengamatan *marker* MHC II tersebut akan menggunakan metode ICC dengan bantuan CLSM. Hipotesis yang muncul adalah senyawa fitoestrogen dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas menghambat pembentukan MHC II pada sel mikroglia HMC 3 secara *in vitro*.

### 3.2.2. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat senyawa fitoestrogen dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang berinteraksi agonis dengan protein 3OLS secara *in silico*.
2. Senyawa fitoestrogen dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas menghambat pembentukan MHC II pada sel mikroglia HMC 3 secara *in vitro*.



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

#### 4.1.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis rancangan penelitian eksperimental dengan rancangan *pre experimental one shot case study* berbasis komputer pada uji *in silico* untuk mengetahui interaksi agonis antara fitoestrogen dan protein 3OLS serta *true experimental post test only* pada uji aktivitas antineuroinflamasi secara *in vitro* untuk mengetahui dan membandingkan beberapa kelompok perlakuan.

Penelitian ini menggunakan protein hasil *X ray* dari *Protein Data Bank* (PDB) ID 3OLS serta menggunakan sel mikroglia HMC3 yang diinduksi dengan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan beberapa dosis (Sarwono, 2006).

#### 4.1.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas preparasi bahan, pengamatan interaksi fitoestrogen dengan protein 3OLS menggunakan aplikasi *opensource*, ekstraksi bahan dan uji aktivitas antineuroinflamasi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap sel mikroglia HMC 3 menggunakan *marker* MHC II dengan metode ICC dibantu instrumen CLSM.

### 4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan September 2018 hingga Februari 2019 dengan dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada Oktober 2018 hingga Januari 2019 untuk pengerjaan *in silico* serta dilaksanakan di

Laboratorium Fitokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium *Nano, Molecular and Cellular Biology* Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang pada September 2018 hingga Maret 2019 untuk pengerjaan *in vitro*.

### 4.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas 3 bentuk diantaranya adalah

1. Tanaman menggunakan *M. crenata* yang berasal dari daerah Benowo, Kota Surabaya yang kemudian dilakukan determinasi di UPT. Materia Medika Batu.
2. Senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* menggunakan UPLC QToF MS/MS
3. Sel menggunakan sel Mikroglia HMC 3 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini diantaranya adalah

1. Reseptor ER $\beta$  menggunakan Protein *X ray* dengan ID 3OLS dari [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) untuk studi *in silico*.
2. Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* untuk studi *in vitro*.



#### 4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini diantaranya adalah

1. Affinitas serta interaksi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap asam amino pada ER  $\beta$  untuk studi *in silico*.
2. Intensitas fluoresensi MHC II untuk studi *in vitro*.

#### 4.4.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini diantaranya adalah

1. Komputer personal Hewlett Packard Notebook 14g-102AU untuk studi *in silico*.
2. Suhu dan lama inkubasi sel, keadaan lingkungan sel, CLSM yang dilengkapi dengan CO<sub>2</sub> incubator serta digunakan *Eagles Modified Essential Medium* (EMEM ATCC® 30-2003) untuk studi *in vitro*.

#### 4.4.4. Definisi Operasional

1. Daun *M. crenata* diperoleh dari daerah Benowo, Kota Surabaya dan dilakukan determinasi di UPT. Materia Medika, Kota Batu.
2. Ekstrak adalah sediaan kering yang diperoleh dari penyarian daun *M. Crenata* dengan etanol 96% dengan metode *ultrasonic assisted extraction* (UAE) dan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* (DepKes RI, 1995).
3. Gugus Farmakofor adalah unsur dalam struktur senyawa yang memberikan aktifitas penyembuh pada suatu senyawa bahan obat.
4. Asam Amino adalah protein sederhana yang menyusun sel, jaringan dan organ dari suatu makhluk hidup.
5. Ligan merupakan senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% Daun *M. crenata* C Presl. yang digunakan sebagai sampel dalam pendekatan secara *in silico*.

6. *Topological Polar Surface Area* (TPSA) merupakan besaran nilai yang menjelaskan kemampuan yang dimiliki suatu senyawa untuk dapat menembus membran (Kelder *et al.*, 1999; Martin, 2005).
7. *BBB Permeant* merupakan kemampuan senyawa menembus membran sawar otak berdasarkan sifat fisikokimia yang dimiliki senyawa tersebut.
8. *Binding Affinity* merupakan kemampuan senyawa untuk dapat berikatan dengan protein target dengan memberikan energi bebas paling stabil.
9. *Cell line Human Microglia Clone 3* (HMC 3) adalah sel mikroglia manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat primer sebagai mikroglia.
10. Kontrol negatif adalah sel yang tidak mendapatkan perlakuan penambahan dosis ekstrak.
11. Kontrol positif adalah sel yang mendapatkan perlakuan penambahan isolat genistein.
12. Dosis merupakan jumlah atau takaran ekstrak yang diberikan kepada objek penelitian dalam satuan atau unit tertentu.
13. Interaksi agonis merupakan jenis ikatan yang terjadi antara ligan dengan target yang memberikan efek yang mirip dan sama dengan kinerja reseptor yang dapat diamati dari ikatan asam amino yang diikat.
14. MHC II diamati intensitas fluoresensinya menggunakan metode ICC berbantuan CLSM.

## 4.5. Alat dan Bahan

### 4.5.1. Alat

#### 4.5.1.1. Preparasi Sampel Studi *In Silico*

Alat yang digunakan untuk melakukan preparasi sampel adalah komputer personal Hawlett Packard *Notebook* 14g-102AU, *software* Microsoft Office Excel 2013, PerkinElmer ChemDraw, ChemSpider, Biovia Discovery Studio *Visualizer* 2016 dan Avogadro.

#### 4.5.1.2. Penambatan Ligand-Protein

Alat yang digunakan untuk melakukan penambatan ligan-protein dan penentuan gugus farmakofor adalah komputer personal Hawlett Packard *Notebook* 14g-102AU, aplikasi *PyRX 0.8*, Biovia Discovery Studio *Visualizer* 2016.

#### 4.5.1.3. Preparasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* Presl.

Alat-alat yang digunakan dalam proses preparasi sampel diantaranya yaitu blender, gunting dan Mettler Toledo HC-103 *moisture analyzer*.

#### 4.5.1.4. Ekstraksi Ultrasonik Daun *M. crenata* Presl.

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi *M. crenata* yaitu neraca analitik, gelas beker, gelas ukur, gelas arloji, pipet tetes, pipet ukur, batang pengaduk, corong gelas, erlenmeyer, wadah maserat, cawan porselen, sendok tanduk, spatula, kertas saring, aluminium foil, Soltec Sonica 5300 EP S3 *ultrasonicbath*, Memmert UN 55 *universal oven* dan Heidolph Hei-VAP ML/G3 *rotary evaporator*.

#### 4.5.1.5. Kultur *Cell line Human Microglia Clone 3 (HMC3)*

Alat yang digunakan yaitu mikropipet 1000  $\mu\text{l}$ , *conical tube* 15mL dan 50 mL, rak tabung, *flask culture* 15 mL, *milipore* 0,22  $\mu\text{m}$ , spuit 10 mL, scraper, pipet ukur steril 5 mL. Selain itu dibutuhkan instrumen seperti ThermoScientific Hera

Cell 150i CO<sub>2</sub> incubator, ThermoScientific HeraSafe KS Class II bio safety cabinet, Olympus IX 71 inverted microscope, ThermoScientific Aquabath 18022AQ waterbath, LW C5 centrifuge.

#### 4.5.1.6. Uji Aktivitas dengan Menggunakan *Immunocytochemistry*

Alat-alat yang digunakan yaitu neraca analitik, mikropipet 1000 µl, milipore 0,22 µm, conical tube 15mL dan 50 mL, 24-well plate. Instrumen yang dibutuhkan diantaranya ThermoScientific Hera Cell 150i CO<sub>2</sub> incubator, ThermoScientific HeraSafe KS Class II bio safety cabinet dan Olympus IX 81 motorized inverted microscope tandem fluoview FV1000 with CO<sub>2</sub> incubator.

#### 4.5.2. Bahan

##### 4.5.2.1. Preparasi Sampel Studi *In Silico*

Bahan-bahan yang digunakan adalah protein *X ray* dari PDB ID 3OLS dari [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) dan senyawa *metabolite profiling* UPLC QToF MS/MS ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C Presl.

##### 4.5.2.2. Penambatan Ligand-Protein

Bahan-bahan yang digunakan adalah protein 3OLS yang telah di preparasi dan senyawa *metabolite profiling* UPLC-MS/MS ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C Presl. yang diseleksi potensinya sebagai kandidat obat dengan *physicochemical descriptor* SwissADME.org.

##### 4.5.2.3. Ekstraksi Ultrasonik Daun *M. crenata* Presl.

Bahan-bahan yang digunakan adalah *M. crenata* C Presl. yang diambil di sawah daerah Benowo, Kota Surabaya dan pelarut yang digunakan yaitu Etanol 96%.

#### 4.5.2.4. Kultur *Cell line Human Microglia Clone 3 (HMC3)*

Bahan yang digunakan dalam kultur sel yaitu *Cell line HMC3* yang diperoleh dari ATCC, EMEM, *fetal bovine serum* (FBS), Penstrep, 0,25% Tripsin-0,53 mM EDTA, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Etanol 70%, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

#### 4.5.2.5. Uji Aktivitas dengan Menggunakan *Immunocytochemistry*

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas dengan Menggunakan *Immunocytochemistry* yaitu 4% *paraformaldehyde*, media kultur EMEM, 0,5% DMSO, 0.5% Triton X-100, Anti-Rb MHC II, Antibodi Sekunder Anti-Rb FITC, *Bovine Serum Albumin* (BSA), Aluminium foil.

### 4.6 Prosedur Penelitian

#### 4.6.1. Determinasi Tanaman dan Preparasi Simplisia Daun *M. crenata*

Langkah preparasi simplisia daun *M. crenata* diantaranya adalah

1. Determinasi tanaman akan dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang.
2. Daun *M. crenata* dipanen, lalu dicuci dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C . Hal ini dimaksudkan agar daun kering namun tetap berwarna hijau.
3. Daun *M. crenata* 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. Simplisia diukur kadar air menggunakan *moisture analyzer*.

#### 4.6.2. Prosedur Ekstraksi

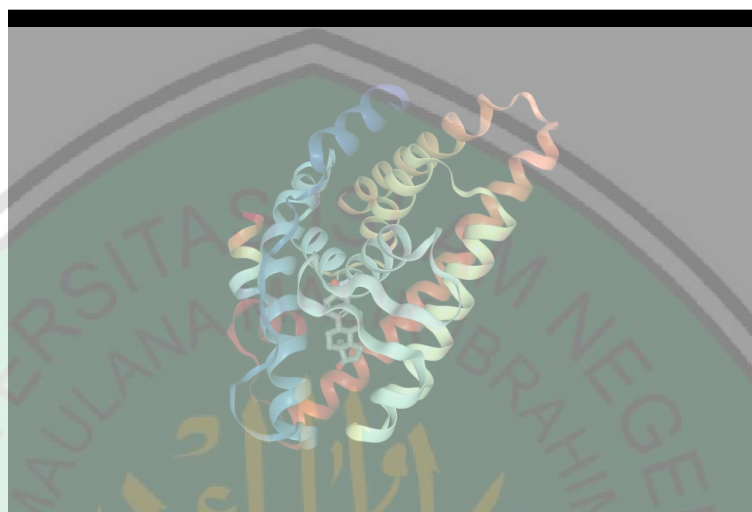
Proses ekstraksi simplisia herba *M. crenata* dilakukan menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol 96%, hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan dioven hingga kering. Langkah-langkah ekstraksi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

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

#### 4.6.3. Preparasi Sampel In Silico

Langkah yang dilakukan dalam penyiapan sampel diantaranya adalah

1. Protein *X Ray* dengan *ligand*  $17\beta$  estradiol diunduh dari PDB [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) yang dapat diamati pada gambar 4.1



**Gambar 4.1.** Protein *X Ray* dengan *ligand*  $17\beta$  dengan ID 3OLS

2. Dilakukan preprasi awal untuk memisahkan *ligand* dengan proteinnya menggunakan Biovia Discovery Studio *Visualizer* 2016 (Muchtaridi *et al.*, 2018)
3. Senyawa hasil *metabolite profiling* UPLC QToF MS/MS dilakukan preparasi awal untuk mencari senyawa yang menjadi kandidat kuat bahan berkhasiat obat dengan ketentuan nilai TPSA <70 (Kelder *et al.*, 1999) menggunakan SwissADME (Daina *et al.*, 2017).
4. Ligan  $17\beta$  estradiol serta senyawa dengan potensi kandidat dipisahkan dan segera dilakukan optimasi geometri struktur menggunakan Avogadro untuk mencari energi minimal dengan metode MMFF94.

#### 4.6.4. Penambatan Ligand-Protein

Langkah yang dilakukan dalam proses penambatan diantaranya adalah

1. Ligand  $17\beta$  estradiol ditambahkan ulang dengan protein 3OLS untuk melakukan validasi internal agar didapatkan metode tepat dalam melakukan penambatan senyawa inklusi hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*.
2. Senyawa inklusi hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dilakukan penambatan dengan PyRX metode Autodock Vina.
3. Hasilnya kemudian dianalisis menggunakan Biovia Discovery Studio *Visualizer* 2016 untuk mengetahui interaksi senyawa yang terjadi.

#### 4.6.5. Preparasi *Cell line Human Microglia Clone 3* (HMC3)

*Cell line* HMC3 diperoleh dari ATCC serta dilakukan kultur seperti berikut

1. Sel dikeluarkan dari freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), dihangatkan dalam penangas air pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2-3 menit.
2. Setelah mencair, sel disemprot etanol 70%, dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 9 ml medium komplet yang terdiri dari EMEM yang dilengkapi dengan 10% FBS dan 1% Penstrep.
3. Sentrifugasi untuk memisahkan *Cell line* HMC3 (pellet) dengan media. *Cell line* HMC3 kemudian dikembangkan pada medium lengkap dalam inkubator  $\text{CO}_2$  dengan kelembaban atmosfer 5% pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (ATCC,2017). Selanjutnya sel diganti medium pertumbuhan dengan ketentuan penggantian 2 kali dalam seminggu.

#### 4.6.6. Uji Aktivitas Antineuroinflamasi dengan Menggunakan ICC

Langkah perlakuan uji dilakukan dalam beberapa tahapan diantaranya adalah

1. Ditimbang sampel ekstrak lalu dilarutkan ekstrak dengan surfaktan Tween 80 0,5% dan DMSO 0,5%. Selanjutnya dilakukan pengenceran untuk dosis 62.5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm.



2. Aktivasi mikroglia, dimana sel di letakan dalam *24-well plates* dan setelah *confluence* 80% , sel diberi 10 ng/ml IFN- $\gamma$  dan dilakukan inkubasi selama 48 jam.
2. Sel kemudian diganti media serta mulai mendapatkan perlakuan varian dosis ekstrak, diamati menggunakan *inverted microscope* dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C/ CO<sub>2</sub> 5%.
4. Sel setelah 24 jam dilakukan fiksasi dengan menambahkan *Paraformaldehyde* dan dilakukan inkubasi suhu 4°C selama 30 menit.
5. Sel dicuci PBS dan ditambahkan dengan Triton X-100 dan kemudian ditambahkan BSA serta diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.
6. Larutan BSA dibuang dan mulai dimasukkan antibodi primer anti-Rb MHC II dan dilakukan inkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam penuh.
7. Dilakukan penambahan Antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan FITC dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.
8. Sel diamati pada CLSM menggunakan panjang gelombang 488 nm.

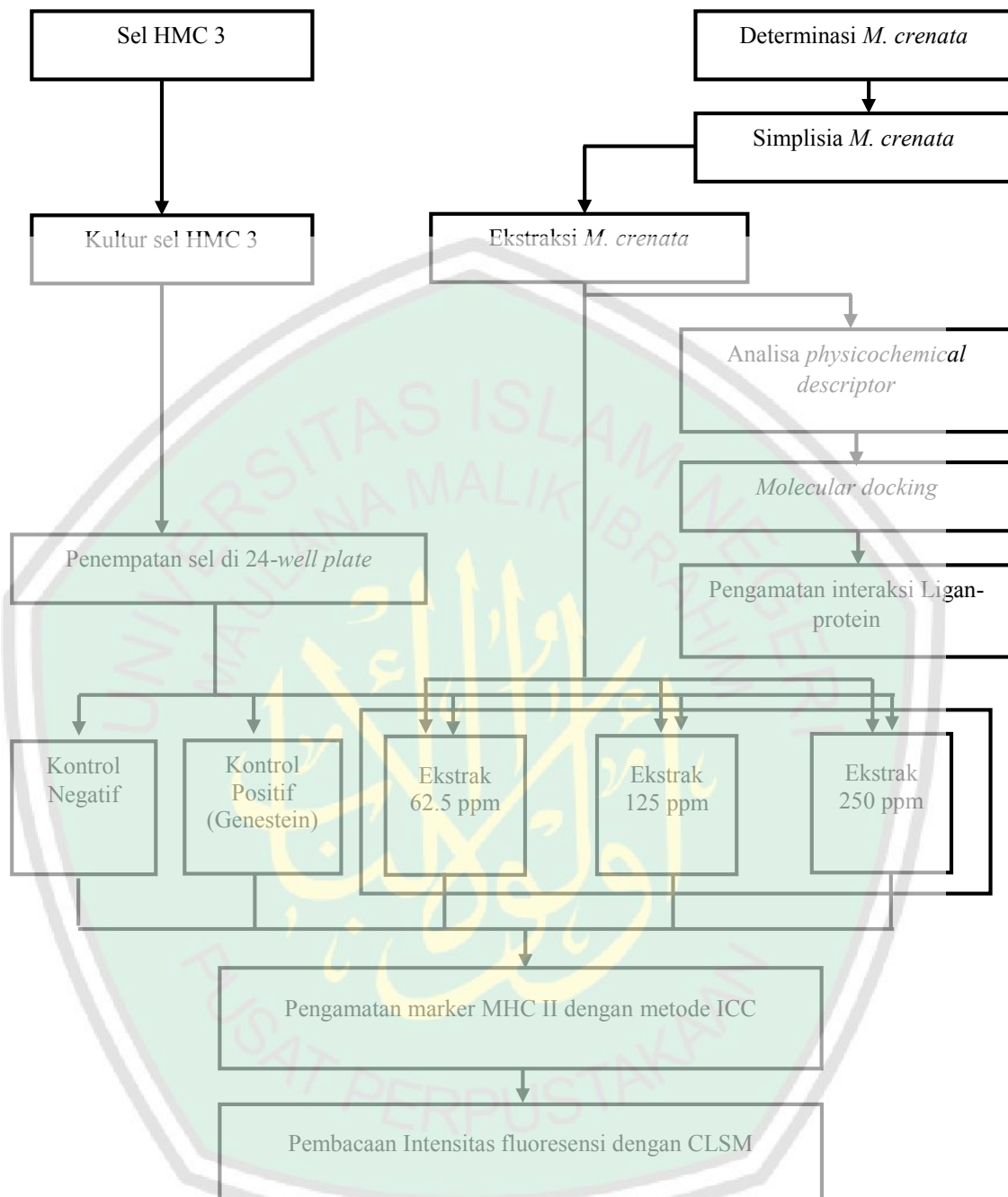
#### 4.7 Analisis Data *In Vitro* dengan Analisis *Probit*

Analisis data *in vitro* menggunakan pengerjaan statistik dengan langkah langkah sebagai berikut.

1. Data hasil pengamatan dikumpulkan dalam tabel distribusi frekuensi dan diamati jenis skala yang terbentuk dan dipilih jenis pengujian distribusi normal data.

2. Dilakukan perhitungan dan pengamatan distribusi data menggunakan *Shapiro Wilk* karena data yang terkumpul sejumlah 5 data.
3. Dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene test* dan melakukan perhitungan untuk mengamati homogenitas data. Ketika data tidak homogen maka dilakukan perhitungan dan pengamatan data lanjutan menggunakan uji beda non parametrik dengan menggunakan metode *Kruskal-Wallis*.
4. Pengujian selanjutnya melakukan uji korelasi data non parametrik menggunakan *Spearman Rho* untuk mengetahui hubungan dosis perlakuan dengan penurunan intensitas fluoresensi MHC II.
5. Dilakukan pengujian post hoc untuk mengamati signifikansi perbedaan antara dosis perlakuan terhadap kontrol positif dan kontrol negatif.
6. Terakhir dilakukan pengujian untuk mengetahui nilai  $ED_{50}$  ekstrak menggunakan analisis probit.

#### 4.8. Skema Penelitian



**Gambar 4.2.** Skema Penelitian

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Determinasi dan Preparasi Bahan Tanaman

Daun Semanggi (*M. crenata* C. Presl.) yang digunakan dalam penelitian dipanen dari persawahan daerah Benowo, Kota Surabaya, Jawa Timur pada bulan September 2017 dengan alasan dalam waktu tersebut tanaman telah siap untuk dilakukan pemanenan sehingga diperoleh khasiat maksimal (Emilan *et al.*, 2011). Proses selanjutnya dilakukan identifikasi di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur untuk memastikan bahwa tanaman yang dipanen dan digunakan telah benar serta sesuai dengan taksonomi yang diakui. Metode yang digunakan dalam langkah identifikasi adalah mengamati kesesuaian antara tanaman dengan kunci determinasi dimana setiap tanaman akan digolongkan berdasarkan taksonomi mulai dari *kingdome* hingga spesies (Putra, 2018). Hasil identifikasi tanaman *M. crenata* memiliki kunci determinasi 1a-17b-18a-1.

Simplisia yang telah diidentifikasi selanjutnya dibuat dalam bentuk serbuk simplisia yang dimaksudkan untuk mengurangi ukuran dari bahan menggunakan peralatan tertentu sehingga lebih mudah dikerjakan dalam tahapan selanjutnya seperti ekstraksi (Prasetyo dan Inorih, 2013; Banu dan Catherine, 2015). Hasil pengerjaan ini dapat diamati pada tabel 5.1 berikut

Tabel 5.1 Jumlah Daun *M. crenata*

Daun <i>M. crenata</i>	Berat (Kg)
Daun <i>M. crenata</i> basah	4
Daun <i>M. crenata</i> kering	1,8
Serbuk daun <i>M. crenata</i> kering	1,7

Pengerjaan selanjutnya adalah melakukan pengukuran nilai kadar air serbuk simplisia untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam simplisia yang akan dilakukan penelitian. Kandungan air yang terdapat dalam simplisia berhubungan erat dengan kualitas serbuk simplisia yang akan digunakan karena semakin rendah nilai kadar air, maka akan lebih meningkatkan efektivitas penarikan senyawa aktif dan sulit ditumbuhi oleh jamur maupun mikroorganisme yang dapat merusak serbuk simplisia. Nilai kadar air yang dipersyaratkan agar didapatkan bahan serbuk yang baik adalah 10 % (BPOM, 2000; DepKes RI, 2008). Alasan lain nilai kadar air dibawah 10% karena proses enzimatik yang dapat menyebabkan degradasi senyawa aktif tanaman dapat berkurang bahkan tidak ada (Prasetyo dan Inorih, 2013; Putra, 2018).

Nilai yang diperoleh dari hasil pengukuran nilai kadar air simplisia kering *M. crenata* menggunakan *moisture content analyzer*, dapat diamati pada tabel 5.2 dengan nilai rata rata 8,6%.

**Tabel 5.2** Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering *M. crenata*

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

Hasil tersebut mengindikasikan bahwa bahan serbuk simplisia kering telah memiliki kadar air yang baik karena memiliki nilai kadar air dibawah 10%. Nilai kadar yang baik tersebut diperoleh karena bahan hingga berbentuk serbuk selama proses berlangsung mendapatkan proses pengeringan yang baik dan mendapatkan proses penyimpanan yang baik dimana bahan serbuk disimpan dalam wadah

tertutup serta tidak terkena matahari secara langsung (Emilan *et al.*, 2011; Putra, 2018).

## 5.2 Preparasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata*

Preparasi ekstrak menjadi salah satu tahapan kritis karena untuk memisahkan komponen senyawa target dari campuran menggunakan pelarut dan kondisi sistem tertentu dengan menggunakan prinsip *like dissolve like* (Anwar, 1994; Ma'arif, 2012). Proses ekstraksi pada penelitian ini diawali dengan melakukan penimbangan terhadap bahan serbuk simplisia serta jumlah etanol 96% yang digunakan. Perbandingan yang digunakan untuk melakukan ekstraksi adalah 1 : 16 dengan asumsi digunakan 500 mL etanol 96% untuk mengekstrak 30 gram bahan serbuk simplisia (Putra, 2018). Penggunaan Etanol 96% sebagai pelarut utama ekstraksi serbuk simplisia *M. crenata* karena pelarut etanol memiliki kemampuan untuk menarik senyawa aktif tanaman dalam rentang yang cukup luas dan merupakan pelarut yang telah banyak digunakan dalam industri makanan maupun minuman dalam proses produksinya karena memiliki tingkat toksisitas yang rendah (Jahangiri *et al.*, 2011). Bahan serbuk simplisia tersebut kemudian dilakukan ekstraksi secara bertahap hingga tercapai pelarut 500 mL untuk mendapatkan efisiensi ekstraksi (Arsyad, 2011). Bahan yang telah dilarutkan tersebut kemudian diekstraksi menggunakan metode ultrasonik.

Proses ekstraksi dengan menggunakan ultrasonik ini dilakukan selama 3x2 menit dengan tujuan mengoptimalkan hasil ekstrak (Putra, 2018). Alasan utama penggunaan ultrasonik sebagai metode ekstraksi adalah tingginya senyawa target yang dihasilkan, tergolong ekstraksi yang selektif, efisien dalam waktu pengerjaan

dan mampu mencegah degradasi panas selama proses berlangsung (Azmir *et al.*, 2013). Hal ini disebabkan oleh terjadi pengadukan ekstrak maupun transfer energi yang efektif (Ngaha Njila *et al.*, 2017). Alasan lain penggunaan metode ini dibanding metode lain adalah secara umum, metode ini mempertahankan struktur dari senyawa yang akan diambil dan pada akhirnya juga mempertahankan efek biologis dari senyawa target (Medina-Torres *et al.*, 2017). Penjelasan tersebut juga berkenaan dengan prinsip kerja dari ekstraksi ultrasonik yang memanfaatkan timbulnya gelembung yang ditimbulkan oleh fenomena kavitasi. Gelembung tersebut akan memperlebar pori permukaan dari bahan dan menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi serta bercampur dengan pelarutnya (Vilkhu *et al.*, 2008; Esclapez *et al.*, 2011). Bahan yang telah diekstraksi kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *Rotary Evaporator*.

Pemekatan ekstrak ini bertujuan untuk menghilangkan pelarut proses ekstraksi sehingga didapatkan ekstrak yang siap digunakan serta menekan toksisitas yang dapat ditimbulkan oleh pelarut (DepKes RI, 2008). Proses pemekatan tersebut salah satu dapat dilakukan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* dan untuk mendapatkan ekstrak dengan nilai kadar pelarut lebih kecil dapat dilakukan penguapan menggunakan oven. Ekstrak dapat dipekatkan menggunakan *Rotary Evaporator* karena prinsip kerja dari alat tersebut yang menguapkan pelarut dibawah titik didih normalnya dengan cara menaikkan tekanan uap pelarut tersebut dengan maksud melindungi senyawa target dari degradasi panas selama penguapan (Khunaifi, 2016). Ekstrak dipekatkan menggunakan tekanan 175 psi serta rotasi 70 rpm kemudian ditunggu hingga bersisa 15 mL yang kemudian dapat dilanjutkan

pemekatannya menggunakan oven dengan suhu 40°C. Alasan penggunaan proses ini selain mempermudah proses lebih lanjut, juga dapat mengontrol kadar kekentalan ekstrak yang dibutuhkan (Sharma dan Canoo, 2016). Hasil pemekatan dapat diamati pada gambar 5.1 dimana hasilnya kemudian dilakukan perhitungan rendemen untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan menggunakan suatu bahan serbuk simplisia (Putra, 2018). Langkah perhitungan rendemen yang umum digunakan adalah dengan melakukan perhitungan persentase bobot (b/b) antara bobot ekstrak terhadap bobot serbuk simplisia yang digunakan selama proses ekstraksi (BPOM, 2008).



**Gambar 5.1** Ekstrak Peekat Etanol 96% Daun *M. crenata* C. Presl

Hasil pengolahan ekstrak ini dapat diamati pada tabel 5.3 berikut

Tabel 5.3 Hasil Ekstraksi Daun *M. crenata*

Jumlah Serbuk (g)	Jumlah Ekstrak (g)	Jumlah Pelarut (mL)	Metode Ekstraksi	Rendemen (%)
921,864	26,505	14,5 L	Ultrasonik	2,87

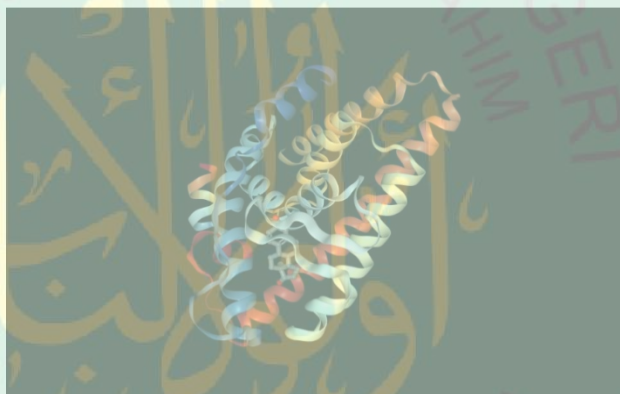
### 5.3 Preparasi Sampel *In Silico*

Preparasi terhadap sampel *In silico* menjadi langkah penting yang dilakukan untuk menghemat biaya analisis hingga waktu pengerjaan sehingga diperoleh hasil analisis yang optimal (Muchtaridi *et al.*, 2018). Proses preparasi yang dilakukan dalam metode *In silico* adalah dengan melakukan preparasi terhadap ligan maupun



protein target yang akan digunakan dalam metode *In silico* (Sliwoski et al., 2014). Sampel yang dipreparasi dalam penelitian ini adalah senyawa uji hasil dari *metabolite profiling* UPLC QToF MS/MS ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* serta protein target yaitu *Estrogen Receptor*  $\beta$  dengan organisme *Human* dan ligan internal  $17\beta$  estradiol.

Langkah awal dalam melakukan preparasi sampel dilakukan dengan cara melakukan unduhan terhadap protein target dari *Protein Data Bank* [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Protein yang sesuai dengan ketentuan target sebelumnya adalah protein *X-ray* 3OLS dan dapat diamati menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer* dalam gambar 5.2



**Gambar 5.2** Protein 3OLS dengan *ligand*  $17\beta$

Protein yang telah diunduh kemudian dilakukan preparasi awal untuk memisahkan ligan internal dengan proteinnya menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2016. Langkah ini dilakukan untuk 2 tujuan yaitu untuk mengetahui aplikasi yang sesuai digunakan serta untuk mempersiapkan protein target yang akan dilakukan penambatan dalam tahapan selanjutnya (Muchtaridi *et al.*, 2018).

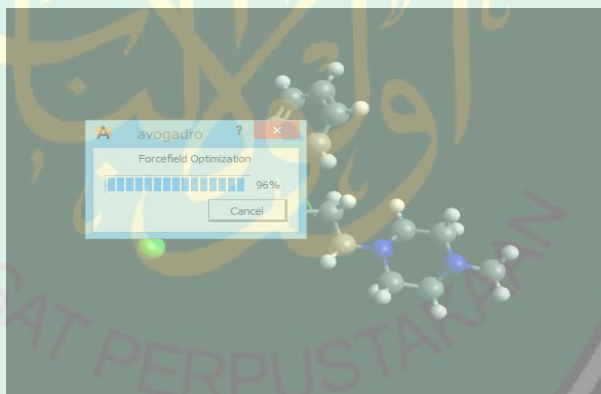
Preparasi selanjutnya dilakukan terhadap sampel senyawa uji hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* menggunakan UPLC-QToF MS/MS. Langkah ini perlu dilakukan sebagai upaya untuk mendapatkan

efisiensi waktu yang dibutuhkan dalam proses penambatan senyawa uji yang dapat diinterpretasikan oleh instrumen serta dapat mengetahui kandidat kuat senyawa uji yang memiliki aktivitas fitoestrogen dan senyawa dapat menembus sawar otak karena diharapkan senyawa tersebut dapat memiliki aktivitas antineuroinflamasi. Senyawa yang dapat diinterpretasi oleh instrumen berjumlah 75 dengan 59 diantaranya dapat diidentifikasi sebagai senyawa yang telah dikenal. Langkah selanjutnya adalah melakukan seleksi lebih lanjut dengan menggunakan SwissADME untuk membaca parameter kritis yang menggambarkan senyawa tersebut dapat melewati sawar otak. Pemilihan SwissADME sebagai *physicochemical descriptor* berkaitan dengan kemampuannya mempresentasikan hasil prediksi dari banyak senyawa tersebut kemudian memberikan rangkuman analisis sehingga lebih mudah dalam tahapan analisis maupun pemilihan senyawa inklusi dengan menampilkan mode *Boiled EGG* dimana tampilan tersebut memberikan gambaran sederhana prediksi kemampuan senyawa dalam terabsorpsi hingga dapat menembus BBB (Daina *et al.*, 2016).

Parameter kritis yang menjadi pengamatan adalah nilai TPSA yang berkaitan dengan nilai bioavailabilitas senyawa serta kemampuan senyawa untuk menembus sawar otak (Martin, 2005). Kemampuan senyawa untuk menembus sawar otak tersebut cukup kritis karena senyawa yang ditarget memiliki titik pengobatan untuk menjaga homeostasis di sistem saraf pusat (Villa *et al.*, 2016). Nilai TPSA senyawa yang dibutuhkan untuk dapat menembus sawar otak memiliki rentang 0-79 °A dimana hasilnya terdapat 19 senyawa yang dapat diamati pada tabel 5.4 serta menjadi senyawa inklusi penambatan sekaligus kandidat

senyawa fitoestrogen sebagai agen antineuroinflamasi terhadap 3OLS (Kelder *et al.*, 1999).

Langkah terakhir dalam tahapan preparasi sampel *In silico* adalah melakukan optimasi geometri terhadap ligan internal protein uji dan senyawa kandidat fitoestrogen sebagai agen antineuroinflamasi. Seluruh senyawa uji dan ligan internal dilakukan optimasi geometri menggunakan Avogadro untuk mencari struktur paling stabil dari struktur kimia yang terbentuk serta dapat diamati pada gambar 5.3. Parameter penting untuk mendapatkan struktur paling stabil adalah digunakannya metode MMFF94 yang memetakan struktur senyawa sedemikian rupa untuk mendapatkan nilai energi minimal geometri struktur. Langkah ini dilakukan untuk mempermudah mendapatkan data yang valid ketika senyawa uji ditambahkan pada 3OLS (Hanwell *et al.*, 2012).



**Gambar 5.3** Optimasi Geometri Senyawa Uji Penambatan

Tabel 5.4 Senyawa Kandidat Agen Antineuroinflamasi

Kodifikasi Senyawa	Nama Senyawa	Nilai TPSA (Å <sup>2</sup> )
MTL 6	3-Hydroxy-2H-chromen-2-one	50.44
MTL 7	Prochlorperazine	35.02
MTL 14	1-[1-(4-Methoxyphenyl)cyclohexyl]methanamine	35.25
MTL 15	1-carboxy-3-hydroxyadamantane	57.53
MTL 16	1-(7-Ethyl-1-benzofuran-2-yl)-2-[(2-methyl-2-propanyl)amino]ethanol	45.40
MTL 17	1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzimidazol-5-amine hydrochloride	50.32
MTL 20	1-(4-Butoxyphenyl)-3-(1-piperidinyl)-1-propanone (dyclonine)	29.54
MTL 22	N,N,N-Trimethyl-3-oxo-3-phenyl-1-propanaminium	17.07
DCM 2	Dibutyl phthalate	52.60
DCM 4	11-Aminoundecanoic acid	63.32
DCM 6	4-Butylaniline	26.02
DCM 10	12-Aminododecanoic acid	63.32
DCM 11	Cyclazocine	23.47
DCM 12	Trihexyphenidyl	23.47
DCM 13	Hexadecylamine	26.02
DCM 14	2-Amino-2-tetradecyl-1,3-propanediol	66.48
DCM 16	Pentadecylamine	26.02
DCM 17	3-(Hexadecylamino)-1,2-propanediol	52.49
DCM 24	2-Pyridylethylamine	38.91

#### 5.4 Penambatan Ligand-Protein

Penambatan ligan terhadap protein target 3OLS menjadi tahapan penting dalam metode *In silico* untuk mengetahui prediksi aktivitas maupun sifat fisikokimia ligan terhadap protein mulai dari hasil paling optimal hingga paling buruk (Waddod *et al.*, 2013). Tahapan ini memiliki titik kritis terutama dalam pemilihan aplikasi penambatan karena setiap aplikasi memiliki algoritma hingga prosedur teknik tertentu dalam melakukan penambatan. Hal tersebut kemudian akan mempengaruhi hasil penambatan dan analisis yang akan dilakukan maupun meminimalisasi terjadinya data bias. Prosedur dasar untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan melakukan validasi internal antara protein target dengan ligan internal yang diunduh bersamaan dari *Protein Data Bank* (Muchtaridi *et al.*, 2018).

Validasi internal sebagai upaya untuk mendapatkan aplikasi penambatan yang sesuai, melakukan pengamatan hasil nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) antara ligan dengan protein target. Nilai RMSD merupakan jarak yang ditimbulkan akibat interaksi antara ligan internal dengan protein target mulai nilai paling rendah hingga paling tinggi. Semakin kecil nilai RMSD dengan ketentuan spesifik nilai RMSD  $< 2 \text{ \AA}$ , maka semakin baik aplikasi tersebut digunakan untuk penambatan (Muchtaridi *et al.*, 2018). Validasi internal dalam penelitian ini dilakukan terhadap Autodock Vina dengan hasil yang dapat diamati pada tabel 5.5 dan dapat dinyatakan bahwa Autodock Vina sesuai digunakan untuk penambatan senyawa inklusi agen antineuroinflamsi terhadap 3OLS.

**Tabel 5.5** Hasil Validasi Internal Autodock Vina

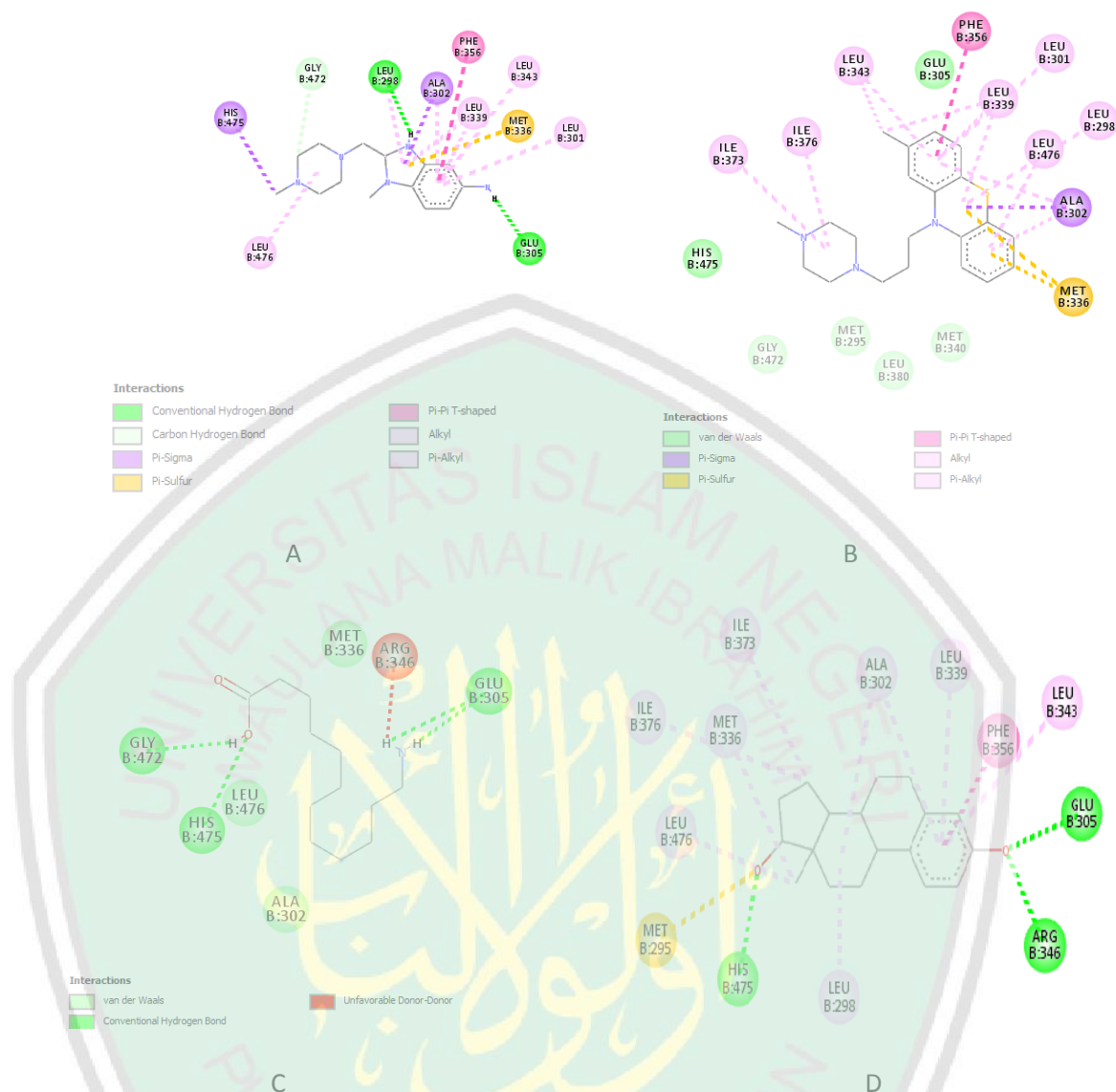
<b>Binding Affinity</b>	<b>RMSD/ Upper (Å)</b>	<b>RMSD/ Lower (Å)</b>	<b>Rata Rata RMSD (Å)</b>
-10.5	0.0	0.0	0.0
-8.7	2.698	1.258	1.987
-7.6	2.565	1.189	1.877
Rata Rata RMSD Autodock Vina			1.288

Senyawa inklusi kemudian dilakukan penambatan terhadap protein target 3OLS dengan menggunakan Autodock Vina sebagai aplikasi penambatan. Autodock Vina dipilih sebagai aplikasi penambatan karena memiliki keunggulan dalam melakukan penambatan yaitu dapat memberikan hasil penambatan mulai terbaik hingga terburuk secara tepat dan cepat (Trott dan Olson, 2010). Hasil dari penambatan dapat diamati pada tabel 5.6 dimana terdapat 3 senyawa dari 19 senyawa yang memiliki aktivitas sebagai senyawa fitoestrogen sekaligus agen antineuroinflamasi.

**Tabel 5.6** Senyawa Inklusi Sebagai Senyawa Fitoestrogen dan Agen Antineuroinflamasi.

<b>Kodifikasi Senyawa</b>	<b>Nama Senyawa</b>	<b>Nilai TPSA</b>	<b>Binding Affinity</b>	<b>Interaksi Asam Amino</b>
MTL 7	Prochlorperazine	35.02	-4.9	Agonis (Glu 305, His 475)
MTL 17	1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzimidazol-5-amine hydrochloride	50.32	-5.8	Agonis (Glu 305, His 475)
DCM 10	12-Aminododecanoic acid	63.32	-5.6	Agonis (Glu 305, His 475)
ligandb	17 $\beta$ Estradiol	-	-10.5	Agonis (Glu 305, His 475)

Hasil tersebut dapat diamati menggunakan Biovia Discovery Studio 2016 *Visualizer* dengan membandingkan antara interaksi ligan internal dengan senyawa inklusi. Pengamatan tersebut berfokus terhadap interaksi gugus farmakofor dengan asam amino ER  $\beta$  yang terjadi karena adanya ikatan hidrogen, Van der Walls dan Pi-sigma diantaranya keduanya sehingga menimbulkan aktivitas agonis. Pemilihan ikatan hidrogen, Van der Walls dan Pi-sigma karena ikatan tersebut memiliki ikatan yang cukup kuat untuk memberikan aktivitas namun tidak terlalu lama berikatan dengan reseptor sehingga memiliki sifat farmakokinetik yang tergolong baik dengan berasumsi bahwa ikatan yang terjadi merupakan gambaran dari teori interaksi pendudukan ligan terhadap makromolekul target dan dapat diamati pada gambar 5.4. Alasan selanjutnya terkait dengan pemilihan interaksi agonis karena dalam penambatan dibutuhkan senyawa yang memiliki aktivitas serupa dengan ligan internal yaitu sebagai fitoestrogen yang mampu bertindak sebagai agen antineuroinflamasi (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

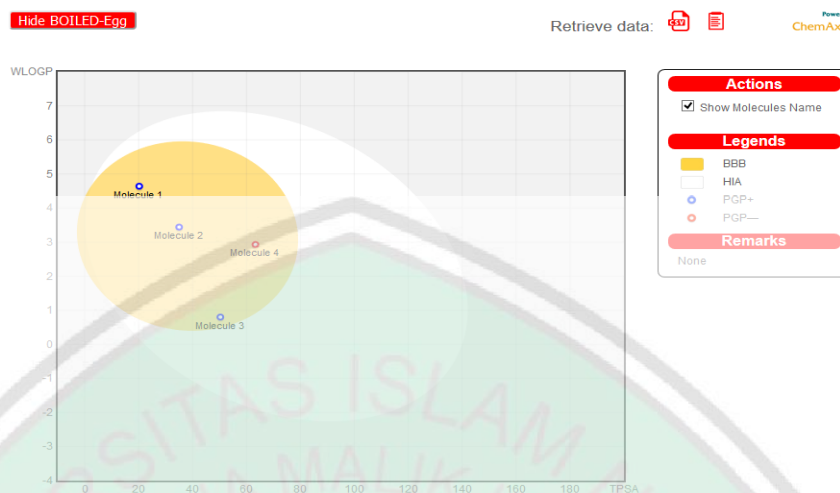


**Gambar 5.4** Analisis Gugus Farmakofor (A) MTL 7 (B) MTL 17 (C) DCM 10 (D) Kontrol

Analisis selanjutnya dilakukan untuk mengetahui sifat farmakokinetik terutama kemampuan untuk menembus sawar otak dari ketiga senyawa yang potensial menggunakan metode *Boiled-Egg* dalam SwissADME yang dapat diamati pada gambar 5.5. Senyawa dapat disimpulkan memiliki kemampuan menembus sawar otak ketika senyawa memasuki daerah “kuning telur” dalam metode tersebut (Daina *et al.*, 2016) Penggunaan metode ini dapat menganalisa sifat senyawa dengan lebih cepat serta lebih mudah dipahami oleh berbagai kalangan baik



akademisi maupun praktisi sehingga diharapkan pengembangan agen antineuroinflamasi dapat dilakukan.



**Gambar 5.5**

Molecule 1 :  $17\beta$  estradiol

Molecule 2 : Prochlorperazine;

Molecule 3 : 1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl] benzimidazol-5-amine

### 5.5 Preparasi *Cell Line* HMC3

Sel yang digunakan dalam penelitian merupakan sel mikroglia manusia yang telah dilakukan diisolasi, memiliki sifat pertumbuhan menempel pada wadah pertumbuhan serta merupakan salah satu jenis mikroglia yang sering digunakan dalam pengamatan terhadap aktivitas mikroglia secara *in vitro* dimana sel HMC 3 dikembangkan sekaligus dikomersialkan oleh ATCC. Pemilihan HMC3 menjadi objek penelitian karena HMC3 berasal dari jaringan manusia yang telah diisolasi sehingga dapat menggambarkan keadaan neuroinflamasi pada wanita postmenopause. Selain itu sel HMC3 dalam penelitian sebelumnya tidak mengekspresikan marker tertentu sebelum dilakukan induksi agen pro inflamasi yang dapat mempengaruhi hasil pengamatan (Russo *et al.*, 2018). Kegiatan preparasi sel HMC 3 dilaksanakan di LSIH Universitas Brawijaya Malang dan

diawali dengan tahapan *thawing* atau penanaman sel *ke flask* pertumbuhan yang telah berisi EMEM, FBS serta Antibiotik PenStrep sebagai media pertumbuhan yang sesuai. Sel kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C/ CO<sub>2</sub> 5% dan dilakukan penggantian ketika medium pertumbuhan mengalami perubahan dan dalam praktiknya dilakukan pergantian sebanyak 2 kali dalam seminggu (Russo *et al.*, 2018). Sel yang berada dalam flask culture diamati pertumbuhan serta persebaran sel (*confluence*) menggunakan *mikroskop inverted* yang dapat diamati dalam gambar 5.5. Pengamatan dihentikan dan dilanjutkan dalam tahapan selanjutnya ketika *confluence* sel mencapai 80-90% dalam *flask culture* karena pada tingkat sel siap mendapatkan perlakuan . Sel segera dilakukan *plating* dalam 24-well plate melalui tahapan *pasage* sel untuk melakukan preparasi pengujian aktivitas (Ma'arif *et al.*,2018).



**Gambar 5.6** Sel line HMC3 mencapai *confluence* 80-90% dengan pengamatan *Mikroskop Inverted*

### 5.6 Uji Aktivitas Antineuroinflamasi dengan Menggunakan ICC

Pengujian aktivitas antineuroinflamasi dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan larutan uji ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm. Pemilihan dosis tersebut berdasarkan hasil pengujian toksisitas ekstrak yang diberikan ke sel HMC3. Ekstrak pekat etanol 96%

diencerkan menjadi larutan baku induk dengan konsentrasi 5000 ppm dengan menambahkannya dengan tween 80 0,5% dan ditambahkan DMSO 0,5% hingga terbentuk suspensi larutan induk yang dibutuhkan dalam pengujian. Tujuan penambahan tween 80% adalah untuk mempermudah pencampuran antara ekstrak dengan pelarut yang digunakan sehingga terbentuk satu fase larutan yang siap digunakan. Proses terakhir larutan yang telah terbentuk disterilkan menggunakan milipore 0,2  $\mu\text{m}$  untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang mungkin terjadi selama pembuatan larutan uji

Sel HMC3 yang telah dipreparasi dalam 24-well *plate* diamati menggunakan mikroskop *inverted* untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan sel. Sel yang telah tingkat *confluence* sebesar 80% diaktifkan terlebih dahulu menggunakan IFN- $\gamma$  yang ditambahkan dalam media pertumbuhan sebagai aktivator sel. Pemilihan IFN- $\gamma$  sebagai aktivator sel karena IFN- $\gamma$  merupakan induktor potensial dalam mengaktifkan transkripsi genetik untuk mengekspresikan MHC II yang menjadi marker pengamatan dalam penelitian (Mojic *et al.*, 2018). Pemberian IFN- $\gamma$  dalam penelitian ini diberikan 10 ng/ $\mu\text{L}$  disetiap well berisi sel uji selama 48 jam dan dalam dosis tersebut sel dapat teraktivasi dan memasuki *phenotype* M1 (Patro *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2018)

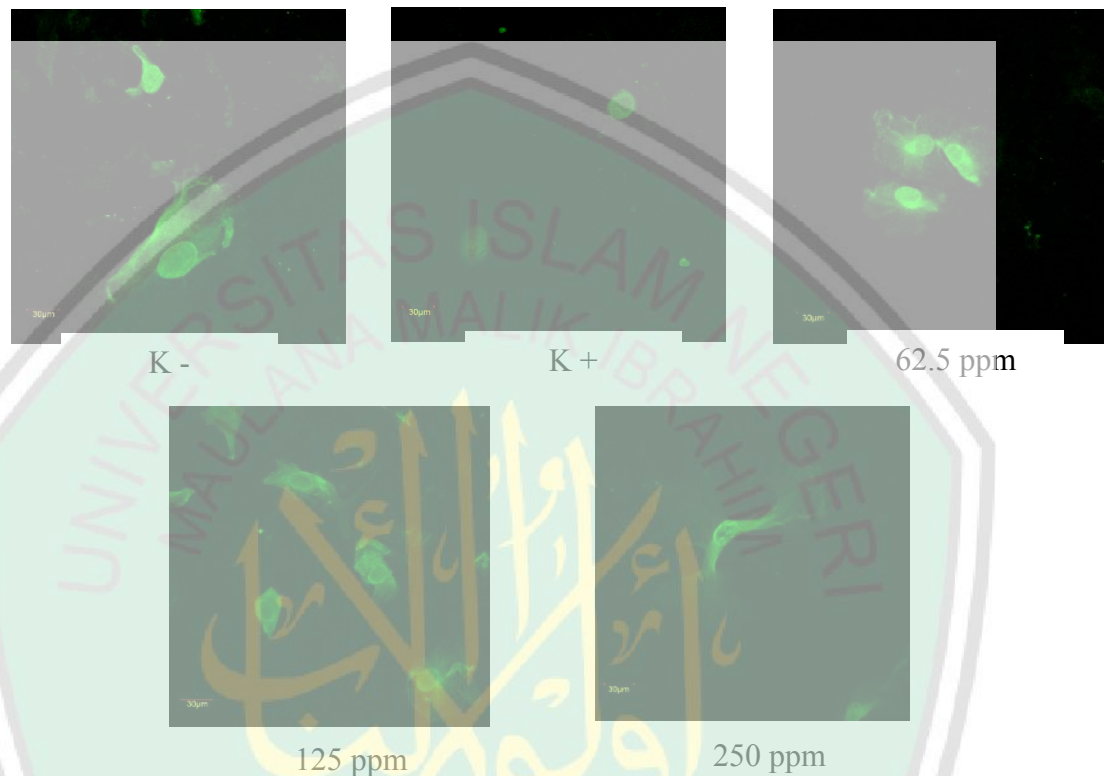
Langkah selanjutnya medium pertumbuhan digantikan dengan medium yang telah berisi masing masing dosis dalam larutan uji yang telah dipersiapkan sebelumnya. Pemberian medium dengan ekstrak tersebut dilakukan selama 24 jam dengan asumsi bahwa dalam pemberian dalam kurun waktu tersebut, sel telah berubah memasuki *phenotype* M2 serta melakukan perbaikan sel (Patro *et al.*, 2016). Pemberian ekstrak dalam penelitian tersebut untuk mengetahui potensi

senyawa dalam ekstrak sebagai sumber fitoestrogen yang mampu melakukan perbaikan sel karena terjadinya perubahan transkripsi genetik oleh IFN- $\gamma$  (Villa *et al.*, 2016). Proses selanjutnya adalah melakukan fiksasi sel yang telah masuk pemberian ekstrak uji selama 24 jam dengan *Paraformaldehyde* (PFA) 4% dalam PBS menggunakan suhu 4°C selama 24 jam.

Proses fiksasi ini dilakukan untuk menghentikan metabolisme sel sehingga dapat diamati lebih lanjut terkait ekspresi MHC II yang telah dihasilkan selama pemberian ekstrak selama 24 jam sebagai tahapan awal metode ICC. Metode ICC dipilih dalam penelitian karena metode tersebut dapat mengevaluasi keadaan sel mengekspresikan antigen yang diinginkan dalam hal ini MHC II (Taylor dan Rudbeck, 2013). Sel yang telah difiksasi PFA selama 24 jam dicuci dengan PBS untuk menghilangkan PFA yang mungkin masih tertinggal dalam *24-well plate* uji. Proses selanjutnya adalah dalam *well plate* ditambahkan Triton X-100 serta dilakukan inkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar dengan tujuan agar sel yang telah difiksasi mengalami permeabilitas sehingga MHC II yang telah diekspresikan dapat lebih mudah teramati. Proses dilanjutkan dengan melakukan pemberian BSA 2% kedalam *24-well plate* untuk menghentikan aktivitas Triton X-100 selama 30 menit dalam suhu kamar. Terakhir dalam tahapan ini *well* ditambahkan Anti-Rb MHC II dengan suhu 4°C selama 24 untuk mengikat MHC II yang terekspresikan selama proses pengujian aktivitas berlangsung (Ma'arif *et al.*, 2018).

Tahapan setelah dilakukan inkubasi dengan Anti-Rb MHC II adalah pemberian kojugat pewarna FITC selama 1 jam dalam suhu ruang untuk mengukur intensitas pendar warna yang diberikan oleh MHC II. Sel yang telah diberikan FITC kemudian diamati menggunakan CLSM karena instrumen tersebut dapat

memberikan gambaran struktur sel lebih baik serta mampu menunjukkan protein yang diekspresikan oleh sel sampel (Claxton et al., 2010). Hasilnya dapat diamati pada gambar 5.8 dimana terjadi penurunan intensitas MHC II dari kontrol negatif, dosis perlakuan 62,5 hingga 250 ppm.



**Gambar 5.7** Pengamatan CLSM (A) Kontrol Negatif (B) 62,5 ppm (C) 125 ppm (D) 250 ppm

### 5.7 Analisis Data In Vitro

Hasil dari pengamatan menggunakan CLSM kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan analisis statistik untuk mengetahui ekspresi MHC II serta mengetahui effective doses dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* sebagai agen antineuroinflamasi. Hasil yang diperoleh dari analisis awal dapat diamati dalam tabel 5.7 berikut

**Tabel 5.7** Intensitas MHC II Dosis Perlakuan Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata*

Dosis Perlakuan	Intensitas dari MHC II (AU) $\pm$ SD
Kontrol (+)	978,886 $\pm$ 88,923
Kontrol (-)	1.404,716 $\pm$ 366,645
Dosis 62,5 ppm	904,553 $\pm$ 130,320
Dosis 125 ppm	1.001,413 $\pm$ 76,636
Dosis 250 ppm	667,989 $\pm$ 26,862

Hasil berdasarkan tabel 5.7 menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak etanol 96 % ekspresi MHC II mengalami penurunan berdasarkan intensitas pendar warna yang dihasilkan. Tahapan untuk mengetahui lebih lanjut mengenai potensi ekstrak etanol 96% sebagai agen antineuroinflamasi dilakukan dalam beberapa tahapan sebagaimana berikut

#### 1. Uji Normalitas

Analisis uji normalitas digunakan untuk mengetahui keterkaitan distribusi normal model regresi antara variabel independen dan variabel dependen dalam suatu hasil pengamatan (Ghozali, 2016). Pengujian normalitas yang sering digunakan untuk melakukan analisis data adalah *Shapiro-Wilk* dan *Kolmogorov-Smirnov* dimana *Shapiro-Wilk* lebih dipilih apabila hasil pengamatan dalam suatu uji kurang dari 50 hasil. Ketentuan suatu data dapat dinyatakan normal apabila suatu data memiliki signifikansi normalitas diatas 0.05 dan hasil analisis uji normalitas ekspresi MHC II dapat diamati dalam tabel 5.8

**Tabel 5.8** Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

<b>Kelompok</b>	<b>Signifikansi</b>
Kontrol (-)	0,317
Kontrol (+)	0,212
Dosis 62,5 ppm	0,808
Dosis 125 ppm	0,815
Dosis 250 ppm	0,770

Hasil tabel tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal karena masing-masing kelompok uji dalam penelitian memiliki nilai signifikansi di atas 0.05.

Analisis lebih lanjut dilakukan untuk mengetahui homogenitas data yang telah diperoleh

## 2. Uji Homogenitas

Tahapan uji selanjutnya adalah uji homogenitas data untuk mengetahui kesamaan variasi data sampel dari sampel uji penelitian (Sugiyono, 2013). Ketentuan yang diberikan dalam pengujian homogenitas berkebalikan dengan pengujian normalitas dimana suatu sampel memiliki data yang homogen ketika suatu data memiliki nilai signifikansi kurang dari 0.05. Pengujian yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan Levene's test dimana hasilnya dapat diamati pada tabel 5.9 berikut

**Tabel 5.9** Hasil Uji Homogenitas *Levene's test*

<b><i>Levene's test</i></b>	<b>Signifikansi</b>
7,307	0,005

Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa signifikansi data memiliki nilai kurang dari 0.005 dan dapat disimpulkan bahwa meskipun data memiliki distribusi normal namun tidak memiliki data yang homogen sehingga dilakukan pengujian uji lanjutan non parametrik.

### 3. Analisis Korelasi data

Data yang diperoleh berdasarkan analisis yang telah dilakukan sebelumnya tergolong data non parametrik sehingga untuk mengetahui hubungan korelasi antara peningkatan dosis dan penurunan ekspresi MHC II dilakukan menggunakan Analisis Spearman Rho seperti dalam tabel 5.10 berikut

**Tabel 5.10** Uji Korelasi *Spearman Rho*

		Perlakuan	Intensitas
<b>Perlakuan</b>	<i>Correlation Coefficient</i>	1,000	-0,502*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	.	0,000
	N	15	15
<b>Intensitas</b>	<i>Correlation Coefficient</i>	-,502**	1,000
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,000	.
	N	15	15

Berdasarkan hasil pengujian korelasi tersebut diperoleh koefisien korelasi 0.502\* yang dapat diterjemahkan bahwa peningkatan dosis dengan penurunan ekspresi dosis memiliki korelasi yang kuat. Selanjutnya dalam intensitas tersebut ditemukan tanda (-) yang dapat diterjemahkan bahwa kurva akan bergerak dari sumbu ordinat tinggi menuju sumbu ordinat dimana secara sederhana terjadi penurunan nilai sumbu ordinat ketika sumbu axis terus bertambah.



#### 4. Uji Beda Non-parametrik

Uji non parametrik yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kruskal Wallis yang bertujuan untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok data sampel dengan ketentuan apabila nilai signifikansi data kurang dari 0.05 maka  $H_0$  ditolak.  $H_0$  yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel berasal dari populasi yang sama (Hidayat dan Istiadah, 2011). Hasil dari uji beda menggunakan Kruskal Wallis dapat diamati pada tabel 5. 11

**Tabel 5.11** Hasil Uji Beda *Kruskal-Wallis test*

<i>Kruskal-Wallis test</i>	Signifikansi
8,267	0,082

Hasil pengujian menunjukkan bahwa signifikansi data lebih dari 0.05 yang dapat diterjemahkan bahwa mean ekspresi MHC II setiap dosis perlakuan memiliki beda tidak signifikan. Meskipun nilai mean signifikansi uji beda menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan dalam tiap kelompok pengujian, pengujian sebelumnya menunjukkan adanya hubungan yang erat antara peningkatan dosis dengan penurunan nilai intensitas MHC II. Langkah untuk mengetahui perbedaan kelompok secara lebih mendetail harus dilakukan menggunakan pengujian *post hoc*.

#### 5. Analisis Probit untuk mengetahui *Effective Dose* Ekstrak

Analisis sebelumnya telah menyatakan bahwa terdapat korelasi antara kenaikan pemberian dosis dengan penurunan ekspresi MHC II dalam pengujian aktivitas antineuroinflamasi. Selanjutnya perlu dilakukan analisis mengenai dosis yang paling efektif atau  $ED_{50}$  untuk menurunkan intensitas MHC II dan data

tersebut akan menjadi data acuan dalam pengembangan sediaan antineuroinflamasi. Tahapan dalam penentuan ED<sub>50</sub> dilakukan dengan analisis probit dimana hasilnya dapat diamati pada tabel 5.12 dan 5.13

**Tabel 5.12** Hasil Uji Chi-Square

		Chi-Square	Df	Signifikansi
PROBIT	<i>Pearson Goodness-of-Fit Test</i>	1598,691	10	0,000*

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

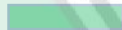
**Tabel 5.13** Hasil Nilai Probabilitas Uji *Chi-Square*

Probability	Estimate
0,400	5,246
0,450	4,515
0,500	3,795
0,550	3,076
0,600	2,345

Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki nilai ED<sub>50</sub> 3,795 ppm dan penjelasan pada tabel 5.12 memperkuat penjelasan bahwa dengan pemberian 3,795 ppm, ekstrak *M. crenata* diduga memiliki kandungan senyawa fitoestrogen serta memiliki aktivitas farmakologi dalam antineuroinflamasi. Tujuan utama dari penggunaan ekstrak etanol 96% sebagai sampel pengujian ini adalah membuktikan bahwa *M. crenata* memiliki potensi sebagai sumber fitoestrogen sekaligus agen antineuroinflamasi sehingga perlunya dilakukan analisis lebih lanjut mengenai uji beda aktivitas isolat fitoestrogen dengan ekstrak etanol 96% menggunakan uji LSD dimana memiliki ketentuan apabila signifikansi perlakuan memiliki nilai lebih dari 0.05 terhadap

isolat fitoestrogen dapat diterjemahkan bahan tersebut memiliki aktivitas serupa dan memiliki potensi sebagai agen antineuroinflamasi baru. Hasil uji LSD dapat diamati pada tabel 5.14

**Tabel 5.14** Hasil Uji *Least Significant Difference* (LSD)

Kelompok	Kontrol (+)	Kontrol (-)	Dosis 62,5 ppm	Dosis 125 ppm	Dosis 250 ppm	Keterangan
Kontrol (+)		0.014	0.343	0.199	0.953	 Dosis 250 ppm dapat memberikan efek serupa dengan K (+) dan memiliki efek antineuroinflamasi terhadap K (-).
Kontrol (-)	0.014		0.077	0.142	0.016	
Dosis 62,5 ppm	0.343	0.077		0.710	0.372	
Dosis 125 ppm	0.199	0.142	0.710		0.218	
Dosis 250 ppm	0.953	0.016	0.372	0.218		

Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis 250 ppm dapat memberikan efek terapi antineuroinflamasi dan memiliki aktivitas yang setara dengan isolat fitoestrogen.

### 5.8 Potensi Ekstrak Etanol 96% *M. crenata* menjadi Agen Antineuroinflamasi

*M. crenata* secara etnofarmasi memiliki potensi sebagai bahan berkhasiat obat seperti untuk peluruh air seni dan pada penelitian lebih lanjut memiliki aktivitas antiosteoporosis (Rindawati, 2015; Adityara, 2017; Widiasari, 2017). Pemanfaatan yang beragam tersebut tidak terlepas dari beragam kandungan yang terdapat dalam *M. crenata* dengan kandungan metabolit sekunder seperti steroid, alkaloid serta flavonoid (Agil *et al.*, 2017). Potensi yang disertai dengan kandungan tanaman *M. crenata* tersebut kemudian diamati dan diteliti lebih lanjut dimana

hasilnya ditemukan senyawa serupa dengan estrogen yang ditemukan pada tubuh wanita menggunakan metode RIA (Laswati, 2007). Hasil tersebut kemudian diteliti lebih lanjut menggunakan instrumen analisis dimana didapatkan senyawa yang berperan estrogenik menggunakan GC MS yang selanjutnya dikembangkan dengan melakukan analisis terhadap isolat n-Heksana daun *M. crenata* dimana ditemukan senyawa serupa estrogen dengan gugus fungsi O-H dan C-H (Ma'arif et al., 2016; Sari, 2017). Hasil tersebut kemudian menjadi acuan awal pengembangan *M. crenata* sebagai sumber terbaru fitoestrogen.

Fitoestrogen menjadi pilihan yang tepat untuk menangani berbagai permasalahan kesehatan salah satunya adalah defisiensi estrogen yang dialami oleh wanita *pasca menopause* karena memiliki tingkat keamanan yang tergolong tinggi. Defisiensi tersebut dapat terjadi karena menurunnya produksi estrogen pada tubuh wanita *pasca menopause* yang pada akhirnya mempengaruhi homeostasis tubuh seperti terjadinya penurunan fungsi kognitif maupun memori (Kovac, 2014). Keadaan patologis tersebut dikenal dengan istilah neurodegeneratif yang disebabkan terjadinya neuroinflamsi dan salah satu langkah upaya penanganannya adalah pemberian fitoestrogen sebagai agen antineuroinflamasi terhadap penderita (Alldredge et al. 2013). Gambaran tersebut kemudian menjadi urgensi pengembangan *M. crenata* sebagai agen antineuroinflamasi yang potensial karena telah dikenal oleh masyarakat secara luas.

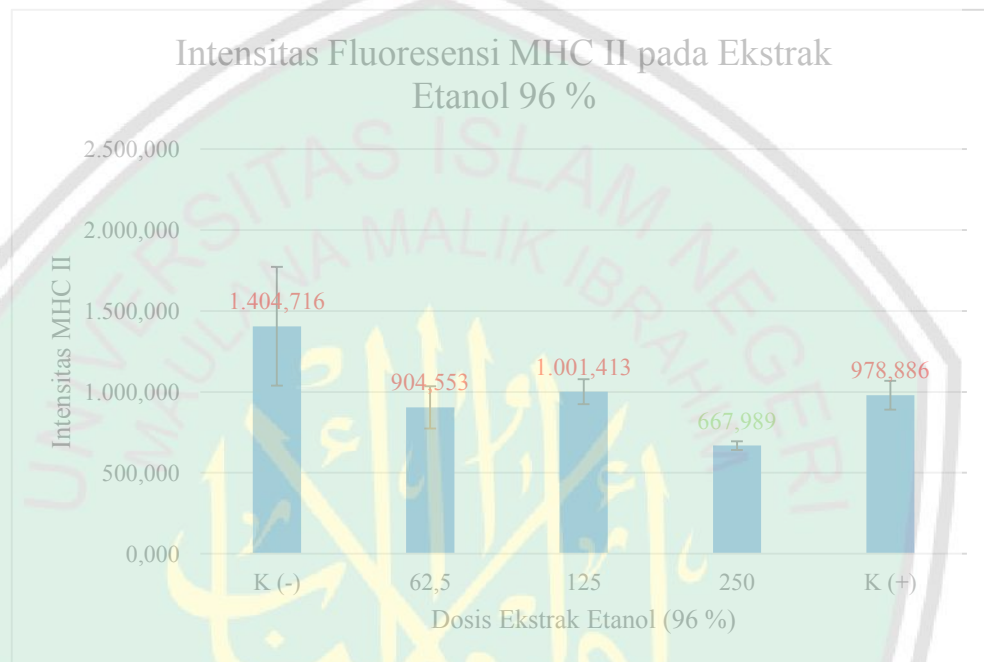
Fitoestrogen yang tergolong senyawa bahan alam perlu dilakukan langkah pengujian untuk mengetahui khasiat serta efektifitasnya sebelum diberikan kepada masyarakat. Langkah awal pengujian yang paling relevan dilakukan untuk mengetahui efektifitas senyawa diduga fitoestrogen dalam ekstrak etanol 96% daun

*M. crenata* adalah melakukan penambatan molekular dengan memanfaatkan keunggulan metode *In silico* (Muchtaridi, 2018). Pendekatan *In silico* memberikan keunggulan untuk membuktikan hipotesis awal diantaranya membutuhkan waktu yang singkat, murah serta dapat menjelaskan secara jelas mekanisme yang mungkin terjadi ketika suatu senyawa bahan alam masuk kedalam tubuh (Waddod *et al.*, 2013; Sliwoski *et al.*, 2014). Hasil dari pengamatan *In silico* menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terdapat 3 senyawa yang memiliki potensi yang kuat sebagai agen antineuroinflamasi karena memiliki aktivitas agonis  $17\beta$  estradiol terhadap ER- $\beta$ . Selain itu aktivitas tersebut disertai dengan kemampuan senyawa untuk menembus sawar otak sehingga senyawa tersebut dapat berikatan atau berinteraksi agonis dengan ER- $\beta$ . Namun pengujian *In silico* yang tergolong prediksi ini perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengetahui manfaat ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap ER- $\beta$  (Noori dan Spanagel, 2013).

Pengujian yang dapat dilakukan untuk membuktikan prediksi serta melengkapi pendekatan *In silico* adalah dilakukannya pendekatan *In vitro* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan mengamati ekspresi sel yang mendapatkan perlakuan ekstrak (Ma'arif *et al.*, 2018). Salah satu sel yang sesuai digunakan untuk mengamati aktivitas antineuroinflamasi adalah sel HMC3 yang mendapatkan induksi IFN- $\gamma$ . Induktor tersebut cukup relevan untuk menggambarkan keadaan patologis seseorang yang mengalami neuroinflamasi dengan terjadinya peningkatan ekspresi MHC II karena terjadinya defisiensi estrogen (Mojic *et al.*, 2018). Hasil pengerjaan *In vitro* tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi MHC II yang diamati dengan metode

ICC berbantu CLSM dan menunjukkan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas fitoestrogen sebagai agen antineuroinflamasi yang dapat diamati pada grafik grafik 5.1 berikut

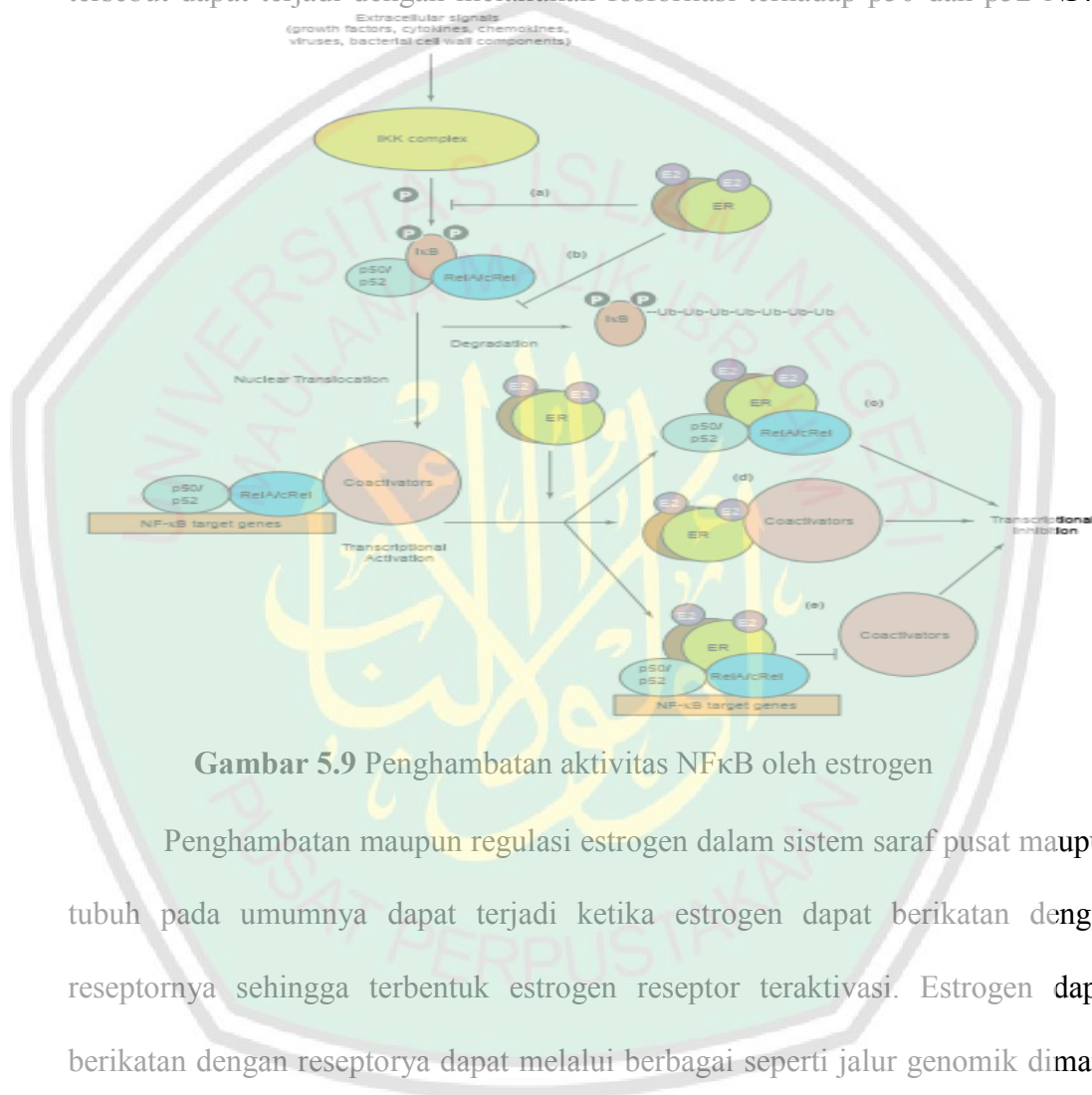
**Grafik 5.1** Hasil Pengujian Antineuroinflamasi bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*



■ = Dosis 250 ppm memiliki nilai beda terhadap kontrol negatif dan setara terhadap kontrol positif

Keterkaitan fitoestrogen dengan aktivitas antineuroinflamasi tidak terlepas dari kemiripan struktur, afinitas bahkan aktivitas fitoestrogen dengan estrogen. Estrogen dikenal luas sebagai regulator sistem organ tubuh salah satunya adalah sistem imun (Rettberg *et al.*, 2013; Ma,arif *et al.*, 2018). Salah satu peranan estrogen yang ditemukan dalam sistem imun sistem saraf pusat adalah menjaga homeostasis sel neuron. Peranan tersebut dapat terjadi dengan melakukan regulasi katekolamin untuk menghambat aktivasi NFκB oleh IFN-γ maupun mediator inflamasi lain dengan cara melakukan fosforilasi p38 TLR4 (Villa *et al.*, 2016). Mekanisme

estrogen dalam upaya menjaga homeostasis sistem saraf pusat adalah dengan berikatan dengan estrogen reseptor kemudian melakukan hambatan langsung terhadap NF $\kappa$ B agar tidak terekspresi protein maupun mediator peradangan seperti MHC II, IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  maupun mediator peradangan lainnya. Upaya penghambatan tersebut dapat terjadi dengan melakukan fosforilasi terhadap p50 dan p52 NF $\kappa$ B



**Gambar 5.9** Penghambatan aktivitas NF $\kappa$ B oleh estrogen

Penghambatan maupun regulasi estrogen dalam sistem saraf pusat maupun tubuh pada umumnya dapat terjadi ketika estrogen dapat berikatan dengan reseptornya sehingga terbentuk estrogen reseptor teraktivasi. Estrogen dapat berikatan dengan reseptorya dapat melalui berbagai seperti jalur genomik dimana estrogen dapat berikatan dengan ER- $\beta$  dan ER- $\alpha$ , melalui jalur non genomik dengan berikatan dengan faktor transkripsi lain yang dapat memberikan efek estrogenik maupun melalui jalur berikatan dengan ligan tertentu memberikan estrogenik terutama ketika estrogen berperan dalam aktivitas antioksidan (Cui *et al*, 2013; Vrtacni *et al.*, 2014). Penjelasan tersebut secara sederhana menggambarkan bahwa

untuk estrogen dalam berperan sebagai agen antineuroinflamasi dapat melewati berbagai jalur untuk berikatan dengan reseptornya. Hal tersebut kemudian menjadi permasalahan karena dalam pemberian dosis dalam rentang tertentu akan memberikan aktivitas yang beragam dan cenderung tidak mematuhi kaidah paraselsus dimana dengan penambahan dosis, aktivitas akan mengalami peningkatan yang dikenal dengan fenomena *non monotonic dose responses* (NMDR) (Li *et al.*, 2007).

Non monotonic sering ditemukan dalam pengujian aktivitas hormonal maupun senyawa steroid karena terjadinya beberapa faktor penyebab berkaitan dengan interaksinya dengan target pengobatan. Hasil yang diperoleh dari pengujian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* sebagai agen antineuroinflamasi juga mengalami NMDR. Syarat suatu pengujian mengalami fenomena NMDR diantaranya adalah kelompok perlakuan harus lebih dari 3 kelompok uji serta memiliki nilai kesesuaian Calabrese-Blain lebih dari 2 dimana pengujian aktivitas antineuroinflamasi memiliki kelompok uji sebanyak 5 kelompok dan memiliki nilai kesesuaian diatas 8 sehingga data dapat dikategorikan memiliki kesesuaian *moderate*. Fenomena NMDR dapat teramati pada dosis pemberian 62.5 ppm yang dapat menurunkan intensitas MHC II, mengalami kenaikan intensitas MHC II pada dosis 125 ppm dan kembali dapat menurunkan intensitas MHC II kembali pada dosis 250 ppm. Penjelasan terjadinya kenaikan intensitas MHC II pada dosis 125 ppm terkait dengan terjadinya kejenuhan ER maupun terjadinya kerusakan ER karena ER sisi aktif ER yang terenuhi oleh estrogen. Sebaliknya setelah dosis ditambahkan maka nilai intensitas MHC II mengalami penurunan kembali karena diduga terjadinya interaksi estrogen dengan ligand maupun faktor transkripsi dalam



sel yang dapat menimbulkan aktivitas estrogenik yang bersesuaian dengan penjelasan sebelumnya (Li *et al.*, 2007; Lagarde *et al.*, 2015).

### 5.9 Integrasi Penelitian dengan Kajian Al-Qur'an

Manusia sebagai makhluk ciptaan Allah SWT melewati fase fase pertumbuhan serta perkembangan seiring dengan berjalannya waktu. Fase tersebut berawal dari penciptaan manusia dari nutfah menjadi seseorang yang memiliki kemandirian dalam beraktivitas hingga manusia mengalami masa penuaan. Fase yang dialami manusia tersebut apabila disimpulkan membentuk sebuah kurva normal dimana keadaan manusia yang berasal dari sesuatu yang lemah menjadi seseorang yang kuat dan seiring bertambahnya waktu akan mengalami kemunduran kekuatan dan menjadi lemah kembali di masa tuanya. Gambaran tentang kurva tersebut dijelaskan oleh Allah SWT dalam Q.S Ar Rum ayat 54 sebagaimana berikut

﴿اللَّهُ الَّذِي خَلَقَكُمْ مِنْ ضَعْفٍ ثُمَّ جَعَلَ مِنْ بَعْدِ ضَعْفٍ قُوَّةً ثُمَّ جَعَلَ مِنْ بَعْدِ قُوَّةٍ ضَعْفًا وَشَيْبَةً يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ وَهُوَ الْعَلِيمُ الْقَدِيرُ﴾

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

Perubahan yang dapat teramati sesuai dengan ayat tersebut teramati dalam berbagai aspek diantaranya adalah gaya bicara, perilaku khas hingga pada gerakan dan

kecepatan untuk merespon sesuatu yang menurun sebagaimana seorang balita. Mobilitas menjadi lamban dan akhirnya banyak pekerjaan yang sulit untuk dilakukan kembali (Shihab, 2013).

Perubahan yang dialami oleh seseorang menjadi sosok yang lemah sebagaimana dalam awal kehidupan tersebut adalah konsekuensi yang harus diterima karena terjadinya penurunan fungsi fisiologis tubuh. Berbagai organ mulai mengalami kemunduran kemampuan, salah satu tanda penurunan yang dapat teramati secara jelas adalah tanggalnya gigi seseorang seiring dengan berjalannya waktu. Kemampuan untuk mencerna makanan dan memenuhi nutrisi tubuh mengalami penurunan dan cenderung tidak tercukupi (Mutaqin, 2017). Hal ini berdampak pada munculnya penyakit degeneratif khas yang muncul pada diri seseorang seperti penjelasan sebelumnya seperti kepikunan maupun gangguan kognitif (Kovac, 2014).

Penjelasan mengenai munculnya penyakit karena terjadinya fase penuaan dan menurunnya fungsi tubuh seseorang dapat diamati lebih mudah terhadap seorang wanita yang mengalami penuaan. Allah SWT dalam Firman-Nya menjelaskan keterkaitan tersebut dalam QS. An Nur ayat 60 sebagaimana berikut

وَالْقَوَاعِدُ مِنَ النِّسَاءِ اللَّاتِي لَا يَرْجُونَ نِكَاحًا فَلَيْسَ عَلَيْهِنَّ جُنَاحٌ أَنْ  
يَضَعْنَ ثِيَابَهُنَّ غَيْرَ مُتَبَرِّجَاتٍ بِزِينَةٍ وَأَنْ يَسْتَعْفِفْنَ خَيْرٌ لَهُنَّ وَاللَّهُ  
سَمِيعٌ عَلِيمٌ ﴿٦٠﴾

*Artinya : Dan perempuan-perempuan tua yang telah terhenti (dari haid dan mengandung) yang tiada ingin kawin (lagi), tiadalah atas mereka dosa menanggalkan pakaian mereka dengan tidak (bermaksud) menampakan*

*perhiasan, dan berlaku sopan adalah lebih baik bagi mereka. Dan Allah Maha Mendengar lagi Maha Bijaksana*

Pemaknaan ayat tersebut menekankan perubahan fisiologis wanita mengenai terhentinya haid dan penurunan sistem reproduksi pada kalimat لَا يَرْجُونَ نِكَاحًا. Terhentinya haid tersebut menjadi penanda terjadinya penuaan pada tubuh seorang wanita yang dikenal dengan istilah *postmenopause* serta akan diikuti dengan penyakit khas seperti gangguan kardiovaskular maupun kepikunan (Alldredge *et al.*, 2013; Setiawan, 2017). Fase terhentinya fase haid yang dialami oleh seorang wanita berkaitan dengan terjadinya penurunan fungsi hormonal yaitu penurunan fungsi hormon estrogen. Hormon estrogen yang memiliki peran dalam menjaga homeostasis tubuh wanita mengalami penurunan jumlah bahkan kehilangan fungsi yang disebabkan berbagai faktor salah satunya adalah perubahan genetik karena kurangnya asupan gizi yang dibutuhkan oleh seorang wanita pada masa tuanya (Mutaqin, 2017).

Konsekuensi yang harus diterima oleh seorang wanita lanjut usia salah satunya adalah kemunculan penyakit khas berupa kepikunan seperti dalam penjelasan sebelumnya yang disebabkan oleh keadaan neurodegeneratif. Keadaan neurodegeneratif tersebut dapat terjadi karena neuroinflamasi yang disebabkan oleh penurunan jumlah hingga fungsi estrogen. Hormon estrogen dalam penjelasan sebelumnya memiliki peran menjaga homeostasis tubuh seorang wanita dimana estrogen berperan menstimulasi senyawa katekolamin sehingga homeostasis sistem imun maupun sistem saraf pusat dapat terjaga (Alldredge *et al.*, 2013; Kovac, 2014).

Setiap penyakit sebagaimana sabda rasulullah memiliki obatnya masing-masing termasuk penyakit yang menyertai penuaan seperti neurodegeneratif dimana dibutuhkan peran generasi muda serta ahli pengobatan. Penjelasan tersebut tidak mengupayakan untuk menghambat masa penuaan namun mengurangi resiko penyakit yang menyertai masa penuaan salah satunya kepikunan. Langkah tersebut berupaya untuk membantu orang tua untuk dapat meningkatkan kualitas hidup bahkan kualitas ibadah seseorang. Alasan tersebut berkaitan dengan kualitas ibadah dari seorang lansia yang memiliki kaitan erat dengan tingkat kesehatan seseorang yang memasuki masa tua. Penelitian membuktikan bahwa seseorang yang memiliki tingkat religius lebih tinggi memiliki kekebalan fisik (Hurlock, 2002; Mutaqin, 2017).

Salah satu langkah yang dapat dilakukan adalah memberikan kepedulian berupa dukungan kepada orang tua secara psikologis maupun dukungan kesehatan dengan memanfaatkan kekayaan alam yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Kepedulian dan perbuatan baik tersebut menjadi kewajiban syar'i bagi diri seorang muslim untuk meringankan berbagai kesulitan hidup orang tua (An Nabrawi, 2006). Penjelasan tersebut kemudian menjadi awal pengembangan sediaan antineuroinflamasi menggunakan tanaman *M. crenata* yang memiliki kandungan fitoestrogen yang mampu menjaga homeostatis sistem imun dan sistem saraf pusat (Alldredge *et al.*, 2013).

Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur senyawa bahkan aktivitas yang menyerupai dengan estrogen maupun estradiol yang ditemukan dalam mamalia (Sirotkin dan Harrath, 2014). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, *black cohosh*, kedelai maupun kacang-kacangan

lainnya (Michel *et al.*, 2013). Beragam kekayaan dan manfaat alam yang telah diciptakan oleh Allah SWT tersebut perlu dikembangkan lebih lanjut yang bersesuaian dengan Q.S. Asy Syura ayat 7

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

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

Ayat diatas yang lebih menekankan dalam kalimat *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* dimana memiliki arti tumbuh tumbuhan yang baik. Kalimat tersebut menjelaskan bahwa salah satu tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang dapat memberikan manfaat dalam kehidupan manusia dimana salah satunya adalah tumbuhan berkhasiat obat. Penjelasan tafsir untuk penggalan ayat diatas ditambah pada tafsir as Showi dimana ditemukan kalimat *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* yang mengindikasikan Allah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat sehingga mendatangkan suatu kebaikan. (Lajnah, 2009). Selain itu penggalan manfaat tumbuhan sebagai sumber fitoestrogen ini juga bersesuaian dengan hadits Rasulullah SAW "Berobatlah kamu, karena sesungguhnya Dzat yang membuat penyakit, Dia pula yang membuat obatnya." (Riwayat Ahmad). (Qardhawi, 2008).

Berdasarkan hadits tersebut sebagai praktisi kesehatan perlu melakukan kajian kajian tentang pengobatan dengan memanfaatkan berbagai nikmat yang telah diberikan oleh Allah SWT baik berupa alam sekitar maupun kecerdasan akal. Hadits tersebut membahas bahwa obat bukan muncul dari “langit” namun kita sebagai perantara harus memaksimalkan apa yang telah dimiliki untuk mengembangkan pengetahuan sehingga didapatkan obat untuk suatu penyakit.

## BAB VI

### PENUTUP

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian Studi *In silico* dan *In vitro* Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* C. Presl dapat ditarik kesimpulan diantaranya adalah

- 1) Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* mengandung senyawa agonis 3OLS diantaranya adalah *Prochlorperazine*, *1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzimidazol-5-amine*, *11-Aminododecanoic acid*.
- 2) Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas antineuroinflamasi dengan menurunkan MHC II.
- 3) Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki ED<sub>50</sub> 3,725 ppm sebagai agen antineuroinflamasi.

#### 6.2. Saran

Berdasarkan penelitian Studi *In silico* dan *In vitro* Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* C. Presl peneliti memberikan saran diantaranya adalah

- 1) Studi *In silico* ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* perlu dikembangkan dengan melakukan pengamatan menggunakan *molecular dynamics*.
- 2) Studi *In vitro* etanol 96% daun *M. crenata* perlu dikembangkan dengan melakukan pengamatan terhadap marker pro antineuroinflamasi sehingga potensi *M. crenata* dapat teramati lebih baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman, N. H., dan Olalere, O. A. 2016. A Comparative Review Of Conventional And Microwave Assisted Extraction In Capsaicin Isolation From Chili Pepper. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. Vol 10 (10) : 263-275.
- Adityara, R. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula femur mencit betina. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Afriastini, J. J. 2003. *Marsilea crenata* Presl. Dalam: *de Winter WP*, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI.
- Agil, M., Kusumawati, I., Purwitasari, N. 2017. Phenotypic Variation Profile of *Marsilea crenata* Presl. Cultivated in Water and in the Soil. *Journal of Botany*. 7232171.
- Akbar, A.A., Fianto, A.Y.A., Sutikno. 2014. Penciptaan Buku Referensi Masakan Semanggi Sebagai Upaya Pelestarian Kuliner Tradisional Surabaya. *Art Nouveau*. Vol 3 (1).
- 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.
- Anwar, C. 1994. *Pengantar Praktikum Kimia Organik*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Arsyad, M. N. 2001. *Kamus Kimia Arti dan Penjelasan Ilmiah*. Jakarta: Gramedia.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norularni. N. A. N., Omar, A. K. M. 2013. Technique for Extraction of Bioactive Compound from Plant Material. *J. Food Engineering*. 117 : 426-436.

- Banu, K. S., dan Cathrine, L. 2015. General Techniques Involved in Phytochemical Analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*. Vol 2 (5).
- Bernasconi. 1995. *Teknologi Kimia 2*. Jakarta: Pradya Paramitha.
- 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
- Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. 2010. Laser Scanning Confocal Microscopy. *Der Hautarzt*.
- Cui, J., Shen, Y, Li, R. 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways during Ageing: From Periphery to Brain. *Trends Mol Med*. 19(3).
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. 2017. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. Vol.7 (42717).
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan*. Jakarta: Direktorat Jenderal POM Republik Indonesia.
- Emilan, T., Kurnia, A., Utami, B., Diyani, L. N., Maulana, A. 2011. *Konsep Herbal Indonesia*. Depok : Universitas Indonesia
- 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.
- Esclapez, M. D., Garcia-Perez, J. V., Mulet, A., Carcel, J. A. 2011. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Review*. Vol 3 : 108 – 120.
- Ghozali, Imam. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Grimholt, U. 2015. MHC and Evolution in Teleosts. *Biology*. Vol 5 (6).



- Handa, S. S. 2007. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO
- Hanna, S., Etzioni A. 2014. MHC Class I and II Deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. Vol 134 (2).
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R. 2012. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics*. Vol. 4:17.
- Hardjono, S. 2013. Sintesis dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksi)urea dan 1-(4- klorobenzoiloksi)urea. *Berkala Ilmia Kimia Farmasi*. 2 (1).
- Hurlock, E. B. 2002. *Psikologi Perkembangan: Suatu Pendekatan Sepanjang Rentang Kehidupan*. Jakarta: Erlangga.
- Jahangiri, Y., Ghahremani, H., Torghabeh, J. A., Salehi, E. A. 2011. Effect of Temperature and Solvent on the Total Phenolic Compounds Extraction from Leaves of Ficus Carica. *JOCPR*. Vol. 5 (3).
- Jantaratnotai A,N., Utaisincharoen B,P., Sanvarinda A,P., Thampithak C,A., Sanvarinda, Y. 2013. Phytoestrogens Mediated Anti-Inflammatory Effect Through Suppression Of IRF-1 and PSTAT 1 Expressions in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology* 17 : 483–488.
- Ji, M.X., dan Yu, Q. 2015. Primary Osteoporosis in Postmenopausal Women. *Chronic Diseases And Translational Medicine*. Vol. 1-13.
- Johan, A. K. 2016. Uji In Silico Senyawa Genistein sebagai Ligan pada Reseptor Estrogen Beta. *Skripsi*. Yogyakarta: Univesitas Sanata Dharma.
- Kanazawa, M ., Ninomiya, I., Hatakeyama, M., Takahashi, T., dan Shimohata, T. 2017. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *Int. J. Mol. Sc*. 18 (2135).

- Katzung, Bertram G., 2004, *Farmakologi Dasar dan Klinik* Ed. I. Jakarta: Salemba Empat.
- Kelder, J., Grootenhuis, D. J. P., Bayada, D. M., Delbressine, P. C. L., Ploemen, J. P. 1999. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharmaceutical Research*. Vol. 16 (10).
- Ketaren. 1988. *Teknologi Minyak dan Minyak Pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kettenmann, H dan Verkhratsky, A. 2013. *Neurosciences in The 21st Century*. Singapore: Springer Science+Business Media.
- Kettenmann, H., Hanisch, U-K., Noda, M., dan Verkhratsky, A. 2011. Physiology of Microglia. *Physiol Rev*. Vol. 91.
- Khunaifi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (ten.) Steenis) Terhadap Bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Klempin, F dan Kempermann, G. 2007. Adult Hippocampal Neurogenesis and Aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 257:271–280.
- Kovacs, G.G. 2014. Current Concepts of Neurodegenerative Diseases. *Emj Neurol*. 1:78-86.
- Kovacs, G.G. 2016. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning Towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.*. 17, 189.
- Kulkarni, A., Ganesan, P., dan O'donnel, L. A. 2016. Interferon Gamma: Influence on Neural Stem Cell Function in Neurodegenerative and Neuroinflammatory Disease. *Libertas Academica*. 9 (S1).
- Lajnah Pentashih al Qur'an. 2009 *Tafsir al Qur'an tematik: kesehatan dalam perspektif Al-Quran*. Jakarta: Lajnah pentashihan Al-Qur'an.

- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47 (2).
- Lattante, S., Perulli, A., Anni, M. 2014. Characterization by Confocal Laser Scanning Microscopy of the Phase Composition at Interfaces in Thick Films of Polymer Blends. *Journal of Polymers*. 541248
- Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. 2012. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. Florida: CRC Press.
- 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.
- Lisak, R. P., Bealmear, B., Benjamins, J.A. 2016. Schwann cell differentiation inhibits interferon-gamma induction of expression of major histocompatibility complex class II and intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Neuroinflammation*. 295–296 (2016) 93–99.
- Ma'arif, B. 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid dari Ekstrak n Heksan Daun *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Ma'arif, B. 2015. Aktivitas Ekstrak n-Heksana dan Fraksi Hasil Pemisahan Daun *Marsilea crenata* Presl. terhadap Diferensiasi Sel Preosteoblas MC3T3-E1 melalui Pengukuran Alkaline phosphatase In vitro. *Tesis*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Ma'arif, B., 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).

- Martin, Y. C. 2005. A Bioavailability Score. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 48 (9).
- 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.
- Medina-Torres, N., Ayora Talavera, T. Espinosa Andrews, H., Sanchez, A., Pacheo, N. 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. Vol 7 (47).
- Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med.* 79, 514–532.
- Muchtaridi, M., Dermawan, D., Yusuf, M. 2018. Molecular Docking, 3D Structure-Based Pharmacophore Modeling, and ADME Prediction of Alpha Mangostin and its Derivatives against Estrogen Receptor Alpha. *J Young Pharm.* Vol 10 (3).
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Vol. VII (2).
- Mutaqin, J. Z. 2017. Lansia dalam Al-Qur'an Kajian Term (Tafsir Asy Syaikh, Al Kibar, Al Ajuz, Ardzal Al Umur). Skripsi. Semarang: UIN Walisongo
- Naresh, K., Bhawani, S., Kumar, T.M. 2014. Ultra Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc.* Vol 3 (3).
- Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Massoma Lembe, D., Nde, Z., Nyonseu, D. 2017. Review On Extraction And Isolation Of Plant Secondary Metabolites. *ACBES-2017*.
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1. (3).

- Paracha, H., Hussain, T., Tahir, M. Z., Yasmeen, A., Pervez, M. T., Sheik, A. A., Haider, A., Ali, R., Khan, W. A. 2015. Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene, as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review. *Journal of Infection and Molecular Biology*. Vol 3 (1).
- Patro, I., Nagayach, A., Sinha, S and Patro, N. 2016. *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies*. Singapore : Springer Science and Business Media.
- Prasetyo dan Inorihah, E. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat Obatan*. Bengkulu : UNIB
- Prince, M., Guerchet, M., Prina, M., 2015. The Epidemiology and Impact of Dementia: Current State and Future Trends.
- Qardawi, M.Y. 2008. *Al-Ghaul Fi Al-Islam*. Doha: AFP publisher.
- Rassem, H. H. H., Nour, A. H., Yunus, R. M. 2016. Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. Vol 10 (16) : 117-127.
- Rettberg, J. R., Yao, J., Brinton, R. D. 2013. Estrogen: A Master Regulator of Bioenergetic Systems in the Brain and Body. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 35: 8-30.
- Rindawati. 2015. Eksistensi Bakul Semanggi. Gendong. *Disertasi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Sari, D. N. 2017. Isolasi Senyawa Terpenoid Ekstrak n-Heksana dari *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Setiawan, I. 2017. Tafsir Ayat Alqur'an Tema Keperawatan, Kebidanan dan Fakta Ilmiahnya. *Journal of Health Studies*. Vol. 1 (2).
- Sharma, A dan Canoo, D. D. 2016. Comparative Study Effect of Extraction Solvents or Techniques on Percentage Yield, Polyphenolic Composition and Antioxidant Potential of Various Extract Obtained from Stems of *N. leucophylla*: RP-HPLC-DAD Assesment of Its Polyphenolic Constituent. *J. Food Biochem*.
- Shihab,Q. 2013. *Al-Quran dan Maknanya*. Jakarta:Lentera Hati.

- Shityakov S, Salvador E, Förster C. 201. In silico, in vitro, and in vivo *Methods to Analyse Drug Permeation Across The Blood-Brain Barrier: A critical review*. *OA Anaesthetics. 1 (2)*.
- Sirotkin, A.V., Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogen And Their Effects. *European Journal Of Pharmacology* 741 : 230–236.
- Siswandono dan Soekardjo, B. 1995. *Kimia Medisinal*. Surabaya: University of Airlangga Press.
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W. Jr. 2014. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol Rev.* 66:334–395
- Slone, Ethel. 1994. *Anatomy and Physiology*. Jakarta: EGC.
- Suharna. 2012. *Studi In Silico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Penghambatan Enzim Tirosinase*. Skripsi. Makassar: UIN Alauddin.
- Tang, Y dan Le, W. 2015. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. New York : Springer Science and Business Media.
- Taylor, C. R., and Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako Denmark : IHC Handbook sixth edition.
- Trott, O., Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking With a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J Comput Chem.* Vol. 31(2).
- Varnum, M. M. dan Ikezu, T. 2012. The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer's Disease Brain. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*No 60: 251-256.
- Varshney, M., dan Nalvarte, I. 2017. Genes, Gender, Environment, And Novel Functions of Estrogen Receptor Beta In The Susceptibility to Neurodevelopmental Disorders. *Brain Sci.* 7 (24).
- Verkhatsky, A dan Parpura, V. 2014. Neurological and Psychiatric Disorders as a Neuroglial Failure. *National Institutes of Health.* No 116 (2).

- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Society*.
- Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. 2014. The Many Faces of Estrogen Signaling. *Biochemica Medica*. Vol. 24 (3).
- Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H., Shams, S. 2013. In Silico Drug Design: An Approach Which Revolutionarised the Drug Discovery Process. *OA Drug Design and Delivery*. 1 (1).
- Wells. G.B., Dipiro, J.T., Scwhinghammer, T.L., Dipiro, C.V. 2015. *Pharmacotherapy Handbook*. NY : Mcgraw Hil.
- Widiasari, F. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula vertebra mencit betina. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- 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.
- Zhuang, X. 2013. *Marsilea crenata*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013*:e.T168620A6523971.

## LAMPIRAN-LAMPIRAN

### Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman *M.crenata*



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU**

Jalan Lahor No.87 Telpon/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

- 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 : *Marsilea crenata* Presl
  - Sinonim : *Marsilea quadrifolia* Bl. ; *M. minuta* L.  
Indonesia : Semanggi, semanggan, paku tapak itik. Jawa : Semanggi
- Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1
- 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.
- Nama Simplisia : Marsileae crenatae folium / Daun semanggi air.
- Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol
- Penggunaan : Penelitian
- Daftar Pustaka :
  - Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/> salam, Diakses 14 Februari 2007
  - Anonim, <http://www.plantamor.com/semanggi> , diakses 11 Desember 2010
  - Steenis, CGGJ Van Dr , *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
  - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

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

Batu, 05 Oktober 2017  
Kepala UPT Materia Medica Batu

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



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

### A. Replikasi 1

#### METTLER TOLEDO

Moisture determination

#### Method name

FITOESTROGEN

Date &amp; Time

23.07.2018 / 13:19

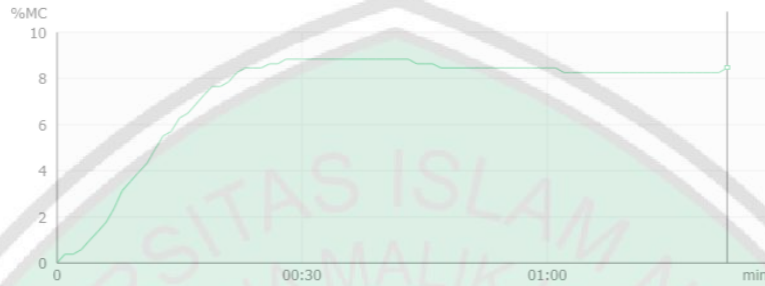
Measured values and drying curve

#### End result

8.45%MC

Duration

01:22 min



Comment:

Start weight	0.509 g
Dry Weight	0.466 g
Moisture Content	0.043 g

#### Method parameters and instrument data

##### Main parameter

Drying program	Standard
Drying temperature	105 °C
Switch-off criterion	3(1mg/50s)

##### Workflow handling

Start mode

Automatic

#### Result and value handling

##### Instrument data

Type	HC103/01		
SNR (Drying unit)	B624595599	SNR (Terminal)	B624595599
SW (Drying unit)	1.20	SW (Terminal)	1.31
Last weight adjustment	14.06.2016 09:33	Last temperature adjustment	16.06.2016 11:44

B. Replikasi 2

**METTLER TOLEDO**

Moisture determination

**Method name**

**FITOESTROGEN**

Date & Time

23.07.2018 / 13:24

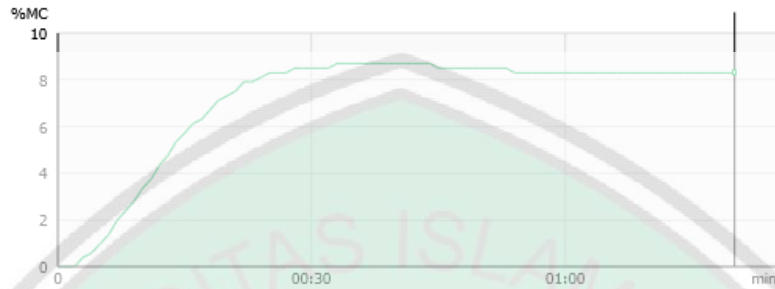
Measured values and drying curve

**End result**

**8.30%MC**

Duration

01:20 min



Comment:

Start weight	0.506 g
Dry Weight	0.464 g
Moisture Content	0.042 g

**Method parameters and instrument data**

**Main parameter**

Drying program	Standard
Drying temperature	105 °C
Switch-off criterion	3(1mg/50s)

**Workflow handling**

Start mode	Automatic
------------	-----------

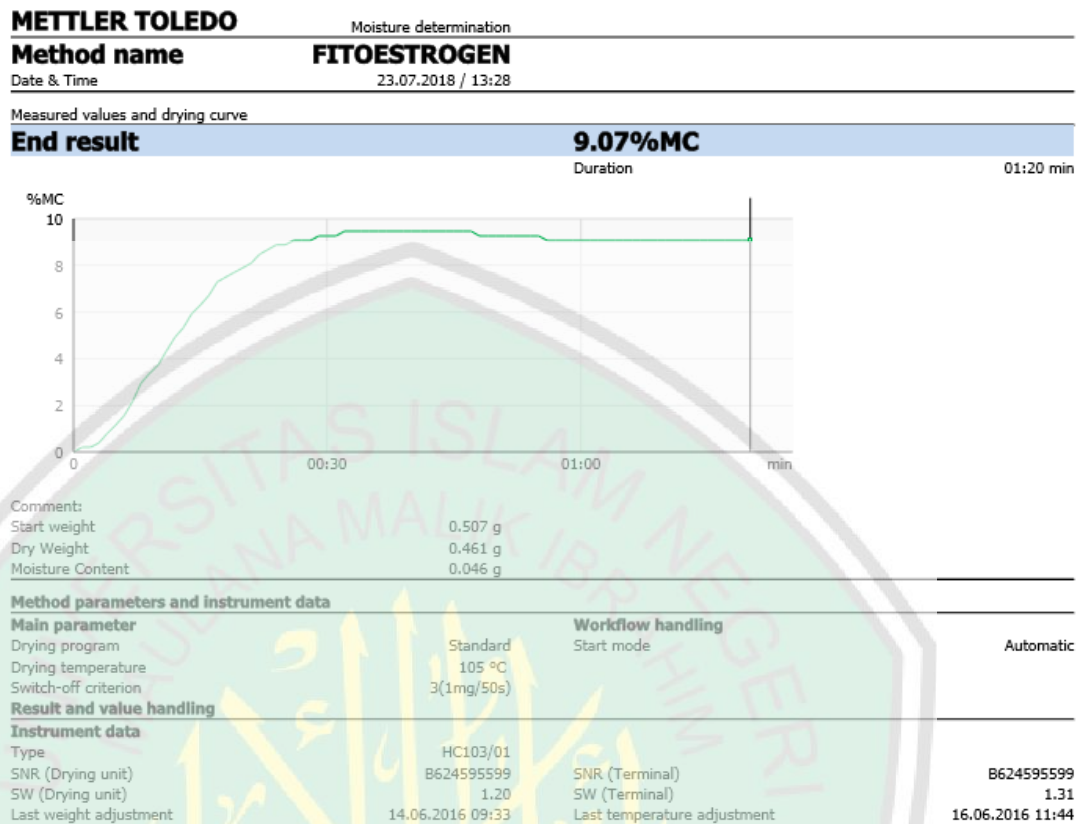
**Result and value handling**

**Instrument data**

Type	HC103/01	SNR (Terminal)	B624595599
SNR (Drying unit)	B624595599	SW (Terminal)	1.31
SW (Drying unit)	1.20	Last temperature adjustment	16.06.2016 11:44
Last weight adjustment	14.06.2016 09:33		



## C. Replikasi 3

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

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

### Lampiran 3 Hasil Penambatan Molekular

#### A. Senyawa Inklusi Penambatan

##### Etanol 96% Metanol

Molecule	TPSA	BBB Permeant	Ikatan Pg-p	Melanggar Hukum	Hasil Docking
Molecule 6	50.44	Yes	Tidak	1 Ghose dan 1 Muegge	Berhasil
Molecule 7	35.02	Yes	Berikatan	-	Berhasil
Molecule 14	35.25	Yes	Tidak	-	Berhasil
Molecule 15	57.53	Yes	Berikatan	1 Muegge	Berhasil
Molecule 16	45.40	Yes	Tidak	-	Gagal Docking
Molecule 17	50.32	Yes	Berikatan	-	Berhasil
Molecule 20	29.54	Yes	Tidak	-	Berhasil
Molecule 22	17.07	Yes	Berikatan	1 Muegge	Berhasil

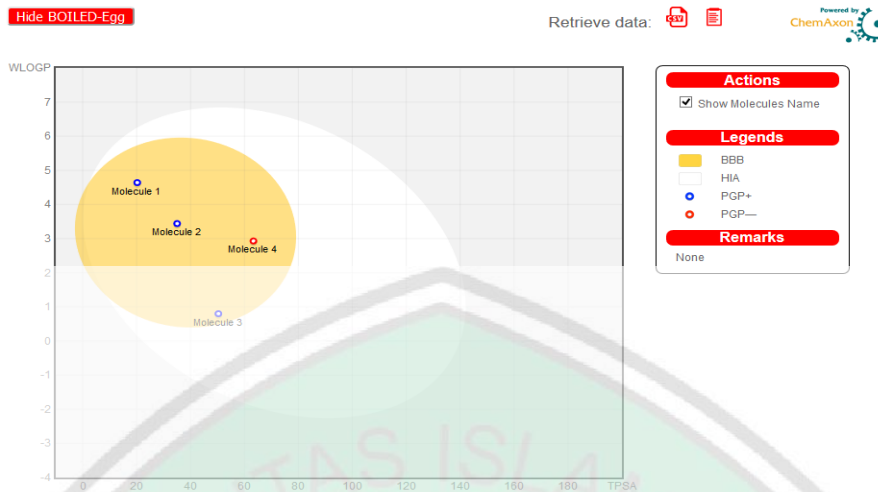
##### Etanol 96% DCM

Molecule	TPSA	BBB Permeant	Ikatan Pg-p	Melanggar Hukum	Hasil Docking
Molecule 2	52.60	Yes	Tidak	-	Berhasil
Molecule 4	63.32	Yes	Tidak	-	Berhasil
Molecule 6	26.02	Yes	Tidak	1 Ghose dan 2 Muegge	Berhasil
Molecule 10	63.32	Yes	Tidak	1 Veber	Berhasil
Molecule 11	23.47	Yes	Berikatan	-	Berhasil
Molecule 12	23.47	Yes	Tidak	-	Berhasil
Molecule 13	26.02	Yes	Berikatan	1 Lipinski, 1 Veber, 1 Muegge	Berhasil
Molecule 14	66.48	Yes	Berikatan	1 Veber dan 1 Muegge	Berhasil
Molecule 16	26.02	Yes	Berikatan	1 Lipinski, 1 Veber, 1 Muegge	Berhasil
Molecule 17	52.49	Yes	Berikatan	1 Veber dan 1 Muegge	Berhasil
Molecule 24	38.91	Yes	Tidak	1 Veber dan 2 Muegge	Berhasil

#### B. Senyawa Agonis 3OLS

Kodifikasi Senyawa	Nama Senyawa	Nilai TPSA	Binding Affinity	Interaksi Asam Amino
MTL 7	Prochlorperazine	35.02	-4.9	Agonis (Glu 305, His 475)
MTL 17	1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzimidazol-5-amine hydrochloride	50.32	-5.8	Agonis (Glu 305, His 475)
DCM 10	12-Aminododecanoic acid	63.32	-5.6	Agonis (Glu 305, His 475)
ligandb	17 $\beta$ Estradiol	-	-10.5	Agonis (Glu 305, His 475)

### C. Sifat Fisikokimia Senyawa dengan *Boiled-Egg*



Molecule 1 : 17 $\beta$  estradiol

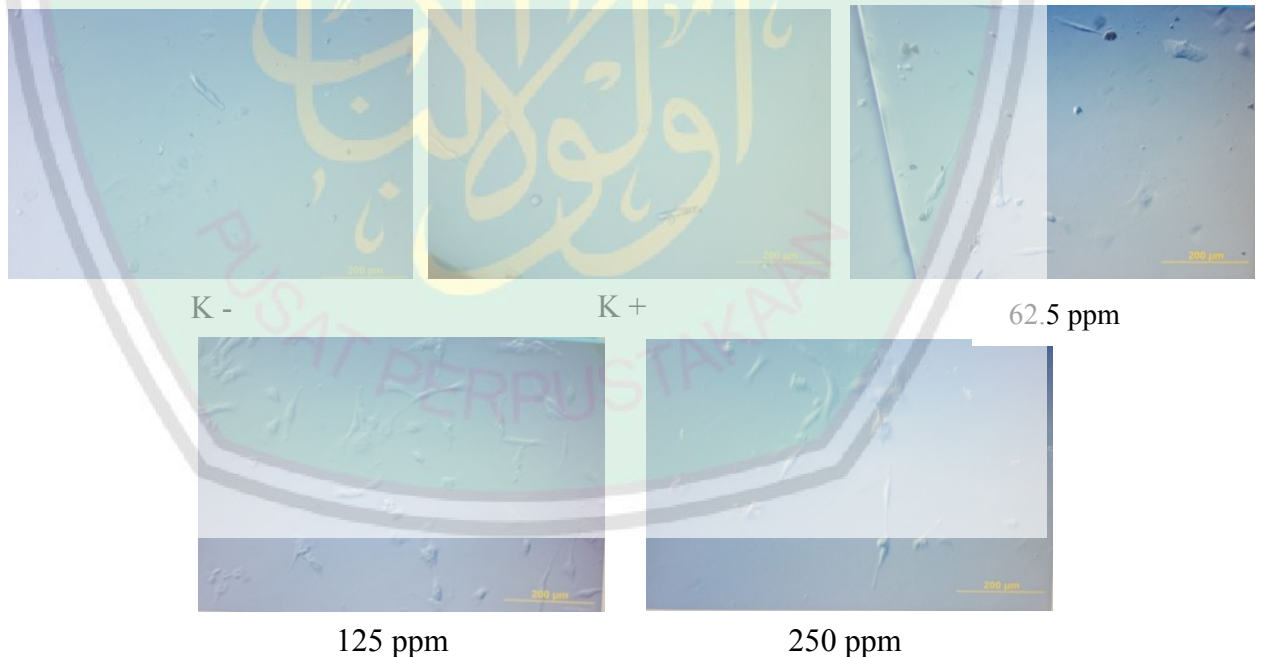
Molecule 2 : Prochlorperazine;

Molecule 3 : 1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl] benzimidazol-5-amine hydrochloride

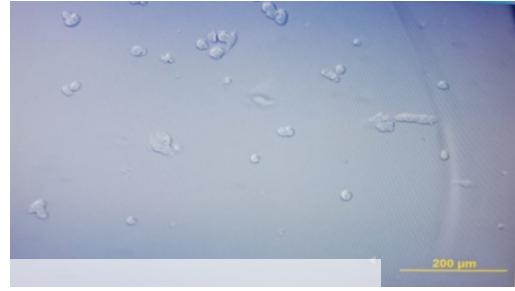
Molecule 4 : 12-aminododecanoic acid

#### Lampiran 4 Hasil perlakuan uji aktivitas metode ICC

##### A. Pengamatan sel HMC 3 setelah pemberian IFN- $\gamma$



B. Pengamatan sel HMC 3 setelah pemberian IFN- $\gamma$



K -

K +

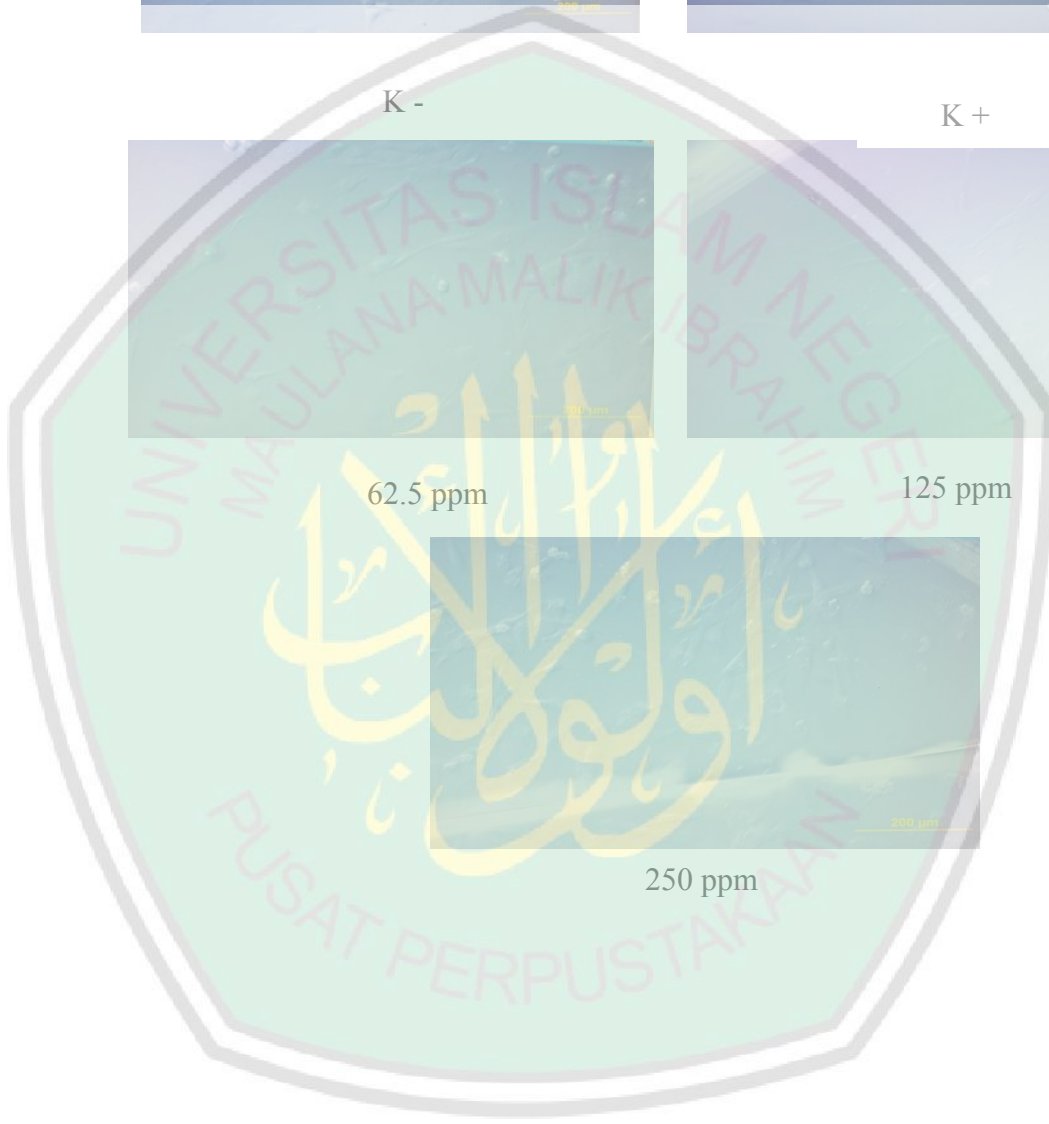


62.5 ppm

125 ppm



250 ppm



## C. Pengamatan sel HMC 3 pada CLSM



## Lampiran 5. Perhitungan dan Preparasi Sampel

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

1. Disiapkan conical tube ukuran 15 ml
2. Diambil FBS 10% dalam 5 ml yaitu 0,5 ml atau 500  $\mu$ l
3. Diambil Penstrep 1% dalam 5 ml yaitu 0,05 ml atau 50  $\mu$ l
4. Di tambahkan Media EMEM sampai 5 ml

### B. Pembuatan Media Perlakuan

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

### C. Pengenceran IFN- $\gamma$ 1 $\mu$ g/ mL

1. Induksi IFN- $\gamma$  = 9 *well-microplate* x 300  $\mu$ L = 2700  $\mu$ L = 2,7 mL = 3 mL
  2. Stok IFN- $\gamma$  1  $\mu$ g/ mL = 1000 ng/ mL
  3. IFN- $\gamma$  10 ng/mL (dosis literatur)
- $$V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$
- $$V1 \cdot 1000 \text{ ng/ mL} = 3 \text{ mL} \cdot 10 \text{ ng}$$
- $$V1 = 0,03 \text{ Ml}$$
- $$V1 = 30 \mu\text{L}$$

### D. Pembuatan dan pemberian larutan IFN- $\gamma$ ke dalam *well-microplate*

1. Diambil Media kultur sebanyak 3 ml, dikurangi 30  $\mu$ L
2. Ditambahkan dengan IFN- $\gamma$  30  $\mu$ L dari hasil pengenceran 10 ng/ ml
3. Di *mix gentle*



4. Diambil *well-microplate* dari inkubator
5. Diambil media dari *well-microplate*
6. Dimasukkan IFN- $\gamma$  pada masing-masing *well-microplate*
7. Diinkubasi kembali dalam inkubator 37° C

E. Perhitungan Pengenceran ekstrak etanol 96%

1. Ekstrak etanol 96% 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. Ekstrak etanol 96% konsentrasi 125 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

3. Ekstrak etanol 96% 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 ekstrak etanol 96%

1. Ekstrak etanol 96% konsentrasi 62,5 ppm
  - a. Diambil 350  $\mu\text{L}$  fraksi 125 ppm
  - b. Ditambah media 350  $\mu\text{L}$  dalam eppendorf, dihomogenkan
2. Ekstrak etanol 96% konsentrasi 125 ppm
  - a. Diambil 550  $\mu\text{L}$  fraksi 125 ppm

- b. Ditambah media 550  $\mu$ L dalam eppendorf, dihomogenkan
3. Ekstrak etanol 96% konsentrasi 250 ppm
  - a. Diambil 62,5  $\mu$ L fraksi 125 ppm
  - b. Ditambah media 1187,5  $\mu$ L dalam eppendorf, dihomogenkan

### Lampiran 6. Hasil Analisa Data SPSS

#### A. Uji Normalitas

Dosis	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Intensitas	K (-) IFN	,324	3	,878	3	,317
	K (+)	,345	3	,839	3	,212
	62,5 PPM	,213	3	,990	3	,808
	125 PPM	,211	3	,991	3	,815
	250 PPM	,222	3	,986	3	,770

#### B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
Intensitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,307	4	10	,005

#### C. Uji Korelasi Non Parametrik dengan menggunakan *Spearman Rho*

		Dosis	Intensitas	Total	
Spearman's rho	Dosis	Correlation Coefficient	1,000	-,502*	.
		Sig. (1-tailed)	.	,028	.
		N	15	15	15
	Intensitas	Correlation Coefficient	-,502*	1,000	.
		Sig. (1-tailed)	,028	.	.
		N	15	15	15
Total	Correlation Coefficient	.	.	.	
	Sig. (1-tailed)	.	.	.	
	N	15	15	15	

D. Uji Komparasi Non Parametrik menggunakan *Kruskal Wallis***Test Statistics<sup>a,b</sup>**

Intensitas	
Chi-Square	8,267
Df	4
Asymp. Sig.	,082

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dosis

E. Uji *Least Significant Different* (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 (-) IFN	K (+)	752,125333*	253,341939	,014	187,64432	1316,60635
	62,5 PPM	-500,163333	253,341939	,077	-64,31768	1064,64435
	125 PPM	403,303333	253,341939	,142	-161,17768	967,78435
	250 PPM	736,727333*	253,341939	,016	172,24632	1301,20835
K (+)	K (-) IFN	-752,125333*	253,341939	,014	-1316,60635	-187,64432
	62,5 PPM	-251,962000	253,341939	,343	-816,44302	312,51902
	125 PPM	-348,822000	253,341939	,199	-913,30302	215,65902
	250 PPM	-15,398000	253,341939	,953	-579,87902	549,08302
62,5 PPM	K (-) IFN	-500,163333	253,341939	,077	-1064,64435	64,31768
	K (+)	251,962000	253,341939	,343	-312,51902	816,44302
	125 PPM	-96,860000	253,341939	,710	-661,34102	467,62102
	250 PPM	236,564000	253,341939	,372	-327,91702	801,04502
125 PPM	K (-) IFN	-403,303333	253,341939	,142	-967,78435	161,17768
	K (+)	348,822000	253,341939	,199	-215,65902	913,30302
	62,5 PPM	96,860000	253,341939	,710	-467,62102	661,34102
	250 PPM	333,424000	253,341939	,218	-231,05702	897,90502
250 PPM	K (-) IFN	-736,727333*	253,341939	,016	-1301,20835	-172,24632
	K (+)	15,398000	253,341939	,953	-549,08302	579,87902
	62,5 PPM	-236,564000	253,341939	,372	-801,04502	327,91702
	125 PPM	-333,424000	253,341939	,218	-897,90502	231,05702

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

F. Uji Analisa Probit (ED<sub>50</sub>)**Confidence Limits**

95% Confidence Limits for Dosis

	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>	,010	17,112	.	.
	,020	15,552	.	.
	,030	14,562	.	.
	,040	13,817	.	.
	,050	13,211	.	.
	,060	12,695	.	.
	,070	12,243	.	.
	,080	11,838	.	.
	,090	11,470	.	.
	,100	11,131	.	.
	,150	9,728	.	.
	,200	8,613	.	.
	,250	7,656	.	.
	,300	6,797	.	.
	,350	6,001	.	.
	,400	5,246	.	.
	,450	4,515	.	.
	,500	3,795	.	.
	,550	3,076	.	.
	,600	2,345	.	.
	,650	1,589	.	.
	,700	,793	.	.
	,750	-,066	.	.
	,800	-1,023	.	.
	,850	-2,138	.	.
	,900	-3,541	.	.
	,910	-3,880	.	.
	,920	-4,248	.	.
	,930	-4,653	.	.
	,940	-5,105	.	.
	,950	-5,621	.	.
	,960	-6,226	.	.
	,970	-6,971	.	.

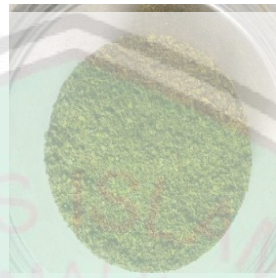
,980	-7,961	.	.
,990	-9,522	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

### Lampiran 7. Dokumentasi Alat dan Penelitian



(1)  
Proses pengeringan daun  
*M.crenata*



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



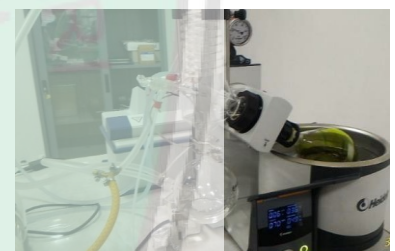
(3)  
Proses penimbangan  
simplisia daun *M.crenata*



(4)  
Proses ultrasonifikasi  
daun *M.crenata*



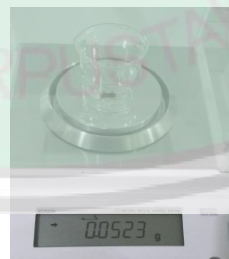
(5)  
Proses penyaringan filtrat  
dan residu daun *M.crenata*



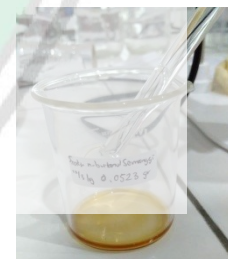
(6)  
Proses pemisahan pelarut dari  
ekstrak menggunakan *Rotary  
Evaporator*



(7)  
Proses pengovenan ekstrak  
etanol 96% daun *M.crenata*



(8)  
Penimbangan  
ekstrak etanol 96%



(9)  
Penambahan tween 80% dan  
DMSO pada ekstrak etanol 96%



(10)  
Pembuatan dan sterilisasi larutan induk 5000 ppm ekstrak etanol 96%



(11)  
Pengenceran sampel ekstrak etanol 96% 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm



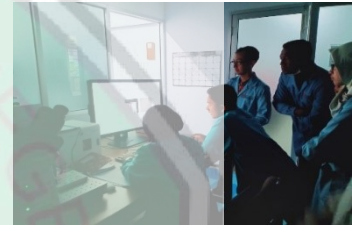
(12)  
Pemberian larutan Triton-X untuk permeabilisasi membran membran pada sel



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



(18)  
Pencucian dengan PBS sebelum diberikan antibodi sekunder



(19)  
Analisa menggunakan instrument CLSM