

**AKTIVITAS NEUROPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN *Marsilea crenata* C. Presl SECARA *IN VITRO*
PADA SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh :
HAFIZHA FADHILA SULEMAN
NIM. 15670075



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

**AKTIVITAS NEUROPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN *Marsilea crenata* C Presl. SECARA *IN VITRO*
TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh:
HAFIZHA FADHILA SULEMAN
NIM. 15670075

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

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

**AKTIVITAS NEUROPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL 96% DAUN
Marsilea crenata C Presl. SECARA *IN VITRO* TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh:
HAFIZHA FADHILA SULEMAN
NIM. 15670075

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 7 Oktober 2019

Pembimbing I



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

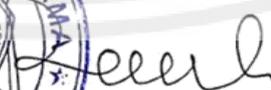
Pembimbing II



Rahmi Annisa, M.Farm., Apt.
NIP. 19890416 20170101 2 123



Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi



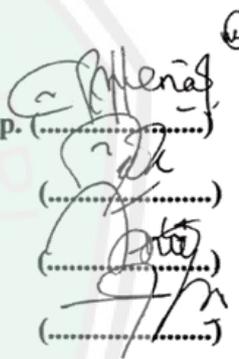
Dr. Rofiqul Muti'ah, M.Kes., Apt.
NIP. 19800203 200912 2 003

**AKTIVITAS NEUROPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL 96% DAUN
Marsilea crenata C Presl. SECARA *IN VITRO* TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3**

SKRIPSI

Oleh:
HAFIZHA FADHILA SULEMAN
NIM. 15670075

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 7 Oktober 2019

Ketua Penguji	: Meilina Ratna Dianti, S.Kep., NS., M.Kep. (.....)	
	NIP. 19820523 200912 2 001	
Anggota Penguji	: Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm., Apt. (.....)	
	NIP. 19900221 201801 1 001	
	Rahmi Annisa, M.Farm., Apt. (.....)	
	NIP. 19890416 20170101 2 123	
	Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm, Apt (.....)	
	NIP. 19761214 200912 1 002	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi




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

LEMBAR PERSEMBAHAN

Allhamdulillahirobbil'aalamin

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

Kedua orang tua, Bpk. Suleman Awad, M.Pd. yang penulis hormati, Ibu Ir. Darussaadah Paransa, M.Si. yang saat ini sedang menempuh studi S3 serta Kakak Dininurilmi Putri Suleman S.Tp yang sedang menempuh studi S2, semoga imu yang diperoleh dapat membawa kebermaanfaatan dunia hingga akhirat, Adik Wishal Dinansyah Suleman sebagai pendengar terjujur, Keluarga Besar di Singosari (Alm. Bunda Ida, Azka, Aqil, Ibu Nunu, Bapak Wawan, Mas Eka, Kiki, Om Robi, Tante Hepi, Eyang, dan tentunya yang paling penulis sayangi, Ika Aprilia) terima kasih atas hangat canda tawa dan suka duka yang diberikan.

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

Terima kasih tak terhingga juga penulis ucapkan kepada teman-teman farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya untuk farmasi angkatan 2015 *Pharmajelly*, kepada teman-teman kelas B atas kisah-kasih yang telah diberikan untuk penulis, teman-teman proyek Fitoestrogen (Eka, Kiba, Pacemol, Tayo, Aang, Udin dan Denis) yang memberikan warna-warni selama kurang lebih 3 semester terakhir, teman se-atap (Mala dan Milo) serta *partner in crime* tersetia Novi, yang telah memberikan saran dan kritik membangun serta membantu proses hingga penulisan skripsi ini selesai.

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

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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Hafizha Fadhila Suleman
NIM : 15670075
Jurusan : Farmasi
Fakultas : Kedokteran Ilmu Kesehatan
Judul Penelitian : Aktivitas Neuroprotektif Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* C
Presl. secara *In Vitro* terhadap Sel Mikroglia HMC3

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa penelitian ini merupakan ide *proyek fitoestrogen* dan tidak terdapat unsur plagiarasi karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang tertulis dikutip dalam naskah ini dari disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Malang,

Yang Membuat Pernyataan,



Hafizha Fadhila Suleman

NIM. 15670075

MOTTO

“Jangan terlalu fokus dengan mimpi, karena terwujudnya mimpi itu hak prerogatif Allah, kewajiban kita hanya berjuang untuk saat ini”

Burhan Ma'arif Z.A M.Farm., Apt



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarokatuh

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmat, rahmat, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul "**Aktivitas Neuroprotektif Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* C Presl. secara *In Vitro* Terhadap Sel Mikroglia HMC3**", 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 telah menyadari bahwa telah banyak pihak yang telah berpartisipasi dalam penyelesaian penulisan skripsi ini, iringan doa dan ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri 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 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 Ma'arif Z.A, M.Farm., Apt., selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan ide dan waktu untuk membimbing penulis demi terselesainya skripsi ini.
5. Rahmi Annisa, M.Farm., Apt selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan berupa kritik dan saran, bimbingan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Seluruh Dosen Pengajar di Jurusan Farmasi yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama di UIN Malang.
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. Keluarga Penulis, Aba, Umi, Kakak dan Dinan, yang telah menjadi *support system* tertulis.
9. Keluarga Singosari, yang telah memberikan pengalaman sebagai guru terbaik.
10. Teman se-atap, Mala dan Milo, yang telah meluangkan waktunya dan memberi semangat kepada penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi ini.
11. Keluarga Besar Proyek Fitoestrogen UIN Malang; Mas Putra, Mas Miftah, teman-teman seperjuangan; Eka, Kiba, Malik, Nanda, Aang, Udin dan Denis, terima kasih atas ilmu, pengalaman serta motivasinya kepada penulis, adik-adik angkatan 2016; Bela, Kamil, Marte, Dian, Qodir, Ici, Aam, Galih, serta tak lupa adik-adik angkatan 2017; Faisal, Sur, Luqman, Hamdan, Hilwa, Fariza, Nisfa, Dila dan Ifa, terima kasih atas segala proses pendewasaan yang telah diberikan.
12. Teman se-grup *Kartini Masa Kini*, Novi dan Ihda, teman kelas B Farmasi 2015, teman-teman *Pharmajelly* Farmasi angkatan 2015 yang berjuang bersama-sama untuk meraih mimpi dan terima kasih untuk setiap kenangan indah yang dirajut bersama dalam menggapai impian.
13. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan proposal skripsi ini baik moril maupun materil.

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

Wassalamu'alaikum Warahmutullahi Wabarokatuh

Malang,
Penulis



Hafizha Fadhila Suleman
NIM. 15670075

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGAJUAN	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
LEMBAR PERSEMBAHAN	
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	
MOTTO	
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Aplikatif.....	6
1.4.2 Manfaat Teoritis.....	7
1.5 Batasan Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjauan Tentang Semanggi (<i>M. crenata</i> C. Presl)	8
2.1.1 Klasifikasi	8
2.1.2 Penyebaran dan Tempat Tumbuh	9
2.1.3 Habitus dan Morfologi	9
2.1.4 Kandungan	9
2.1.5 Kegunaan	10
2.2 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi	10
2.2.1 Definisi Ekstrak	10

2.2.2 Metode Ekstraksi	11
2.2.3 Ekstraksi UAE	11
2.2.4 <i>Rotary Evaporator</i>	14
2.3 Tinjauan Tentang Fitoestrogen	15
2.4 Tinjauan Tentang Estrogen	16
2.4.1 Reseptor Estrogen	17
2.4.2 Mekanisme Regulasi Estrogen.....	18
2.5 Tinjauan Tentang Pascamenopause	20
2.5.1 Fase Klimakteriks	21
2.5.2 Perubahan Fisiologis pada Menopause	22
2.5.3 Keluhan Menopause.....	23
2.6 Tinjauan Tentang Sistem Saraf Pusat	27
2.7 Tinjauan Tentang Neuroglia	27
2.8 Tinjauan Tentang Mikroglia	28
2.9 Tinjauan Tentang Neuroinflamasi	30
2.10 Tinjauan Tentang Neurodegeneratif	31
2.11 Tinjauan Tentang Sel Mikroglia HMC3 (ATCC® CRL-3304™).....	32
2.12 Tinjauan Tentang Interferon-gamma	32
2.13 Tinjauan Tentang <i>Nuclear Chain Kappa Light B Activated</i> (Nf-kB).....	34
2.14 Tinjauan Tentang <i>Immunocytochemistry</i> (ICC).....	36
2.15 Tinjauan Tentang CLSM	38
2.16 Tinjauan Tentang Anova.....	39
2.17 Tinjauan Tentang Indeks Terapi	40
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	41
3.1 Kerangka Konseptual.....	41
3.2 Uraian Kerangka Konseptual.....	42
3.3 Hipotesis Penelitian	44
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	45
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	45
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	45
4.3 Populasi dan Sampel	45
4.3.1 Populasi.....	45
4.3.2 Sampel.....	46
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	46
4.4.1 Variabel Bebas	46
4.4.2 Variabel Tergantung	46
4.4.3 Variabel Kontrol	46
4.4.4 Definisi Operasional	46
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	48
4.5.1 Alat Penelitian.....	48
4.5.1.1 Preparasi Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M. crenata</i> C. Presl	48
4.5.1.2 Ekstraksi Ultrasonik Daun <i>M. crenata</i> C. Presl	48
4.5.1.3 Kultur <i>Cell Line Human Microglia Clone 3</i> (HMC3).....	48
4.5.1.4 Uji Aktivitas Neuroprotektif.....	49
4.5.2 Bahan Penelitian	49

4.5.2.1 Ekstraksi Ultrasonik Daun <i>M. crenata</i> C. Presl	49
4.5.2.2 Kultur <i>Cell Line Human Microglia Clone 3</i> (HMC3).....	49
4.5.2.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif.....	49
4.6 Prosedur Penelitian	50
4.6.1 Preparasi Sampel Tanaman.....	50
4.6.1.1 Determinasi Tanaman.....	50
4.6.1.2 Preparasi Daun <i>M. crenata</i> C. Presl	50
4.6.1.3 Prosedur Ekstraksi	50
4.6.1.4 Preparasi Ekstrak	51
4.6.2 Preparasi Sampel Sel.....	51
4.6.2.1 Pembuatan Media Kultur Sel.....	51
4.6.2.2 <i>Thawing cell</i>	51
4.6.2.3 Pengamatan dan Penggantian Media.....	52
4.6.2.4 <i>Plating</i> Sel pada <i>24 well-plate</i>	52
4.6.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif	52
4.6.3.1 Pemberian Larutan Uji dalam <i>Plate</i>	52
4.6.3.2 Pengukuran ER β dengan ICC.....	53
4.6.3.3 Pembacaan CLSM	53
4.7 Analisis Statistik	53
4.8 Skema Alur Penelitian	55
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	56
5.1 Preparasi Sampel Tanaman	56
5.1.1 Determinasi Tanaman	56
5.1.2 Preparasi Sampel Daun dan Analisis Kadar Air Simplisia <i>M. crenata</i>	57
5.1.3 Prosedur Ekstraksi	60
5.1.4 Skrining Fitokimia Menggunakan TLC Visualizer	63
5.1.5 Preparasi Sampel Ekstrak.....	64
5.2 Preparasi Sampel Sel HMC3.....	65
5.2.1 Pembuatan Media Kultur Sel HMC3.....	66
5.2.2 <i>Thawing Cell</i>	66
5.2.3 Pengamatan dan Pergantian Media	67
5.2.4 <i>Plating</i> Sel Mikroglia HMC3	67
5.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif	68
5.4 Analisis Statistik	71
5.5 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen sebagai Agen Neuroprotektif.....	76
5.6 Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen Daun Semanggi dalam Perspektif Islam.....	80
BAB VI PENUTUP	82
6.1 Kesimpulan	82
6.2 Saran.....	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN.....	96

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Marsilea crenata</i> C. Presl	8
Gambar 2.2 Proses Mekanisme Ekstraksi UAE	13
Gambar 2.3 Proses terjadinya Ekstraksi menggunakan Metode UAE	14
Gambar 2.4 Struktur Estron, Estradiol, Estriol.....	16
Gambar 2.5 Mekanisme jalur persinyalan estrogen	20
Gambar 2.6 Sel Mikroglia	29
Gambar 2.7 Mekanisme penghambatan aktivasi Nf-kB oleh <i>Estrogen Receptor</i> teraktivasi	36
Gambar 2.8 Pengamatan dengan metode ICC.....	37
Gambar 2.9 Pengamatan CLSM.....	38
Gambar 2.10 Diagram CLSM	39
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	41
Gambar 4.1 Alur penelitian	55
Gambar 5.1 Daun <i>M. crenata</i> C. Presl kering	58
Gambar 5.2 Simplisia <i>M. crenata</i> C. Presl	58
Gambar 5.3 Ekstrak Pekat Etanol 96 % Daun <i>M. crenata</i> C. Presl.....	62
Gambar 5.4 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan TLC <i>Visualizer</i>	64
Gambar 5.5 Intensitas Fluoresensi ER- β yang tidak teraktivasi pada Sel Mikroglia HMC3 (A) Kontrol Negatif (B) 62,5 ppm (C) 125 ppm (D) 250 ppm (E) Kontrol Positif.....	70
Gambar 5.6 (a) Sel mikroglia HMC3 <i>resting state</i> sebelum diberi perlakuan (b) Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ (B). Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ dan pemberian ekstrak etanol 96% daun <i>M. crenata</i>	78
Gambar 5.7 Intensitas Fluoresensi ER β Bebas pada Ekstrak Etanol 96%	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakter Interferon Manusia	34
Tabel 4.1 Skema <i>Platting</i> Uji Neuroprotektif	52
Tabel 5.1 Nilai kadar air serbuk simplisia kering daun <i>M. crenata</i>	60
Tabel 5.2 Hasil Ekstraksi Daun <i>M. crenata</i> C. Presl.....	62
Tabel 5.3 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan TLC <i>Visualizer</i>	64
Tabel 5.4 Intensitas Fluoresensi ER β Bebas Tiap Dosis Perlakuan.....	71
Tabel 5.5 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	72
Tabel 5.6 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's test</i>	72
Tabel 5.7 Klasifikasi Uji Korelasi	73
Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	73
Tabel 5.9 Hasil Uji <i>one-way anova</i>	74
Tabel 5.10 Hasil Uji <i>Least Significant Difference</i>	75
Tabel 5.11 Hasil Uji Chi-Square	76
Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas	76

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Semanggi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl)	96
Lampiran 2. Hasil Uji <i>Moisture Content</i> Serbuk Simplisia Daun Semanggi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl).....	97
Lampiran 3. Hasil Perlakuan Uji Aktivitas Metode Pewarnaan ICC.....	99
Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel	101
Lampiran 5. Hasil Analisa Statistik.....	104
Lampiran 6. Dokumentasi	108



DAFTAR SINGKATAN

AD	= <i>Alzheimer disease</i>
AP-1	= <i>activator protein 1</i>
APC	= <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	= <i>Adenosina Trifosfat</i>
BBB	= <i>Blood Brain Barrier</i>
BSA	= <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSC	= <i>Bio Safety Cabinet</i>
CLSM	= <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CO ₂	= <i>Karbon dioksida</i>
DMSO	= <i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	= <i>asam deoksiribonukleat</i>
E ₂	= <i>Estrogen</i>
mm	= <i>milimeter</i>
μM	= <i>mikromolar</i>
ng/mL	= <i>nanogram per mililiter</i>
ED ₅₀	= <i>effective dose</i>
EGF	= <i>epidermal growth factor</i>
EMEM	= <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	= <i>Estrogen Receptor</i>
ER*	= <i>Estrogen Receptor Teraktivasi</i>
EREs	= <i>estrogen response elements</i>
ER-β	= <i>Estrogen receptor-β</i>
FBS	= <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	= <i>Flourescein isothiocyanate</i>
HLA	= <i>Human Leococyte Antigen</i>

HMC3	= <i>Human Microglial Clone 3</i>
ICC	= <i>Immunocytochemistry</i>
IFN- γ	= Interferon-gamma
IGF-1	= <i>insulin-like growth factor-1</i>
IHC	= <i>Immunohistochemistry</i>
IL	= Interleukin
I κ B	= Inhibitor Kinase B
kHz	= kilohertz
TD ₅₀	= Dosis toksik
LPS	= <i>Lipopolysaccharide</i>
LSIH	= Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
mGluRs	= <i>metabotropic glutamate receptors</i>
MHC II	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	= <i>messenger RNA</i>
NF- κ B	= <i>Nuclear Factor- kappa B</i>
ng/ml	= nanogram/mililiter
NO	= <i>Nitric Oxide</i>
NK	= <i>natural killer</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD	= <i>Parkinson disease</i>
MK	= Medium komplet
μ g/mL	= mikrogram per mililiter
μ m	= mikrometer
mL	= mililiter
mg	= miligram
Penstrep	= Penisilin-Streptomisin
PFA	= <i>Paraformaldehida</i>
RIA	= <i>Radioimmunoassay</i>

rpm	= rotasi per menit
RNA	= asam ribonukleat
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	= Standar Deviasi
SP-1	= <i>stimulating protein-1</i>
SSP	= Sistem Saraf Pusat
TLR	= <i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	= <i>tumor necrosis factor-α</i>
TSH	= Terapi Sulih Hormon
UAE	= <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>



ABSTRAK

Suleman, H.F. 2019. **Aktivitas Neuroprotektif Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* C. Presl secara *In Vitro* terhadap Sel Mikroglia HMC3.** Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm., Apt. (II) Rahmi Annisa M. Farm., Apt. Penguji: Meilina Ratna Dianti, S. Kep., NS., M Kep.

Neuroprotektif adalah suatu mekanisme yang digunakan untuk melindungi atau mengurangi kerusakan saraf pada sistem saraf pusat yang disebabkan oleh penyakit neurodegeneratif. Neurodegeneratif pada wanita pascamenopause disebabkan oleh defisiensi estrogen yang berujung pada aktivasi patologis dari sel mikroglia. Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur dan fungsi yang sama seperti estrogen. Daun *Marsilea crenata* C. Presl diduga mengandung senyawa fitoestrogen yang dapat berkhasiat sebagai neuroprotektif. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas dan ED₅₀ dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap intensitas fluoresensi ER β pada sel mikroglia HMC3. Penelitian ini dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan dosis 62,5 μ g/mL, 125 μ g/mL, dan 250 μ g/mL ke sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi IFN- γ selama 24 jam agar mengalami neuroinflamasi, dan pemberian genistein 50 μ M sebagai kontrol positif. Analisa intensitas fluoresensi ER β dilakukan menggunakan metode pewarnaan ICC dan instrumen CLSM untuk memvisualisasikan intensitas fluoresensi ER β . Analisa statistik menggunakan uji beda *one-way anova* menunjukkan nilai signifikansi 0,000<0,050, maka terdapat perbedaan signifikan pada masing-masing dosis perlakuan dan uji korelasi *pearson* memiliki korelasi yang sangat kuat, ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi -0,849. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 96% dapat menurunkan intensitas fluoresensi ER- β tidak teraktivasi pada semua dosis perlakuan, dimana pada dosis 125 μ g/mL menjadi dosis optimal dan ED₅₀ yang di dapat yaitu 3,724 μ g/mL. Dari hasil penelitian tersebut, ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki aktivitas sebagai neuroprotektif yang ditunjukkan dengan penurunan intensitas fluoresensi ER β tidak teraktivasi pada sel mikroglia HMC3.

Kata Kunci : *Marsilea crenata* C. Presl, ER β , Sel Mikroglia HMC3

ABSTRACT

Suleman, H.F. 2019. **Neuroprotective Activity Of Ethanol 96% Extract *Marsilea Crenata* C Presl. Leaves *In Vitro* On HMC3 Microglia Cells.** *Essay*. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim Malang State Islamic University. Mentors: (I) Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm., Apt. (II) Rahmi Annisa M. Farm., Apt. Consultant: Meilina Ratna Dianti, S. Kep., NS., M Kep.

Neuroprotective is a mechanism used to protect or reduce nerve damage to the central nervous system caused by neurodegenerative diseases. Neurodegenerative diseases in postmenopausal women are caused by estrogen deficiency which results in pathological activation of microglia cells. Phytoestrogens are compounds that have the same structure and function as estrogen. Semanggi leaves (*Marsilea crenata* C. Presl) is suspected contain phytoestrogens compounds which can be efficacy as antineuroinflammation. The purpose of this study was to determine the activity and ED₅₀ of ethanol 96% extract *M. crenata* leaves to intensif of ER- β fluorescence on HMC3 microglia cells. This research was carried out by giving ethanol 96% extract of *M. crenata* leaves with variant doses; 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, and 250 $\mu\text{g/mL}$ to HMC3 microglia cells that had been induced by IFN- γ for 24 hours to experience neuroinflammation, and genistein 50 μM as a positive control. Intensity of ER β fluorescence analysis using the ICC to staining method and using the CLSM instrument to visualize ER β . Statistical analysis using the *one-way anova* difference test showed a significance value of $0,000 < 0,050$, so there were significant differences in each dose of treatment and the *pearson* correlation test had a very strong correlation, indicated by the correlation coefficient value -0,849. The results showed that ethanol 96% extract of *M. crenata* leaves can reduce the intensity of ER- β not activated fluorecence at all treatment doses, with 125 $\mu\text{g/mL}$ as the optimal dose and the ED₅₀ obtained was 3,724 $\mu\text{g/mL}$. From the results of these studies, the ethanol 96% extract of *M. crenata* leaves has activity as an neuroprotective which is indicated by a decrease in the intensity of ER- β not activated fluorecence in HMC3 microglia cells.

Keywords: *Marsilea crenata* C. Presl, ER- β , HMC3 Microglial Cells

مستخلص البحث

سليمان، ه ف. 2019. أنشطة إعصاب استخراج الإيثانول 96% ورقة (*Marsilea crenata*)
 المرضية، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: 1) برهان معارف ز.أ الماجستير 2) رحمي النساء الماجستير 3) عبد
 الحاكم.

Neuroprotective هي آلية تستخدم لحماية أو تقليل تلف الأعصاب للجهاز العصبي المركزي الناجم عن الأمراض
 التنكسية العصبية. (Neurodegeneratif) للنساء (pascamenopause) تسبب النقص الإستروجين الذي يملك الحافة لتفعيل
 المرضي من خلايا الخلايا الدبقية الصغيرة. فتوستروجنس هو المركب الذي يملك الهيكل والتوظيف سويا مثل الإستروجين. تظن ورقة
 (*Marsilea crenata* C. Presl) ان تتضمّن المركب الفتوستروجنس الذي يملك المنفعة إعصبا. الهدف من هذا البحث هو لتثبيت
 الأنشطة و (ED₅₀) من الإيثانول 96% ورقة (*M. crenata*) لحدة المضان (ER-β) لخلايا الخلايا الدبقية الصغيرة
 (HMC3). يفعل هذا البحث بإعطاء استخراج الإيثانول 96% ورقة (*M. crenata*) بجرعة (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, dan 250 µg/mL)
 لخلايا الخلايا الدبقية الصغيرة (HMC3) الذي إستقرأ (IFN-γ) كلما 24 ساعة لكي يكابد الإلتهاب العصب،
 وإعطاء الجينيستين (50 µM) السيطرة الإيجابية. تحليل حدة المضان (ER-β) يفعل ان يستخدم الطريقة اللونية (ICC) والة (CLSM)
 للتصوير حدة المضان (ER-β). يستخدم تحليل الإحصائية الإختبار المختلف (one-way anova) يدلّ القيمة الأهمية
 (0,000<0,050)، فيكون المختلف الأهم لكل جرعة العلاج والإختبار الإرتباط (pearson) يملك العلاقة القوة الشديدة، تدلّ على
 قيمة المعامل الإرتباط (-0,849). يدل حاصل البحث أنّ إعطاء استخراج الإيثانول 96% يستطيع ان ينخفض حدة المضان (ER-β)
 لانشط لكل جرعة العلاج، وتصبح الجرعة 125 (µg/mL) الجرعة المثلى و (ED₅₀) الذي يستطاع هو 3,724 (µg/mL). من ذلك
 البحث، استخراج الإيثانول 96% ورقة (*M. crenata*) يملك الأنشطة الإعصاب الذي يدل بإنخفاض حدة المضان (ER-β) لانشط
 لخلايا الخلايا الدبقية الصغيرة (HMC3).

(. (HMC3)، خلايا الخلايا الدبقية الصغيرة (ER-β)، (*Marsilea crenata* C. Presl) الكلمات المفتاحيات:

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause menurut *World Health Organization* (WHO) yaitu berhentinya siklus menstruasi bagi wanita selama 12 bulan berturut-turut dimana ovarium secara progresif telah gagal dalam memproduksi estrogen. Fase ini dimulai pada sekitar usia 40-50 tahun (Proverawati, 2009). WHO memperkirakan ditahun 2030 ada 1,2 miliar wanita memasuki fase pascamenopause dan 80 persen diantaranya tinggal di negara berkembang (Sullelu, 2010). Wanita yang telah memasuki fase tersebut seringkali mengalami berbagai masalah kesehatan akibat defisiensi estrogen (Dipiro *et al.*, 2008). Defisiensi estrogen atau penurunan produksi dan ketidakseimbangan hormon tersebut (Yang *et al.*, 2012) menyebabkan berbagai macam penyakit salah satunya yaitu penurunan fungsi kognitif pada sistem saraf pusat (Klempin dan Kempermann, 2007) yang mengakibatkan terjadinya neurodegeneratif (Rettberg *et al.*, 2013; Varshney dan Nalvarte, 2017).

Neurodegeneratif merupakan suatu keadaan patologis yang dialami oleh seseorang secara progresif ditandai dengan hilangnya kemampuan kognitif dan memori karena hilangnya kemampuan fisiologis sel pada sistem saraf. Pada fase tersebut seseorang akan mengalami penurunan kinerja saraf dalam melakukan aktivitas tertentu (Kovacs, 2014). Keadaan tersebut diprediksi akan terjadi peningkatan hingga hampir 2 kali lipat serta akan di dominasi oleh wanita pada tahun 2050 (Prince *et al.*, 2015), hingga pada akhirnya akan 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 muncul karena terjadi kenaikan sel mikroglia teraktivasi (Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015) dan memicu munculnya mediator peradangan lainnya (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Salah satu terapi neuroprotektif yang paling umum dan sering digunakan karena dianggap memiliki efektifitas yang tinggi adalah Terapi Sulih Hormon (TSH) (Yang *et al.*, 2012). Terapi tersebut secara simultan mengganti estrogen dalam tubuh penderita. Penggunaan yang dianggap efektif ini kemudian memunculkan masalah baru ketika digunakan dalam jangka waktu yang lama, seperti terjadinya peningkatan kanker endometrium, kanker payudara, emboli bahkan stroke yang berujung pada kematian (Lee *et al.*, 2013; Jantaratnotai *et al.*, 2013). Penggunaan TSH akhirnya menjadi perdebatan sehingga perlunya dilakukan penggantian terapi yang dinilai lebih aman dengan efikasi yang hampir sama (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Pengobatan tradisional merupakan pengobatan yang memanfaatkan tanaman-tanaman berkhasiat yang diduga memiliki senyawa aktif. Hal tersebut merupakan tanda-tanda dari kekuasaan-Nya yang telah diturunkan ke bumi melalui tanaman–tanaman tersebut. Al-Qur’an surat Asy-syu’ara ayat 7–8 telah dijelaskan sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَأْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾
 إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً ۖ وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh–tumbuhan yang baik? (7). Sesungguhnya pada yang demikian itu benar–benar terdapat tanda kekuasaan Allah. Dan kebanyakan mereka tidak beriman (8) (Qs. Asy–Syuara: 7–8).

Berdasarkan ayat Al-Qur’an tersebut dijelaskan bahwa Allah menumbuhkan tumbuhan–tumbuhan yang baik di bumi ini dengan beragam warna dan bentuk (Al-Qarni, 2008). Hal tersebut menunjukkan bahwa tumbuhan–tumbuhan yang baik ini dapat diambil manfaatnya, diantaranya dalam hal pengobatan. Indonesia memiliki ribuan tanaman yang dipercaya memiliki potensi sebagai bahan baku obat yang mengandung beraneka ragam jenis senyawa kimia alami yang memiliki efek farmakologis dan bioaktivitas. Fakta menunjukkan bahwa masyarakat cukup banyak menggunakan obat tradisional dalam usaha pengobatan sendiri (*self medication*). Salah satunya adalah dengan menggunakan *Marsilea crenata* C. Presl.

Marsilea crenata C. Presl. (Semanggi) merupakan tanaman yang potensial dalam menyeimbangkan jumlah estrogen dalam tubuh (Trisunuwati, 2017). Tanaman tersebut merupakan tanaman khas Kota Surabaya, Jawa Timur, Indonesia. Berbagai penelitian telah dilakukan terhadap tanaman Semanggi dan diketahui mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, steroid, polifenol, serta senyawa antioksidan (Nurjanah *et al.*, 2010; Yacoeb *et al.*, 2010).

Semanggi memenuhi ketiga aspek kandungan senyawa sebagai fitoestrogen, yaitu senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki kemiripan fungsi, struktur atau dapat berikatan dengan *estrogen receptor-β* (ER-β) sehingga

memiliki efek yang serupa (Yang *et al.*, 2012). Secara struktur melalui pengujian menggunakan *Radioimmunoassay* (RIA) menunjukkan bahwa *estradiol-like compound* pada ekstrak etanol 96% terdeteksi cukup tinggi (Laswati, 2011). Secara fungsi dapat ditemui pada pengujian *in vitro* menggunakan sel mikroglia HMC3 yang menurunkan intensitas MHC II karena pemberian ekstrak etanol 96% daun Semanggi (Mirza, 2019). Secara afinitasnya terhadap ER melalui uji aktivitas *in silico* Semanggi juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki afinitas yang tinggi terhadap *Estrogen receptor* β (ER β) (Ma'arif *et al.*, 2016). Selain itu setelah dilakukan penapisan fitokimia dan *metabolit profiling* ekstrak daun semanggi didapatkan senyawa senyawa terpenoid yang dapat menjadi senyawa pencegah terjadi osteoporosis pascamenopause (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).

Aktivitas fitoestrogen di dalam tubuh sangat penting sebagai pengganti estrogen dengan ikatannya bersama ER β yang berperan sebagai homeostasis dalam tubuh. Pada otak dalam jangka waktu tertentu fitoestrogen dapat meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel otak maupun menghambat pembentukan Nf- κ B dengan cara menghambat *Toll like Receptors*, sehingga hal ini dapat menjadi dasar awal fitoestrogen pada *M. crenata* bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Neuroprotektor dari *M. crenata* ini dapat menghambat terjadinya neuroinflamasi akibat kenaikan mikroglia teraktivasi (Lee *et al.*, 2013; Matt dan Johnson, 2016).

Berdasarkan penjelasan tersebut perlunya dilakukan pengujian secara *in vitro* untuk mengetahui intensitas senyawa dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang dapat berinteraksi dengan ER β sehingga dapat diketahui aktivitasnya sebagai neuroprotektif. Pelarut Etanol 96% dipilih karena merupakan pelarut universal yang bersifat non toksik. Penggambaran terjadinya neuroinflamasi tersebut dilakukan dengan melakukan pemberian IFN- γ pada sel mikroglia HMC3 karena induktor ini dapat memberikan gambaran terjadinya neuroinflamasi pada kejadian neurodegeneratif pada wanita pascamenopause. Interaksi sinergisme yang menguntungkan diharapkan mampu menurunkan intensitas fluoresensi ER β bebas dengan pengujian menggunakan metode *immunocytochemistry* (ICC) dengan bantuan instrumen *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM). Penelitian ini memiliki harapan agar menjadi langkah awal pengembangan sediaan neuroprotektor, mengingat masa menopause akan terjadi secara alamiah dan belum ditemukannya obat yang secara klinis mengurangi efek samping dan keluhan dari defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause, serta dapat memberikan motivasi kepada pembaca dan praktisi kesehatan untuk mendalami potensi *M. crenata* sebagai sumber fitoestrogen dan neuroprotektor.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki efek neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3 melalui pengukuran ER β bebas?

2. Berapakah nilai *effective dose* (ED₅₀) dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang mampu menurunkan intensitas fluoresensi ER- β bebas pada sel mikroglia HMC3?

1.3 Tujuan Penelitian

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

1. Membuktikan potensi dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki efek neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3 melalui pengukuran ER- β bebas.
2. Mengetahui nilai *effective dose* (ED₅₀) dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yang mampu menurunkan intensitas fluoresensi ER β bebas pada sel mikroglia HMC3.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1.4.1 Manfaat Aplikatif

1. Menambah pengetahuan masyarakat akan manfaat tanaman semanggi.
2. Menambah pengetahuan di bidang kesehatan, yakni dapat memberikan informasi bahwa *M. crenata* merupakan salah satu sumber hormon estrogen.
3. Penggunaan obat tradisional di masyarakat, sebagai bentuk dari pemanfaatan bahan alam atau konsep *back to nature*.

1.4.2 Manfaat Teoritis

1. Menambah referensi mengenai kemampuan IFN- γ dalam menginduksi sel mikroglia HMC3 melalui jalur patofisiologis neuroinflamasi.
2. Menambah referensi mengenai metode ICC dan instrumen CLSM bagi peneliti lainnya.
3. Mengetahui aktivitas dan ED₅₀ tanaman semanggi sebagai sediaan neuroprotektif.

1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagian tanaman semanggi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun yang memiliki warna hijau muda yang diperoleh dari Desa Kendung, Benowo, Surabaya, Provinsi Jawa Timur.
2. Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak adalah Etanol 96%.
3. Ekstraksi yang digunakan menggunakan metode UAE.
4. Sel yang digunakan adalah sel mikroglia HMC3, diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, USA, dan dilakukan kultur di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang.
5. Induktor yang digunakan yaitu IFN- γ
6. *Marker* yang diamati yaitu ER β bebas.
7. Metode yang digunakan adalah *immunocytochemistry* (ICC).
8. Instrumen yang digunakan adalah CLSM.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Semanggi (*M. crenata* C. Presl)

Semanggi merupakan tumbuhan air yang banyak terdapat di lingkungan air tawar seperti sawah, kolam, danau, dan sungai. Semanggi memiliki beberapa nama lain seperti jukut calingcingan (Sunda), tapak itek (Malaysia), upat-upat (Filiina), chutul phnom (Kamboja), pak vaen (Laos), phak waen (Thailand), dan *water clover fern* (Inggris) (Afriastini, 2003).

2.1.1 Klasifikasi

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Filicianae

Bangsa : Salviniiales

Suku : Marsileaceae

Marga : *Marsilea*

Jenis : *Marsilea crenata* C. Presl.

Nama umum/dagang : Semanggi (Afriastini, 2003)



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

2.1.2 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tanaman ini tumbuh tersebar di Asia Tenggara di daerah yang mempunyai ketinggian 900 meter di atas permukaan air laut. Di Indonesia banyak terdapat di pulau Jawa dan Madura. Tumbuhan liar yang sering dijumpai disawah, pematang, saluran air, selokan yang tidak dalam, dan genangan air (Hutapea, 1994; Ma'arif, 2012). Tumbuhan semanggi tumbuh merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm (Afriastini, 2003).

2.1.3 Habitus dan Morfologi

Habitus : Paku air atau paku rawa, dengan tangkai panjang dan tegak, panjang 2-30 cm.

Daun : Daun berdiri sendiri atau dalam berkas, menjari berbilangan 4, anak daun menyilang, berhadapan, berbentuk baji bulat telur, gundul atau hampir gundul, 3-22 kali 2-18 mm, urat daun rapat berbentuk kipas, pada air yang tidak dalam muncul di atas air, pada air yang mengapung (Steeins, 1975; Ma'arif, 2012).

Akar : Akar pada tanaman semanggi tertanam dalam substrat di dasar perairan (Afriastini, 2003)

2.1.4 Kandungan

Daun dan batang *Marsilea crenata* C. Presl. mengandung saponin, triterpenoid bebas, steroid, flavonoid, dan polifenol (Tiyaningsih, 2007) dan memiliki kandungan air yang tinggi yaitu sebesar 82,59%, abu 1,72%, protein 1,91%, lemak 0,36%, karbohidrat 11,46 % dan serat kasar 1,96%. Ekstrak kasar semanggi mengandung 6 komponen bioaktif yaitu alkaloid, steroid, flavonoid,

karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino (Nurjanah *et al.*, 2012). Semanggi juga banyak memiliki senyawa yang bersifat folatil diantaranya yaitu monoterpenoid, diterpenoid, dan beberapa kelompok asam amino yang memiliki aktivitas. Salah satu asam amino yang terdapat pada semanggi yang memiliki aktivitas antiosteoporosis yaitu asam palmitat (Ma'arif *et al.*, 2016). Ekstrak etanol 96% mengandung senyawa agonis 3OLS diantaranya adalah *Prochlorperazine*, *1-methyl-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl] benzimidaol-5-amine*, *11-Aminododecanoic acid* (Mirza, 2019).

2.1.5 Kegunaan

Semanggi secara turun temurun sudah digunakan untuk mengobati penyakit asma, batu empedu, batu ginjal, infeksi saluran kemih, radang amandel, radang kerongkongan, sakit kuning, salesma dan *cantengan* (bengkak pada jari tangan atau kaki karena infeksi) dan infeksi telinga (SarI, 2008). Hasil uji aktivitas *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* daun semanggi juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat memiliki afinitas yang tinggi terhadap *estrogen receptor-β* (ER-β) serta secara fungsi dapat ditemui pada pengujian *in vitro* menggunakan sel mikroglia HMC3 yang menurunkan intensitas MHC II karena pemberian ekstrak etanol 96% daun Semanggi (Mirza, 2019).

2.2 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang

tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995). Ada beberapa jenis ekstrak yakni ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5-30%. Ekstrak kering jika mengandung kadar air kurang dari 5% (Voight, 1994).

2.2.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan, dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif yang akan diekstraksi terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda, demikian pula metode ekstraksi yang digunakan. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014).

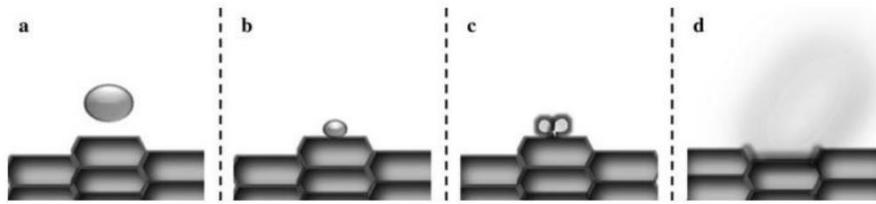
Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Senyawa aktif yang telah diketahui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

2.2.3 Ekstraksi UAE

Ekstraksi ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-20.000 kHz (Banu dan Catherine, 2015). Prinsip kerja dari ekstraksi ini yaitu meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga timbul fraksi interfase (Ma'arif, 2012). Mekanisme yang terjadi yaitu intensifikasi masif transfer massa

dan laju kecepatan pelarut ke bahan sel dari bagian tanaman. Mekanisme ekstraksi oleh ultrasonik melibatkan dua jenis fenomena fisika yaitu difusi di dinding sel dan pembilasan isi sel setelah memecahkan dinding. Kadar air sampel, tingkat penggilingan, ukuran partikel dan pelarut merupakan faktor yang sangat penting untuk memperoleh ekstraksi yang efisien dan efektif. Selain itu, suhu, tekanan, frekuensi dan waktu sonikasi adalah faktor yang juga mempengaruhi kerja UAE. UAE juga telah digabungkan dengan berbagai teknik klasik untuk meningkatkan efisiensi sistem konvensional. Dalam unit ekstraksi pelarut, perangkat ultrasonik ditempatkan pada posisi yang tepat untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi (Azmir *et al.*, 2013).

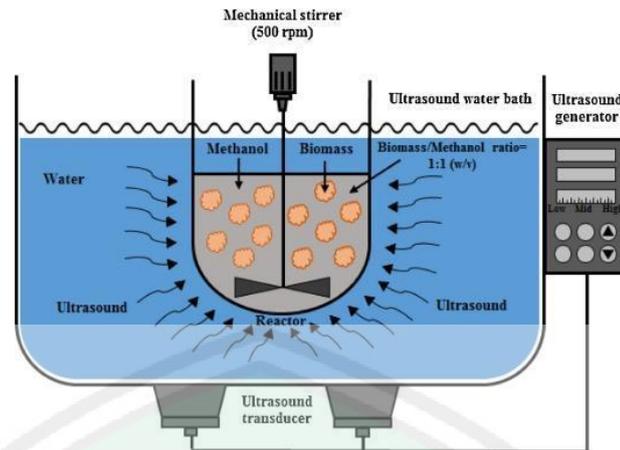
Metode ekstraksi UAE memiliki faktor penentu keberhasilan diantaranya adalah ukuran partikel ekstrak, *moisture content* bahan dan pelarut yang digunakan (Ngaha Njila *et al.*, 2017). *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) memiliki kekuatan kavitas akustik sebagai kekuatan pendorong utama yang mampu menginduksi serangkaian kompresi dan *rarefactions* dalam molekul pelarut, sehingga menyebabkan pembentukan gelembung sebagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al.*, 2017). Proses terjadinya mekanisme ekstraksi metode ini diawali dengan terjadi perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitas. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Vilkhu *et al.*, 2008). Proses mekanisme ini dapat diamati pada gambar berikut ini (Esclapez *et al.*, 2011):



Gambar 2.2 Proses Mekanisme Ekstraksi UAE

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

Metode UAE memiliki keuntungan yaitu mudah untuk ditangani, aman dan ekonomis (Vieira *et al.*, 2013). Selain itu, Keuntungan dari UAE yaitu mengurangi waktu ekstraksi, energi dan penggunaan pelarut. Energi ultrasonik dapat memberikan beberapa manfaat lainnya yaitu pencampuran yang lebih efektif, transfer energi yang lebih cepat, pengurangan gradien termal dan temperatur ekstraksi, ekstraksi selektif, pengurangan ukuran peralatan, respon lebih cepat terhadap pengendalian proses ekstraksi, peningkatan produksi dan menghilangkan langkah-langkah proses seperti metode lainnya (Chemat *et al.*, 2008). Namun, penggunaan metode ini juga memiliki kerugian yaitu penggunaan yang sulit dilakukan untuk skala besar, memiliki biaya pengerjaan tinggi serta gelombang yang ditimbulkan meskipun jarang terjadi dapat merubah struktur senyawa aktif dalam simplisia (Banu dan Catherine, 2015). Proses metode ini dapat diamati pada gambar berikut ini:



Gambar 2.3 Proses terjadinya Ekstraksi menggunakan Metode UAE

2.2.4 Rotary Evaporator

Rotary Evaporator adalah alat yang berfungsi untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya sehingga dihasilkan ekstrak dengan kandungan kimia tertentu sesuai yang diinginkan. Cairan yang ingin diuapkan biasanya ditempatkan dalam suatu labu yang kemudian dipanaskan dengan bantuan penangas, dan diputar. Uap cairan yang dihasilkan didinginkan oleh suatu pendingin (kondensor) dan ditampung pada suatu tempat. Kecepatan alat ini dalam melakukan evaporasi sangat cepat, terutama bila dibantu oleh vakum. Kelebihan dari alat ini adalah diperolehnya kembali pelarut yang diuapkan (Senjaya dan Surakusumah, 2002).

Prinsip kerja alat ini didasarkan pada titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari pelarut terkumpul di atas, serta adanya kondensor yang menyebabkan uap ini mengembun dan akhirnya jatuh ke tabung penerima (*receiver flask*). Setelah pelarutnya diuapkan, akan dihasilkan ekstrak yang dapat berbentuk padatan (solid) atau cairan (liquid) (Nugroho *et al.*, 1999; Senjaya dan Surakusumah, 2002).

2.3 Tinjauan Tentang Fitoestrogen

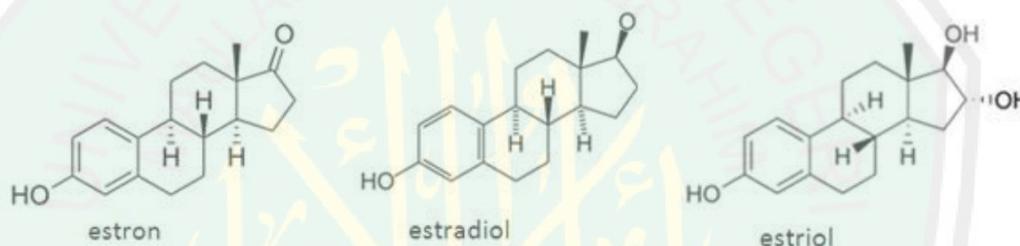
Fitoestrogen adalah substansi derivat dari tanaman yang secara struktur maupun fungsional sama seperti 17β -estradiol (E2) (Duffy *et al.*, 2010). Khasiat estrogenik terjadi karna fitostrogen juga memiliki 2 gugus –OH atau hidroksil yang berjarak 1,0-11,5 Å pada intinya, sama persis dengan inti estrogen sendiri. Para peneliti sepakat bahwa jarak 11 Å dan gugus –OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik, yakni memiliki afinitas tertentu untuk dapat “menduduki” *estrogen receptors*. Substrat-substrat tersebut baru akan berefek estrogenik apabila telah berikatan dengan reseptor-reseptor estrogen. Senyawa-senyawa tersebut antara lain isoflavon, lignan, coumestan dan Tripteren glikosid (Darmadi, 2011).

Fitoestrogen merupakan senyawa dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur dengan estrogen sehingga dapat menunjukkan sifat agonis pada *Estrogen Receptor* (ER). Kemampuan meniru efek estrogen oleh fitoestrogen didasarkan oleh keberadaan senyawa dengan berat molekul setara dengan estrogen (272g/mol), cincin fenolik sebagai binding site dan memiliki inti dengan dua gugus hidroksil dengan jarak 11,0-11,5Å. Terdapat 4 jenis senyawa fitoestrogen yang terkandung di dalam tanaman antara lain flavonoid, coumestan, lignan, dan stilben (Lestari, 2014). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, *black cohosh*, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al.*, 2013).

Aktivitas fitoestrogen sendiri didalam otak memiliki beberapa manfaat setelah digunakan dalam jangka waktu tertentu seperti meningkatkan fungsi kognitif dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel-sel otak maupun

menghambat pembentukan NF- κ B dengan cara menghambat aktifitas *Toll Like Receptors* dengan reaksi fosforilasi pada protein p38. Aktivitas 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 aktivitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015).

2.4 Tinjauan Tentang Estrogen



Gambar 2.4 Struktur estron, estradiol, estriol (Poppy, 2010)

Estrogen merupakan hormon steroid dengan 10 atom C dan dibentuk terutama dari 17-ketosteroid androstenedion. Estrogen alamiah yang terpenting adalah estradiol, estron dan estriol. Secara biologis, estradiol adalah yang paling aktif dan paling banyak dalam tubuh yaitu dengan perbandingan khasiat biologis berturut-turut dari ketiga hormon tersebut (estradiol, estron dan estriol) yaitu 10 : 5 : 1. Potensi estradiol yakni 12 kali dari potensi estron dan 8 kali dari potensi estriol sehingga estradiol dianggap sebagai estrogen utama (Speroff *et al.*, 2005). Selain di ovarium, estrogen juga di sintesis di adrenal, testis, plasenta, jaringan lemak dan susunan saraf pusat namun dalam jumlah yang kecil. Hal ini

menyebabkan wanita mempunyai kadar estrogen yang rendah setelah menopause (Baziad, 2003).

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

2.4.1 Reseptor Estrogen

Terdapat dua sub tipe reseptor estrogen (Bustamam, 2008), yaitu:

- a. Reseptor α : terdapat banyak pada saluran reproduksi wanita diantaranya adalah uterus, vagina, ovarium dan juga dikelenjar mammae, hipotalamus, sel-sel endotel dan otot polos vascular.
- b. Reseptor β : terletak menyebar yakni terdapat di ginjal, tulang, mukosa, otak dan pembuluh darah.

Aktivasi kedua jenis reseptor ini menyebabkan transkripsi gen tertentu yang merupakan elemen estrogen spesifik. Mutasi ER akan mengakibatkan ekspresi sel

target yang berbeda dari seharusnya dan dapat menjadi predisposisi keganasan. Aktivasi ER menyebabkan transkripsi gen tertentu yang kemudian akan menghasilkan *messenger* RNA (mRNA) untuk sintesis protein tertentu (Suparman, 2014).

2.4.2 Mekanisme Regulasi Estrogen

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

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

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

kB (NF- κ B), and c-jun. Selanjutnya berikatan dengan Promotor DNA dan terjadi proses transkripsi menghasilkan protein.

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

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

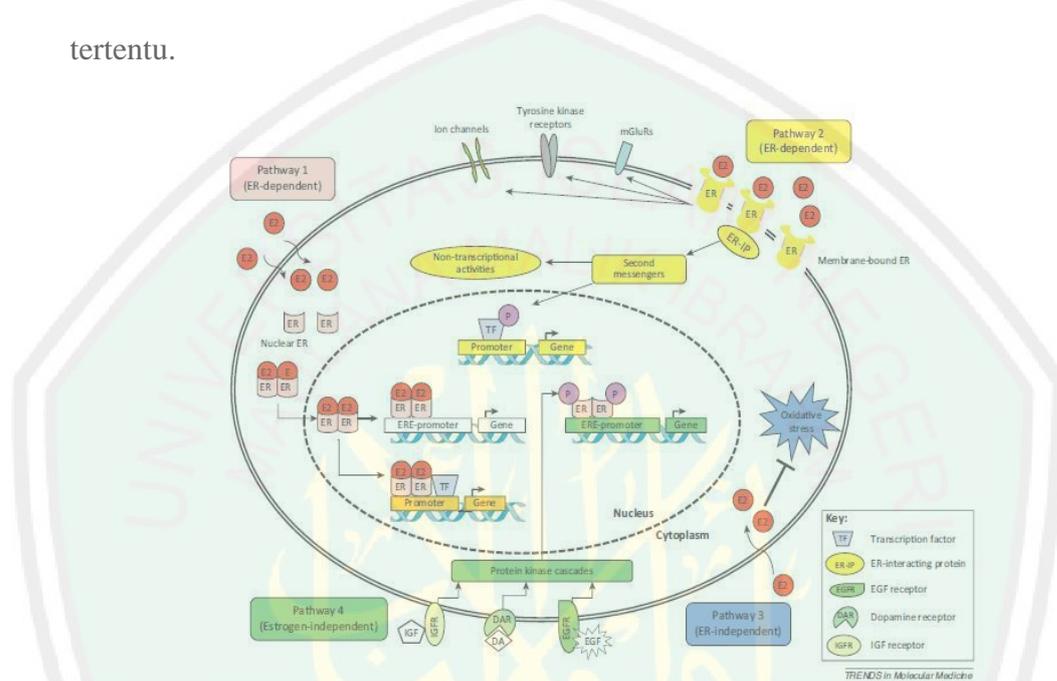
3. *The ER-independent pathway*

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

4. *Ligand-independent activation of ER*

Dalam kondisi fisiologis normal, ER dapat diaktifkan dengan cara ligan-independen melalui pensinyalan yang dipicu oleh berbagai faktor, termasuk neurotransmitter seperti dopamin, faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth*

factor (EGF) dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dan aktivator jalur sinyal intraseluler tertentu, seperti yang dimediasi oleh kinase PKC, PKA, MAPK dan phosphatidylinositol 3-kinase. Aktivasi jalur ligan-independen terkait dengan fosforilasi ER oleh ikatan protein seluler kinase dan ER teraktivasi akan berikatan dengan EREs dan promotor di DNA sehingga dapat menghasilkan protein tertentu.



Gambar 2.5 Mekanisme jalur pensinyalan estrogen (Cui *et al.*, 2013)

2.5 Tinjauan Tentang Pascamenopause

Manusia mengalami pertumbuhan dan perkembangan dalam berbagai tingkatan umurnya. Semakin meningkat umurnya maka pertumbuhan dan perkembangan akan berhenti pada suatu tahap yang mengakibatkan berbagai perubahan fungsi tubuh (Proverawati, 2009). Allah SWT telah menjelaskan hal ini dalam Al-Quran surah Ar-Ruum (30) ayat 54:

﴿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.

Menopause adalah tidak terjadinya periode menstruasi selama 12 bulan akibat dari tidak aktifnya folikel sel telur. Periode transisi menopause dihitung dari periode menstruasi terakhir diikuti dengan 12 bulan periode amenorea (tidak mendapatkan siklus haid) atau bagian dari periode transisi perubahan masa reproduktif ke masa tidak reproduktif. Usia rata-rata menopause berkisar 43 – 57 tahun namun tidak ada cara yang pasti untuk memprediksi kapan seorang wanita akan memasuki masa menopause (Tina, 1999).

2.5.1 Fase Klimakteriks

Klimakterik (Bahasa Yunani: tangga) merupakan periode peralihan dari fase reproduksi menuju fase usia tua (senium) yang terjadi akibat menurunnya fungsi generatif ataupun endokrinologik dari ovarium. Klimakterium merupakan suatu masa peralihan yang normal, yang berlangsung beberapa tahun sebelum dan sesudah menopause. Dalam menentukan awal dan akhir klimakterium sering dijumpai kesulitan, tetapi dapat dikatakan bahwa klimakterium mulai kira-kira 6 tahun sebelum menopause berdasarkan keadaan endokrinologik (kadar estrogen mulai turun dan kadar hormon gonadotropin naik), dan jika ada gejala-gejala klinis. Klimakterium berakhir kira-kira 6-7 tahun sesudah menopause. Pada saat

ini kadar estrogen telah mencapai nilai yang rendah. Dengan demikian, klimakterium lebih kurang 13 tahun (Belardin, 2014).

2.5.2 Perubahan Fisiologis pada Menopause

Mengenai dasar klimakterium dapat dikatakan bahwa pubertas disebabkan oleh mulainya sintesis hormon gonadotropin oleh hipofisis, klimakterium disebabkan oleh kurang bereaksinya ovarium terhadap rangsangan hormon itu. Hal ini disebabkan oleh karena ovarium menjadi tua. Proses tua sudah mulai pada usia 4 tahun. Jumlah folikel pada ovarium waktu lahir \pm 750.000 buah, pada waktu menopause tinggal beberapa ribu buah. Tambahan pula folikel yang tersisa ini rupanya juga lebih resisten terhadap rangsangan gonadotropin. Dengan demikian, siklus ovarium yang terdiri atas pertumbuhan folikel, ovulasi, dan pembentukan korpus luteum lambat laun berhenti. Pada wanita di atas 40 tahun siklus haid untuk 25% tidak disertai ovulasi (Belardin, 2014).

Pada klimakterium terdapat penurunan produksi estrogen dan kenaikan hormone gonadotropin. Kadar hormon gonadotropin ini terus tetap tinggi sampai kira-kira 15 tahun setelah menopause, kemudian mulai menurun. Tingginya kadar hormone gonadotropin disebabkan oleh berkurangnya produksi estrogen, sehingga *negative feedback* terhadap produksi gonadotropin berkurang. Peningkatan kadar FSH dan LH merangsang pembentukan stroma dari ovarium, yang mengakibatkan peningkatan kadar estron dan penurunan kadar estradiol. Tanpa sumber folikel, proporsi terbesar estrogen pada pascamenopause dari stroma ovarium dan sekresi adrenal dari androstenedion, dimana akan diaromatisasi di sirkulasi perifer (Proverawati, 2008).

Dengan berhentinya ovulasi, produksi estrogen oleh aromatisasi androgen di stroma ovarium dan di tempat-tempat ekstra gonad berlanjut, tanpa berlawanan dengan produksi progesterone dari korpus luteum. Kadar estradiol menurun secara signifikan karena penurunan produksi folikel pada menopause, tetapi estron yang diaromatisasi dari androstenedion yang berasal dari sumber nonfolikel, masih diproduksi dan merupakan sumber utama sirkulasi estrogen pada wanita pascamenopause (Proverawati, 2008).

Aromatisasi androgen menjadi estrogen dapat terjadi di jaringan adipose, otot, hati, tulang, sumsum tulang, fibroblas, dan akar rambut. Karena kebanyakan konversi androgen menjadi estrogen terjadi di jaringan adipose, sering diasumsikan bahwa wanita obesitas atau berat badan berlebih yang memiliki lebih banyak sirkulasi estrogen, seharusnya memiliki lebih sedikit keluhan vasomotor (Badziad, 2003).

2.5.3 Keluhan Menopause

Fungsi ovarium yang tidak teratur dan fluktuasi kadar estrogen bukan defisiensi estrogen selama menopause menyebabkan wanita sering mengalami beberapa simptom yang secara keseluruhan disebut sebagai sindrom klimaterik. Lebih kurang 70% wanita perimenopause dan pascamenopause mengalami keluhan vasomotorik, depresif, dan keluhan psikis dan somatik lainnya. Berat atau ringannya keluhan berbeda-beda pada setiap wanita. Seiring dengan bertambahnya usia pascamenopause, disertai dengan hilangnya respon ovarium terhadap gonadotropin, simptom yang berhubungan dengan klimakterium juga semakin menurun (Proverawati, 2008). Simptom tersebut berupa:

a. Simptom Vasomotor

Simptom vasomotor mempengaruhi sampai pada 75% wanita perimenopause. Simptom ini berakhir satu sampai dua tahun setelah menopause pada kebanyakan wanita, tetapi dapat juga berlanjut sampai sepuluh tahun atau lebih pada beberapa lainnya. Gejolak panas (*hot flashes*) merupakan alasan utama wanita untuk mencari pertolongan dan mendapatkan terapi hormon (Mulyati, 2006).

b. Keluhan Somatik

Estrogen memicu pengeluaran β -endorfin dari susunan saraf pusat. Kekurangan estrogen menyebabkan pengeluaran β -endorfin berkurang, sehingga ambang sakit juga berkurang. Oleh karena itu, tidak heran kalau wanita peri/pascamenopause sering mengeluh sakit pinggang atau mengeluh nyeri di daerah kemaluan, tulang dan otot. Nyeri tulang dan otot merupakan keluhan yang paling sering dikeluhkan wanita usia peri/pascamenopause. Pemberian Terapi Sulih Hormon (TSH) dapat menghilangkan keluhan tersebut (Badziad, 2003)

c. Keluhan Psikis

Steroid seks sangat berperan terhadap fungsi susunan saraf pusat terutama terhadap perilaku suasana hati, serta fungsi kognitif dan sensorik seseorang. Dengan demikian, tidak heran bila terjadi penurunan sekresi steroid seks, timbul perubahan psikis yang berat dan perubahan fungsi kognitif. Kurangnya aliran darah ke otak menyebabkan sulit berkonsentrasi dan mudah lupa. Akibat kekurangan hormon estrogen pada wanita pascamenopause,

timbullah keluhan seperti mudah tersinggung, cepat marah, dan berasa tertekan (Badziad, 2003).

d. Gangguan Tidur

Gangguan tidur paling banyak dikeluhkan wanita pascamenopause. Kurang nyenyak tidur pada malam hari menurunkan kualitas hidup wanita tersebut. Estrogen memiliki efek terhadap kualitas tidur. Reseptor estrogen telah ditemukan di otak yang mengatur tidur. Penelitian lain menunjukkan bahwa wanita yang diberi estrogen equin konjugasi memiliki periode '*rapid eye movement*' yang lebih panjang dan tidak memerlukan waktu lama untuk tidur (Badziad, 2003).

e. Fungsi Kognitif dan Sensorik

Kemampuan kognitif, ataupun kemampuan mengingat akan bertambah buruk akibat kekurangan hormon estrogen. Akibat kekurangan estrogen terjadi gangguan fungsi sel-sel saraf serta terjadi pengurangan aliran darah ke otak. Pada keadaan kekurangan estrogen jangka lama dapat mendapatkan kerusakan pada otak, yang suatu saat kelak dapat menimbulkan demensia atau penyakit Alzheimer. Pada wanita yang dilakukan pengangkatan kedua ovarium pada usia muda yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar estrogen dan androgen secara tiba-tiba, akan terjadi perburukan fungsi kognitif. Pemberian estrogen atau endrogen dapat mencegah perburukan tersebut (Badziad, 2003).

f. Seks dan Libido

Semakin meningkat usia, maka makin sering dijumpai gangguan seksual pada wanita. Akibat kekurangan hormon estrogen, aliran darah ke vagina berkurang, cairan vagina berkurang, dan sel-sel epitel vagina menjadi tipis dan

mudah cedera. Beberapa penelitian membuktikan bahwa kadar estrogen yang cukup merupakan faktor terpenting untuk mempertahankan kesehatan dan mencegah vagina dari kekeringan sehingga tidak ada lagi menimbulkan nyeri saat senggema (Badziad, 2003).

g. Gangguan Neurologi

Lebih kurang sepertiga wanita menderita sakit kepala dan migrain. Pada 12% wanita keluhan tersebut muncul menjelang atau selama haid berlangsung. Ini menunjukkan adanya hubungan keluhan tersebut dengan perubahan hormonal. Pada sepertiga wanita, sakit kepala atau migrain akan membaik setelah menopause. Namun, terdapat juga wanita yang keluhan sakit kepala dan migrain justru bertambah berat setelah memasuki usia menopause. Migrain yang muncul berhubungan dengan siklus haid diduga berkaitan dengan turunnya kadar estradiol (Badziad, 2003).

WHO memperkirakan ditahun 2030 nanti ada 1,2 miliar wanita yang berada pada masa pascamenopause. Sebagian besar dari mereka (sekitar 80 persen) tinggal di negara ber kembang dan setiap tahunnya populasi wanita menopause meningkat sekitar 3 persen. Perkiraan kasar menunjukkan akan terdapat sekitar 30-40 juta kaum wanita usia lanjut (wulan) dari seluruh jumlah penduduk Indonesia yang sebesar 240-250 juta. Dalam kategori wulan tersebut (usia lebih dari 60 tahun), hampir 100 persen telah mengalami menopause dengan segala akibat serta dampak yang menyertainya (Sullelu, 2010).

2.6 Tinjauan Tentang Sistem Saraf Pusat

Sistem saraf merupakan serangkaian organ kompleks dan berkesinambungan (Sloane, 2003) yang berfungsi untuk mengatur dan merespon perubahan yang terjadi di dalam dan di luar tubuh atau lingkungan. Sistem saraf juga bertanggungjawab sebagai sistem persepsi, perilaku dan daya ingat, serta merangsang pergerakan tubuh (Farley *et al.*, 2014). Secara anatomi, sistem saraf terdiri dari sistem saraf pusat dan sistem saraf tepi. Sistem saraf pusat yang terdiri dari otak dan medulla spinalis, berfungsi untuk mengintegrasikan, memproses dan mengkoordinasi data sensorik dengan perintah motorik.

Sistem saraf dibentuk oleh jaringan saraf. Sel pembentuk saraf diantaranya yaitu sel saraf (neuron) dan sel penunjang (neuroglia/sel glia). Sel neuron berfungsi untuk menghantarkan dan memproses informasi; menjalankan fungsi sistem saraf seperti mengingat, berfikir, dan mengontrol semua aktivitas tubuh. Sedangkan sel neuroglia berfungsi untuk memberi dukungan, melindungi, merawat dan mempertahankan homeostasis cairan di sekeliling neuron (Cowrin, 2009).

2.7 Tinjauan Tentang Neuroglia

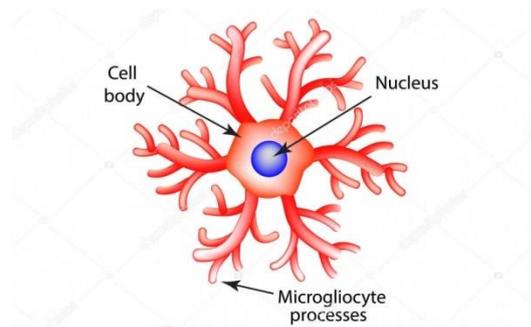
Neuroglia atau sel penyokong memiliki fungsi untuk menopang struktural dan nutrisi bagi neuron, isolasi elektrik, menaikkan konduksi impuls di sepanjang akson. Ada dua jenis sel glia yaitu sel glia pada sistem saraf pusat dan sel glia pada sistem saraf tepi (Cowrin, 2009).

Sel glia pada sistem saraf pusat terdiri dari (Cowrin, 2009):

- a. Astrosit : sel dengan ukuran paling besar, bentuk sferis, tidak teratur, memiliki fungsi utama untuk memberikan sokongan struktur sel, memberi nutrisi, membentuk *barrier* darah-otak.
- b. Oligodendroglia : sel dengan jumlah paling banyak, memiliki fungsi sebagai pendukung konduksi impuls (membentuk mielin) pada SSP.
- c. Sel ependima : merupakan neuroepitel, terdapat di lapisan dalam ventrikel otak, berfungsi sebagai penghasil cairan serebrospinal, pelindung nutrisi sel.
- d. Mikroglia : memiliki ukuran paling kecil dan berfungsi sebagai komponen fagositik atau melindungi sel dari pengaruh luar.

2.8 Tinjauan Tentang Mikroglia

Mikroglia adalah tipe dari sel glial yang merupakan sel imun pada sistem saraf pusat (SSP). Mikroglia, sel glial terkecil dapat juga beraksi sebagai fagosit, membersihkan debris sistem saraf pusat. Kebanyakan merupakan sebagai representatif sistem imun otak dan medula spinalis. Mikroglia adalah sepupu dekat sel fagosit lainnya, termasuk makrofag dan sel dendritik. Mikroglia memainkan beberapa peran penting dalam melindungi sistem saraf (Rock, 2004). Pada otak manusia normal, jumlah sel mikroglia berkisar 0.5% hingga 16.6% dari semua sel otak (Prasetyo, 2017).



Gambar 2.6 Sel Mikroglia

Sel mikroglia pertama kali di karakterisasi oleh Pio del Rio-Hortega melalui gambaran jelas mengenai fenotip morfologinya pada sekitar tahun 1920 (Kettenmann *et al.*, 2011). Sel tersebut melepaskan substansi larut seperti faktor neurotropik yang mempengaruhi tingkat proliferasi dari sel neural progenitor dimana akan meningkatkan respon cedera pada otak (Kettenmann *et al.*, 2011) serta meningkatkan neurogenesis dan atau proliferasi progenitor yang terjadi pada penyakit seperti epilepsi, stroke, neuroinflamasi maupun penyakit neurodegeneratif lainnya.

Sel ini berasal dari mesodermal atau mesenkimal dan bermigrasi ke seluruh sistem susunan saraf pusat, kemudian menyebar ke daerah parenkim otak. Melalui *signaling pathways* sel mikroglia berkomunikasi dengan neuron dan sistem kekebalan tubuh. Sebagai makrofag di SSP, sel mikroglia bertindak sebagai bentuk aktif pertama dan utama dari sistem imun (Filiano *et al.*, 2015). Mikroglia yang telah aktif dapat menjalankan banyak fungsi seperti fagositosis, melepaskan sitokin, melakukan perbaikan pada sel dan berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) (Morales *et al.*, 2014).

2.9 Tinjauan Tentang Neuroinflamasi

Inflamasi merupakan respon tubuh terhadap adanya kerusakan jaringan dan melibatkan sistem imun seluler maupun pelepasan mediator. Respon inflamasi terdiri dari fase proinflamasi dimana terjadi pembersihan patogen, sel yang rusak, dan debris seluler dan pengembalian hemostasis lokal seperti sebelumnya. Dilanjutkan dengan fase resolusi, terjadi perbaikan jaringan, dan hilangnya efek yang berpotensi merusak dari respon inflamasi yang terus menerus (Ellis dan Bennett, 2013). Apabila inflamasi menetap dalam waktu yang lama akan menyebabkan efek yang tidak diinginkan (Block, 2014).

Respon neuroinflamasi bertujuan membersihkan agen yang berpotensi merusak jaringan saraf atau sisa debris seluler (Ramesh, 2014). Mikroglia yang aktif merupakan salah satu bentuk respon fisiologi yang berfungsi melawan agen-agen tersebut (Wang *et al.*, 2014). Peningkatan sel mikroglia secara genetik dapat muncul karena aktivasi NF- κ B yang disebabkan oleh defisiensi estrogen pada wanita yang telah memasuki masa pascamenopause (Lee *et al.*, 2013). Peningkatan tersebut menyebabkan ekspresi penanda *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) ikut meningkat (Chamniansawat dan Chongtammakun, 2015) dan selanjutnya memicu munculnya mediator peradangan seperti Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Jantaratnotai *et al.*, 2013).

Tingginya kadar sitokin di otak dalam waktu lama akan memicu terjadinya neuroinflamasi kronis (Careaga *et al.*, 2010). Sitokin tersebut akan mengganggu kerja dari *Blood Brain Barrier* (BBB) atau sawar darah otak yang berfungsi menjaga normalitas homeostasis sistem saraf pusat dan mengakibatkan

berkurangnya jumlah dendrit primer dalam otak, kelenjar, panjang dendrit dan mempengaruhi kelangsungan hidup dan aktivitas neuron (Gilmore *et al.*, 2004) sehingga berujung pada gangguan neurodegeneratif (Wang *et al.*, 2014).

2.10 Tinjauan Tentang Neurodegeneratif

Neurodegeneratif merupakan kondisi patologis pada sel saraf dimana sel saraf tersebut mengalami kehilangan struktur atau fungsi sebenarnya secara progresif (Kovacs *et al.*, 2014). Prevalensi dari penyakit tersebut semakin meningkat setiap tahunnya, yaitu 74,7 juta jiwa pada tahun 2030 serta 131,5 juta jiwa pada tahun 2050, dimana mayoritas penderitanya adalah wanita pascamenopause (Prince *et al.*, 2015).

Proses neurodegenerasi ini terjadi disebabkan oleh berkurangnya sel-sel neuron pada struktur saraf, seperti halnya yang terdapat pada penyakit neurodegeneratif otak. Penderita neurodegenerasi umumnya akan mengalami gangguan memori dan pergerakan (Bertram *et al.*, 2005). Penyakit tersebut seringkali dikarakterisasi dengan penumpukan beta amiloid yang berlebih. Beta amiloid ini bersifat neurotoksik dan dapat menyebabkan kematian pada sel-sel saraf yang dikarakterisasi oleh sel-sel saraf yang degeneratif. Selanjutnya juga disebutkan bahwa neurodegeneratif dapat terjadi karena beberapa penyebab diantaranya yaitu perubahan biokimia, genetik maupun peningkatan radikal bebas penyebab terjadinya stress oksidatif yang merujuk pada terjadinya mekanisme neuroinflamasi pada sistem sel saraf (Kovacs, 2016).

2.11 Tinjauan Tentang Sel Mikroglia HMC3 (ATCC® CRL-3304™)

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

- a. Organisme Asal : *Homo sapiens* (manusia)
- b. Jaringan : Otak
- c. Tipe Sel : Mikroglia
- d. Usia : Embrio
- e. Morfologi : Makrofag
- f. Sifat Pertumbuhan : Melekat
- g. Penggunaan : Sel mikroglia manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglial primer. Seringkali digunakan untuk analisis biokimia terkait fungsi sel mikroglial di dalam otak, seperti dalam mekanisme neuroinflamasi.
- h. Sumber : ATCC

2.12 Tinjauan Tentang Interferon-gamma

Interferon (IFN) merupakan molekul protein kecil dengan bobot molekul 12.000-30.000, yang stabil pada pH asam serta panas, namun masa aktifnya pendek. Fungsi utama sitokin ini adalah merupakan mediator pada respon imun terhadap infeksi virus. IFN tergolong sitokin yang dirilis oleh sel inang (seperti limfosit dan makrofag) yang terinfeksi virus dan berfungsi mencegah penyebaran infeksi virus lebih lanjut. Rilis interferon terjadi manakala asam nukleat virus berikatan dengan *toll-like receptor* (TLRs), seperti TLR3, TLR7 atau TLR8. IFN dapat menyebabkan gejala malaise, otot nyeri, demam menggigil dan sakit kepala,

yang berkaitan dengan infeksi virus (Lucia, 2016). Sejarah penemuan IFN dimulai pada tahun 1954 ketika Nagano dan Kojima menemukannya pada virus di kelinci. Tiga tahun kemudian Isaacs dan Lindenmann berhasil menemukan molekul yang serupa pada kultur sel ayam yang diinfeksi dengan virus influenza (Kallioliias dan Ivashkiv, 2010).

Ada dua tipe dari *human* IFN (Lucia, 2016);

- a. Interferon tipe I yaitu IFN- α dan IFN- β , berasal dari leukosit (misalnya limfosit dan makrofag) dan fibroblas jaringan ikat, terekspresikan pada awal terjadinya infeksi virus. Beberapa jam setelah terjadinya infeksi virus pada leukosit monosit, makrofag dan beberapa limfosit, maka akan terjadi sekresi IFN- α . Hal yang sama, bila terjadi pada fibroblas, kartilago, tendon dan tulang, maka akan terjadi produksi IFN- β . Fungsinya adalah:
 - Menginduksi sel tetangga yang tidak terinfeksi virus untuk memproduksi protein antivirus,
- b. Interferon tipe II yaitu IFN- γ , diproduksi oleh sel limfosit T dan sel limfosit NK yang teraktivasi oleh paparan antigen virus. Limfosit T merupakan komponen sistem imun adaptif, yang terstimulasi pada infeksi virus beberapa hari setelah infeksi awal. IFN- γ disebut sebagai faktor pengaktivasi makrofag dan aktivitas fagositik. Fungsinya adalah:
 - Menginduksi sel tetangga yang tidak terinfeksi virus untuk memproduksi protein antivirus,
 - IFN- γ menginduksi neutrofil dan makrofag untuk membinasakan bakteri,

- Menstimulasi makrofag untuk menghasilkan NO guna menghambat produksi ATP sehingga sel bakteri dan sel kanker akan rusak
- Sebagai imuno-modulator, yang dapat meningkatkan ekspresi molekul kelas II untuk mempresentasikan antigen.

Tabel 2.1 Karakter Interferon Manusia

	Tipe I		Tipe II
	IFN- α	IFN- β	IFN- γ
Lokasi sumber	Epitel, leukosit	Fibroblas	Limfosit teraktivasi
Agen penginduksi	Virus	Virus	Respon imun adaptif
Aksi	Stimulasi produksi protein antivirus	Stimulasi produksi protein antivirus	Stimulasi aktivitas fagositik dari makrofag dan neutrofil
Nama lain	Leukosit-IFN	Fibroblas-IFN	- faktor pengaktivasi makrofag - Imune-IFN

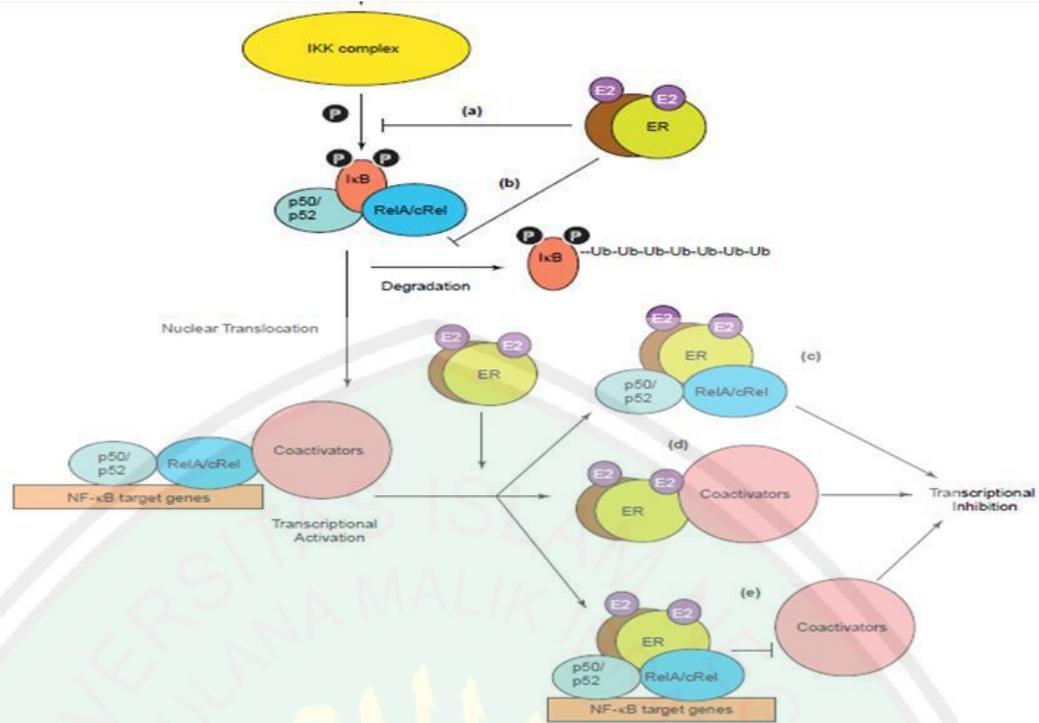
Secara teoritis IFN bermanfaat untuk terapi anti-virus dengan beberapa kekurangan penggunaan diantaranya yaitu masa aktifnya yang singkat (Lucia, 2016). Namun secara invitro, IFN dapat dimanfaatkan sebagai substituen dari defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause untuk memunculkan patofisiologis neurodegeneratif (Vagaska *et al.*, 2016).

2.13 Tinjauan Tentang *Nuclear Chain Kappa Light B Activated* (Nf-kB)

Nuclear Chain Kappa Light B Activated (Nf-kB) merupakan salah satu keluarga faktor transkripsi yang memiliki peran dalam regulasi berbagai transkripsi protein di sel. Regulasi yang dilakukan meliputi proliferasi, inflamasi, dan proteksi terhadap invasi antigen. Nf-kB bisa ditemui di sitoplasma secara tidak

aktif terikat bersama IKK Kompleks dan secara aktif dalam bentuk dimer tunggal di nukleus. Nf-kB terdiri dari 5 anggota utama diantaranya ialah p65/ relA, relB, c-rel, p50, dan p52. Aktivasi Nf-kB bisa dilakukan melalui berbagai signal intraseluler yaitu faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, virus, dan komponen dinding sel bakteri. Signal intraseluler tersebut menyebabkan fosforilasi pada rantai pengikat Nf-kB dan Inhibitor Kinase B (I κ B) sehingga I κ B lepas dari ikatan dengan Nf-kB dan mengalami degradasi oleh protein P20S. Nf-kB yang telah lepas tersebut akan melakukan translokasi atau berpindah dari sitoplasma ke nukleus dan akan melakukan transkripsi gen (Tilstra *et al.*, 2011).

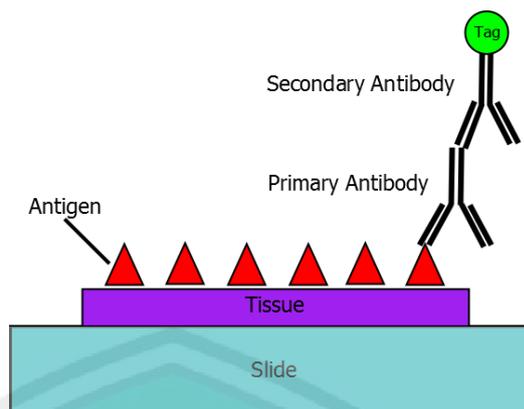
Estrogen Receptor yang berikatan dengan E2 atau estradiol (*Estrogen Receptor* teraktivasi) juga merupakan faktor transkripsi yang memediasi respons biologi pada sistem reproduksi dan non-reproduksi yaitu sistem kardiovaskuler, tulang persendian, dan sistem saraf. *Estrogen receptor* yang teraktivasi mampu menghambat aktivasi Nf-kB dengan 5 mekanisme. 2 mekanisme terdapat di sitoplasma dan 3 mekanisme penghambatan yang lain di nukleus. Mekanisme di sitoplasma meliputi mekanisme penghambatan fosforilasi pada rantai ikatan antara Nf-kB dengan I κ B dan mekanisme penghambatan degradasi I κ B oleh protein P20S. Sementara penghambatan di nukleus terdapat 3 macam diantaranya menghambat Nf-kB, menghambat *Coactivator*, dan menghambat kompleks Nf-kB dengan *Coactivator* (Kalaitzidis *et al.*, 2005).



Gambar 2.7 Mekanisme penghambatan aktivasi Nf-κB oleh *Estrogen Receptor* teraktivasi (Kalaitzidis *et al.*, 2005).

2.14 Tinjauan Tentang *Immunocytochemistry* (ICC)

Immunocytochemistry (ICC) merupakan teknik yang umum digunakan dalam laboratorium untuk memvisualisasikan lokasi suatu protein atau antigen tertentu dalam sel dengan menggunakan antibodi primer yang kemudian akan 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 telah terkonjugasi dengan gugus fluorofor. Metode ini memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi apakah sel dalam sampel tertentu dapat mengekspresikan antigen yang diinginkan (Javois, 1999; Fujiwara *et al.*, 2011; Taylor dan Rudbeck, 2013).



Gambar 2.8 Pengamatan dengan metode ICC

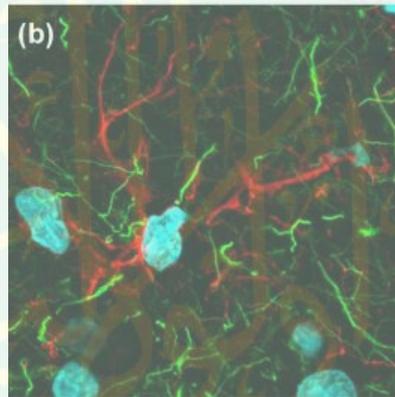
Tujuan dari ICC adalah untuk mendeteksi suatu molekul dalam sampel biologis yang sangat kompleks. Secara umum teknik ICC terdiri dari empat tahap

- a. Preparasi sel
- b. *Blocking binding site* pengganggu (non spesifik) dengan inkubasi pada larutan tertentu, dimana larutan tersebut mengandung protein yang berbeda dengan antigen dengan konsentrasi tinggi
- c. Inkubasi dengan antibodi primer
- d. Deteksi molekul antibodi primer (Holmseth *et al.*, 2006)

Perbedaan mendasar ICC dengan *immunohistochemistry* (IHC) terletak pada sampel atau objek yang digunakan, walaupun sebagian besar prinsip dan teknik pewarnaannya sama. Pada ICC sampel yang digunakan adalah sel utuh yang hampir seluruh matriks ekstraselularnya dihilangkan, termasuk di dalamnya 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 (Javois, 1999; Taylor dan Rudbeck, 2013).

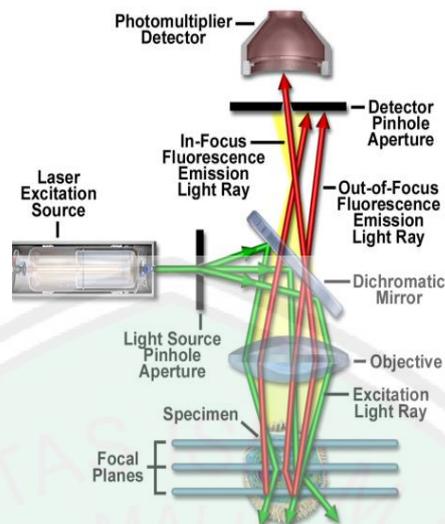
2.15 Tinjauan Tentang CLSM

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) merupakan instrumen yang digunakan untuk mengamati sampel dengan memanfaatkan laser sebagai sumber pengamatan dan menggunakan kamera untuk merekam hasil pengamatan yang kemudian diolah menggunakan *software* pengolah data yang terdapat pada komputer. Pada instrumen ini pendar sampel dapat diamati setelah dikenai laser dengan panjang gelombang tertentu (Lattante *et al.*, 2014). Instrumen ini awalnya dikembangkan oleh seorang mahasiswa kesehatan di Amerika Serikat bernama Marvin Minsky untuk mengamati aktivitas sel otak (Claxton *et al.*, 2010) diamati pada gambar 2.9.



Gambar 2.9 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 2.10.



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

2.16 Tinjauan Tentang Anova

Anova merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya (Ghozali, 2009). Prinsip uji tersebut adalah melakukan analisis variabilitas data menjadi dua sumber variasi yaitu variasi di dalam kelompok (*within*) dan variasi antar kelompok (*between*). Bila variasi *within* dan *between* sama (nilai perbandingan kedua varian mendekati angka satu), berarti nilai *mean* yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila variasi antar kelompok lebih besar dari variasi didalam kelompok, nilai *mean* yang dibandingkan menunjukkan adanya perbedaan (Aryani, 2013).

2.17 Tinjauan Tentang Indeks Terapi

Indeks terapeutik suatu obat adalah rasio dari dosis yang menghasilkan toksisitas dengan dosis yang menghasilkan suatu respon yang efektif dan diinginkan secara klinik dalam suatu populasi individu, dengan rumus;

$$\text{Indeks Terapi} = \frac{TD_{50}}{ED_{50}}$$

Keterangan =

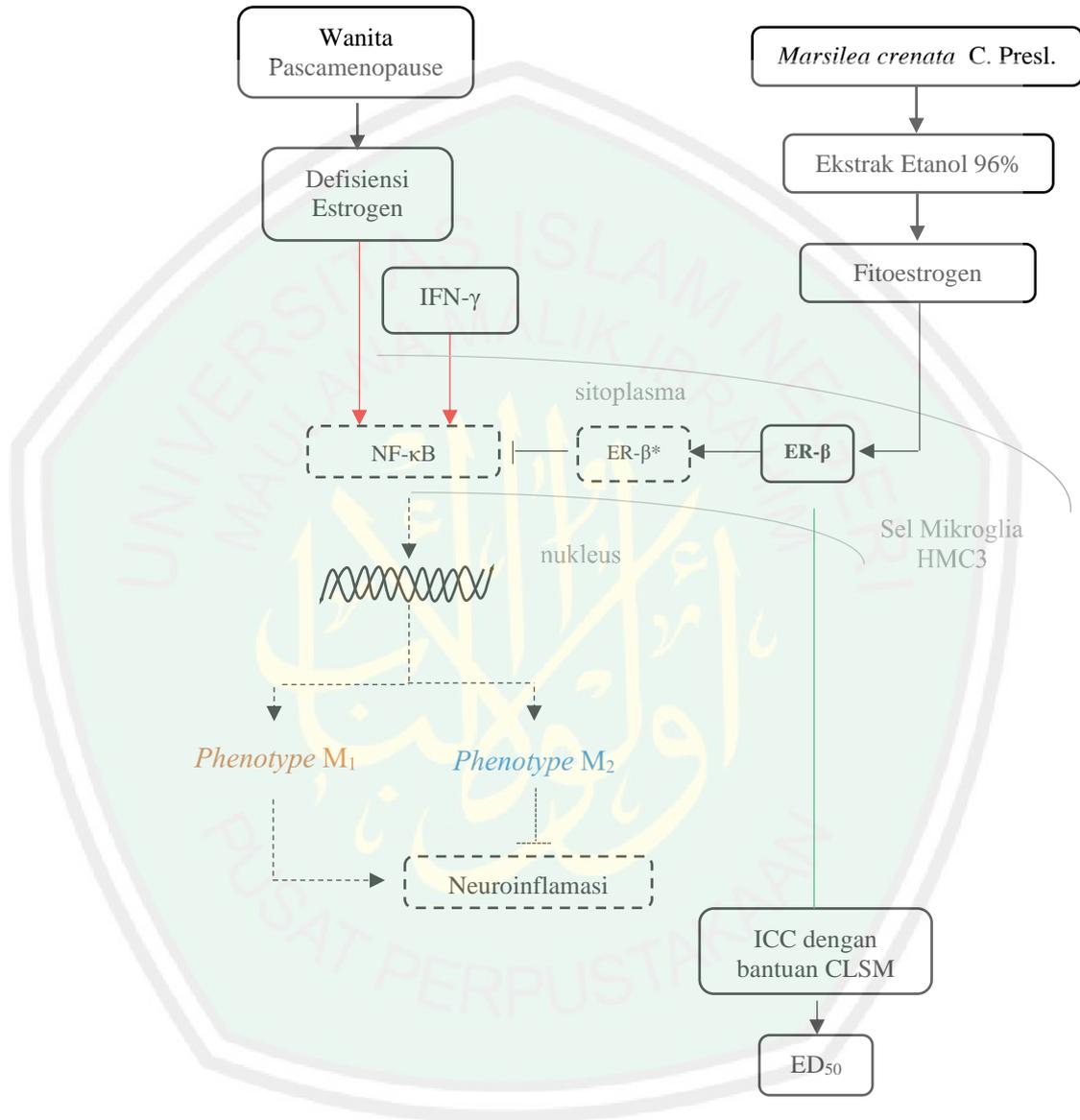
TD₅₀: Dosis toksik

ED₅₀: Dosis efektif

Indeks terapeutik menunjukkan suatu ukuran keamanan obat karena nilai yang besar menunjukkan bahwa terdapat suatu batas yang luas/lebar diantara dosis-dosis yang efektif dan dosis-dosis yang toksik. Penentuan indeks terapeutik ditentukan dengan mengukur frekuensi respons yang diinginkan dan respons toksis pada berbagai dosis obat (Mary, 2001).

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

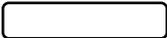
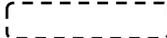
3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan Gambar

- = Jalur aktivasi
- (red) = Menginduksi
- | = Menghambat

-  = Metode Pengamatan
 = Fokus Penelitian
 = Pendukung Penelitian

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Wanita pascamenopause umumnya mengalami penurunan produksi hormon estrogen karena beberapa faktor salah satunya terjadinya perubahan aktivitas estrogen pada sistem saraf yang dipengaruhi oleh peningkatan usia (Yu dan Ji, 2015). Ketika mengalami defisiensi estrogen maka reseptor estrogen tidak dapat menangkap estrogen karena estrogen tersebut tidak diproduksi lagi oleh tubuh sehingga menyebabkan terjadinya penurunan jumlah *Estrogen Receptor* Teraktivasi (ER*) salah satunya yang terdapat pada sistem saraf pusat. Penurunan jumlah ER* mengakibatkan terjadinya peningkatan aktivitas NF-kB yang dapat mempengaruhi sintesis protein salah satunya pada sel HMC3 (Villa *et al.*, 2016).

Penelitian dilakukan uji antineuroinflamasi secara *in vitro* ekstrak etanol 96% terhadap sel mikroglia HMC3. *M. crenata* merupakan salah satu tumbuhan yang diketahui memiliki kandungan senyawa golongan fitoestrogen. Fitoestrogen adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki struktur maupun fungsi sama dengan estrogen yang terdapat pada manusia (Sirotkin dan Harrath, 2014), sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif pada wanita pascamenopause.

Respon neuroprotektor muncul ketika senyawa fitoestrogen dalam daun *M. crenata* menggantikan fungsi estrogen (Cos *et al.*, 2003; Ososki dan Kennelly, 2003; Villiers, 2009; Yang *et al.*, 2012). Ikatan fitoestrogen–ER β dapat

mengaktivasi ER β pada sitoplasma untuk bertranslokasi dalam nukleus dan menghambat aktivasi NF- κ B sebagai faktor transkripsi inflamasi, sehingga menyebabkan penurunan produksi agen proinflamasi serta meningkatkan produksi agen antiinflamasi (Abu-Taha *et al.*, 2009; Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017).

Penggambaran patofisiologis neuroinflamasi pada penelitian ini menggunakan induktor berupa IFN- γ , sebagai substituen dari defisiensi estrogen, untuk mengaktivasi jalur klasik (*Phenotype M₁*) pada sel mikroglia HMC3 (Kettenmann *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011). Ketika senyawa fitoestrogen dalam daun *M. crenata* menggantikan fungsi estrogen, sel mikroglia mengubah *phenotype M₁* (neurotoksik) ke bentuk *phenotype M₂* (neuroprotektif). *Phenotype M₁* merupakan gambaran ketika mikroglia teraktivasi dan mengakibatkan terjadinya neuroinflamasi. *Phenotype M₂* merupakan gambaran mikroglia yang berusaha untuk “mempertahankan hidup” karena ditemukannya jejas atau luka. Secara sederhana, respon neuroprotektif dapat terjadi ketika *Phenotype M₁* mengalami penurunan dan *Phenotype M₂* mengalami kenaikan. Kedua *phenotype* tersebut dapat terjadi secara berurutan melalui *Phenotype M₁* (sakit) menjadi *Phenotype M₂* (penyembuhan) maupun berkebalikan karena berbagai faktor yang mungkin dapat ditemukan (Patro *et al.*, 2016).

Hipotesis yang muncul pada penelitian ini adalah dengan pemberian ekstrak semangi, sel akan teraktivasi dan memberikan respon neuroprotektif. Hal tersebut pada akhirnya diamati dengan melihat penurunan ekspresi ER β bebas dengan melihat sinyal intensitas warna yang dihasilkan dengan metode

Immunocytochemistry (ICC) dengan bantuan instrumen *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki efek neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3 melalui pengukuran ER β bebas.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* laboratorik dengan desain *post test control*, dan untuk mencapai tujuan penelitian ini dilakukan beberapa tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Melakukan preparasi sampel tanaman.
2. Melakukan preparasi sampel sel.
3. Melakukan uji aktivitas neuroprotektif ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* terhadap sel mikroglia HMC3.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2019 hingga Juni 2019. Penelitian dilakukan 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.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Marsilea crenata C. Presl yang ditanam di sawah di daerah Kecamatan Benowo, Surabaya, Jawa Timur.

4.3.2 Sampel

1. Sampel Tanaman; Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah Daun *M. crenata* yang diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya, dan diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang.
2. Sampel Sel; Sampel sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel mikroglia HMC3 yang diperoleh dari koleksi *American Type Culture Collection* (ATCC), dan di subkultur di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun semanggi yang diberikan sebagai perlakuan dengan beberapa dosis; 62,5 µg/mL, 125 µg/mL dan 250 µg/mL.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah fluoresensi ERβ bebas pada sel mikroglia HMC3.

4.4.3 Variabel Kontrol

Keadaan lingkungan sel, suhu dan lama inkubasi, metode pengamatan ICC dan instrumen CLSM.

4.4.4 Definisi Operasional

1. Daun semanggi dengan tinggi batang 20 cm diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya, kemudian diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang.

2. Ekstrak etanol 96% merupakan ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi ultrasonik daun semanggi menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Kontrol negatif merupakan kontrol dengan tidak menambahkan sampel tanaman pada perlakuan, hanya sel, media dan induktor IFN- γ .
4. Kontrol positif merupakan perlakuan dengan menggunakan isolat genistein dengan dosis 50 μ M.
5. Dosis merupakan ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C. Presl yang digunakan sebagai perlakuan pada sel, dilarutkan dalam DMSO 0,5% dengan surfaktan Tween 80 0,5%.
6. Sel mikroglia HMC3 adalah sel yang didapatkan dari sel otak manusia yang merupakan jenis sel mikroglia.
7. IFN- γ merupakan induktor yang diberikan pada sel mikroglia HMC3 agar memberikan respon yang sama seperti saat terjadi defisiensi estrogen pada sel mikroglia sebanyak 10 ng/mL selama 24 jam.
8. Penurunan ekspresi ER β bebas pada penelitian ini diamati secara flouresensi, yaitu pengukuran rerata intensitas pendar (flouresensi) ER β tidak teraktivasi pada sel mikroglia HMC3 melalui CLSM.
9. ER β teraktivasi (ER β *) adalah estrogen reseptor yang telah teraktivasi karena telah berikatan dengan senyawa fitoestrogen.
10. Media kultur merupakan suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi berbentuk cair yang digunakan untuk mengembangbiakkan sel.
11. Inkubasi merupakan suatu teknik perlakuan bagi mikroorganisme yang telah diinokulasikan pada media, kemudian media tersebut disimpan pada suhu dan jangka waktu tertentu untuk dapat melihat pertumbuhannya.

12. Metode yang digunakan adalah metode imunisitokimia yang merupakan suatu teknik umum untuk memvisualisasikan lokasi suatu protein tertentu dalam sel.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Preparasi Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata* C. Presl.

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

4.5.1.2 Ekstraksi Ultrasonik Daun *M. crenata* C. 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, *ultrasonicbath* (Soltec Sonica 5300 EP S3), *universal oven* (Memmert UN 55) dan *rotary evaporator* (Heidolph Hei-VAP ML/G3).

4.5.1.3 Kultur *Cell Line Human Microglia Clone 3* (HMC3)

Alat yang digunakan yaitu mikropipet 1000 μl , *conical tube* 15 mL dan 50 mL, rak tabung, *flask culture* 15 mL, *milipore* 0,22 μm , spuit 10 mL, *scrapper*, pipet ukur steril 5 mL. Selain itu dibutuhkan instrumen seperti *incubator* (ThermoScientific HeraCell 150i CO₂), *bio safety cabinet* (ThermoScientific HeraSafe KS Class II), *inverted microscope* (Olympus IX 71), *waterbath* (ThermoScientific Aquabath 18022AQ), *centrifuge* (LW C5).

4.5.1.4 Uji Aktivitas Neuroprotektif

Alat-alat yang digunakan yaitu neraca analitik, mikropipet 1000 μL , *milipore* 0,22 μm , *conical tube* 15 mL dan 50 mL, *24-well plate*. Instrumen yang dibutuhkan diantaranya *incubator* (ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂), *bio safety cabinet* (ThermoScientific HeraSafe KS Class II) dan Olympus IX 81 *motorized inverted microscope tandem fluoview FV1000 with CO₂ incubator*.

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Ekstraksi Ultrasonik Daun *M. crenata* C. Presl

Bahan-bahan yang digunakan adalah *M. crenata* C Presl. yang diambil di sawah daerah Benowo, Surabaya, yang telah di determinasi di Materia Medika, Kota Batu, dengan kunci determinasi 1a-17b-18a-1, serta pelarut yang digunakan yaitu Etanol 96%.

4.5.2.2 Kultur *Cell Line Human Microglial 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).

4.5.2.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas dengan menggunakan *Immunocytochemistry* yaitu 4% *paraformaldehyde*, media kultur EMEM, PBS, 0,5% DMSO, 0.5% Triton X-100, *Bovine Serum Albumin* (BSA), Antibodi primer ER- β , Antibodi sekunder FITC, dan Aluminum foil.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Preparasi Sampel Tanaman

4.6.1.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang.

4.6.1.2 Preparasi Daun *M. crenata* C. Presl

Daun *M. crenata* dipanen, lalu dicuci dan dikeringkan dibawah sinar matahari pukul 7-10 pagi. Hal ini dimaksudkan agar tetap kering namun berwarna hijau. 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. Selanjutnya simplisia diukur kadar air menggunakan *moisture content* (Putra, 2018).

4.6.1.3 Prosedur Ekstraksi

Simplisia *M. crenata* ditimbang sejumlah 30 gram sebanyak 2 kali, masing-masing dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian ditambahkan 200 mL etanol 96% pada gelas beaker kedua. Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan UAE sebanyak 3 kali masing-masing selama 2 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya. Hasil ekstraksi disaring, kemudian residu ditambahkan kembali dengan pelarut sebanyak 2 x 150 ml disertai ulangan ekstraksi dan penyaringan sebanyak 3 kali replikasi. Filtrat yang terkumpul dimasukkan labu *rotary evaporator*. Suhu alat diatur 40°C dengan kecepatan pemutaran 70 rpm. Ekstrak hasil *rotary evaporator* diuapkan kembali (dikeringkan) dalam oven pada suhu 40°C agar diperoleh ekstrak kering bebas pelarut (Putra, 2018).

4.6.1.4 Preparasi Ekstrak

Ekstrak seberat 50 mg dicampur dengan 0,5% Tween 80 dan 10 mL DMSO 0,5% kemudian dihomogenkan hingga terbentuk larutan induk sampel 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selanjutnya di sterilisasi menggunakan mikrofilter dengan *milipore* 0,22 μm (Aditama, 2016), kemudian dilakukan pengenceran larutan sampel uji dengan dosis 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dari larutan induk ekstrak etanol 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, menggunakan media komplit sel.

4.6.2 Preparasi Sampel Sel

4.6.2.1 Pembuatan Media Kultur Sel

Medium Komplit (MK) merupakan sumber nutrisi yang mendukung perkembangbiakan sel. Langkah pembuatannya diawali dengan sterilisasi alat kultur dengan etanol 70% sebelum masuk *Bio Safety Cabinet* (BSC). Penicilin-Streptomycin (PenStrep) 1% dipindahkan dalam *conical tube* 15 mL, ditambahkan FBS 10%, di ad medium EMEM dalam jumlah tertentu., kemudian dihomogenkan (ATCC, 2017).

4.6.2.2 Thawing Cell

Thawing cell memiliki arti mencairkan sel. Langkah ini dilakukan saat sel pertama kali diterima dilaboratorium kultur. Tahapannya yaitu dilakukan pemanasan *vial cell* dengan *waterbath* 37°C selama 2 menit. Selanjutnya 5 mL MK dipindahkan dengan spuit dalam *conical tube* 15 mL, kemudian jarum diganti *filter* berukuran 0,22 μm dan disaring. Sel dipindahkan dari *vial cell* dengan mikropipet ke *conical tube* 15 mL steril kemudian dilakukan sentrifugasi 800 rpm / 5 menit dan diambil *pellet* sel. Pellet tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 mL steril dan dihomogenkan. Disiapkan *flask culture*,

ditambahkan \pm 3 mL MK dan dipindah campuran MK dan sel dari *Conical Tube* 15 mL ke *flask culture* (ATCC, 2017).

4.6.2.3 Pengamatan dan Penggantian Media

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* untuk mengamati presentase konfluensi pertumbuhan sel. Penggantian media sel dilakukan 2 hingga 3 kali dalam seminggu (ATCC, 2017).

4.6.2.4 *Plating* Sel pada 24 *well-plate*

Sel diletakan atau disubkultur dalam 24-*well plates* yang sebelumnya telah dimasukan potongan *coverslip* dengan diameter 20 mm sebagai tempat melekat dan bertumbuhnya sel, dengan kerapatan 1×10^6 sel/*well*, kemudian diinkubasi dalam CO₂ dengan kelembaban atmosfer 5% pada suhu 37°C (ATCC, 2017).

4.6.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif

4.6.3.1 Pemberian Larutan Uji dalam *Plate*

Induksi IFN- γ dilakukan selama 24 jam dengan dosis 10 ng/mL (ATCC, 2017). Selanjutnya supernatan dibuang dan diganti dengan perlakuan larutan sampel dan kontrol positif yaitu genistein dengan dosis 50 μ M yang telah dipreparasi sebelumnya, selama 24 jam, dengan penempatan sebagai berikut:

Tabel 4.1. Skema *Plating* Uji Neuroprotektif

Replikasi	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	62,5 μ g/mL	125 μ g/mL	250 μ g/mL	
1						-
2						-
3						-
-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

Kontrol Negatif : sel + media + IFN

Kontrol Positif : sel + media + IFN + genistein

62,5 μ g/mL : sel + media + IFN + ekstrak 62,5 μ g/mL

125 μ g/mL : sel + media + IFN + ekstrak 125 μ g/mL

250 μ g/mL : sel + media + IFN + ekstrak 250 μ g/mL

4.6.3.2 Pengukuran ER β dengan ICC

Pengukuran ER β bebas dilakukan menggunakan metode imunositokimia (ICC). Sel difiksasi dalam 4% *paraformaldehyde*, lalu dicuci dengan PBS, selanjutnya dipermeabilisasi membran dengan 0.1% Triton X-100 dalam PBS lalu dicuci lagi dengan PBS. Setelah memblok ikatan nonspesifik dengan *blocking buffer* 1% BSA dalam PBS, sel di inkubasi semalam pada 4°C dengan campuran 1 : 200 Antibodi primer ER β . Pencucian dilakukan untuk menghilangkan antibodi primer berlebih, kemudian sel diinkubasi dengan campuran 1 : 500 Antibodi sekunder FITC (Ma'arif, 2018).

4.6.3.3 Pembacaan CLSM

Coverslip sebagai tempat melekatnya sel mikroglia HMC3 kemudian diangkat dan diletakan pada kaca preparat, kemudian diamati. Sinyal fluoresensi selanjutnya dianalisa menggunakan CLSM dengan panjang gelombang 488 nm, untuk mengetahui penurunan ekspresi ER β bebas pada sel mikroglia HMC3 dari setiap sampel uji.

4.7 Analisis Statistik

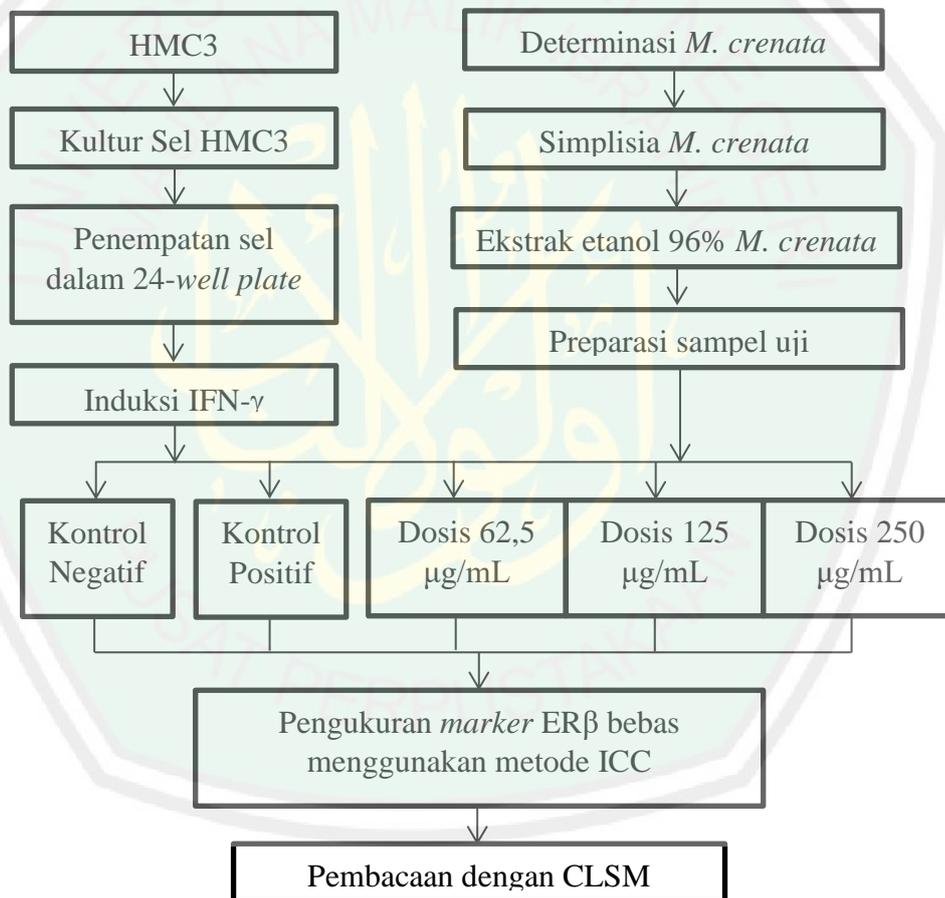
Data yang diperoleh dari perhitungan ekspresi ER β bebas akan dicatat sebagai nilai *mean* \pm SD. Analisa statistik yang dilakukan melihat dengan ada atau tidaknya perbedaan bermakna pada nilai ekspresi ER β bebas antara kelompok kontrol negatif maupun kontrol positif dengan kelompok uji. Data yang diperoleh merupakan data parametrik, sehingga analisa dilakukan dengan menggunakan Uji *one-way anova* pada $\alpha = 0,05$. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, maka uji statistik dilanjutkan dengan *Posc Hoc Test* untuk mengetahui adanya perbedaan

dalam kelompok perlakuan dalam penelitian ini menggunakan uji *Least Significance Different* (LSD). Langkah-langkah uji hipotesis adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal, digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran.
2. Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen atau tidak.
Data yang diperoleh terdistribusi normal namun tidak memiliki data yang homogen sehingga dilakukan pengujian lanjutan non parametrik.
3. Uji *one-way anova*: merupakan uji beda parametrik bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikansi, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau lebih dikenal dengan uji *Least Significance Different* (LSD).
4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Apabila *P value* < 0,05 berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

5. Uji Korelasi: dilakukan untuk mengetahui hubungan suatu variabel dengan variabel lainnya, pada penelitian ini yaitu antara dosis perlakuan dengan intensitas *marker* yang dihasilkan. Digunakan uji korelasi *Pearson Correlation* untuk menganalisis data parametrik.
6. Uji Probit dilakukan untuk mengetahui ED_{50} dari data yang memberikan aktivitas penurunan $ER\beta$ bebas.

4.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Preparasi Sampel Tanaman

5.1.1 Determinasi Tanaman

Daun *M. crenata* yang digunakan pada penelitian dipanen dari persawahan daerah Benowo, Surabaya, Jawa Timur pada bulan September 2017, karena pada waktu tersebut tanaman telah siap untuk dilakukan pemanenan sehingga diperoleh khasiat maksimal (Emilan *et al.*, 2011). Selanjutnya dilakukan proses determinasi di UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Determinasi tumbuhan atau pengklasifikasian makhluk hidup berdasarkan ciri-ciri baik morfologi maupun anatominya (Steenis, 2008), merupakan suatu cara agar dapat memastikan bahwa tumbuhan tersebut benar sesuai dengan jenis dan familinya, metode yang digunakan dengan menggunakan kunci determinasi dimana setiap tumbuhan akan digolongkan secara bertahap dari bangsa, suku, marga atau jenis dan seterusnya (Abidin, 2006; Zulkifli, 2009; Putra, 2018).

Determinasi penting dilakukan karena dengan diketahuinya keaslian identitas dari suatu tanaman maka dapat dijadikan acuan untuk kebenaran pada suatu sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian dan untuk meminimalisir kesalahan dalam penelitian (Shirvi, 2018). Apabila terjadi kesalahan tumbuhan yang digunakan, maka perbedaan kandungan juga tidak dapat dihindari sehingga kemungkinan efek terapeutik yang diharapkan tidak sesuai. Hasil identifikasi daun *M.crenata* sebagai berikut: 1a-17b-18a-1.

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

5.1.2 Preparasi Sampel Daun dan Analisis Kadar Air Simplisia *M. crenata*

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *M. crenata* atau yang dikenal dengan nama lokal daun semanggi. Daun tersebut merupakan jenis daun majemuk dimana dalam satu tangkai terdapat empat kelopak daun dan memiliki warna hijau, namun bagian atas daun berwarna lebih tua dibandingkan dengan warna daun pada bagian bawah. Daun *M. crenata* diperoleh dalam keadaan segar, lalu dilakukan sortasi. Sortasi merupakan kegiatan memisahkan produk yang sudah bersih menjadi beberapa fraksi mutu dapat berdasarkan warna dan panjang tangkai. Setelah dilakukan sortasi, kemudian dicuci bersih dengan air mengalir supaya kotoran-kotoran tanah yang masih menempel pada daun dan tangkai dapat hilang. Daun yang telah dicuci kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung di pagi hari mulai pukul 07.00 hingga pukul 10.00. Hal ini dimaksudkan agar terik matahari tidak terlalu menyengat sehingga tidak merusak senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman (Dean *et al.*, 2014). serta kadar air yang terkandung di dalam daun dapat menurun sehingga mencegah pertumbuhan kapang serta kerusakan pada simplisia.



Gambar 5.1 Daun *M. crenata* C. Presl kering

Langkah selanjutnya adalah penggilingan daun yang sudah kering menjadi serbuk simplisia. Penggilingan dilakukan untuk mengecilkan ukuran partikel daun sehingga mempermudah dalam proses ekstraksi. Hal ini disebabkan karena semakin kecil ukuran serbuk, maka semakin luas permukaan serbuk sehingga memudahkan kontak antar pelarut dengan bahan. Kemudian serbuk simplisia disimpan di dalam wadah khusus yang kering dan tidak lembab untuk menghindari pertumbuhan jamur serta disimpan di tempat yang terhindar dari sinar matahari secara langsung agar terhindar dari radiasi sinar UV dan mencegah rusaknya simplisia.



Gambar 5.2 Simplisia *M. crenata* C. Presl

Uji kadar air dilakukan terhadap serbuk simplisia yang telah melalui proses pengeringan dengan tujuan untuk mengetahui seberapa banyak kandungan air yang masih terdapat dalam serbuk simplisia sehingga dapat diketahui serbuk simplisia yang digunakan penelitian sudah memenuhi kriteria untuk digunakan

sebagai sampel atau tidak. Tingginya kadar air dalam serbuk simplisia dapat menjadi media pertumbuhan mikroba seperti jamur, kapang, maupun bakteri (Salaman dan Widyasari, 2015; Inayatin, 2018).

Analisis kadar air serbuk simplisia *M. crenata* menggunakan alat *moisture analyzer*. Dibandingkan dengan oven, instrumen ini mampu memberikan hasil yang presisi. Instrumen *Moisture Content Analyzer* ini memanfaatkan sinar infra merah atau halogen untuk memberikan sumber panas sehingga sampel dapat menguapkan air yang dikandungnya dan menjadi kering. Kadar air total bahan dapat ditentukan dengan adanya pemanasan intensif dengan menggunakan metode pengeringan adsorpsi (Kenkel, 2003). Waktu yang dibutuhkan adalah sekitar 3-15 menit/sampel. Pengukuran akan segera berhenti setelah sampel mengalami penurunan berat lebih rendah dari 1 mg per 90 detik. Dengan waktu yang singkat, tentunya hal ini membantu untuk mempersingkat waktu pengujian (Kumalasari, 2012).

Langkah pengujian yaitu simplisia ditimbang dan dimasukkan kedalam wadah sampel kemudian ditutup dan ditunggu hingga instrumen tersebut selesai beroperasi. Prinsip kerja dari *Moisture Content Analyzer* tersebut yaitu sampel dipanaskan pada suhu tertentu sehingga kandungan lembab yang dimiliki menguap. Menurut peraturan Kepala Badan POM nomor 12 tahun 2014 tentang persyaratan mutu obat tradisional bahwa kadar air maksimal yang terkandung dalam sediaan adalah $\leq 10\%$ (BPOM, 2014).

Tabel 5.1 Nilai kadar air serbuk simplisia kering daun *M. crenata*

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

Hasil kadar air serbuk simplisia *M. crenata* memiliki nilai dibawah batas maksimal yang telah ditentukan yaitu 8,6%. Hal ini dikarenakan proses pengeringan yang dilakukan secara optimal, serta penyimpanan serbuk yang disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak terkena sinar matahari langsung (Putra, 2018). Dapat disimpulkan bahwa serbuk simplisia daun *M. crenata* memenuhi kriteria yang dipersyaratkan oleh peraturan Kepala Badan POM nomor 12 tahun 2014.

5.1.3 Prosedur Ekstraksi

Ekstraksi merupakan tahapan penting untuk mendapatkan senyawa target secara maksimal. Senyawa target tersebut dapat diperoleh dengan memilih metode ekstraksi yang sesuai (Ma'arif, 2012). Pelarut yang dipilih pada metode ini yaitu etanol 96% karena pelarut tersebut merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa polar dan nonpolar serta aman digunakan terutama dalam pembuatan ekstrak bahan baku sediaan *herbal medicine* (Arifianti *et al*, 2014).

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah ultrasonik dengan menggunakan bantuan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) yaitu metode ultrasonik yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan sinyal dengan frekuensi tinggi (20 kHz). Alasan utama penggunaan ultrasonik adalah tingginya senyawa target yang dihasilkan, tergolong ekstraksi yang selektif dan efisien dalam waktu pengerjaan

(Azmir *et al.*, 2013) juga merupakan salah satu upaya peningkatan efisiensi hasil ekstrak dari metode konvensional serta bertujuan untuk memperoleh hasil rendemen yang lebih besar dari pada menggunakan metode ekstraksi konvensional.

Serbuk daun *M. crenata* yang telah dilarutkan dalam pelarut etanol 96% kemudian diultrasonikasi selama 3x2 menit dengan tujuan untuk mengoptimalkan hasil ekstrak (Putra, 2018). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah ultrasonik. Proses terjadinya mekanisme ekstraksi ini diawali dengan terjadi perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitasi. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Esclapez *et al.*, 2011; Mukhairini, 2014; Sani *et al.*, 2014). Selanjutnya dilakukan proses penyaringan menggunakan bantuan kertas saring untuk memisahkan antara filtrat dan residu.

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



Gambar 5.3 Ekstrak Pekat Etanol 96 % Daun *M. crenata* C. Presl

Hasil pemekatan dapat diamati pada gambar 5.3 dimana hasilnya kemudian dilakukan perhitungan rendemen untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan menggunakan suatu bahan serbuk simplisia (Putra, 2018). Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen berdasarkan perhitungan berat akhir (berat ekstrak) dibagi berat awal (berat serbuk simplisia) dikalikan 100%. Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, 2013; Sani, 2014).

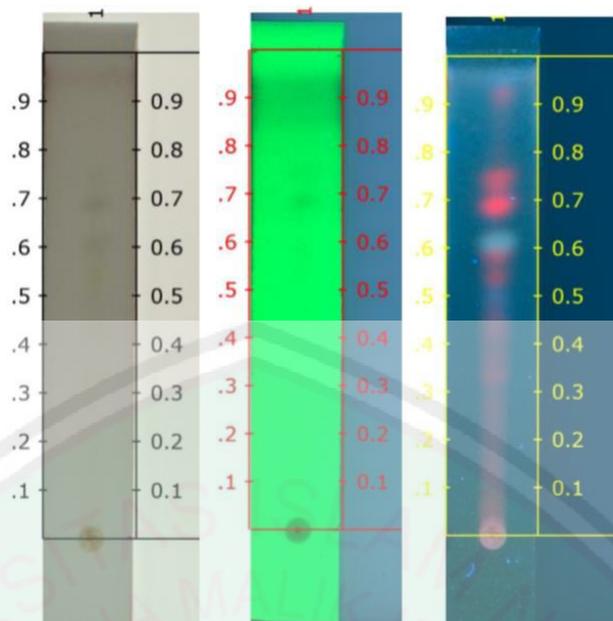
Tabel 5.2 Hasil Ekstraksi Daun *M. crenata* C. Presl

Jumlah Serbuk	Jumlah Ekstrak	Metode Ekstraksi	Rendemen (%)
1.600 g	70 g	Ultrasonik	4,375

5.1.4 Skrining Fitokimia Menggunakan TLC *Visualizer*

Skrining fitokimia dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dini kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% *M. crenata*. Skrining fitokimia yang dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang divisualisasikan dengan menggunakan TLC *Visualizer*. Skrining fitokimia dengan KLT ini berprinsip pada sistem adsorpsi dan partisi dimana sampel akan berpisah berdasarkan kepolaran antara fase diam dan fase geraknya (Dirjen POM, 1979; Putra, 2018).

Hasil pengamatan pada visualisasi plat KLT dengan TLC *Visualizer* terdapat beberapa noda tampak yang dapat diamati. Pada visualisasi lampu cahaya putih dan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm hasil spot yang diberikan berbeda-beda, dengan demikian digunakan data hasil pengamatan pada plat HPTLC yang telah diderivatisasi, karena hasil yang lebih bagus dan penampakan noda spot jauh lebih jelas dibandingkan yang belum diderivatisasi. Hasil yang diperoleh yaitu terdapat 8 titik spot warna yang muncul dan dapat diidentifikasi, rincian data tertera pada gambar 5.4 dan tabel 5.3.



Keterangan:

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

Gambar 5.4 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan TLC *Visualizer*

Tabel 5.3 Visualisasi Skrining Fitokimia dengan TLC *Visualizer*

Ekstrak	No	Rf	Warna	Golongan
Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M. crenata</i>	1	0,021	Jingga	Flavon
	2	0,076	Kuning	Flavonoid
	3	0,090	Kuning	Flavonoid
	4	0,496	Ungu	Terpenoid
	5	0,609	Biru Kehitaman	Alkaloid
	6	0,690	Biru Kehitaman	Alkaloid
	7	0,743	Biru	Alkaloid
	8	0,955	Biru	Alkaloid

5.1.5 Preparasi Sampel Ekstrak

Ekstrak pekat kemudian diencerkan menjadi larutan baku induk dengan konsentrasi 5000 µg/mL. Pengenceran tersebut menggunakan pelarut DMSO 0,5% dan tween 80 0,5%. Pemilihan DMSO karena merupakan pelarut yang

bersifat bipolar atau sifat nonpolar dan polar serta karena tidak memberikan efek yang berarti terhadap sampel atau sel uji, sehingga tidak mempengaruhi hasil pengujian (Tahar *et al.*, 2015) dengan persyaratan kadar DMSO maksimal 1% (Aditama, 2016). Tween merupakan surfaktan yang mampu menurunkan tegangan permukaan. Tween 80 memiliki nilai HLB yang tinggi, sehingga memiliki sifat yang lipofilik dan merupakan yang paling murni dibandingkan dengan surfaktan lainnya. Hal tersebut membantu sampel melewati membran semipermeabel sel yang bersifat lipofilik juga (Rowe *et al.*, 2009). Konsentrasi surfaktan dapat merusak sel bila penggunaannya berlebihan, oleh karena itu dipilih penggunaan kadar tween 80 0,5%.

Larutan baku induk ekstrak etanol 96% kemudian dihomogenkan dan disaring dengan *milipore* 0,22 μm serta disimpan dalam tabung steril. Selanjutnya dilakukan pengenceran kembali menjadi varian dosis 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ dan 250 $\mu\text{g/mL}$. Pemilihan dosis uji tersebut berdasarkan hasil pengujian toksisitas ekstrak etanol 96% yang diberikan ke sel HMC3. Perbedaan dosis dengan *range* yang besar bertujuan untuk melihat bagaimana profil pemberian berbagai macam dosis terhadap respon intensitas *marker* serta untuk mengetahui dosis optimal sediaan tersebut.

5.2 Preparasi Sampel Sel HMC3

HMC3 dipilih menjadi objek penelitian karena HMC3 berasal dari jaringan manusia yang telah diisolasi (ATCC, 2017) sehingga dapat menggambarkan keadaan neuroinflamasi pada wanita pascamenopause. Selain itu sel HMC3 dalam penelitian sebelumnya tidak mengekspresikan *marker* tertentu sebelum dilakukan

induksi agen proinflamasi yang dapat mempengaruhi hasil pengamatan (Russo *et al.*, 2018).

5.2.1 Pembuatan Media Kultur Sel HMC3

Kultur sel adalah proses dimana suatu sel diambil dari suatu jaringan dan ditumbuhkan dalam keadaan yang dikontrol (Syahidah dan Hadisaputri, 2016). Media dasar yang digunakan dalam kultur sel HMC3 adalah *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) yang dilengkapi dengan 1% penisilin-streptomisin (penstrep) dan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (ATCC, 2017). Media dasar tersebut merupakan yang pertama kali digunakan secara luas diformulasikan oleh Harry Eagle dari medium basal (BME) yang lebih awal dan lebih sederhana. Sejauh ini, banyak variasi formulasi EMEM untuk aplikasi yang berbeda. EMEM hanya mengandung 12 jenis asam amino non-esensial, glutamin, 8 vitamin dan beberapa garam anorganik (Liu *et al.*, 2016; Syahidah dan Hadisaputri, 2016).

Nutrisi tambahan pada media dasar yaitu FBS, merupakan serum yang berasal dari janin sapi yang berfungsi untuk menyediakan nutrisi yang esensial, hormon dan faktor pertumbuhan, pengikatan protein, perlindungan, dan faktor ekstensi dan *adherent*. Penambahan asam amino non-esensial untuk sel dalam mensintesis protein. Serta antibiotik penstrep diberikan untuk mencegah kultur sel terkontaminasi bakteri dan antimikotik mencegah kontaminasi jamur (Syahidah dan Hadisaputri, 2016).

5.2.2 Thawing Cell

Sel apabila tidak digunakan dalam penelitian disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk waktu penyimpanan yang lama, atau disimpan dalam suhu -80°C untuk penyimpanan selama 2-3 bulan. Sel ditumbuhkan kembali dalam

medium saat akan digunakan dalam uji *in vitro* (CCRC, 2010). Penumbuhan kembali sel tersebut dikenal dengan istilah *thawing cell* dan terdiri dari beberapa tahapan yaitu pencairan sel, penambahan media komplit, pemisahan media komplit dan sel menggunakan sentrifus, lalu penanaman sel pada *flask culture*. Sel kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C/ CO₂ 5%.

5.2.3 Pengamatan dan Pergantian Media

Konsentrasi sel dalam pertumbuhannya yang tinggi menyebabkan produksi asam laktat dan berkurangnya nutrisi untuk pertumbuhan sel. Guna mencapai kondisi sel yang pertumbuhannya optimum diperlukan penggantian media pertumbuhan. Pergantian media dilakukan saat warna media memudar, 2-3 kali dalam seminggu (ATCC, 2017).

Pengamatan dihentikan dan dilanjutkan dalam tahapan selanjutnya ketika *confluence* sel mencapai 80-90% dalam *flask culture* karena pada tingkatan tersebut 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).

5.2.4 *Plating* Sel Mikroglia HMC3

Plating sel atau penanaman sel pada 24-*wellplates* dilakukan setelah sel konfluen 80-90%. Perlakuan *plating* sel diawali dengan pemberian PBS fisiologis yang berperan sebagai *buffer* untuk membantu sel mikroglia mempertahankan konstan pH (7-8), mekanisme *buffer* mempertahankan osmolaritas sel mikroglia karena garam mengandung ion, yang menyeimbangkan jumlah ion garam di dalam sel mikroglia. Jika sel mikroglia berada di dalam lingkungan yang memiliki

terlalu banyak garam ion, air akan bocor keluar dari sel dan menyebabkan sel menyusut.

Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA lalu di *scrapping* agar sel terlepas dari dasar *culture flask*. Alasan penggunaan tripsin yaitu sebagai enzim proteolitik untuk merusak ikatan peptida pada sel dan EDTA digunakan untuk meningkatkan aktivitas dari tripsin, larutan ini digunakan untuk mengangkat sel yang melekat pada dasar *culture flask* agar mudah dipindahkan ke *microplate 24-well*. Setelah sel mikroglia tersuspensi, maka akan dipipet ke dalam *conical tube* 15 ml. Selanjutnya *conical tube* 15 ml dimasukkan ke dalam *centrifuge* dan diatur kecepatan 800 rpm selama 7 menit (ATCC, 2017), alat ini bertujuan untuk memisahkan antara medium komplit dengan sel mikroglia.

Suspensi sel mikroglia kemudian di *plating* ke dalam *microplate 24-well* yang telah diberikan *coverslip* dimasing-masing sumuran. Penanaman ini dilakukan menggunakan penambahan *coverslip* pada dasar setiap *well* sebagai tempat melekatnya sel sehingga akan mempermudah pengambilan sel pada saat visualisasi dengan instrumen CLSM. Kemudian sel diinkubasi selama 48 jam agar sel mikroglia menempel secara optimal.

5.3 Uji Aktivitas Neuroprotektif

Sel HMC3 di induksi IFN- γ , sebagai substituen defisiensi estrogen, untuk memberikan gambaran terjadinya neuroinflamasi. Induksi IFN- γ dengan dosis 10 ng/ml dapat mengaktifkan sel HMC3 selama 24 jam (ATCC, 2017) dalam dosis tersebut sel dapat teraktivasi dan memasuki *phenotype* M₁ (Patro *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2018) dan mengeluarkan respon inflamasi. Selanjutnya sel di induksi

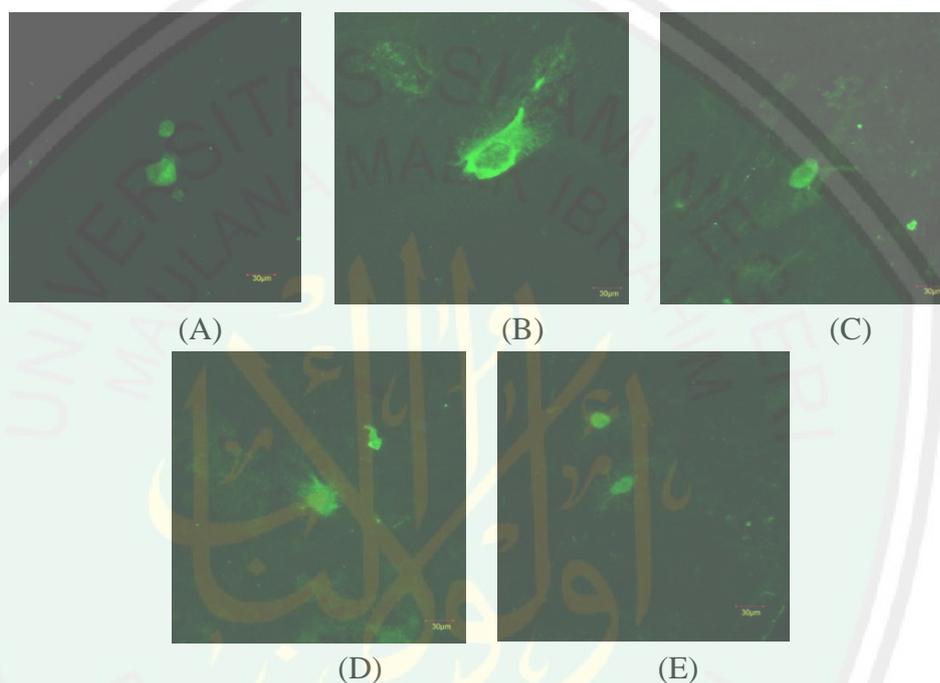
dengan varian dosis ekstrak etanol 96% selama 24 jam dengan asumsi sel teraktivasi dan memasuki *phenotype* M₂ serta mengeluarkan respon antineuroinflamasi dan perbaikan sel (Patro *et al.*, 2016).

Tahapan selanjutnya yaitu pewarnaan *marker* ER β tidak teraktivasi dari sel HMC3 dengan metode ICC yang terdiri dari fiksasi, permeabilisasi membran, *blocking*, pemberian antibodi primer dan antibodi sekunder. Metode ini dipilih dalam penelitian karena dapat mengevaluasi keadaan sel dengan mengekspresikan antigen yang diinginkan (Taylor dan Rudbeck, 2013).

Fiksasi dilakukan menggunakan 4% paraformadehid (PFA), bertujuan untuk mempertahankan morfologi sel seperti dalam keadaan hidup, menghentikan proses enzimatik sel untuk mencegah kerusakan akibat bakteri atau autolisis, serta mengkoagulasi protein sehingga menjadikan sel *insoluble* yang mencegah masuk atau keluarnya zat-zat dalam sel. Permeabilisasi membran sel dilakukan menggunakan 0,1% Triton X-100, berfungsi untuk membuka membran sel sehingga dapat memberikan respon terhadap rangsangan luar serta memudahkan perpindahan suatu senyawa terlarut, yaitu antibodi primer. Sedangkan pemberian 1% BSA sebagai *blocking buffer* berfungsi untuk memblok ikatan nonspesifik, agar antibodi primer tidak berikatan dengan antigen selain ER β .

Pemberian antibodi primer dan antibodi sekunder yaitu ER β dan FITC bertujuan untuk pewarnaan protein pada sel. Antibodi primer akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik di dalam sel, yaitu ER β yang tidak berikatan dengan senyawa fitoestrogen yang dikandung oleh ekstrak etanol 96%. Antibodi yang tidak berikatan dipisahkan dengan pencucian, sedangkan antibodi yang berikatan dideteksi secara tidak langsung dengan penambahan antibodi sekunder

sehingga protein target dapat berfluoresensi dan diamati dibawah mikroskop fluoresensi. Pengamatan sel dilakukan menggunakan instrumen CLSM yaitu jenis mikroskop fluoresensi yang memiliki keunggulan kedalaman fokus yang tinggi dan dapat menyajikan gambar tiga dimensi dengan bantuan fokus dari komputer dengan pendar sampel setelah dikenai laser dengan panjang gelombang 488 nm (Lattante *et al.*, 2014).



Gambar 5.5 Intensitas Fluoresensi ER β yang tidak teraktivasi pada Sel Mikroglia HMC3 (A) Kontrol Negatif (B) 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E) Kontrol Positif

Hasil pendar tersebut akan memperlihatkan intensitas fluoresensi ER β yang tidak teraktivasi dalam bentuk gambar dan angka dengan satuan *arbitrary unit* (AU). Hal itu sebabkan karena ER yang tidak teraktivasi tersebut berikatan dengan antibodi primer saat pewarnaan ICC, sedangkan ER teraktivasi terbentuk dari ikatan ER dan senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*. Semakin sedikit ER β tidak teraktivasi artinya semakin

banyak ER β yang berikatan dengan senyawa fitoestrogen. Gambar tersebut kemudian diukur intensitas fluoresensinya menggunakan *software* fluoview 4.2a.

Tabel 5.4 Intensitas Fluoresensi ER β Bebas Tiap Dosis Perlakuan

Dosis Perlakuan	Intensitas ER β Bebas \pm SD
Kontrol Negatif	1.067,460 \pm 59,100
62,5 μ g/mL	1.421,538 \pm 29,495
125 μ g/mL	814,216 \pm 82,453
250 μ g/mL	573,190 \pm 63,605
Kontrol Positif	347,940 \pm 51,551

5.4 Analisis Statistik

Analisis statistik terhadap hasil yang didapat dari intensitas fluoresensi ER β bebas pada sel mikroglia HMC3 dilakukan dengan menggunakan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas dengan tingkat signifikansi atau kebermaknaan suatu data dinyatakan dalam (*p-value*) 0,05 dan taraf kepercayaan (α) 95% dari *software* IBM SPSS *Statistic* 24. Nilai uji normalitas dan homogenitas akan menentukan uji komparasi dan uji korelasi yang akan digunakan.

1. Uji Normalitas

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

Tabel 5.5 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Signifikansi
Kontrol Negatif	0,553
Dosis 62,5 µg/mL	0,108
Dosis 125 µg/mL	0,659
Dosis 250 µg/mL	0,561
Kontrol Positif	0,646

Berdasarkan data pada tabel 5.5 diperoleh nilai signifikansi pada kelima kelompok perlakuan lebih besar dari 0,05 yang berarti bahwa semua data dari masing-masing kelompok yang didapat adalah berdistribusi normal. Kemudian, setelah didapat data pada uji normalitas berdistribusi normal, dilakukan uji homogenitas.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama (Sugiyono, 2013). Jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama. Jika nilai signifikansi $> 0,05$, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama. Berikut data hasil uji homogenitas *Levene's test* ditunjukkan pada tabel 5.6 sebagai berikut:

Tabel 5.6 Hasil Uji Homogenitas *Levene's test*

<i>Levene's test</i>	Signifikansi
0,880	0,507

Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa signifikansi data memiliki nilai lebih dari 0,05 dan dapat disimpulkan bahwa data memiliki distribusi normal dan populasi data homogen sehingga dilakukan pengujian uji lanjutan parametrik.

3. Uji Korelasi

Uji korelasi bertujuan untuk mengetahui hubungan suatu variabel dengan variabel lainnya (Syaodih, 2007). Nilai korelasi berkisar antara -1 hingga 1, dimana nilai korelasi -1 berarti hubungan korelasi negatif sempurna, nilai korelasi 0 berarti tidak ada hubungan, dan nilai korelasi 1 berarti hubungan korelasi positif sempurna. Interpretasi data besarnya nilai korelasi antara variabel dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Tabel 5.7 Klasifikasi Uji Korelasi (Gani, 2015)

Nilai	Korelasi Makna
0,00 – 0,24	Sangat Lemah
0,25 – 0,49	Lemah
0,50 – 0,74	Kuat
0,75 – 1,00	Sangat Kuat

Uji korelasi yang digunakan yaitu *Pearson* untuk mengkaji hubungan atau pengaruh variabel bebas (dosis ekstrak etanol 96%) dengan variabel tergantung. Hasil uji korelasi *Pearson* terdapat pada tabel 5.8 sebagai berikut:

Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi *Pearson*

		Dosis	Intensitas
Dosis	<i>Correlation Coefficient</i>	1	-0,849**
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		0,000
	N	16	16
Intensitas	<i>Correlation Coefficient</i>	-0,849**	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,000	
	N	16	16

Berdasarkan hasil uji *pearson* didapatkan nilai korelasi 0,849 maknanya adalah terdapat korelasi dengan kategori sangat kuat antara dosis perlakuan dengan variabel yang didapat (Sugiyono, 2013). Tanda negatif (-) pada (-0,849**) menyatakan bahwa adanya arah yang berlawanan (linear) antara dosis perlakuan yang diperoleh terhadap ekspresi ER β yang dihasilkan. Sementara itu nilai

signifikansi yang diperoleh $0,000 < 0,050$, maka terdapat korelasi yang signifikan antara dosis perlakuan dengan ekspresi ER β bebas. Sehingga, dari uji korelasi di atas dapat dinyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat berikatan dengan ER β pada sel mikroglia HMC3 dan memiliki respon neuroprotektif melalui pengukuran ekspresi *marker* ER β bebas.

4. Uji Beda

Uji Beda *one-way anova* adalah uji parametrik yang digunakan untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok data sampel. Uji ini digunakan ketika asumsi normalitas dan homogenitas terpenuhi. Dikatakan terdapat perbedaan yang bermakna jika nilai signifikansi $< 0,05$ (Hidayat dan Istiadah, 2011). Berikut data hasil Uji Beda *one-way anova* ditunjukkan pada tabel 5.9:

Tabel 5.9 Hasil Uji Beda *one-way anova*

Signifikansi
0,000

Berdasarkan uji beda *one-way anova* tersebut didapatkan nilai signifikansi 0,000 yang berarti kurang dari 0,05, maka terdapat perbedaan yang bermakna dari nilai *mean* intensitas fluoresensi antar dosis perlakuan (H1 diterima).

5. Uji LSD

Uji *Least Significant Difference* (LSD) yang bertujuan untuk mengetahui secara detail signifikansi perbedaan dari data pengukuran intensitas fluoresensi ER β tiap dosis perlakuan yang didapat. Hasil nilai yang di dapat dari intensitas fluoresensi ER β dinyatakan signifikan dengan kelompok lain apabila nilai yang diperoleh memiliki signifikansi $< 0,05$. Hasil Uji LSD dapat diamati pada tabel 5.10 sebagai berikut:

Tabel 5.10 Hasil Uji *Least Significant Difference*

Kelompok	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	Dosis 62,5 $\mu\text{g/mL}$	Dosis 125 $\mu\text{g/mL}$	Dosis 250 $\mu\text{g/mL}$
Kontrol Positif		0,000	0,000	0,000	0,001
Kontrol Negatif	0,000		0,000	0,000	0,000
Dosis 62,5 $\mu\text{g/mL}$	0,000	0,000		0,000	0,000
Dosis 125 $\mu\text{g/mL}$	0,000	0,000	0,000		0,000
Dosis 250 $\mu\text{g/mL}$	0,001	0,000	0,000	0,000	

Keterangan: berbeda signifikan satu sama lain

Hasil uji LSD yang terdapat pada tabel 5.10 menyatakan bahwa masing-masing kontrol negatif dan kontrol positif terhadap variasi dosis 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ dan 250 $\mu\text{g/mL}$ berbeda signifikan. Hal itu ditandai dengan nilai signifikansi dibawah 0,05. Sehingga, dari ketiga kelompok perlakuan menggunakan ekstrak etanol 96%, varian dosis tersebut dapat memberikan respon neuroprotektif karena nilai yang dihasilkan berbeda signifikan dengan kontrol negatif. Namun respon tersebut tidak semaksimal dengan respon yang dihasilkan oleh kontrol positif, karena nilai yang dihasilkan juga berbeda signifikan dengan kontrol positif.

6. Analisis Probit

Analisis sebelumnya telah menyatakan bahwa terdapat korelasi antara kenaikan pemberian dosis dengan penurunan ekspresi ER β bebas. Selanjutnya perlu dilakukan analisis mengenai dosis yang paling efektif atau ED₅₀ dan data tersebut akan menjadi data acuan dalam pengembangan sediaan neuroprotektif. Tahapan dalam penentuan ED₅₀ dilakukan dengan analisis probit dimana hasilnya dapat diamati pada tabel 5.11 dan 5.12.

Tabel 5.11 Hasil Uji *Chi-Square*

		Chi-Square	Df	Signifikansi
Probit	<i>Pearson Goodness-of-Fit Test</i>	2579,120	11	0,000

Hasil Uji *Chi-Square* pada tabel 5.11 menunjukkan bahwa nilai dari data yang diperoleh pada perlakuan tiap dosis ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* yaitu signifikan, karena $< 0,05$. Selanjutnya untuk melihat nilai dosis efektif (ED_{50}) dilakukan uji probabilitas yang ditampilkan pada tabel 5.12 sebagai berikut:

Tabel 5.12 Hasil Nilai Probabilitas

Dosis Efektif	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
ED_{40}	4,301
ED_{45}	4,010
ED_{50}	3,724
ED_{55}	3,438
ED_{60}	3,147

Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* memiliki nilai ED_{50} 3,724 $\mu\text{g/mL}$ dan penjelasan pada tabel 5.12 memperkuat penjelasan bahwa dengan pemberian 3,724 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak *M. crenata* diduga memiliki kandungan senyawa fitoestrogen serta memiliki aktivitas farmakologi sebagai sediaan neuroprotektif.

5.5 Mekanisme Aktivitas Fitoestrogen sebagai Agen Neuroprotektif

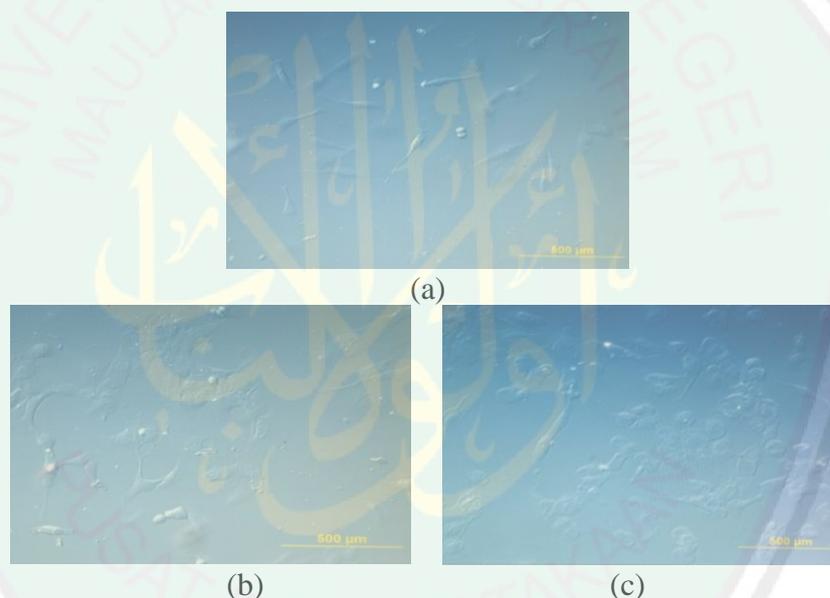
Fitoestrogen merupakan alternatif senyawa untuk mengatasi defisiensi estrogen yang dipercaya dapat mengurangi efek samping penggunaan terapi sulih hormon dengan memberikan tingkat keamanan yang lebih baik namun dengan aktifitas yang sama (Alldredge *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2015). Fitoestrogen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

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

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* sehingga dibutuhkan induktor untuk mengkondisikan sel mikroglia HMC3 mengalami defisiensi estrogen. Induktor yang digunakan yaitu IFN- γ , berfungsi untuk mengaktifkan sel mikroglia HMC3 secara patofisiologis dengan memasuki mikroglia melalui *Toll Like Receptor 4* (TLR4). Interferon- γ (IFN- γ) merupakan satu-satunya interferon tipe 2 yang memiliki sifat imunomodulator. Aktivasi IFN- γ akan berikatan dengan subunit reseptor Jak1 dan Jak2, aktivasi dari keduanya akan menghasilkan fosforilasi reseptor, sehingga dapat mengikat *signal transducer and activator of transcription-1* (STAT1) dan akan mempengaruhi translokasi di nukleus. Ketika berada di nukleus, STAT1 akan berikatan dengan *IFN-gamma-activated sequence* (GAS) dipromotor gen, hal ini bertujuan untuk mengatur proses transkripsinya dan intensitas fluoresensi gen lainnya.

Akibat dari pensinyalan IFN- γ tersebut, jalur pensinyalan NF- κ B untuk mengatur intensitas fluoresensi gen Sel Limfosit T CD4+ akan teraktivasi yang berperan sebagai sistem imun spesifik seluler. Munculnya Sel Limfosit T CD4+ akan mengaktifkan sel *T helper 1* (Th1) yang selanjutnya akan memediasi agen proinflamasi MHC II sebagai *antigen presenting cell* (APC) ke sel mikroglia. Sel Th1 bertanggung jawab untuk kekebalan terhadap patogen intraseluler terutama melalui sekresi IFN- γ (Hyunju *et al.*, 2013) dan memengaruhi transkripsional gen. Transkripsional gen yang dipengaruhi terutama adalah NF- κ B, dimana NF- κ B inilah yang akan bertanggungjawab terhadap sistem kekebalan dan respons inflamasi. Peran NF- κ B sangat penting dalam regulasi patogenesis penyakit

terkait neuroinflamasi. Berlimpahnya faktor transkripsi NF- κ B dan aktivasi konstitutif di otak memiliki beragam fungsi diantara neuron, glia, dan pembuluh darah otak. Teraktivasinya NF- κ B di sel neuron akan meningkatkan intensitas fluoresensi dari MHC II sebagai agen proinflamasi, ER yang teraktivasi akan menghambat aktivasi dari NF- κ B, kemudian mempengaruhi sintesis protein sel (Tang dan Le, 2015; Villa *et al.*, 2016). Sintesis protein sel yang terganggu kemudian akan merubah morfologi sel dan akan mengekspresikan *marker* tertentu (Azcutia *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2015; Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016).

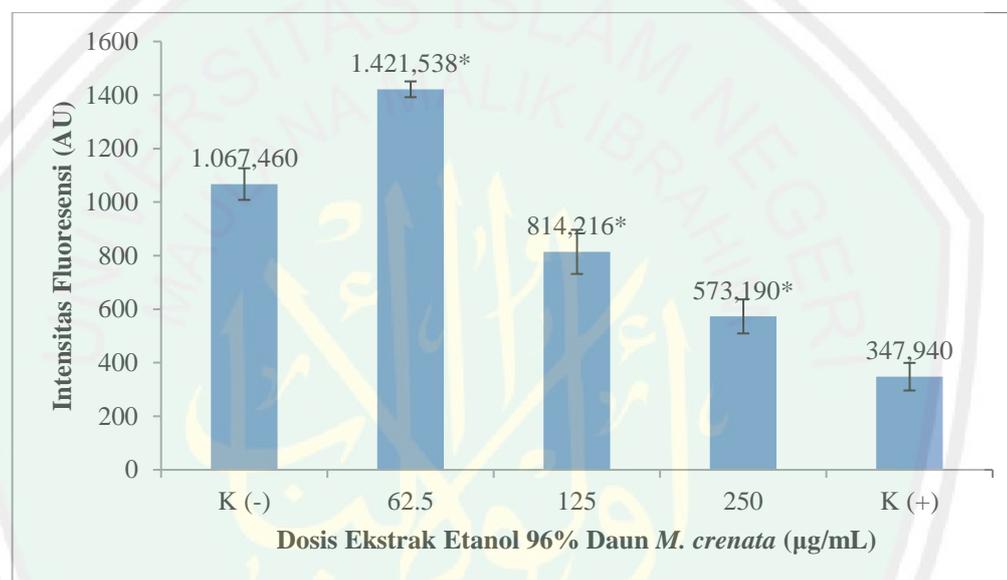


Gambar 5.6 (a) Sel mikroglia HMC3 *resting state* sebelum diberi perlakuan (b) Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ (B). Sel mikroglia HMC3 setelah diberikan perlakuan IFN- γ dan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*.

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

mengalami neuroinflamasi (*phenotype* M₁), maka selanjutnya sel HMC3 diberikan perlakuan ekstrak etanol 96% dari daun *M. crenata* sebagai agen neuroprotektor yang diasumsikan dapat menggantikan estrogen dalam sel, agar sel teraktivasi menjadi *phenotype* M₂ yang merupakan gambaran sel mikroglia yang berusaha untuk “mempertahankan hidup” karena ditemukannya jejas.

Berikut adalah gambar 5.7 yang merupakan grafik dari intensitas fluoresensi ER β bebas pada sel mikroglia HMC3:



Gambar 5.7 Intensitas Fluoresensi ER β Bebas pada Ekstrak Etanol 96% Daun *M. crenata*

Marker ER β diukur untuk mengkonfirmasi adanya ikatan senyawa fitoestrogen dalam daun *M. crenata* dengan ER β pada sitoplasma sel mikroglia HMC3 mekanisme jalur *ER-dependent*. Semakin sedikit ER bebas artinya semakin banyak ER yang berikatan dengan senyawa fitoestrogen. Aktivitas fitoestrogen dalam menurunkan intensitas ER β bebas pada sel mikroglia HMC3 menunjukkan bahwa semakin besar dosis perlakuan yang diberikan, maka intensitas ER β bebas tersebut pada sel mikroglia akan semakin menurun, hal ini disebabkan oleh senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam ekstrak etanol 96%

daun semanggi dapat berikatan dengan ER β pada sel mikroglia HMC3 dan akan mencegah proses transkripsi dari NF- κ B, sehingga dapat memberikan respon neuroprotektif.

Peranan estrogen dalam tubuh umumnya dapat terjadi ketika estrogen berikatan dengan reseptornya sehingga terbentuk estrogen reseptor teraktivasi. Dari berbagai mekanisme ikatan estrogen dengan reseptornya, jalur *ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling* yang memiliki kemungkinan paling besar dilalui oleh senyawa estrogen yang terkandung dalam daun semanggi, hal ini dikarenakan jalur tersebut terjadi pada sistem saraf dan juga mempengaruhi transkripsional gen. Ikatan tersebut terjadi pada reseptor- β , karena ER β memiliki sifat dominan dalam konsep pensinyalan estrogen. Selain itu, ER β juga berperan sebagai modulator penting dari beberapa sistem neurobiologis non-reproduksi, seperti pada kondisi biologis tubuh (Arteaga-Lopez *et al.*, 2003). Pada jalur ini ER β yang teraktivasi akan mengaktifkan *second messenger* pada sitoplasma, kemudian terkativasinya *second messenger* akan menghambat aktivasi NF- κ B, yang merupakan faktor transkripsi penyebab neuroinflamasi. Dengan demikian, senyawa firoestrogen pada daun semanggi dapat dikatakan sebagai senyawa yang memiliki respon neuroprotektif.

5.6 Aktivitas Kandungan Senyawa Fitoestrogen Daun Semanggi dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah yang sangat bermanfaat untuk hewan ataupun manusia. Tumbuhan seringkali digunakan manusia untuk memberi makan hewan ternak dan tidak sedikit pula yang digunakan sebagai obat,

diantaranya dikenal dengan sebutan jamu. Hal ini menjadi bukti bahwasanya segala sesuatu yang diciptakan Allah tidak ada yang sia-sia. Terdapat banyak manfaat yang terdapat pada setiap makhluk yang Allah ciptakan termasuk tumbuhan. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an surat An-Nahl ayat :

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

Artinya : *Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman, zaitun, kurma, anggur, dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kekuasaan Allah bagi orang-orang yang berpikir'.*

Ayat diatas memberitahu kita bahwasanya Allah benar-benar menciptakan segala sesuatu dengan kebaikan yang ada padanya. Pada kata '*Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kekuasaan Allah bagi orang-orang yang berpikir'* ditujukan untuk manusia agar selalu berpikir akan kuasa Allah dengan mengamati setiap ciptaan Allah. Penjelasan arti yang terdapat pada ayat diatas berhubungan erat dengan kesadaran manusia dalam memperhatikan ciptaan Allah SWT dan mendorong manusia dalam meningkatkan ilmu pengetahuan terutama bidang ilmu botani farmasi, yang berperan dalam pemanfaatan tanaman sebagai bahan baku obat. Keterkaitan ayat tersebut dengan penelitian ini dimana tanda kekuasaan Allah salah satunya terdapat pada tanaman *M. crenata* yang memiliki manfaat sebagai obat herbal untuk mengurangi keluhan akibat defisiensi estrogen pada wanita pasca menopause.

BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan yaitu:

1. Ekstrak etanol 96% daun semanggi memiliki aktivitas sebagai agen neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3 ditandai dengan penurunan intensitas fluoresensi ER β bebas, pada pemberian dosis 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
2. Nilai *effective dose* (ED₅₀) dari ekstrak etanol 96% daun semanggi yang mampu menurunkan intensitas fluoresensi ER β bebas pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi IFN- γ dari hasil uji probabilitas menunjukkan nilai 3,724 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.2 Saran

Setelah dilakukan penelitian terhadap kemampuan ER β berikatan pada sel mikroglia HMC3 dan terhadap *marker phenotype* M₁ yaitu MHC II yang diekspresikan oleh sel tersebut, penelitian ini perlu dilanjutkan sampai tahap pengujian *marker phenotype* M₂ yaitu Arg1, bertujuan untuk melengkapi data ekstrak etanol 96% daun semanggi sebagai sediaan neuroprotektif pada wanita pascamenopause.

DAFTAR PUSTAKA

- [ATCC] American Type Culture Collection. 2017. *HMC 3* (ATCC® CRL-3304™) American Type Culture Collection. www.atcc.org.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 tahun 2014 tentang persyaratan mutu obat tradisional*, Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- [CCRC] Cancer Chemoprevention Research Center. 2010. *Protocol Uji In Vitro*. Cancer Chemoprevention Research Center. ccrc.farmasi.ugm.ac.id
- [Depkes, RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes, RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Aditama, A. P., Agil, M., Laswati, H. 2016. An In Vitro Antiosteoporotic Activity Of 96% Ethanol Extract Of *Abelmoschus Manihot* L. Medik Leaves Using Mc3t3-E1 Preosteoblast Cells. *Trad. Med. J.* Vol. 21(3), p 116-123.
- Afriastini JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI.
- Al-Qarni, A. 2008. Tafsir Muyasar, Jilid 1. Terjemahan Tim Qisthi Press. Jakarta: Qisthi Press.
- Arifianti L, Oktarina RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. Volume 2, Nomor 1: 1-4.
- Arteaga-Lopez, Paola, Handal-Silva, Anabella y Morán-Perales, José Luis. 2003. Differential cholinergic system regulation of mRNA ex-pression of estrogen

receptors in the hypothalamus of the female rat. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*.

Aryani, Benita. 2013. Penentuan Faktor dan *Setting* Parameter Optimal untuk Meminimalkan Jumlah Cacat Roti Smeer dengan Desain Eksperimen. [skripsi]. Yogyakarta: Program Studi Teknik Industri, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Atma Jaya.

Asl, S. Z., Khaksari, M., Khachki, A. S., Shahrokhi, N and Nourizade, S. 2013. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 119:353–361.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M. A., Mohamed., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. Vol 117, pp, 426–436.

Banu, K. S dan Chathrine, L. 2015. General Tecniques Involved in Phytochemical Analysis. *Internasional Journal of Advanced Research in Chemical Science*. Vol 2 (5).

Baziad A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Edisi ke-1. Jakarta. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Hal 75-81.

Bertram, L. dan Rudolph, E. T. 2005. The Genetic Epidemiology of Neurodegenerative Disease. *The Journal of Clinical Investigation*.

Block, M. L., Zecca, L dan Hong, Jau-Shyong. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews . Neuroscience*. Vol 8. Doi:10.1038/Nrn2038

Bustamam N. 2008. Fitoestrogen dan kesehatan tulang. *Bina Widya*. Volume 19, Nomor 3: 146-150.

- Careaga, M., Water, J. V. D., dan Ashwood, P. 2010. Immune Dysfunction in Autism: A Pathway to Treatment. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*. Vol. 7, hal 283-292.
- Cersosimo, G., Eduardo, M., Benarroch, E. 2015. Estrogen Actions In The Nervous System. *Neurology*. Vol 85.
- Chamniansawat A,S., Chongthammakun, S. 2015. Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis By Reactive Microglia Leads to Downregulation of Synaptic Protein Expression. *Neurotoxicology*. 46. 25–34.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Abert-vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem*. Vol 34, pp, 540–560.
- Chemat, F., Tomao, V dan Virot, M., 2008. In: Otles, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*. CRC Press, pp. 85–94.
- Cherry, J., Olschowka, J., and O’banion, Kerry. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* . <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>.
- 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).
- Darmadi, 2011. Efek Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Osteoblast dan Osteoklast pada Tikus dengan Ovariectomi: Jurnal Kedokteran Brawijaya.
- Dipiro, T. Joseph., Talbert, L. Robert., Yee, C. Gary. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach 7th Edition*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

- Dirjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Cetakan Pertama)*. Jakarta : Departemen Kesehatan.
- Duffy, C., Perez, K., dan Partidge A. 2010. Implication of Phytoestrogen Intake for Breast Cancer. *Cancer Journal for Clinician*. Vol. 57. hal: 260-277.
- Ellis D, dan Bennett, D., L., H. 2013. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia* 2013;111 (1): 26–37
- 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., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev*. Vol 3 (2). Pp : 108–120. doi: 10.1007/s12393-011-9036-6.
- Filiano, A. J., Gadani, S. P., and Kipnis, J. 2015. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res*. 1617, 18–27. doi: 10.1016/j.brainres.2014.07.050.
- Galien, Alvero AB, Silasi DA, Kelly MG, Fest S, Visintin I, Leiser A, Schwartz PE, Rutherford T, Mor G. 1997. Regulation of IKK β by miR-199a affects NF- κ B activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 27:4712–4723.
- Gani, I. dan Amalia, S. 2015. *Alat Analisis Data: Aplikasi Statistik untuk Bidang Ekonomi dan Sosial*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Ghani, Lannywati. 2009. Seluk Beluk Manopause. (Journal)Media Peneliti dan pengembangan Kesehatan. Volume 19 No. 4. *Puslitbang Biomedis dan Farmasi*
- Ghozali, Imam. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang : Universitas Diponegoro.

- Ghozali, Imam. 2016. *Aplikasi Analisis Multivariete Dengan Program IBM SPSS 23 Edisi 8*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Gilmore, J. H., Fredrik, J. L., Vadlamudi S, Lauder, J. M. 2004. Prematal Infection and Risk for Schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha Inhibit Cortical Neuron Dendrite Development. *Neuropsychopharmacology*, 29; 1221-1229.
- Hidayat, T., dan Istiadah N. 2011. *Paduan Lengkap Menguasai SPSS untuk Mengolah Data Statistik Penelitian*. Jakarta: Mediakita.
- Holmseth, S., Lehre, K. P., Danbolt, N. C. 2006. Specificity controls for immunocytochemistry. *Anat Embryol Journal*. Vol 211. page 257-266.
- Hyunju, Oh., and Ghosh, Sankar. 2013. NF- κ B: roles and regulation in different CD4⁺ T-cell subsets. *Immunological Reviews*. Department of Microbiology and Immunology, Columbia University, New York, NY.
- Inayatin, A., L. 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% daun Krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis.) terhadap induksi Apoptosis dan Penghambatan Siklus Sel pada Sel Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Jantarantotai A,N., Utaisincharoen B,P., Sanvarinda A,P., Thampithak C,A., Sanvarinda, Y. 2013. Phytoestrogens Mediated Anti-Inflammatory Effect Through Suppression Of IRF-1 and PSTAT 1 Expressions in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology* 17 : 483–488.
- Kalaitzidis, D dan Gilmore, T. D. 2005. Review: Transcription Factor Cross-Talk: The Estrogen Receptor And NF- κ B. *Trends In Endocrinology And Metabolism*. Vol.16 No.2. Doi:10.1016/J.Tem.2005.01.004.
- Kallioliias, George D. and Ivashkiv Lionel. B. 2010. Overview of The Biology of Type 1 Interferon. *Arthritis Research and Therapy*. Volume 12. Nomor 1.

- Kenkel, J. 2003. *Analytical Chemistry for Technicians*. Washington: Lewis Publisher.
- Kettenmann, H., Hanisch, UK., Noda, M., and Verkhratsky, A. 2011. *Physiology of microglia*. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- 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.* 1:7#8-86.
- Kovacs, G. G. 2016. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning Towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 189.
- Kumalasari, H. 2012. Validasi Metode Pengukuran Kadar Air Bubuk Perisa Menggunakan Moisture Analyzer Halogen HB43-s sebagai Alternatif Metode Oven Karl Fischer. *Skripsi*. Bogor (ID): IPB Press.
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C. 2015. Non-Monotonic Dose-Response Relationship and Endocrine Disruptors: A Qualitative Method of Assessment. *Eviromental Health*. Vol 14. No 13.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47 (2).
- Lattante, S., Perulli, A., Anni, M. 2014. Characterization by Confocal Laser Scanning Microscopy of the Phase Composition at Interfaces in Thick Films of Polymer Blends. *Journal of Polymers*. 541248
- Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H., Chen, C-P., Wang, P-H. 2013. Hormone therapy for postmenopausal women And unanswered issue. Elsevier : *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol 2.
- Lestari, B., Naisbitt I. H., Ariska D. A., Thoriq Z., Ziana W. 2014. Potensi Biji Labu Kuning Sebagai Agen Fitoestrogen Pada Wanita Post Menstrual.

Journal Kesehatan. Yogyakarta: Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Lewis, D. K., Johnson, A. B., Stohlgren, S., Harms, A., Sohrabji, F. 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol*. 195:47–59.

Ma'arif, B. ZA. 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun *Marsilea crenata Presl*. (isolasi ekstrak n-heksana dengan Rf 0,33 pada fase gerak n-heksana : etil asetat {4:1}). *Skripsi*. Surabaya : Departemen Farmakognosi Dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ; Hal 4-6.

Ma'arif, B., Agil, M., dan Laswati, H. 2016. Analisis Fitokimia Ekstrak N-Heksana dan Fraksi Daun *Marsilea crenata Presl*. dengan GC-MS. *Trad. Med. J*. Vol. 21(2), P 77-85.

Ma'arif, B., Agil, M., dan Laswati, H. 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata Presl*. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol 8 (3).

Matt, S.M., dan Johnson, R.W. 2015. Neuro-Immune Dysfunction During Brain Aging: New Insights in Microglial Cell Regulation. *Current Opinion In Pharmacology*. 26 : 96–101.

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.

- Mirza, D, M. 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.
- Mitry RR, Hughes RD (eds.). Introduction to Cell Culture. Human Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology. 2012; 806
- Mizuno M, Noto D, Kaga N, Chiba A, Miyake S. 2017. The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS ONE* 12(2): e0173032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173032>.
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., and Maccioni, R. B. 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 8:112. doi: 10.3389/fncel.2014.00112.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Makasar : Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar
- Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Lembe, D. M., Nde, Z., Nyonseu. D. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 2017. *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Nisa, Ghallisa Khoirun, Wahyunanto Agung Nugroho, Yusuf Hendrawan. 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. Vol.2, No.1
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1. (3).

- Ososki, A. L., Kennelly, E. J. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research*. Vol 17. Page 845-869
- Patro, I., Nagayach, A., Sinha, S and Patro, N. 2016. *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies*. Singapore : Springer Science and Business Media.
- Prince, M., Guerchet, M., Prina, M., 2015. The Epidemiology and Impact of Dementia: Current State and Future Trends.
- Proverawati, A. & Sulistyawati, E.2010. *Menopause dan sindrom premenopause*. Yogyakarta: Muha Medika.
- Putra, K. H. P. 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea Crenata* Presl.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus Musculus*) Jantan. *Skripsi*. Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ramesh G. Novel Therapeutic Targets in Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Inflammation & Cell Signaling* 2014;1: e111.
- 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.
- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W., S. Cheeran, M., Lokensgard, J. R., Peterson, P. K. 2004. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 17. No. 4.
- Russo, C.D., Cappoli, N., Coletta, I., Mezzogori, D., Paciello, F. 2018. The Human Microglial Sel: Where Do We Stand? A Systematic Literature Review. *Journal of Neuroinflammation*. Vol. 15. No 259.
- Sani, Robby Nasrul, Fithri Choirun Nisa, Ria Dewi Andriani, Jaya Mahar Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol

Mikroalga Laut Tetraselmis chuii. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.2, No.2, hal.121-126

Senjaya, Y. A., Dan Surakusumah, W. 2002. Potensi Ekstrak Daun Pinus (*Pinus Merkusii* Jungh. Et De Vriese) Sebagai Bioherbisida Penghambat Perkecambah Echinochloa Colonum L. Dan Amaranthus Viridis.

Shirvi, Izza Naila. 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Marsilea crenata Presl. Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Osteoblas Tulang Trabekular Vertebrata Mencit. Skripsi. Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sirotkin, A.V., Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogen And Their Effects. *European Journal Of Pharmacology* 741 : 230–236.

Speroff Leon., Fritz Marc A. 2005. *Menopause and the Perimenopausal Transition*. New York : Lippincott Williams & Wilkins.

Stenis, Van, C.G.G.J., 1975, *Flora: Untuk sekolah di Indonesia*. Jakarta: Paradnya Paramita.

Subramaniam, S. dan Unsicker, K. 2009. ERK and Cell Death: ERK 1/2 in Neuronal Death.

Sugiyono. 2010. *Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.

Sullelu, D. 2010. Perbedaan tingkat pengetahuan dan sikap wanita tentang memopause antara cara belajar aktif diskusi kelompok dengan leaflet dibanding metode dengan ceramah leaflet dikomplek Solobaru. *Tesis*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret

Suparman, E dan Suparman E. Peran Estrogen Dan Progesteron terhadap Kanker Payudara. *Jurnal Biomedik (JBM)*. Vol. 6, No. 3: 141-148.

Syahidah, H. N., dan Hadisaputri, Y. E. 2016. Media yang Digunakan pada Kultur Sel. *Jurnal Farmaka*. Vol. 4. No 3.

- Tang, Y., and Le, W. 2016. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.
- Taylor, C. R., and Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods. Dako Denmark : IHC Handbook* sixth edition.
- Tilstra, J. S., Clauson, C. L., Niedernhofer, L. J and Robbins, P., D. 2011. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging and Disease*. Vol 2. No.6.
- Tiyaningsih, D.A., 2007. Studi Makroskopis, Mikroskopis dan Sk.rining Fitokimia *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Trisunuwati, P. 2017. Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Against Blood Estrogen Progesterone Balance, Blood Calcium Levels and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Rattus novergicus*). *Research Journal of Life Science*. Vol. 04 (1).
- Vagaska B, New, S, E, P, Alvarez-gonzalez, C, D'Acquisto, F. S, Gomez, G, Bulstrode, N, W, Madrigal, A, Ferretti, P. 2016. 'MHC-class II are expressed in asubpopulation of human neural stem cells in vitro in an IFN γ -independent fashion and during development. *Scientific Reports*, vol. 6.
- Vandeberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B. 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low Dose Effect and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*. Vol 33.
- 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).
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., Hubinger, M. D. 2013. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *J. Food Eng.* Vol 119. pp, 196–204.

- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. 2008. *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry : A review. Innov Food Sci Emerg.* Vol 9 (2). pp:161–169. doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Society.*
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Terjemahan : S. Noerono. Gadjah Mada University Press. Indonesia.
- Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. 2014. The Many Faces of Estrogen Signaling. *Biochemica Medica.* Vol. 24 (3).
- Wang, Q. M., Luo, A. Z. dan Kong, X. 2014. Neuroinflammation and Autism. *N A J Med Sci,* 7(3):118-122
- 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.
- Xiong, X. Y., Liu, L., dan Yang, Q. W. 2016. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog. Neurobiol.* 142, 23–44. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016. 05.001.
- Yacoeb, A. M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., Kristiono, S. S. 2010. Deskripsi histologis dan perubahan komposisi kimia daun dan tangkai semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia XII (2):*81-95.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized

phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 51.



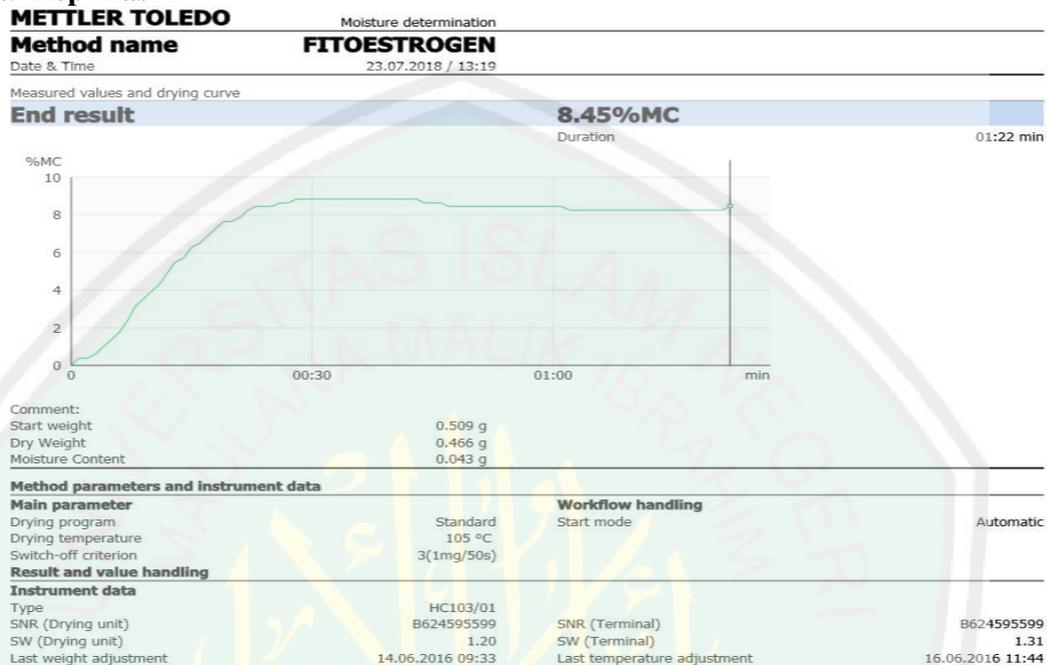
LAMPIRAN

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

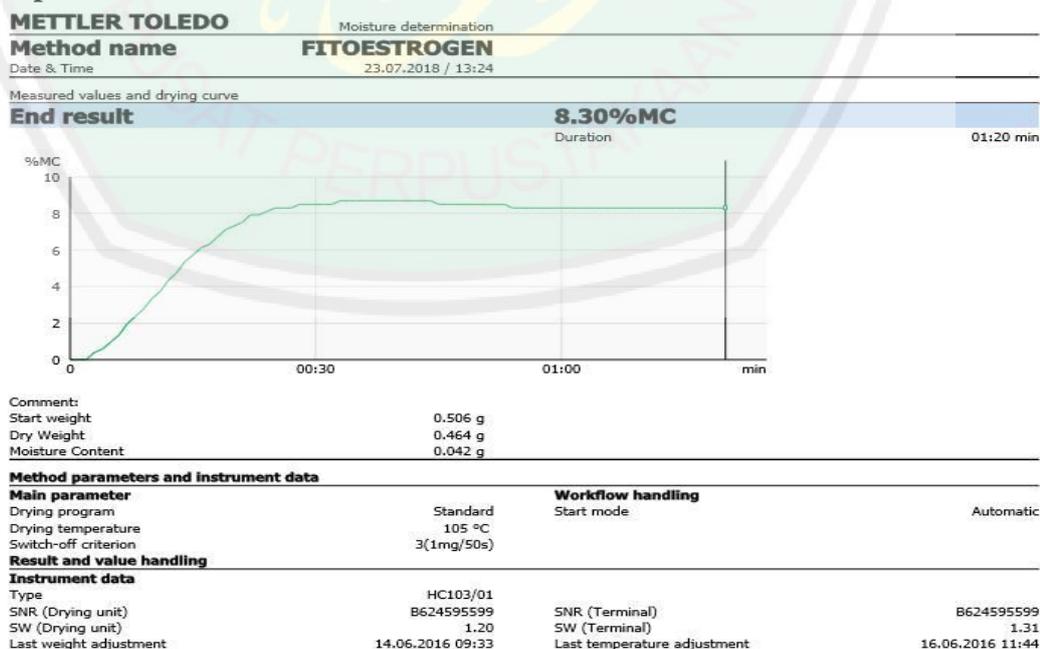
	PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR DINAS KESEHATAN UPT MATERIA MEDICA BATU Jalan Lahor No.87 Telpon/Fax (0341) 593396 KOTA BATU	65313
Nomor	: 074 / 368 / 102.7 / 2017	
Sifat	: Biasa	
Perihal	: Determinasi Tanaman Semanggi Air	
Memenuhi permohonan saudara :		
Nama	: BURHAN MA'ARIF Z.A., M.Farm.,Apt.	
NIDT	: 19900221 201701011 124	
Instansi	: JURUSAN FARMASI, FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG	
1. Perihal determinasi tanaman semanggi air		
Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)	
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)	
Divisi	: Pteridophyta (paku-pakuan)	
Kelas	: Pteridopsida	
Ordo	: Salviniales	
Famili	: Marsileaceae	
Genus	: Marsilea	
Spesies	: <i>Marsilea crenata</i> Presl	
Sinonim	: <i>Marsilea quadrifolia</i> Bl. ; <i>M. minuta</i> L.	
	Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi	
	Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1	
2. Morfologi : Habitus ; Semak, menjalar, panjang ± 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang ± 2 cm, lebar ± 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, lepas/berdiri sendiri, kelopak dua, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serabut, putih kotor.		
3. Nama Simplisia : <i>Marsilea crenata</i> folium / Daun semanggi air.		
4. Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol		
5. Penggunaan : Penelitian		
6. Daftar Pustaka :		
• Anonim, http://www.warintek.ristek.go.id/ salam, Diakses 14 Februari 2007		
• Anonim, http://www.plantamor.com/semanggi , diakses 11 Desember 2010		
• Steenis, CGGJ Van Dr , <i>FLORA</i> , 2008, Pradnya Paramita , Jakarta		
• Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria.1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia I</i> , Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.		
Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.		
Batu, 05 Oktober 2017 Kepala UPT Materia Medica Batu		
		
Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes. NIP.19611102 199103 1 003		

Lampiran 2. Hasil Uji *Moisture Content* Serbuk *Simplisia Daun Semanggi (Marsilea crenata C. Presl)*

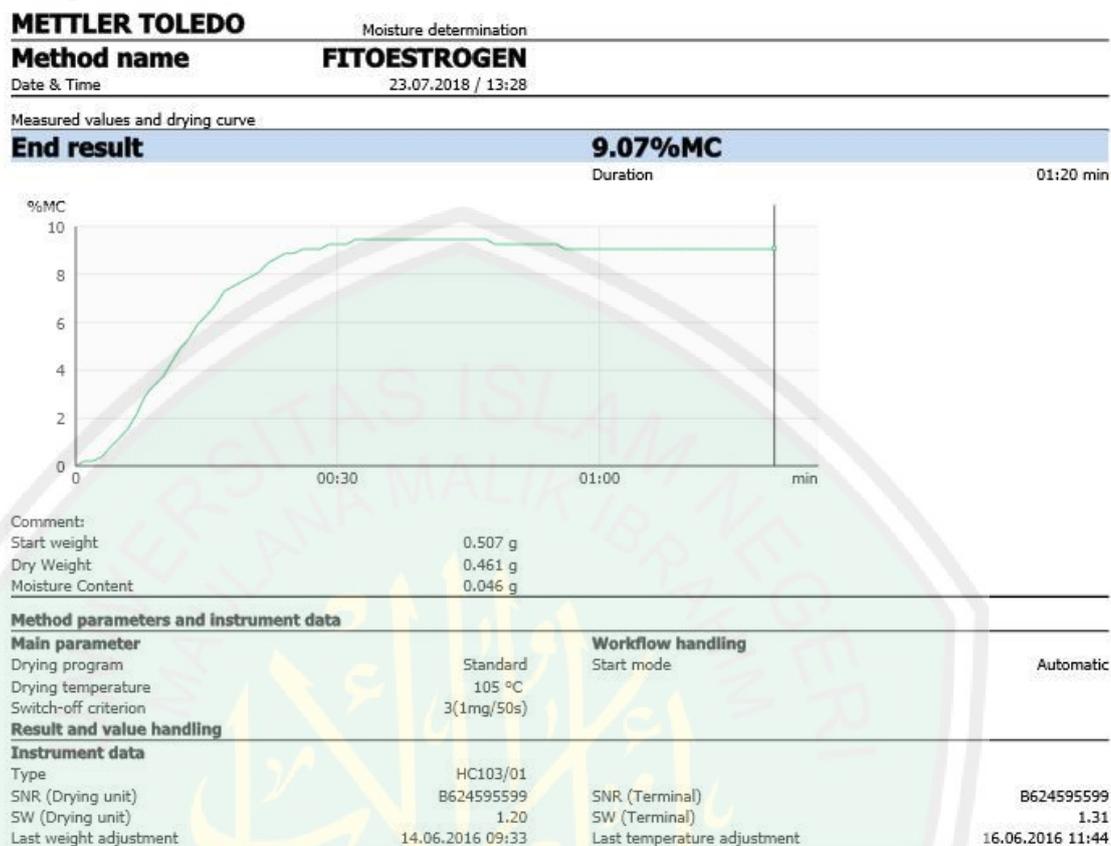
a. Replikasi 1



b. Replikasi 2



c. Replikasi 3

d. Rerata Nilai *Moisture Content*

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

Lampiran 3. Hasil Perlakuan Uji Aktivitas Metode Pewarnaan ICC



(sel sebelum diberi perlakuan)

(sel setelah diberi IFN- γ)

Pengamatan diinduksi larutan sampel



kontrol negatif

62,5 $\mu\text{g/mL}$



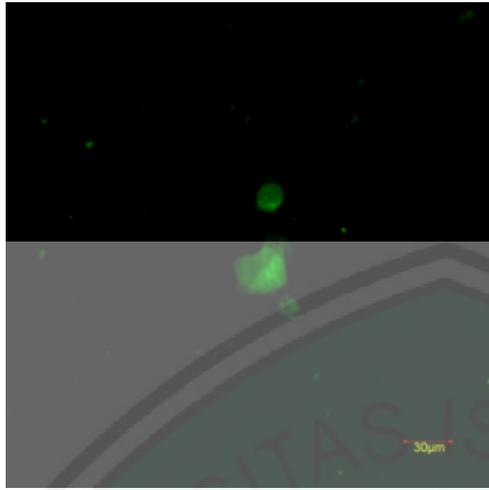
125 $\mu\text{g/mL}$

250 $\mu\text{g/mL}$

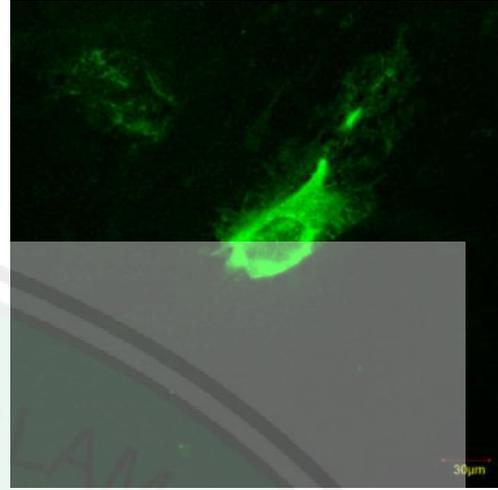


kontrol positif

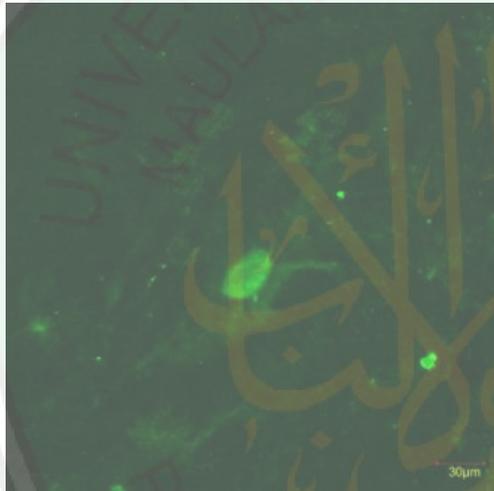
Pengamatan menggunakan instrumen CLSM



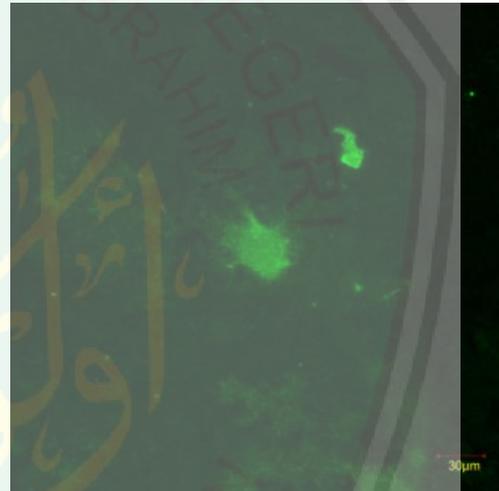
(kontrol negatif)



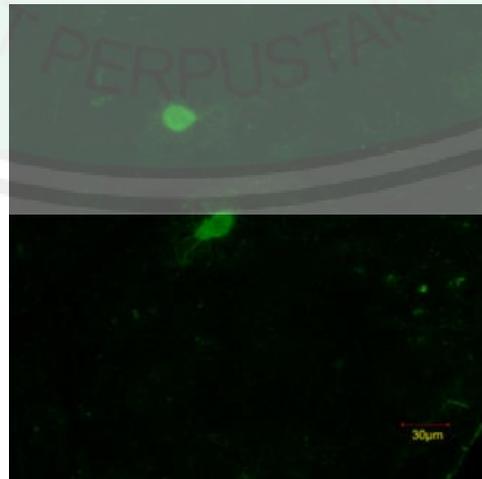
(dosis 62,5 µg/mL)



(dosis 125 µg/mL)



(dosis 250 µg/mL)



(kontrol positif)

Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel

a. Preparasi sampel tanaman

1. Pembuatan tween 80 0,5% dalam 10 ml
 - Diambil 0,05 ml/ 50 μ L tween 80 dalam *conical tube* 15 ml
 - Di ad dengan WFI hingga 10 ml, di *mix gentle*
2. Pengenceran DMSO 0,5% dari DMSO 100%

$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 100\% = 50 \text{ ml. } 0,5\%$$

$$V1 = 0,25 \text{ ml}$$
 - Diambil 0,25 ml DMSO 100% dan dimasukkan labu ukur 50 ml
 - Ditambahkan WFI ad 50 ml
3. Pembuatan larutan ekstrak 5000 ppm
 - Ditimbang \pm 50 mg ekstrak dalam gelas beker
 - Ditambahkan 50 μ L tween 80, diaduk dengan batang pengaduk
 - Ditambahkan 1 mL DMSO 0,5%, dihomogenkan
 - Ditambahkan DMSO ad 10 ml dalam labu ukur, dihomogenkan
 - Dipindahkan ekstrak 5000 ppm dalam *conical tube* 15 ml

b. Preparasi IFN- γ

Induksi IFN- γ = 9 well x 300 μ L = 2.700 μ L = 3 mL

Stok IFN- γ 1 μ g/ mL = 1000 ng/ mL

IFN- γ 10 ng (dosis literatur)

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

$$V1 = 0,03 \text{ mL} = 30 \mu\text{L}$$

Cara pembuatan=

- Diambil MK (penstrep + FBS) 3 ml, dikurangi 30 μ L
- Ditambahkan dengan IFN- γ 30 μ L dari stok 1 ng/ ml
- Di *mix gentle*
- Diambil *plate* dari inkubator
- Dikeluarkan supernatan dari *plate*
- Dimasukkan larutan MK - IFN- γ 300 μ L pada masing-masing *well plate*
- Diinkubasi kembali dalam inkubator 37 $^{\circ}$ C selama 24 jam

c. Preparasi Ekstrak

1. Perhitungan pengenceran ekstrak

- Konsentrasi 62,5 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

- Konsentrasi 125 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

- Konsentrasi 250 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

2. Pembuatan sampel ekstrak

a. konsentrasi 62,5 ppm

- Diambil 350 μL ekstrak 125 ppm
- Ditambah media 350 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan

b. konsentrasi 125 ppm

- Diambil 550 μL ekstrak 125 ppm
- Ditambah media 550 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan

c. konsentrasi 250 ppm

- Diambil 62,5 μL ekstrak 125 ppm
- Ditambah media 1187,5 μL dalam *eppendorf*, dihomogenkan

d. Preparasi Genistein

$$\text{Genistein} = 2 \text{ well} \times 300 \mu\text{L} = 600 \mu\text{L} = 0,8 \text{ mL}$$

Stok Genistein 1 mM

Genistein 50 μM (dosis literatur)

$$V1. M1 = V2. M2$$

$$V1. 1000 \mu\text{M} = 0,8 \text{ mL}. 50 \mu\text{M}$$

$$V1 = 0,04 \text{ mL}$$

$$V1 = 40 \mu\text{L}$$

Cara pembuatan=

- Diambil MK 0,8 mL, dikurangi 40 μL
- Ditambahkan dengan genistein 40 μL dari stok
- Di *mix gentle*

e. Pembuatan Reagen Pewarnaan ICC

1. Triton 0,1%

$$\frac{0,1}{100} \times 3100 \mu\text{L} = 3,1 \mu\text{L} \text{ dalam PBS } 3100 \text{ mL}$$

cara pembuatan =

- diambil PBS 3,1 mL
- dikurangi 3,1 μL
- ditambahkan stok triton 3,1 μL
- di *mix gentle*

2. BSA 1% =

$$\frac{1}{100} \times 3,1 \text{ mL} \times 2 = 0,062 \text{ gr dalam } 6.200 \text{ mL PBS}$$

cara pembuatan =

- ditimbang BSA 0,062 gr
- dilarutkan dalam 6.200 mL PBS

3. Antibodi primer

$$\text{Arg1} = \frac{1}{200} \times 3100 \mu\text{L} = 15,5 \mu\text{L}$$

$$\text{ER-}\beta = \frac{1}{200} \times 3100 \mu\text{L} = 15,5 \mu\text{L}$$

cara pembuatan =

- diambil BSA 3.100 μL
- dikurangi (15,5 μL x 2)
- ditambah stok antibodi primer masing-masing 15,5 μL
- di *mix gentle*

4. Pembuatan Reagen Antibodi Sekunder

BSA 1%

$$\frac{1}{100} \times 3,1 \text{ mL} = 0,031 \text{ gr dalam } 3.100 \text{ mL PBS}$$

cara pembuatan =

- ditimbang BSA 0,031 gr
- dilarutkan dalam 3.100 mL PBS
- di *mix gentle*

anti-rabbit FITC

$$\frac{1}{500} \times 3,1 \text{ mL} = 6,2 \mu\text{L dalam BSA } 1\%$$

anti-mouse Rhodamin

$$\frac{1}{500} \times 3,1 \text{ mL} = 6,2 \mu\text{L dalam BSA } 1\%$$

cara pembuatan antibodi sekunder =

- diambil 3.100 BSA 1%
- dikurangi 6,2 μL x 2
- ditambahkan 6,2 μL dari masing-masing antibodi sekunder
- di *mix gentle*

Lampiran 5. Hasil Analisa Statistik

a. Uji Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Dosis	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Intensitas	Kontrol negatif	.272	3	.	.946	3	.553
	62,5 µg/mL	.289	4	.	.803	4	.108
	125 µg/mL	.248	3	.	.968	3	.659
	250 µg/mL	.270	3	.	.948	3	.561
	Kontrol Positif	.251	3	.	.966	3	.646

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Intensitas	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.880	4	11	.507

c. Uji Korelasi

Correlations

		Dosis	Intensitas
Dosis	Pearson Correlation	1	-.849**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	16	16
Intensitas	Pearson Correlation	-.849**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	16	16

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

d. Uji Beda

ANOVA

Intensitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2423107.117	4	605776.779	182.070	.000
Within Groups	36598.742	11	3327.158		
Total	2459705.858	15			

e. Uji LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Intensitas

LSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	62,5 µg/mL	-354.078083 [*]	44.054992	.000	-451.04247	-257.11370
	125 µg/mL	253.244000 [*]	47.096768	.000	149.58471	356.90329
	250 µg/mL	494.269667 [*]	47.096768	.000	390.61038	597.92895
	Kontrol Positif	719.520000 [*]	47.096768	.000	615.86071	823.17929
62,5 µg/mL	Kontrol negatif	354.078083 [*]	44.054992	.000	257.11370	451.04247
	125 µg/mL	607.322083 [*]	44.054992	.000	510.35770	704.28647
	250 µg/mL	848.347750 [*]	44.054992	.000	751.38337	945.31213
	Kontrol Positif	1073.598083 [*]	44.054992	.000	976.63370	1170.56247
125 µg/mL	Kontrol negatif	-253.244000 [*]	47.096768	.000	-356.90329	-149.58471
	62,5 µg/mL	-607.322083 [*]	44.054992	.000	-704.28647	-510.35770
	250 µg/mL	241.025667 [*]	47.096768	.000	137.36638	344.68495
	Kontrol Positif	466.276000 [*]	47.096768	.000	362.61671	569.93529
250 µg/mL	Kontrol negatif	-494.269667 [*]	47.096768	.000	-597.92895	-390.61038
	62,5 µg/mL	-848.347750 [*]	44.054992	.000	-945.31213	-751.38337
	125 µg/mL	-241.025667 [*]	47.096768	.000	-344.68495	-137.36638

	Kontrol Positif	225.250333*	47.096768	.001	121.59105	328.90962
Kontrol Positif	Kontrol negatif	-719.520000*	47.096768	.000	-823.17929	-615.86071
	62,5 µg/mL	-	44.054992	.000	-1170.56247	-976.63370
	125 µg/mL	1073.598083*	47.096768	.000	-569.93529	-362.61671
	250 µg/mL	-225.250333*	47.096768	.001	-328.90962	-121.59105

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

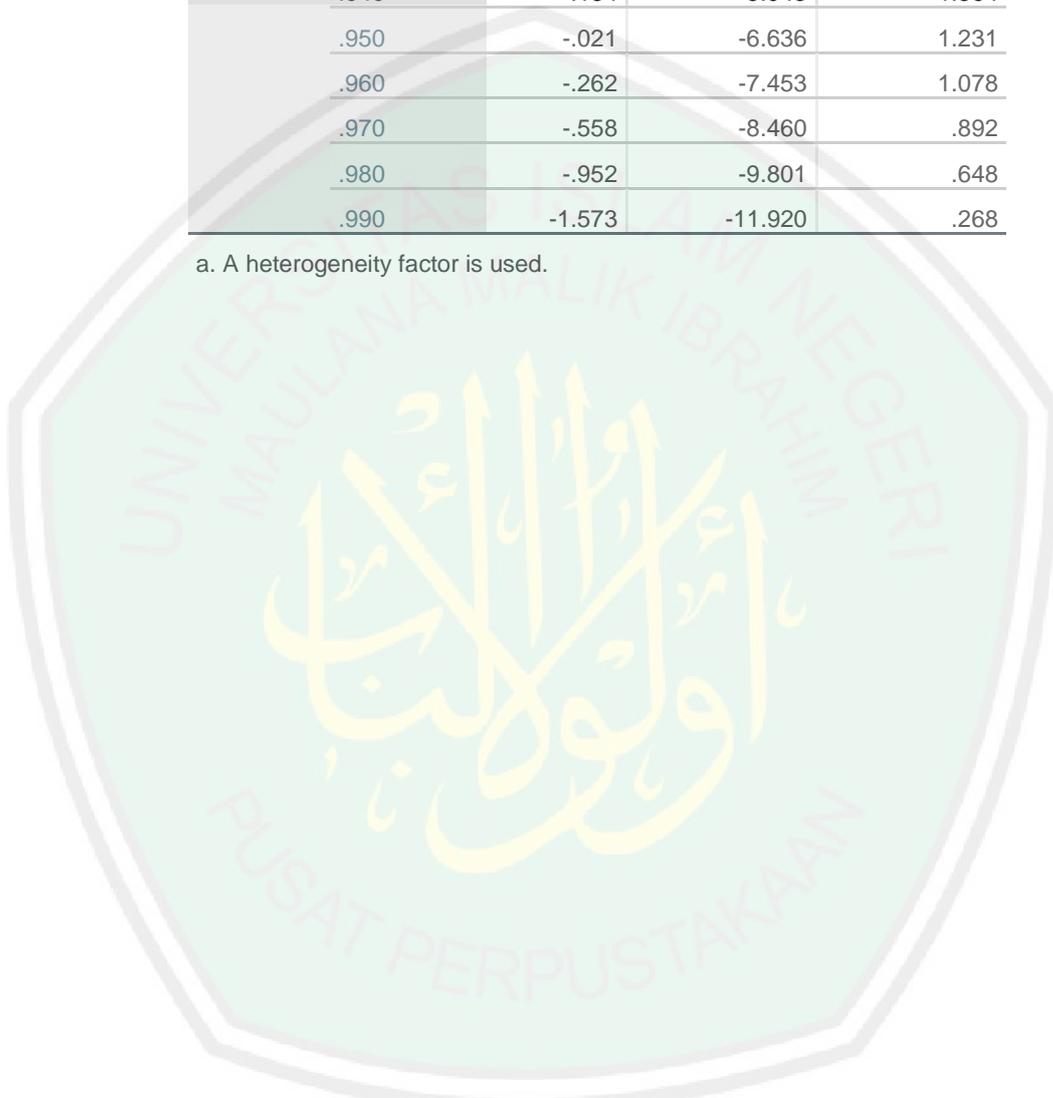
f. Analisis Probit

Confidence Limits

	95% Confidence Limits for Dosis			
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	9.021	6.302	24.698
	.020	8.400	5.932	22.569
	.030	8.006	5.696	21.219
	.040	7.710	5.518	20.204
	.050	7.469	5.373	19.379
	.060	7.264	5.250	18.677
	.070	7.084	5.141	18.061
	.080	6.923	5.043	17.511
	.090	6.777	4.954	17.010
	.100	6.642	4.872	16.549
	.150	6.084	4.530	14.645
	.200	5.640	4.253	13.136
	.250	5.260	4.012	11.845
	.300	4.918	3.790	10.691
	.350	4.601	3.578	9.628
	.400	4.301	3.369	8.627
	.450	4.010	3.155	7.671
	.500	3.724	2.927	6.747
	.550	3.438	2.669	5.853
	.600	3.147	2.355	4.996
	.650	2.847	1.936	4.205
	.700	2.530	1.335	3.532
	.750	2.188	.489	3.001

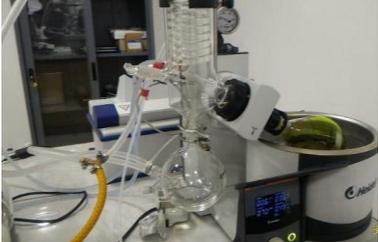
.800	1.808	-.618	2.577
.850	1.364	-2.019	2.192
.900	.806	-3.855	1.780
.910	.671	-4.305	1.687
.920	.525	-4.795	1.588
.930	.364	-5.336	1.481
.940	.184	-5.943	1.364
.950	-.021	-6.636	1.231
.960	-.262	-7.453	1.078
.970	-.558	-8.460	.892
.980	-.952	-9.801	.648
.990	-1.573	-11.920	.268

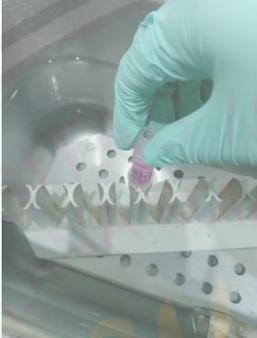
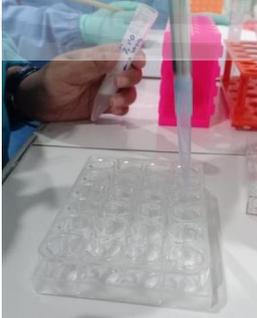
a. A heterogeneity factor is used.

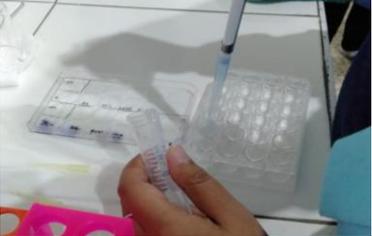


Lampiran 6. Dokumentasi

No	Gambar	Keterangan
preparasi tanaman		
1		<p style="text-align: center;">Daun <i>M.crenata</i> kering</p>
2		<p style="text-align: center;">Proses Grinding Simplisia menjadi serbuk daun <i>M.crenata</i></p>
3		<p style="text-align: center;">Proses Penimbangan simplisia daun <i>M.crenata</i></p>
4		<p style="text-align: center;">Proses Ultrasonifikasi Daun <i>M.crenata</i></p>
5		<p style="text-align: center;">Proses Penyaringan Filtrat dan Residu Daun <i>M.crenata</i></p>

6		<p>Proses Penyaringan Filtrat dan Residu Daun <i>M.crenata</i></p>
7		<p>Proses Pengovenan Ekstrak Etanol 96% Daun <i>M.crenata</i></p>
8		<p>Pembuatan ekstrak etanol 5000 ppm</p>
9		<p>Sterilisasi larutan ekstrak etanol 5000 ppm</p>
10		<p>Pengenceran sampel ekstrak etanol 62,5 ppm, 125 ppm dan 250</p>

preparasi sel		
11		Pembuatan media komplit (MK)
12		<i>Thawing</i> sel mikroglia HMC3
13		<i>Plating</i> sel mikroglia HMC3
14		Pengenceran dan pemberian larutan sampel pada 24-well
15		Pemberian larutan Triton-X untuk permeabilitas membran membran pada sel

16		Pemberian larutan BSA 1 % untuk <i>blocking</i> pada sel
17		Pemberian antibodi primer pada 24-well
18		Analisa menggunakan instrument CLSM