

**EFEK NEUROPROTEKTIF FRAKSI AIR *Marsilea crenata* C Presl.
TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3 YANG DIINDUKSI OLEH IFN- γ**

SKRIPSI

Oleh:
MENARA MUSLIM
NIM. 15670057



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

**EFEK NEUROPROTEKTIF FRAKSI AIR *Marsilea crenata* C Presl.
TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3 YANG DIINDUKSI OLEH IFN- γ**

SKRIPSI

Oleh:
MENARA MUSLIM
NIM. 15670057

Diajukan kepada:
Fakultaas 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

**EFEK NEUROPROTEKTIF FRAKSI AIR *Marsilea crenata* C Presl.
TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3 YANG DIINDUKSI OLEH IFN- γ**

SKRIPSI

Oleh:
MENARA MUSLIM
NIM. 15670057

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 07 Agustus 2019

Pembimbing I



Burhan Ma'arif ZA., M. Farm., Apt.
NIP. 19900221 2018 1 001

Pembimbing II



Wirda Anggraini, M. Farm., Apt.
NIP. 19930130 20180201 2 203

Mengetahui,

Ketua Jurusan Farmasi



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

**EFEK NEUROPROTEKTIF FRAKSI AIR *Marsilea crenata* C Presl.
TERHADAP SEL MIKROGLIA HMC3 YANG DIINDUKSI OLEH IFN- γ**

SKRIPSI

Oleh:
MENARA MUSLIM
NIM. 15670057

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima
sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S. Farm)
Tanggal: 07 Agustus 2019

Penguji Utama : drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort.
NIP. 19850720 200912 1 003
Ketua Penguji : Wirda Anggraini, M. Farm., Apt.
NIP. 19930130 20180201 2 203
Sekretaris Penguji : Burhan Ma'arif, ZA., M. Farm., Apt.
NIP. 19900221 201801 001
Anggota Penguji : Abdul Hakim, M.P.I, M. Farm
NIP. 19761214 200912 1 002



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Farmasi


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Menara Muslim

NIM : 15670057

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Efek Neuroprotektif Fraksi Air Marsilea Crenata C. Presl terhadap Sel Mikroglia HMC3 yang Diinduksi oleh IFN- γ .

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

Malang, 07 Agustus 2019
Yang membuat pernyataan



Menara Muslim
NIM. 15670057

MOTTO

مَنْ جَدَّ وَ جَدَّ

“Siapa yang sungguh-sungguh maka akan berhasil”

مَنْ صَبَرَ ضَفِرَ

“Siapa yang bersabar maka akan beruntung”

مَنْ سَارَ عَلَى الدَّرْبِ وَ صَلَ

“Siapa yang berjalan pada jalannya maka akan sampai tujuan”

Jangan pernah ragu menuntut ilmu di universitas meski UKT selangit, karena hanya itu yang bisa bapak wariskan kepadamu.
(Abati)



HALAMAN PERSEMBAHAN

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Terucap syukur atas rahmat-Mu.

Dialah yang Maha Berilmu.

Allah yang Maha Tahu.

Terselip shalawat dan salam untuk Muhammad nabiku.

Role model akhlaq bagi para penuntut ilmu.

Terima kasih dihaturkan untuk

Abati dan Ibu, galaksi bimasaktiku.

Terhadap do'a yang tak kenal putus.

Jerih payah tak hirau pesimis.

Hingga warisan yang tak larut oleh waktu.

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

Atas kesempatan yang mendarat

Atas kepercayaan yang tersemat

Atas ilmu dan pengalaman yang telah tetambat.

Ibu Wirda Anggraini M. Farm., Apt.

Untuk ketelitian yang membuat naskah selamat.

Untuk waktu konsultasi yang selalu semangat.

Untuk perhatian yang membuat terangkat harkat.

Dokter gigi Arief Suryadinata Spesialis Ortodonsia

Karena logikanya

Karena pertanyaannya

Karena bimbingannya pada analisis data

Kawan sejurusan yang pernah bersinggungan.

Ilmu yang cuma-cuma kalian curahkan.

Waktu dan tenaga yang di sempatkan.

Solidaritas yang telah menahun.

Semut-pun iri melihat kita buat barisan.

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Segala hanyalah milik Allah semata, karena berkat nikmat, hidayah, inayah, dan karunianya sehingga saya diberi kesempatan menyelesaikan skripsi berjudul “Efek Neuroprotektif Fraksi Air *Marsilea crenata* C. Presl terhadap Sel Mikroglia yang Diinduksi oleh IFN- γ ”. Tak lupa sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Rasul yang disaat sakaratul maut berdo'a agar sakaratul maut umatnya dipermudah dan dialihkan kepadanya. Skripsi ini merupakan langkah akhir untuk menyelesaikan salah satu tri dharma perguruan tinggi yaitu penelitian dan pengembangan.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. 3520111302650001 dan 3520116605680002 yang membentuk kepribadianku, al madarasatul ula, *center of universe*, galaksi bimasaktiku.
2. Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag.
3. Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Bapak Prof. Dr. Dr. Bambang Pardjianto, Sp.B, Sp.BP-RE (K).
4. Ibu nomor 1 di Program Studi Farmasi Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.
5. *Supervisor* yang tak pernah bisa terhitung bentuk perhatiannya dan kasih sayangnya sekaligus sekretaris penguji sidang skripsi, Bapak Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm., Apt.

6. *Co-supervisor* yang tak kenal lelah menelaah naskah dan pendengar terbaik se-Farmasi sekaligus ketua penguji sidang skripsi, Ibu Wirda Anggraini, M.Farm., Apt.
7. *Thinker* sekaligus penegak kejujuran yang memberikan saran getir nan membangun sekaligus penguji utama, Bapak drg, Arief Suryadinata Sp.Ort.
8. Empu seluler molekuler Laboratorium Sentral Ilmu Hayati kepada dedikasi yang melampaui jatah libur, Ibu Helly Nurul Karima, M. P dan Ibu Choirunil Chotimah, M. Si.
9. Segenap dosen farmasi, karyawan, dan laboran di Program Studi Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim.
10. Pengumpul informasi, teman debat, sekaligus pelipur lara selama menjalankan amanat laboratorik, kawan-kawan proyek fitoestrogen 2015 (15670011, 15670020, 15670026, 15670040, 15670048, 15670059, 15670075).
11. Teman – teman Pharmajelly yang selalu membuatku bersyukur dan bergidik geli.
12. Dia atau mereka yang haram dicantumkan namun ketika namanya disebut membuat organ dalamku berdesir.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam proposal ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharap saran dan kritik yang membangun dari semua pihak demi penyempurna proposal yang akan menghasilkan skripsi ini.

Wassalamu'alaikumsalam Warahmatullohi Wabarakatuh

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGAJUAN	
HALAMAN PERSETUJUAN	
HALAMAN PENGESAHAN	
MOTTO	
HALAMAN PERSEMBAHAN	
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	ix
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
مستخلص البحث	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat	7
1.4.1 Manfaat Teoritis	7
1.4.2 Manfaat Terapan	7
1.5 Batasan Masalah	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tinjauan Tanaman Semanggi (<i>Marsilea crenata</i> C. Presl)	9
2.1.1 Klasifikasi Semanggi	9
2.1.2 Habitus dan Morfologi	10
2.1.3 Manfaat dan Kandungan	10
2.2 Tinjauan Metode Ekstraksi	11
2.3 Tinjauan Ekstraksi Ultrasonik (<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>)	12
2.4 Tinjauan Ekstrak	14
2.5 Tinjauan Ekstraksi Cair – Cair	15
2.6 Tinjauan Menopause	16
2.7 Tinjauan Neurodegeneratif dan Neuroinflamasi	18

2.8	Tinjauan Estrogen	19
2.9	Tinjauan Neuroglia dan Mikroglia	23
2.10	Tinjauan HMC3	27
2.11	Tinjauan Interferon gamma (IFN- γ)	27
2.12	Tinjauan <i>Nuclear Chain Kappa Light B Activated</i> (Nf- κ B)	28
2.13	Tinjauan <i>Major Histocompatibility Complex Class II</i> (MHC II)	30
2.14	Tinjauan <i>Immunocytochemistry</i> (ICC)	31
2.15	Tinjauan Uji Kruskal Wallis	33
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL		34
3.1	Skema Kerangka Konseptual	34
3.2	Uraian Kerangka Konseptual	35
3.3	Hipotesis Penelitian	36
BAB IV METODE PENELITIAN		37
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	37
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian	37
4.3	Populasi dan Sampel	37
4.3.1	Populasi	37
4.3.2	Sampel Tanaman	38
4.3.3	Sel Kultur	38
4.3.4	Teknik Pengambilan Sampel	38
4.4	Variabel Penelitian	38
4.4.1	Variabel Bebas	38
4.4.2	Variabel Tergantung	38
4.4.3	Variabel Kontrol	38
4.4.4	Definisi Operasional	38
4.5	Alat dan Bahan	40
4.5.1	Alat	40
4.5.2	Bahan Tanaman	40
4.5.3	Bahan Sel	41
4.5.4	Bahan Kimia	41
4.6	Prosedur Penelitian	41
4.6.1	Determinasi Tanaman	41
4.6.2	Preparasi Sampel	41
4.6.3	Penentuan Kadar Air Simplisia	41
4.6.4	Prosedur Ekstraksi	42

4.6.5	Proses Fraksinasi	43
4.6.6	Subkultur Sel Mikroglia	43
4.6.5	Preparasi Fraksi Air <i>Marsilea crenata</i> C. Presl	45
4.6.6	Analisis dengan <i>Immunocytochemistry</i> melalui <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM)	45
4.7	Analisis Data	46
4.8	Gambar Alur Penelitian	48
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN		49
5.1	Determinasi Tanaman dan Preparasi Sampel	49
5.2	Penentuan Kadar Air Simplisia <i>M. crenata</i> C. Presl	50
5.3	Pembuatan Ekstrak Etanol 96% <i>M. crenata</i> C. Presl	51
5.4	Pembuatan Fraksi Air <i>M. crenata</i> C. Presl	53
5.5	Analisis Fitokimia	56
5.6	Subkultur Sel	58
5.7	Preparasi Sampel dan Uji Efek Neuroprotektif	60
5.7	Analisis Data	63
5.8	Mekanisme Aksi Neuroprotektif	68
5.9	Efek Neuroprotektif Fraksi Air <i>M. Crenata</i> C. Presl dalam Perspektif Islam	71
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		73
6.1	Kesimpulan	73
6.2	Saran	73
DAFTAR PUSTAKA		74
LAMPIRAN-LAMPIRAN		85

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Marsilea Crenata</i> C. Presl	10
Gambar 2.2 Proses Mekanisme Ekstraksi UAE	13
Gambar 2.3 Proses Terjadinya Ekstraksi menggunakan Metode UAE.....	14
Gambar 2.4 Struktur Estrone (E1), Estradiol (E2), Estriol (E3) dan Estetrol (E4)	19
Gambar 2.5 Mekanisme Jalur Persinyalan Estrogen	23
Gambar 2.6 Hubungan Neuroglia dan Mikroglia	24
Gambar 2.7 Mekanisme Penghambatan Aktivasi Nf-kB oleh <i>Estrogen</i> <i>Receptor</i> Teraktivasi	30
Gambar 2.8 Pengamatan SEM dan Pengamatan CLSM	32
Gambar 2.9 Diagram CLSM	32
Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol 96% <i>M. crenata</i> C. Presl.....	53
Gambar 5.2 Hasil Pengeringan dengan Oven.....	55
Gambar 5.3 Hasil KLT berbagai Fase Gerak	57
Gambar 5.4 Visualisasi MHC II Fraksi Air <i>M. Crenata</i>	62
Gambar 5.5 Grafik Intensitas MHC II Fraksi Air <i>M. Crenata</i> C. Presl	63

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering <i>M. crenata</i> C Presl	51
Tabel 5.2 Hasil Ekstraksi <i>M. crenata</i> C. Presl	53
Tabel 5.3 Hasil Perhitungan Persen Rendemen	55
Tabel 5.4 Hasil Analisis KLT	57
Tabel 5.5 Hasil Uji Aktivitas	62
Tabel 5.6 Uji Normalitas dengan Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	64
Tabel 5.7 Uji Homogenitas dengan Uji <i>Levene</i>	65
Tabel 5.8 Uji <i>Kruskal Wallis</i>	65
Tabel 5.9 Uji <i>U Mann Whitney</i>	66
Tabel 5.10 Klasifikasi Uji Korelasi	67
Tabel 5.11 Uji <i>Spearman's Rho</i>	67
Tabel 5.12 Nilai <i>Effective Dose</i>	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman M.crenata C. Presl.....	85
Lampiran 2. Hasil Uji Moisture Content Serbuk Simplisia Daun M.crenata C. Presl	86
Lampiran 3. Hasil perlakuan uji aktivitas metode ICC.....	89
Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel	91
Lampiran 5. Hasil Analisis Data	96
Lampiran 6. Dokumentasi Alat dan Penelitian	100



DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

<	: Kurang dari
>	: Lebih dari
%	: Persen
≥	: Lebih dari sama dengan
≤	: Kurang dari sama dengan
μ	: mikro
ANOVA	: Analyze of Variance
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	: Adenosin Triphospat
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
C	: Celcius
CLSM	: <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
cm	: Centimeter
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
CO ₂	: Karbon Dioksida
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E2	: Estradiol
ED ₅₀	: <i>Effective Dose 50</i>
EMEM	: <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
EREs	: Estrogen Receptor Element
F ₂₅₄	: Flouresensi 254 nm
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	: <i>Flourescein isothiocyanate</i>
g	: gram
HRT	: <i>Hormone Replacement Therapy</i>
ICC	: <i>Immunochemistry</i>
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
kHz	: Kilohertz

l	: liter
LSIH	: Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mm	: millimeter
Nf- $\kappa\beta$: <i>Nuclear Chain Kappa Light B Activated</i>
nm	: Nanometer
°	: Derajat
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
PFA	: Paraformaldehida
RIA	: <i>Radioimmunoassay</i>
SEM	: <i>Scanning Electron Microscope</i>
TEM	: <i>Transmitted Electron Microscope</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
UAE	: <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
λ	: Delta

ABSTRAK

Muslim, Menara. 2019. Efek Neuroprotektif Fraksi Air *Marsilea crenata* C Presl. Terhadap Sel Mikroglia HMC3 Yang Diinduksi Oleh IFN- γ . *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) Wirda Anggraini M. Farm., Apt. Penguji : drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort.

Defisiensi estrogen menyebabkan penyakit degeneratif, seperti neurodegeneratif dimana terdapat penurunan fungsi maupun jumlah neuron di otak. Fitoestrogen memiliki struktur dan fungsi yang seperti estrogen serta mampu berikatan dengan reseptor estrogen. *Marsilea crenata* C. Presl. mengandung senyawa fitoestrogen dan dapat dijadikan sebagai pengganti *hormone replacement therapy*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek neuroprotektif dan dosis efektif (ED₅₀) dari fraksi air *M. crenata* C. Presl pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi oleh IFN- γ . Dosis yang digunakan untuk mengamati aktivitas *M. crenata* C. Presl adalah 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm serta genistein 50 μ M sebagai kontrol positif. Analisis efek neuroprotektif sel mikroglia HMC3 menggunakan metode pewarnaan *immunochemistry* dengan bantuan visualisasi CLSM. Analisis statistik untuk melihat perbedaan menggunakan *Kruskal Wallis Test* dan *Mann-Whitney Test*, serta untuk dosis efektif (ED₅₀) menggunakan *Probit Analyze*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fraksi air *M. crenata* C Presl memiliki efek neuroprotektif pada sel mikroglia HMC3 dengan dosis efektif (ED₅₀) sebesar 3,341 ppm.

Kata kunci: *Marsilea crenata* C. Presl., sel mikroglia HMC3, neuroprotektif.

ABSTRACT

Muslim, Menara. 2019. Neuroprotective Effect of Water Fraction *Marsilea crenata* C. Presl on HMC3 Cell Induced by IFN- γ . Thesis. Department of Pharmacy. Faculty of Medicine and Health Sciences. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor: (I) Burhan Ma'arif Z. A., M. Farm., Apt. (II) Wirda Anggraini M. Farm., Apt. Examiner: drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort.

Estrogen deficiency causes degenerative diseases, such as neurodegenerative disease which can decrease function and amount of neurons in the brain. Phytoestrogens have estrogen-like structure and function or also can bind to estrogen receptors. *Marsilea crenata* C. Presl have phytoestrogens contain and become substitute Hormone Replacement Therapy. The aim of this study were to know neuroprotective effect and the effective dose (ED₅₀) of water fraction from *M. crenata* C. Presl on HMC3 microglia cell who induced by IFN- γ . The dose used to observe the activity of *M. crenata* C. Presl is 62.5 ppm, 125 ppm, and 250 ppm and genistein 50 μ M as positive controls. The analysis of neuroprotective effect on HMC3 microglia cell used immunochemistry method with CLSM instrument. Statistical analysis to seen differences using the Kruskal Wallis Test and Mann Whitney Test, then for ED₅₀ using Probit Analyze. The results showed that water fraction of *M. crenata* C. Presl have neuroprotective effect on HMC3 microglia cell with effective dose (ED₅₀) 3.341 ppm.

Key words: *Marsilea crenata* C. Presl., HMC3 Microglia cell, Neuroprotective.

مستخلص البحث

مسلم، منار. 2019. أثر الحماية العصبية من الكسر المائي للسراخس المائية (*Marsilea crenata C Presl*) على خلية دبقية صغيرة HMC3 التي تم تنشيطها بالإنترفيرون غاما (γ -IFN). البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف ز. أ.، الماجستير. المشرف الثاني: وردة أنغريني، الماجستير. المختبر: طبيب عارف سورباديناتا.

الكلمات الرئيسية: السراخس المائية، خلية دبقية صغيرة HMC3، حماية عصبية.

إنخفاض الإستروجين يسبب الأمراض التنكسية، مثل التنكس العصبي (*neurodegeneratif*) حيث هناك انخفاض وظائف وعدد الخلايا العصبية في الدماغ. الإستروجين النباتي (*Fitoestrogen*) لديها هيكل ووظيفة مثل الإستروجين (*estrogen*) وهي قادرة على ربط مستقبلات الإستروجين. تحتوي السراخس المائية (*Marsilea crenata C Presl*) على مركبات الإستروجين النباتي ويمكن استخدامها كبديل للعلاج الهرموني (*hormone replacement therapy*). وكان الهدف من هذا البحث هو معرفة أثر الحماية العصبية والجرعة الفعالة (ED_{50}) من الكسر المائي للسراخس المائية (*Marsilea crenata C Presl*) على خلية دبقية صغيرة HMC3 التي تم تنشيطها بالإنترفيرون غاما (γ -IFN). وكانت الجرعة المستخدمة لمراقبة نشاط السراخس المائية (*Marsilea crenata C Presl*) هي 62.5 فغم، 125 فغم و250 فغم مع جينيستين 50 ميكرومتر كتحكم إيجابي. تحليل أثر الحماية العصبية على خلية دبقية صغيرة HMC3 باستخدام طريقة تلوين الكيمياء المناعية (*immunochemistry*) بمساعدة تصوير مجهر التطابق البؤري (CLSM). وأما التحليل الإحصائي لمعرفة الفرق بينها فاستخدم الباحث اختبار كروسكال ووالس (*Kruskal Wallis Test*) و اختبار مان ويتني (*Mann-Whitney Test*)، في حين تحليل الجرعة فعالة (ED_{50}) استخدم تحليل *Probit*. أظهرت نتائج هذا البحث أن إعطاء الكسر المائي للسراخس المائية له أثر الحماية العصبية على خلية دبقية صغيرة HMC3 مع الجرعة الفعالة (ED_{50}) بقيمة 3.341 فغم.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan masa transisi dalam kehidupan wanita yang ditandai dengan berhentinya produksi sel telur. Berhentinya menstruasi karena hilangnya aktivitas folikel ovarium sehingga menyebabkan defisiensi hormon estrogen. Periode menopause biasanya dirasakan wanita saat usia 45 – 55 tahun (Ghani, L., 2012). Menopause dibagi 3 periode diantaranya perimenopause, menopause dan pascamenopause. Defisiensi estrogen terjadi pada ketiga periode dan produksi estrogen benar-benar berhenti saat masuk ke dalam periode pascamenopause. Sehingga pada periode pascamenopause seringkali muncul penyakit karena defisiensi estrogen, diantaranya penyakit kardiovaskuler, neurodegeneratif, dan osteoporosis (Sherwood, L. 2016).

Neurodegeneratif merupakan hasil sinergis antara sistem imun, sistem endokrin, dan sistem saraf pusat (ThyagaRajan *et al.*, 2018). Neurodegeneratif merupakan kondisi dimana terjadi kehilangan struktur dan fungsi yang merupakan tanda bahwa terdapat kelainan maupun penyakit pada saraf di sistem saraf pusat. Neurodegeneratif bermula dari kondisi inflamasi di sistem saraf pusat yang disebut neuroinflamasi. Terjadinya inflamasi di daerah otak tersebut berkaitan sangat erat dengan penuaan individu. Inflamasi tersebut memicu aktifnya sel mikroglia yang berujung pada aktivitas pro-inflamasi. Hasilnya banyak sel neuron mengalami apoptosis dan jumlahnya kian lama semakin berkurang (Chen, *et al.*, 2016). Jumlah penderita penyakit neurodegeneratif mencapai 36 juta jiwa di tahun 2010. Diprediksi di tahun 2020 meningkat 2 X lipat hingga mencapai 66 juta jiwa

karena angka harapan hidup yang semakin meningkat. Sebagian besar penderita neurodegeneratif ialah wanita pasca menopause (Prince *et al.*, 2015).

Perkembangan zaman memberikan terobosan solusi dalam mengarungi masa menopause, yaitu penggunaan *Hormone Replacement Therapy* (Bolin *et al.*, 2015). *Hormone Replacement Therapy* (HRT) merupakan terapi alternatif untuk mengurangi resiko neuroinflamasi dan mencegah kepikunan pada wanita pasca menopause (Chamniansawat *et al.*, 2014). Namun, penggunaan HRT ini memiliki kekurangan karena terkait dengan efek samping dan biayanya (Gorenstein *et al.*, 2011). Penggunaan secara terus menerus HRT yang relatif mahal ini dapat menyebabkan peningkatan resiko *Venous Thromboemboli*, Stroke, kanker endometrium, kanker payudara, pendarahan vagina, dan gangguan kantung empedu (Lee *et al.*, 2013 dan Shirwaikar *et al.*, 2003).

Solusi potensial yang relatif aman hadir dari tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan menyimpan unsur makro maupun mikro yang dibutuhkan oleh manusia. Beberapa diantaranya memiliki kemiripan, aktivitas, maupun afinitas terhadap reseptor dalam tubuh manusia. Unsur-unsur tersebut juga mampu menghasilkan aktivitas sebagaimana hormon beraksi yang disebut sebagai fitohormon (Trisunuwati, 2017). Fitoestrogen merupakan golongan senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki kemiripan fungsi, struktur atau dapat berikatan dengan *Estrogen Receptor* sehingga memiliki efek yang serupa (Yang *et al.*, 2012). Studi epidemiologi mengkaitkan rendahnya insiden penyakit kardiovaskuler, kanker payudara, dan fraktur akibat konsumsi makanan kaya fitoestrogen pada wanita Asia daripada wanita barat. Terdapat 3 stratifikasi

senyawa fitoestrogen, diantaranya isoflavon, lignan, dan coumestan (Lagari *et al.*, 2010).

Tumbuh-tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah SWT yang bermanfaat bagi manusia. Apabila manusia mau berpikir dan mengkaji rahasia dibalik tumbuhan maka akan diketahui banyaknya manfaat dan khasiat tumbuhan berdasarkan jenisnya serta dapat digunakan sebagai obat untuk keberlangsungan hidup manusia. Sebagaimana yang telah disebutkan dalam Al Quran:

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

Artinya: *Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya*

Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik (Asy Syu'ara': 7).

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

Tanaman yang potensial dalam menyeimbangkan jumlah estrogen dalam tubuh salah satunya adalah *Marsilea crenata* C. Presl (Trisunuwati, 2017). Tanaman tersebut merupakan tanaman khas yang dapat tumbuh di Jawa Timur, Indonesia. Daunnya dikenal masyarakat sebagai komposisi utama pada makanan

khas Jawa Timur. *Marsilea crenata* C. Presl (Semanggi) termasuk dalam tanaman pakis yang biasanya tumbuh di lingkungan akuatik (Ma'arif, 2016). Berbagai penelitian telah dilakukan terhadap semanggi diketahui mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, steroid, polifenol, serta senyawa antioksidan (Nurjanah *et al.*, 2012; Yacoeb *et al.*, 2010).

Semanggi memenuhi ketiga aspek kandungan senyawa sebagai fitoestrogen. 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 osteoblas MC3T3-E1 yang diberi ekstrak n-heksan daun semanggi memberikan peningkatan proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas (Ma'arif, 2018). Begitu pula pada penelitian *in vivo* menggunakan tulang femur mencit betina yang meningkat kepadatannya karena pemberian ekstrak n-heksan, ekstrak etanol 96%, dan fraksi etil asetat daun semanggi (Aemi, 2012; Adityara, 2017; Widiyari, 2017). Secara afinitasnya terhadap ER melalui uji aktivitas *in silico*, 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) (Ma'arif *et al.*, 2016). Sebelum dapat memberikan aktivitas, estrogen maupun fitoestrogen harus berlekatan dengan *Estrogene Receptor* (ER). Tulang dan sistem saraf pusat (otak) dinaungi oleh ER yang sama, yaitu ER- β (Cos, 2003).

Sejalan dengan hal tersebut, di otak terdapat ER- β dan estrogen pada perempuan merupakan regulator imunitas di sistem saraf pusat. Estrogen termasuk dalam faktor transkripsi yang dapat menghambat faktor transkripsi lain yang

mengaktivasi inflamasi. Faktor transkripsi tersebut ialah *Nuclear Chain Kappa Light B Activated* (Nf- κ B) yang memiliki relasi terhadap aktivasi mikroglia. Penghambatan Nf- κ B tersebut mampu membuat sel mikroglia tetap dalam kondisi resting dan tidak melakukan aktivasi. Hal tersebut menyebabkan apoptosis sel yang percuma dapat dicegah. (Zhou, *et al.*, 2017).

Mikroglia merupakan makrofag yang menetap di sistem saraf pusat. Mikroglia termasuk dalam *Antigen Presenting Cell* (APC) Fungsinya ialah mencerna protein antigen dan merubahnya menjadi peptida yang lebih sederhana melalui *Major Histocompatibility Complex* (MHC) (Endang, 2016). Sinyal ekstraseluler diperlukan untuk aktivasi mikroglia. Sehingga induktor IFN- γ yang dapat mengaktivasi makrofag diinduksikan ke sel (Klaassen and Watkins, 2015). Sel mikroglia yang telah teraktivasi tersebut akan mengeluarkan banyak marker salah satunya dan yang masih runtut dengan kejadian inflamasi di sistem imun adalah MHC II (Villa *et al.*, 2016).

Kondisi degeneratif pada neuron masuk ke dalam penyakit-penyakit metabolik degeneratif. Penyakit-penyakit metabolik degeneratif lebih sesuai jika ditangani dengan obat yang memiliki lebih dari satu efek farmakologi (Katno and Pramono, 2008). Fenomena tersebut menyebabkan pergeseran paradigma pengobatan dari obat-obat konvensional yang hanya melibatkan satu senyawa kimia tunggal dengan satu target (*one drug one target*) menjadi pengobatan berbasis tanaman obat yang melibatkan banyak senyawa kimia yang bekerja pada satu target (Li and Zhang, 2013). Ekstrak dengan pelarut polar mampu menyari golongan senyawa fenol (Kusumaningtyas *et al.*, 2008). Terdapat lebih dari 8.000 jenis senyawa yang termasuk dalam golongan fenol (Harborne, 2006). Interaksi

kombinasi bahan aktif pada fraksi air Semanggi sangat mungkin terjadi. Interaksi sinergisme yang menguntungkan diharapkan mampu menurunkan intensitas fluoresensi MHC II yang dijadikan marker dibawah *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

Berdasarkan hal-hal tersebut, penelitian neuroprotektif daun semanggi ini penting dilakukan. Mengingat masa menopause yang alamiah akan terjadi pada setiap perempuan usia 45 – 55 tahun. Selain itu, belum ditemukannya obat yang secara klinis mampu memperbaiki sel saraf yang rusak menjadi landasan fundamental dalam pengembangan bahan alam sebagai pengobatan yang teruji secara klinis. Diharapkan pengembangan Semanggi menjadi alternatif dari penggunaan *Hormon Replacemecnt Therapy* yang tidak ramah pada biaya dan efek samping.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah fraksi air daun Semanggi memiliki efek neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3?
2. Berapa *effective dose* (ED₅₀) dari fraksi air daun Semanggi yang memiliki aktifitas sebagai neuroprotektif di sel mikroglia HMC3?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Membuktikan efek neuroprotektif fraksi air daun semanggi pada sel mikroglia HMC3.
2. Mengetahui *effective dose* (ED₅₀) fraksi air daun semanggi terhadap efek neuroprotektif pada sel mikroglia HMC3.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini terbagi menjadi manfaat secara teoritis dan manfaat secara terapan, diantaranya sebagai berikut:

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah tentang efek neuroprotektif yang terkandung dalam fraksi air daun semanggi sebagai pengembangan obat tradisional.

1.4.2 Manfaat Terapan

a. Manfaat bagi mahasiswa

Penelitian ini diharapkan dapat membawa wawasan dan referensi terkait daun semanggi, neuroinflamasi, neuroprotektif, sel mikroglia HMC3, imunitas, fraksinasi, ICC, CLSM dan analisis data.

b. Manfaat bagi masyarakat

Penelitian ini diharapkan membawa dampak kesadaran dan pemanfaatan tanaman sebagai obat herbal yang dipercaya karena bukti pre-klinisnya.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagian tanaman semanggi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun semanggi dengan tinggi batang atau tangkai 20 cm diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya.
2. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak dari daun semanggi menggunakan pelarut etanol serta menggunakan metode ekstraksi ultrasonik.

3. Fraksi yang digunakan adalah fraksi air daun semanggi dengan metode ekstraksi cair-cair dari ekstrak etanol daun semanggi.
4. Sel uji yang digunakan adalah *Cell line mikroglia* (ATCC® CRL-3304™) yang diperoleh dari American Type Culture Collection, USA.
5. Penelitian ini mengambil parameter penurunan kadar *major histocompatibility class II* (MHC II) dan *effective dose 50* (ED₅₀) yang memberikan aktivitas dari fraksi air daun semanggi.
6. Penurunan kadar *major histocompatibility class II* (MHC II) pada penelitian ini diamati menggunakan metode *Immunocytochemistry* (ICC) melalui fluoresensi dibawah *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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

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

2.1.1 Klasifikasi Semanggi

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Pteridopsida

Ordo : Salviniiales

Famili : Marsileaceae

Genus : *Marsilea*

Spesies : *Marsilea crenata* C.

Presl (Afriastini, 2003)



Gambar 2.1 *Marsilea crenata* C. Presl (Dokumentasi pribadi).

2.1.2 Habitus dan Morfologi

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

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

Akar : Akar pada tanaman *M. crenata* tertanam dalam substrat di dasar perairan (Afriastini, 2003).

2.1.3 Manfaat dan Kandungan

Daun dan batang semanggi mengandung saponin, triterpenoid bebas, steroid, flavonoid, dan polifenol (Tiyaningsih, 2007). Semanggi 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 banyak memiliki senyawa yang bersifat folatil diantaranya yaitu monoterpenoid,

diterpenoid, dan beberapa kelompok asam amino yang memiliki aktivitas. (Ma'arif *et al.*, 2016).

Semanggi memiliki manfaat di bidang kesehatan seperti peluruh air seni, ekspektoran, analgesik, kusta dan demam (Astuti, 2013; Nantasomsaran *et al.*, 2013). Secara turun temurun sudah digunakan untuk mengobati penyakit asma, batu empedu, batu ginjal, infeksi saluran kemih, radang amandel, radang kerongkongan, sakit kuning, salesma dan *cantengan* (bengkak pada jari tangan atau kaki karena infeksi) dan infeksi telinga (Sarl, 2008). Hasil uji aktivitas *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* daun 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 dapat menginduksi proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas, sehingga dapat meningkatkan kepadatan tulang (Laswati, 2011; Ma'arif *et al.*, 2016; Adityara, 2017; Widiyasari, 2017; Ma'arif *et al.*, 2018).

2.2 Tinjauan 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

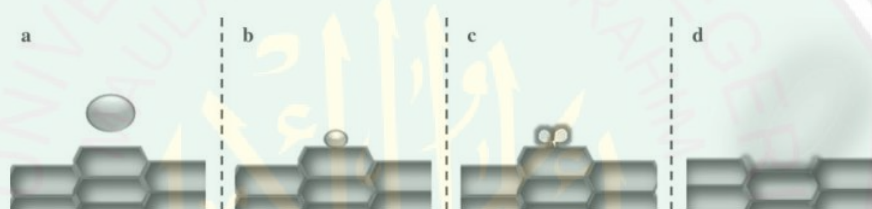
atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Senyawa aktif yang telah diketahui yang dikandung dalam simplisia akan mempermudah dalam pemilihan pelarut dan metode ekstraksi (Depkes RI, 2000).

2.3 Tinjauan Ekstraksi Ultrasonik (*Ultrasonic Assisted Extraction*)

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

Metode ekstraksi UAE memiliki faktor penentu keberhasilan diantaranya adalah ukuran partikel ekstrak, moisture content bahan dan pelarut yang digunakan (Ngaha Njila *et al.*, 2017). *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) memiliki kekuatan kavitasi akustik sebagai kekuatan pendorong utama yang mampu menginduksi serangkaian kompresi dan *rarefactions* dalam molekul

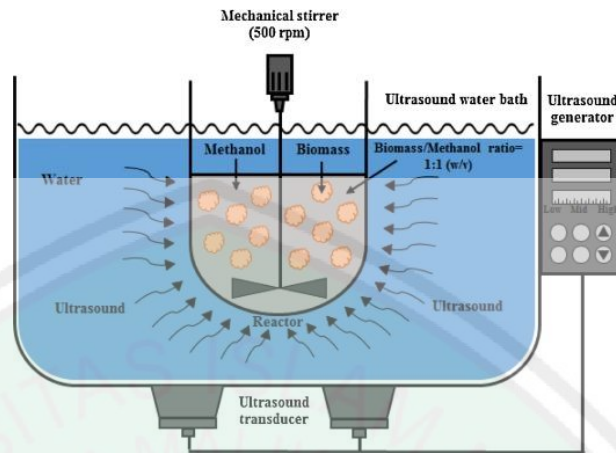
pelarut, sehingga menyebabkan pembentukan gelembung sebagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al.*, 2017). Proses terjadinya mekanisme ekstraksi metode ini diawali dengan terjadi perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitasi. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Vilkhu *et al.*, 2008). Proses mekanisme ini dapat diamati pada gambar berikut ini (Esclapez *et al.*, 2011):



Gambar 2.2 Proses Mekanisme Ekstraksi UAE

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

2.4 Tinjauan Ekstrak

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

Faktor yang mempengaruhi ekstrak yaitu faktor biologi dan faktor kimia. Faktor biologi meliputi spesies tumbuhan, lokasi tumbuh, waktu pemanenan, penyimpanan bahan tumbuhan, umur tumbuhan dan bagian yang digunakan. Sedangkan faktor kimia yaitu faktor internal (jenis senyawa aktif dalam bahan, komposisi kualitatif senyawa aktif, komposisi kuantatif senyawa aktif, kadar total

rata-rata senyawa aktif) dan faktor eksternal (metode ekstraksi, perbandingan ukuran alat ekstraksi, ukuran kekerasan dan kekeringan bahan, pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, kandungan logam berat, kandungan pestisida) (Depkes RI, 2000).

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

2.5 Tinjauan Ekstraksi Cair – Cair

Proses pemisahan selanjutnya masih menggunakan prinsip ekstraksi yang dikenal dengan ekstraksi cair-cair atau yang biasa dikenal dengan nama fraksinasi. Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik (Dey, 2012).

Teknik pemisahan ekstraksi cair-cair ini biasanya dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Kedua pelarut yang saling tidak bercampur tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojok dan dидiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing bergantung pada kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah yang dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Odugbemi, 2008).

Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti petroleum eter, n-heksan, kloroform, dietil eter, etilasetat dan etanol.

Pemilihan pelarut pada ekstraksi umumnya bergantung pada sifat analitnya dimana pelarut dan analit harus memiliki sifat yang sama, contohnya analit yang sifat lipofilitasnya tinggi akan terekstraksi pada pelarut yang relatif nonpolar seperti n-heksan sedangkan analit yang semipolar terlarut pada pelarut yang semipolar seperti etilasetat atau diklorometana (Venn, 2008).

Aglikon pada umumnya terekstraksi pada fraksi non-polar seperti terpenoid dan steroid sedangkan flavonoid, glikosida, saponin dan gula ester ditemukan pada fraksi yang lebih polar dan fraksi air. Petroleum eter dan n-heksana juga dapat digunakan untuk menghilangkan lipid, *wax* dan senyawa lemak (Dey, 2012). Pelarut yang dapat digunakan untuk ekstraksi ini cukup banyak, namun ternyata ada banyak pelarut yang tidak memenuhi syarat. Pertama, pelarut harus tidak bercampur dengan air, mempunyai titik didih yang rendah (jika digunakan untuk evaporasi) dan sebaiknya memiliki densitas yang lebih rendah daripada air (untuk membentuk lapisan atas sehingga pemisahan lebih mudah dilakukan). Kedua, pelarut harus aman dan tidak merusak lingkungan jika digunakan. Praktisnya, hanya ada beberapa pelarut saja yang biasa digunakan seperti n-heksana, metil tertier butil eter (MTBE) dan etilasetat (Venn, 2008).

2.6 Tinjauan Menopause

Menopause didahului oleh haid (*mensis*). Haid atau *mensis* ialah perdarahan bulanan melalui vagina akibat pelepasan lapisan dalam rahim. Siklus haid adalah masa yang terentang antara hari pertama haid dengan hari pertama haid berikutnya. Siklus haid mempunyai 2 (dua) fungsi yaitu menghasilkan 1 sel telur yang matang dan mempersiapkan endometrium (lapisan dalam rahim) untuk menerima kedatangan sel telur yang sudah dibuahi (*zigot*). Menopause adalah

perdarahan surut (*withdrawal bleeding*) fisiologik yang terakhir dalam seumur hidup wanita, yang menunjukkan berakhirnya kemampuan memproduksi. Dengan kata lain meno (menstruasi) *pause* (stop) adalah berhenti haid atau menstruasi (Ghani, L., 2009).

Menopause terjadi pada perempuan yang memasuki usia menjelang 50 tahun. Melalui usia tersebut merupakan bagian *universal* dan *irreversibel* dari keseluruhan proses penuaan yang melibatkan sistem reproduksi dimana siklus haid setiap bulannya mulai terganggu dan akhirnya menghilang sama sekali. Terganggunya atau sampai hilangnya proses haid disebabkan penurunan dan hilangnya hormon estrogen, ini merupakan masalah yang normal yang sadar atau tidak akan dilalui oleh perempuan dalam kehidupannya. Penurunan tersebut berlangsung secara progressif dalam 3 periode yang memiliki durasi waktu 8 – 10 tahun. Periode pertama disebut perimenopause yang ditandai dengan haid yang tidak teratur dan keluhan dari gejala klimakterium (masa peralihan) pada usia 45 – 48 tahun. Periode kedua disebut menopause yang ditandai dengan berkurangnya fungsi ovarium dan terjadi klimakterium pada usia 49 – 51 tahun. Periode terakhir merupakan periode berhentinya produksi estrogen yang dinamai pascamenopause (Ghani, L., 2009).

Perubahan fisik yang terasa dan menimbulkan rasa tidak nyaman adalah adanya semburan panas (*hot flushes*) dari dada keatas yang sering disusul dengan keringat banyak. Semburan panas ini bisa berlangsung selama beberapa detik sampai 1 jam. ini merupakan gejala yang paling sering dijumpai. Perubahan dan keluhan lain yang dirasakan lagi seperti berdebar debar (palpitasi), vertigo, migraine, nafsu seks (libido) menurun, gelisah, lekas marah, depresi, susah tidur

(insomnia), rasa kekurangan, rasa kesunyian, ketakutan keganasan, rasa lelah (fatigue), keropos tulang, nyeri tulang belakang, gangguan sirkulasi darah (miokard infark), hipertensi, kenaikan kadar kolesterol darah sehingga terjadi pengerasan pembuluh darah (arteriosclerosis terutama sclerosis koroner), juga berat badan sedikit meningkat karena terjadi adipositas (penimbunan lemak) dan penyebaran lemak terutama ditemukan di tungkai atas, pinggul, perut bagian bawah dan lengan atas. Juga dikatakan pada masa pasca-menopause ada gangguan pada daerah otak seperti *Alzheimer disease* (Ghani, L., 2009).

2.7 Tinjauan Neurodegeneratif dan Neuroinflamasi

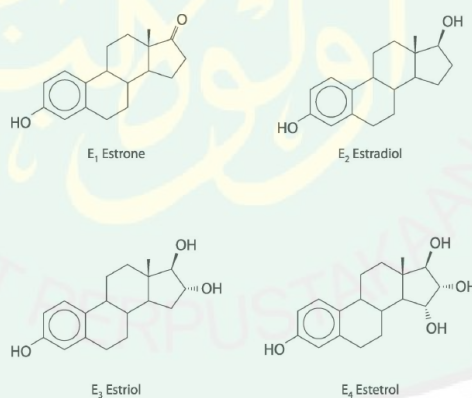
Degenerasi pada sistem saraf pusat yang ditandai dengan berkurangnya struktur dan fungsi secara progresif yang berdampak pada fungsi otak dan kemunduran mental dinamakan neurodegeneratif. Peristiwa tersebut erat kaitannya dengan usia, terutama usia manusia lanjut usia (manula). Beberapa penyakit neurodegeneratif diantaranya ialah Alzheimer, *multiple sclerosis*, Parkinson, *amyotrophic lateral sclerosis*. Virus berperan sebagai pemicu dari beberapa penyakit neurodegeneratif. Karena virus mampu mengaktifasi sistem imun yang akan berujung pada inflamasi melalui perantara mediator neurotoksik. Inflamasi terus menerus yang diregulasi oleh mikroglia dan astrosit berdampak pada gangguan fungsi sel dan akhirnya mati secara apoptosis (Chen et al., 2016).

Neuroinflamasi merupakan respon inflamasi (peradangan) di otak atau sumsum tulang belakang. Inflamasi ini dimediasi oleh produksi sitokin (IL-1 β , IL-6, dan TNF α), kemokin (CCL2, CCL5, CXCL1), *reactive oxygen species* (ROS), dan *secondary messenger* (NO dan prostaglandin). Kebanyakan mediator dibentuk oleh sel glial di susunan saraf pusat (mikroglia dan astrosit), sel endotel,

sel imun di perifer. Selain muncul karena virus, sumber neuroinflamasi lainnya adalah dementia vaskular dan depresi. Inflamasi memicu aktivasi sel imun, edema, kerusakan jaringan, dan berpotensi pada kematian sel (Disabato et al., 2016).

2.8 Tinjauan Estrogen

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



Gambar 2.4 Struktur Estrone (E1), Estradiol (E2), Estriol (E3) dan Estetrol (E4) (Coelingh Benning *et al*, 2008).

Selain di ovarium, estrogen juga di sintesis di adrenal, testis, plasenta, jaringan lemak dan susunan saraf pusat namun dalam jumlah yang kecil. Hal ini menyebabkan wanita mempunyai kadar estrogen yang rendah setelah menopause

(Baziad, 2003). Estrogen memiliki fungsi secara umum yaitu sebagai perangsang sintesis DNA melalui pembentuk utusan RNA (*messenger RNA*), sehingga terjadi peningkatan sintesis protein (Iswahyuni, 2011).

Estrogen memiliki peran yang sangat penting dalam fungsi modulasi sistem saraf pusat yaitu memberikan perlindungan dari kerusakan pada otak, terutama dengan mengurangi respon inflamasi. Estrogen mengurangi respon inflamasi, seperti pada penekanan produksi beberapa mediator proinflamasi termasuk ekspresi protein dan kadar IL-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, and Benarroch, 2015). Salah satu jenis estrogen yaitu estradiol dapat mengatur fungsi mikroglia dan astrosit yang berhubungan dengan peradangan dengan menghambat pelepasan sitokin dan aktivasi serta migrasi sel imun (Asl *et al.*, 2013). ER β banyak terdistribusi di jaringan otak tikus dewasa (Mitra *et al.*, 2003).

Mekanisme regulasi estrogen khususnya 17 β -estradiol 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 factor-faktor transkripsi dan mempengaruhi aktivitasnya seperti faktor transkripsi *stimulating protein-1* (SP-1), *activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor kB* (NF-kB), and c-jun. Selanjutnya berikatan dengan Promotor DNA dan terjadi proses transkripsi menghasilkan protein.

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

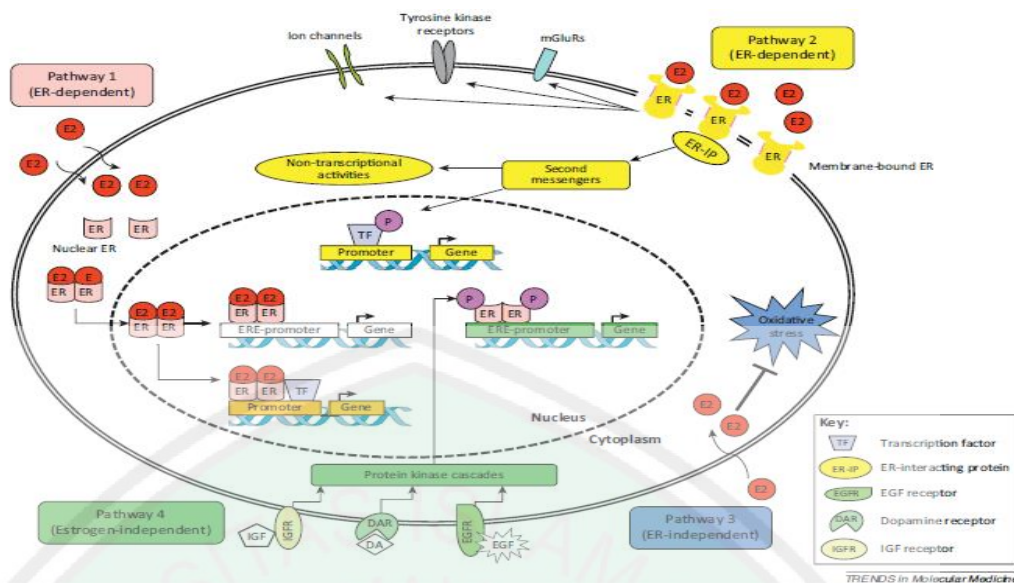
Pada jalur ini, estrogen berikatan dengan ER di membran. Terdapat dua jenis estrogen di membrane yaitu ER-X dan GPR30. Pengiriman sinyal oleh ER melalui *second messengers* dengan tiga kemungkinan yaitu translokasi ke nukleus dan berikatan dengan promotor DNA sehingga menghasilkan protein. Kedua yaitu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

3. *The ER-independent pathway*

Meskipun sebagian besar tindakan biologis estrogen dimediasi melalui ER, namun dalam jalur ini, estrogen tidak berikatan dengan ER. estrogen dapat berperan sebagai agen antioksidan dan menekan stres oksidatif melalui jalur ER-independen. Estrogen dapat mengatur aktivitas enzimatis 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*

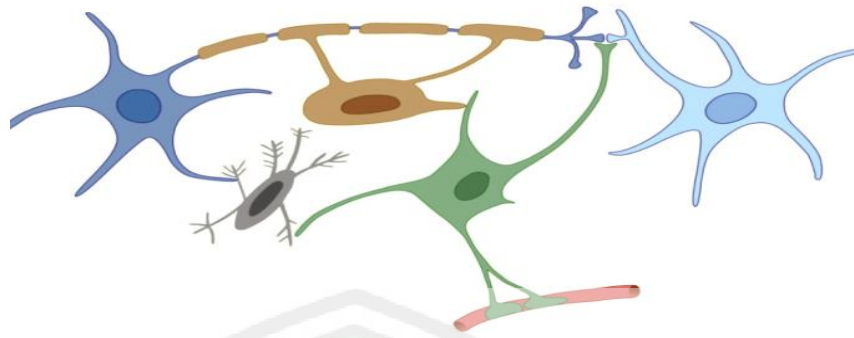
Saat kondisi fisiologis normal, ER dapat diaktifkan dengan cara ligan-independen melalui pensinyalan yang dipicu oleh berbagai faktor, termasuk neurotransmitter seperti dopamin, faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth factor* (EGF) dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dan aktivator jalur sinyal 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 Persinyalan Estrogen (Cui *et al.*, 2013).

2.9 Tinjauan Neuroglia dan Mikroglia

Neuroglia merupakan sekumpulan sel yang memiliki peran diantaranya pemberi nutrisi, pelindung, pengatur homeostasis serta penunjang kehidupan dari sel neuron (Slone, 1994; Verkhratsky dan Parpura, 2014). Secara garis besar neuroglia terbagi menjadi Makroglia dan Mikroglia dimana Makroglia masih dibagi lagi menjadi Astrosit dan Oligodendrosit (Slone, 1994; Kettenmann dan Verkhratsky, 2013; Verkhratsky dan Parpura, 2014). Penjelasan sebelumnya telah disebutkan bahwa neuroglia yang terbagi menjadi Astrosit, Oligodendrosit dan Mikroglia memiliki peran penting dalam memberikan penunjang dan homeostasis kehidupan sel neuron.



Gambar 2.6 Hubungan Neuroglia dengan Mikroglia

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

Sel mikroglia pertama kali di karakterisasi oleh Pio del Rio-Hortega dengan memberikan gambaran yang jelas mengenai *phenotype* morfologinya pada sekitar tahun 1920 (Kettenmann, *et al.*, 2011). Sel ini melepaskan substansi larut seperti faktor neurotropik yang mempengaruhi tingkat proliferasi dari sel neural progenitor (Choi, *et al.*, 2008). Hal ini akan meningkatkan respon cedera pada otak (Kettenmann *et al.*, 2011) dan meningkatkan neurogenesis dan atau proliferasi progenitor yang terjadi pada penyakit seperti epilepsi, stroke, neuroinflamasi maupun penyakit neurodegeneratif lainnya.

Mikroglia merupakan makrofag dalam *central nervous system* (CNS). 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 CNS, 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).

Mikroglia memiliki dua fenotipe yang memiliki perbedaan dalam aktivasinya, yaitu M1 dan M2. Mikroglia dapat mengalami polarisasi M1 dan M2 setelah aktivasi di otak, yang melibatkan pada proses neurodegenerasi (Nakagawa dan Chiba, 2015; Xiong *et al.*, 2016). Fenotipe M1 disebut juga aktivasi klasik, terkait dengan besar respon inflamasi yang dilepaskan yaitu IL-1 β , TNF- α dan *mengekspresikan inducible nitric oxide synthase* (iNOS). M2 disebut juga jalur alternatif dan memiliki peran sebagai antiinflamasi. Aktivasi dari M2 akan menghasilkan IL-4 atau IL-13 dan mengatasi peradangan dan perbaikan jaringan. M2 berperan pada penonaktifan sel apoptosis atau paparan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan mengubah faktor pertumbuhan-b (TGF-b) dan meredakan peradangan akut (Orihuela *et al.*, 2016; Tang and Le, 2016).

Mikroglia sebagai salah satu jenis sel imun seperti makrofag pada CNS memiliki dua fungsi sebagai neurotoksik dan neuroprotektif (Eyo, U. B and Long-JunWu, 2013; Suzumura, 2013). Mikroglia berasal dari sel myeloid di perifer yang jumlahnya mencapai 12% sel di CNS (Block *et al.*, 2007). Mikroglia terakumulasi di lesi (daerah cedera) yang diakibatkan adanya gangguan neurodegeneratif seperti *Alzheimer disease*, *Parkinson disease*, *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ALS) dan *Multiple Sclerosis* (MS) (D. Farfara *et al.*, 2008).

Mikroglia dianggap sebagai pertahanan garis pertama yang dapat merespon rangsangan dengan cepat. Ketika diaktifkan, mikroglia mengalami perubahan morfologi menjadi *amoeboid*, berproliferasi, bermigrasi ke daerah yang terluka atau cedera dan melepaskan berbagai faktor terlarut serta memfagositosis zat-zat asing. Perpindahan mikroglia ke daerah yang terdapat cedera atau luka dikendalikan oleh kemokin dan ATP nukleotida (J. El Khoury and A. D. Luster, 2008). Berdasarkan dua fungsi yang dimiliki mikroglia yaitu sebagai neurotoksik dan neuroprotektif, mikroglia dapat menghasilkan berbagai faktor neurotoksik dan neuroprotektif. seperti sitokin inflamasi yaitu IL-1b, TNF α , IL-6, IFN- γ . Selain itu, juga menghasilkan superoksida dan *nitric oxide*. Faktor-faktor ini dapat mengganggu fungsi neuronal. Sebaliknya, mikroglia juga menghasilkan berbagai macam faktor neuroprotektif seperti neurotropin, BDNF, GDNF, NG (Suzumura, 2013).

Mikroglia yang teraktivasi mengalami transformasi dari keadaan bercabang yang beristirahat (*resting*) menjadi bentuk *amoeboid* dan melepaskan faktor-faktor penanda permukaan seperti CD14, molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC), reseptor kemokin dan beberapa penanda lainnya. Dalam keadaan aktif, beberapa faktor penanda tersebut dapat memiliki fungsi yang penting pada kelangsungan hidup neuron seperti pemeliharaan seluler (contohnya, pembersihan sisa-sisa sel yang beregenerasi) dan sebagai sistem imun bawaan (Harry *et al.*, 2004; Simard *et al.*, 2006 Wilkinson *et al.*, 2006). Pada penyakit neurodegeneratif, terdapat mikroglia yang aktif dalam jumlah yang besar. Hal ini merupakan suatu kondisi yang disebut mikrogliosis yang melibatkan mikroglia aktif dalam patologi penyakit (Block *et al.*, 2007).

2.10 Tinjauan HMC3

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

Organisme Asal : *Homo sapiens* (manusia)

Jaringan : Otak

Tipe Sel : Mikroglia

Usia : Embrio

Morfologi : Makrofag

Sifat Pertumbuhan : Melekat

Penggunaan : Sel mikroglia manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglia primer. Seringkali digunakan untuk analisis biokimia terkait fungsi sel mikroglia di dalam otak, seperti dalam mekanisme neuroinflamasi.

Sumber : ATCC (ATCC, 2016)

2.11 Tinjauan Interferon gamma (IFN- γ)

Interferon merupakan protein sinyal yang dihasilkan oleh sel normal yang memiliki peran sebagai respon terhadap infeksi (Taylor, *et al.* 2014). Interferon pertama kali ditemukan pada tahun 1954 oleh Nagano dan Kojima pada virus di kelinci. Tiga tahun kemudian Issacs dan Linderman berhasil menemukan molekul yang serupa dari pengamatan terhadap sel ayam yang diinkubasi dengan virus influenza. Pengamatan tersebut memberikan gambaran terbentuknya suatu faktor yang dapat melindungi sel dari infeksi virus (Kallioliias, *et al.* 2010). Interferon (IFN) diklasifikasikan kedalam 3 tipe diantaranya Tipe 1 yang terdiri dari IFN α

dan IFN β , Tipe 2 yang terdiri dari IFN γ , dan Tipe 3 yang terdiri dari IFN λ (Green, *et al.* 2017).

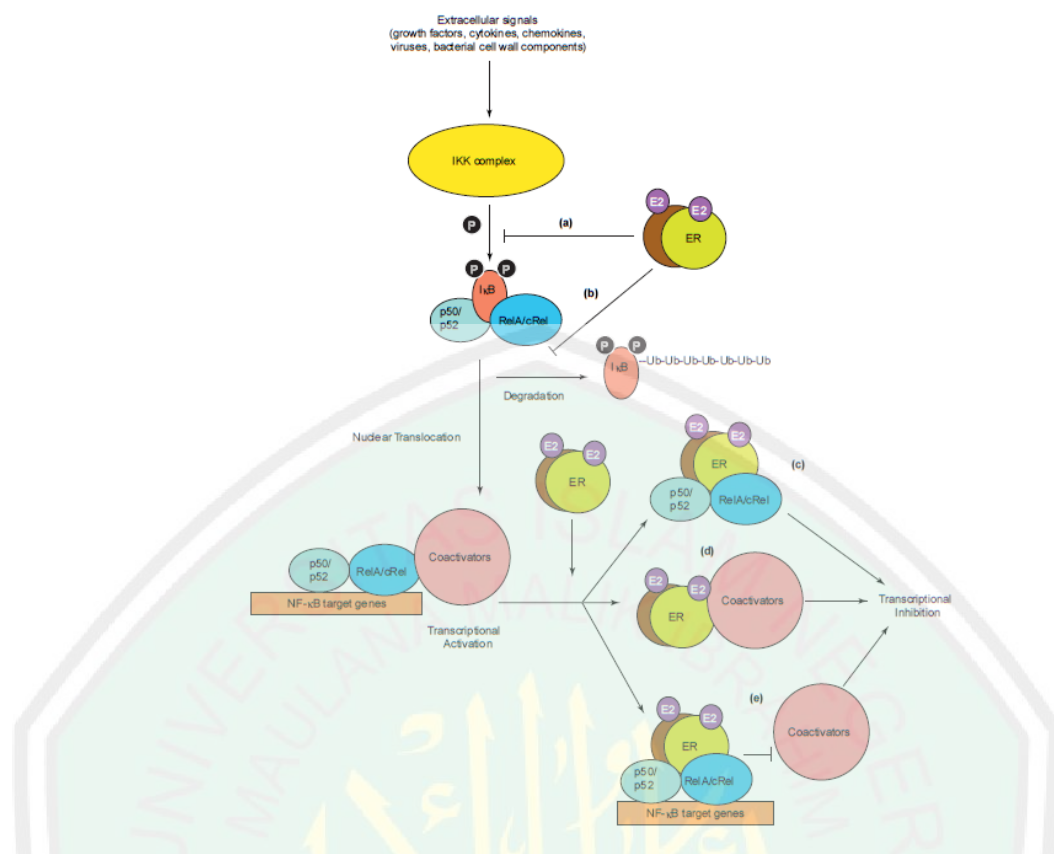
IFN- γ merupakan protein yang memiliki peranan penting dalam regulasi imunitas alami dan seluler. Protein ini diproduksi oleh sel imun. Mayoritas diproduksi oleh sistem imun alami yang diwakili oleh Sel Natural Killer (NK) dan Sel Natural Killer T (NKT). Sementara dari sistem imun seluler diwakili oleh Sel CD4 Th1 dan Sel CD8 Sitotoksik. Selain menghambat replikasi virus, karenanya IFN- γ mampu menstimulasi sel imun. Meregulasi secara langsung maupun tidak langsung *Major Histocompatibility Complex class II* (MHCII). Ujungnya, IFN- γ mampu mengaktifkan makrofag dan memicu keluarnya sitokin pro-inflamasi (Schoenborn, *et al.* 2007).

2.12 Tinjauan *Nuclear Chain Kappa Light B Activated* (Nf- κ B)

Nuclear Chain Kappa Light B Activated (Nf- κ B) 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- κ B bisa ditemui di sitoplasma secara tidak aktif terikat bersama IKK Kompleks dan secara aktif dalam bentuk dimer tunggal di nukleus. Nf- κ B terdiri dari 5 anggota utama diantaranya ialah p65/ relA, relB, c-rel, p50, dan p52. Aktivasi Nf- κ B 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- κ B dan *Inhibitor Kinase B* (IkB) sehingga IkB lepas dari ikatan dengan Nf- κ B dan mengalami degradasi oleh protein P20S. Nf- κ B 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- κ B 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- κ B dengan I κ B dan mekanisme penghambatan degradasi I κ B oleh protein P20S. Sementara penghambatan di nukleus terdapat 3 macam diantaranya menghambat Nf- κ B, menghambat *coactivator*, dan menghambat kompleks Nf- κ B dengan *coactivator* (Kalaitzidis and Gilmore, 2005).



Gambar 2.7 Mekanisme Penghambatan Aktivasi Nf-κB oleh *Estrogen Receptor* Teraktivasi (Kalaitzidis and Gilmore, 2005).

2.13 Tinjauan *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHC II)

Major Histocompatibility Complex (MHC) merupakan sekumpulan gen yang ditemukan pada semua jenis vertebrata. Gen tersebut terdapat di kromosom nomor 6 manusia dan lebih dikenal sebagai kompleks antigen leukosit manusia (HLA). Protein MHC yang disandikan berperan dalam mengikat dan mempresentasikan antigen peptida ke sel T. Protein MHC terdiri dari 2 kelas struktur, yaitu protein MHC kelas 1 (MHC I) dan protein MHC kelas 2 (MHC II) (Defranco, 2007).

Protein MHC kelas II terdapat pada permukaan sel B, makrofag, sel dendritik, dan beberapa sel penampil antigen (*Antigen Presenting Cell* atau APC)

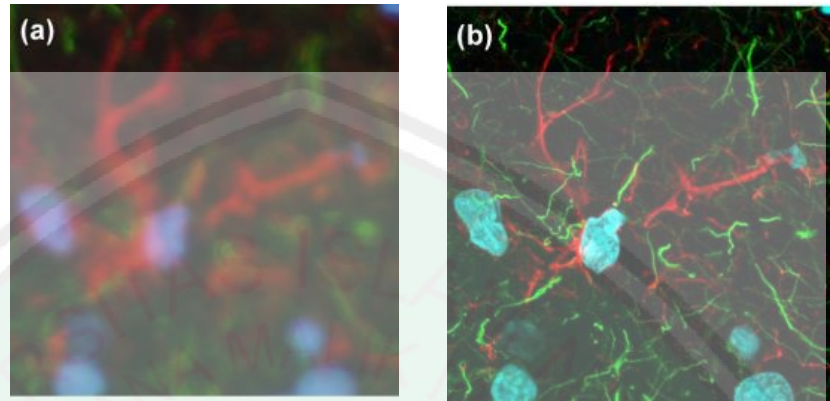
khusus. Melalui protein MHC kelas II inilah, APC dapat mempresentasikan antigen ke sel T *helper* (Th) yang akan menstimulasi reaksi inflamatori atau respon antibodi. MHC kelas II ini terdiri dari dua ikatan non kovalen polipeptida *integrated-membrane* yang disebut α dan β . Biasanya, protein ini akan berpasangan untuk memperkuat kemampuannya untuk berikatan dengan reseptor sel T. Pada sistem otak pusat, MHC II diekspresikan saat mikroglia aktif atau dalam bentuk *ramified* (Defranco, 2007 and Rock, 2004).

2.14 Tinjauan *Immunocytochemistry* (ICC)

Immunocytochemistry adalah metode yang menggunakan antibodi untuk mengidentifikasi protein atau molekul dalam sel yang dapat dilihat dengan mikroskop. ICC juga diartikan sebagai suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi primer spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen. Antibodi primer spesifik ini mampu memvisualisasi protein di bawah mikroskop *fluorescence*, ketika dia berikatan dengan antibodi sekunder yang telah dikonjugasi dengan *fluorophore* atau senyawa yang dapat berfluoresensi (Burry, 2010).

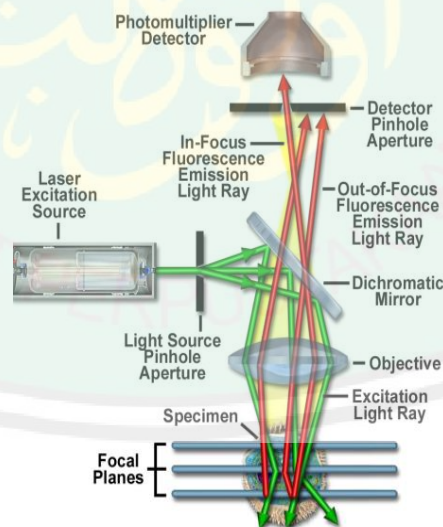
Confocal Laser Scanning Microscopy merupakan instrumen yang digunakan untuk mengamati sampel dengan memanfaatkan laser sebagai sumber pengamatan dan menggunakan kamera untuk merekam hasil pengamatan dimana selanjutnya diolah menggunakan *software* pengolah data yang terdapat pada komputer. Pada instrumen ini digunakan pendar sampel setelah dikenai laser dengan panjang gelombang tertentu (Lattante *et al.*, 2014). Instrumen ini pada awalnya dikembangkan oleh seorang mahasiswa kesehatan di Amerika Serikat

bernama Marvin Minsky untuk mengamati aktivitas sel ota (Claxton *et al.*, 2010). Instrumen ini memberikan struktur sel lebih baik dibandingkan dengan SEM maupun TEM yang dapat diamati pada gambar berikut ini:



Gambar 2.8 (a) pengamatan SEM (b) pengamatan CLSM (Claxton *et al.*, 2010)

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



Gambar 2.9 Diagram CLSM.

2.15 Tinjauan Uji Kruskal Wallis

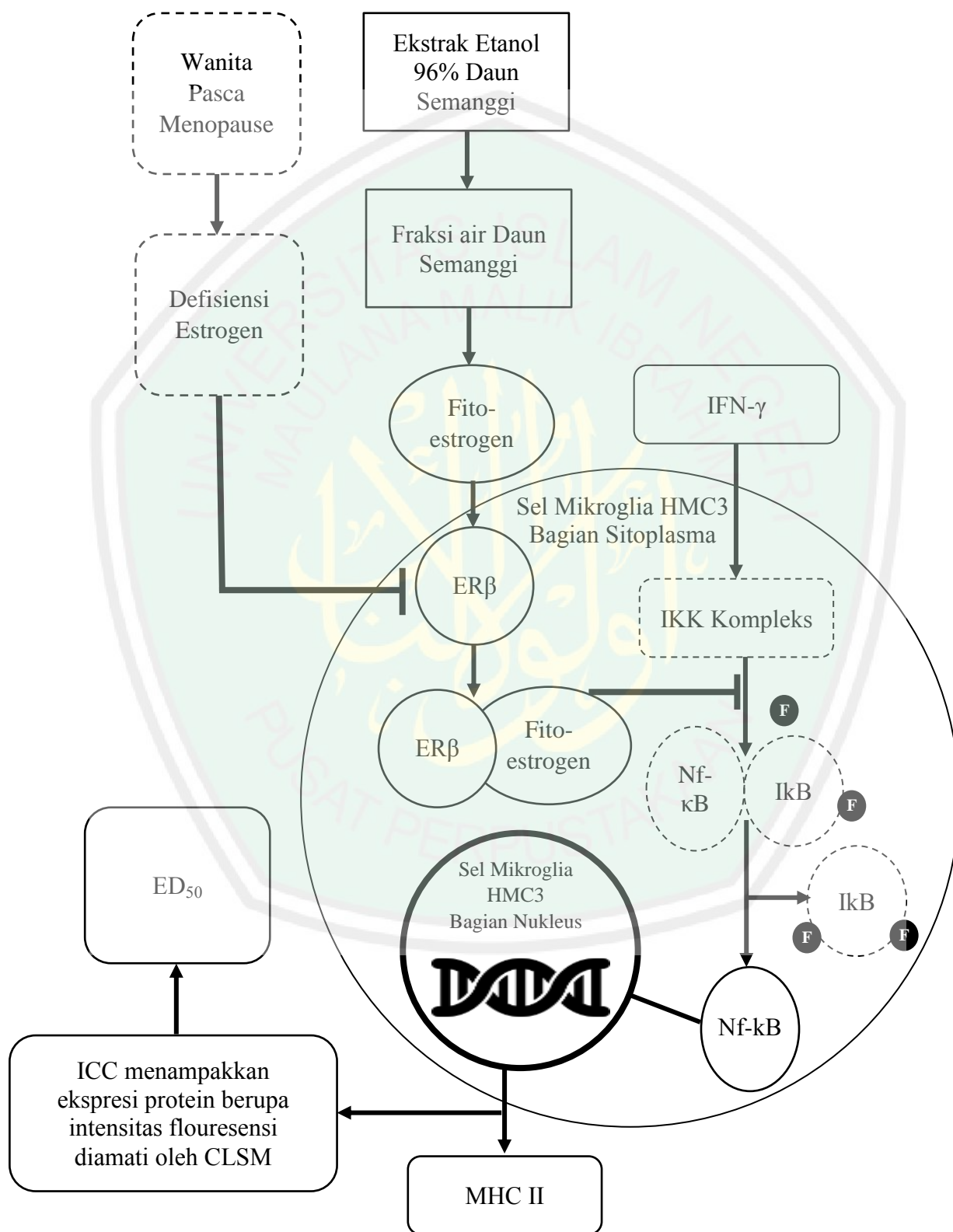
Uji Kruskal Wallis adalah salah satu peralatan statistika non-parametrik dalam komponen prosedur untuk sampel independen. Prosedur ini digunakan untuk membandingkan dua variabel yang diukur dari sampel yang tidak sama (bebas), dimana kelompok yang diperbandingkan lebih dari dua. Dalam statistik parametrik ketika kelompok yang ingin diperbandingkan lebih dari dua, dapat digunakan analisis varians (ANOVA). Sebaliknya pada statistik non-parametrik, alternatifnya menggunakan analisis varians satu arah berdasarkan peringkat yaitu Kruskal Wallis (Daniel, 1991).

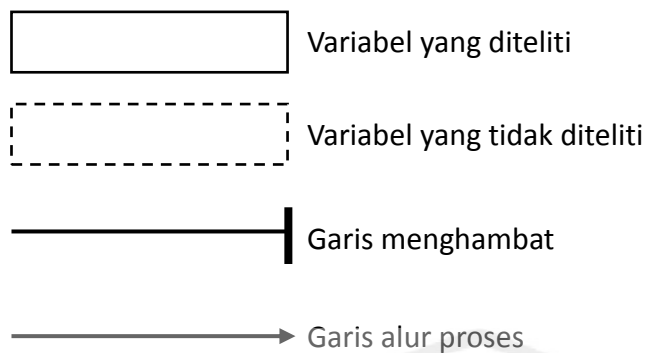


BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Skema Kerangka Konseptual





3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Salah satu hal yang wajar pada setiap insan adalah menjadi tua. Wanita akan memasuki masa menopause. Periode tersebut memberikan dampak pada psikologis, fisik, maupun hormonal dalam tubuh. Beberapa hormon mulai mengalami penurunan dan hilang dari tubuh. Salah satunya hormon estrogen yang diproduksi oleh ovarium. Hal ini menyebabkan *Estrogene Receptor* (ER) kinerjanya berkurang dan bahkan fungsinya terganggu. Terjadinya defisiensi estrogen ini sering dikaitkan dengan penyakit neurodegeneratif karena di otak terdapat ER β . Estrogen yang berlekatan dengan ER dan beraktivasi secara agonis akan meregulasi faktor transkripsi tertentu agar proses inflamasi ditekan (Cui *et al.*, 2013).

Sebagai upaya pemicu terhadap neuroinflamasi pada sel, digunakan IFN- γ sebagai activator sel mikroglia HMC3. IFN- γ yang merupakan interferon tipe II mampu mengaktivasi makrofag. Mekanisme ini diawali dari terurainya IKKkompleks karena stimulus dari IFN- γ . IKKkompleks merupakan kelompok protein yang terdiri dari faktor transkripsi Nf- κ B dan regulatornya, yaitu I κ B. Penguraian IKKkompleks tak hanya memisahkan Nf- κ B dengan I κ B, namun juga membuat I κ B dilekati oleh fosfat dan mengalami degradasi oleh protein P20S. Nf- κ B dalam bentuk dimer tunggal merupakan bentuk aktif dan akan melakukan

translokasi ke nuklues. Nf- κ B yang berlekatan dengan ko-aktivator akan mempengaruhi transkripsi gen, salah satunya inflamasi dan aktifnya sel mikroglia. (Tilstra *et al.*, 2011, Endang, 2016 dan Kaltschmidt., 2009).

Sementara itu, *M. crenata* melalui berbagai penelitian disebut memiliki senyawa Fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa kimia dari tumbuhan yang memiliki struktur dan fungsi yang sama seperti estrogen atau memiliki afinitas terhadap *Estrogene Receptor* (Yang *et al.*, 2012). Fitoestrogen berlekatan dengan ER- β sehingga teraktivasi dan mampu memberikan respons. Respon yang terkait dengan neuroprotektif ialah menghambat proses fosforilasi I κ B. Sehingga I κ B tetap bersama Nf- κ B (Kalaitzidis and Gilmore, 2005).

Aktivasi sel mikroglia ditandai dengan keluarnya MHC II. Menurut Klaassen *et al* (2015) menyatakan bahwa MHC II ini merupakan marker yang keluar saat makrofag diinduksi oleh IFN- γ . Hal ini mampu dideteksi dengan perwarnaan imun salah satunya dengan *Immunocytochemistry*. Hasilnya dapat tervisualisasi secara kualitatif berupa intensitas fluoresensi di bawah *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

3.3 Hipotesis Penelitian

Fraksi air *Marsilea crenata* C. Presl memiliki efek neuroprotektif pada sel mikroglia HMC3.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik, dan untuk mencapai tujuan penelitian ini dilakukan beberapa tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Ekstraksi daun semanggi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian fraksinasi bertingkat menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan air secara berurutan.
2. Tahapan penyiapan sel mikroglia dan sub-kultur selama beberapa minggu serta induksi IFN- γ 10 ng selama 24 jam.
3. Uji aktivitas neuroprotektif menggunakan *Immunocytochemistry* dengan pengamatan fluoresensi melalui *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada Januari 2019 – Juli 2019 bertempat di Laboratorium Fitokimia Departemen Biologi Farmasi Jurusan Farmasi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kultur di Laboratorium *Bioamaging* Lembaga Sentral Ilmu Hayati 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 Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Marsilea crenata* C. Presl yang diambil dari sawah.

4.3.3 Sel Kultur

Sel menggunakan sel mikroglia yang didapatkan dari *American Type Culture Collection* dengan kode CRL-3304.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu *random sampling*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi air daun semanggi yang diberikan sebagai perlakuan dengan dosis 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah intensitas fluoresensi di CLSM.

4.4.3 Variabel Kontrol

Jenis sel mikroglia, lama inkubasi sel mikroglia, suhu inkubasi sel mikroglia, dosis IFN- γ yang diinduksikan, suhu pengeringan ekstrak, perawatan media kultur, dosis fraksi yang diberikan untuk perlakuan.

4.4.4 Definisi Operasional

- 1 Sampel dalam penelitian ini adalah daun semanggi yang diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya, dan 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 Fraksi air merupakan fraksi dari ekstrak etanol 96% daun semanggi dengan fraksinasi bertingkat menggunakan corong pisah dengan berbagai pelarut secara berurutan n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan aquadest.
- 4 Sel mikroglia merupakan sel mikroglia manusia yang telah ditransformasi namun tetap memiliki sifat sel mikroglia primer.
- 5 MHC II merupakan faktor penanda aktivasi sel mikroglia dari *resting state* ke bentuk *activated* setelah induksi IFN- γ .
- 6 IFN- γ merupakan induktor yang diberikan pada sel mikroglia agar sel tersebut aktif dengan dosis 10 ng selama 24 jam.
- 7 Kontrol negatif merupakan sel yang tidak mendapatkan perlakuan dosis fraksi.
- 8 Kontrol positif merupakan sel yang mendapatkan perlakuan genistein 50 μ M.
- 9 Dosis merupakan fraksi air daun *Marsilea crenata* C. Presl yang digunakan sebagai perlakuan pada sel, dilarutkan dalam DMSO 0,5% dengan surfaktan Tween 80 0,5%.
- 10 Subkultur sel mikroglia, Sel mikroglia didapatkan dari ATCC, USA. Sel disubkultur dengan media komplet berisi *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) dengan 10% FBS dan 1% Pen-Strep dalam CO₂ dengan kelembaban atmosfer 5% pada suhu 37 °C. Pada percobaan aktivasi mikroglia, sel di letakan dalam 24-well *microplates* dengan

kerapatan 1×10^6 sel / well. Sel yang telah siap dilakukan, diberikan IFN- γ sebanyak 10 ng selama 24 jam.

11 Pengukuran MHC II dilakukan menggunakan metode *immunocytochemistry* (ICC), sel mikroglia HMC3 dikultur di 24-well *microplate* yang telah diberikan coverslip. Sel kemudian direndam selama 10 menit dalam 4% *paraformaldehyde* pada 4°C, lalu dipermeabilisasi dalam 0.1% Triton X-100 selama 10 menit, lalu dilakukan tahapan blocking ikatan nonspesifik dengan BSA selama 30 menit, kemudian sel diinkubasi semalam pada 4°C dengan campuran 1 : 200 anti rabbit MHC II, lalu sel diinkubasi dengan campuran 1 : 500 Anti Rabbit FITC selama 1 jam, sel selanjutnya dianalisis menggunakan *confocal laser scanning microscopy*.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 500 mL, batang pengaduk, corong pisah, kertas saring, spatula, pipet ukur, cawan porselen, *conical tube* 15 mL, *conical tube* 50 mL, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, spuit 10 mL, *Flask culture* 25 cm², mikropipet 1000 μ L, mikrofilter 0,22 μ m, neraca analitik, *Ultrasonic Cleaner*, *Rotary Evaporator*, Oven, *Biosafety Cabinet*, Inkubator, *Inverted Microscope*, *Confocal Laser Scanning Microscope*, *waterbath*, 24-well *microplate*, *centrifuge*, *coverslip*.

4.5.2 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun *M. crenata* yang didapatkan di daerah Benowo, Kota Surabaya, Provinsi Jawa Timur.

4.5.3 Bahan Sel

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel mikroglia dari ATCC, USA. Sel tersebut merupakan sel mikroglia dari manusia.

4.5.4 Bahan Kimia

Etanol 96%, Tween 80, alkohol 70%, PBS, FBS, Anti-Rabbit MHC II, Anti-Rabbit FITC, Triton X-100, EMEM, DMSO, PFA, n-heksan, etil asetat, n-butanol, aquadest, BSA.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang.

4.6.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dimaksudkan untuk memperoleh simplisia dari tanaman *M. crenata* C. Presl, diantaranya sebagai berikut:

1. Daun *M. crenata* C. Presl dipanen dan lalu dicuci
2. Dikeringkan dibawah sinar matahari pada jam 07.00 – 11.00.
3. *M. crenata* C. Presl yang sudah kering lalu diserbuk kemudian ditimbang.
4. Disimpan di tempat yang kering serta terlindung dari paparan sinar matahari untuk mencegah penurunan mutu dan kerusakan.

4.6.3 Penentuan Kadar Air Simplisia

Penentuan kadar air ini menggunakan alat *moisture analyzer*. Hasil yang didapatkan berupa persentase jumlah air. Adapun prosedur penggunaannya sebagai berikut:

1. Dinyalakan alat *moisture analyzer*.

2. Dilakukan kalibrasi dan layar menunjukkan tampilan 0,000 g.
3. Penutup alat dibuka dan *sample pan* kosong dimasukkan ke dalam *sample pan holder*.
4. Penutup alat diturunkan dan secara otomatis alat akan menunjukkan tampilan 0,000 g pada layar monitor.
5. Simplisia sejumlah $\pm 0,500$ g dimasukkan ke dalam *sample pan* dan penutup alat diturunkan.
6. Kemudian secara otomatis, alat akan mengukur kadar air serbuk simplisia daun semanggi.

4.6.4 Prosedur Ekstraksi

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

1. Ditimbang simplisia daun semanggi seberat 30 gram.
2. Masing-masing simplisia dimasukkan kedalam gelas beaker dan ditambahkan 200 ml etanol.
3. Diatur waktu untuk proses ekstraksi yaitu 3 x 2 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya.
4. Hasil ekstraksi disaring.
5. Residu ditambahkan kembali dengan pelarut sebanyak 2 x 150 ml disertai ulangan proses 3 dan 4.
6. Filtrat yang terkumpul dimasukkan labu *rotary evaporator*.
7. Suhu alat diatur 50°C dengan kecepatan pemutaran 70 rpm.

8. Ekstrak hasil *rotary evaporator* dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C agar diperoleh ekstrak kental.

4.6.5 Proses Fraksinasi

Proses fraksinasi ekstrak etanol 96% daun semanggi menggunakan alat corong pisah dengan menggunakan metode fraksinasi bertingkat. Hasil fraksinasi kemudian diuapkan dengan dengan *rotary evaporator* hingga kering. Langkah-langkah fraksinasi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. 70 gram ekstrak disuspensikan dengan aquadest 700 ml.
2. Dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambah dengan pelarut n-heksan 700 ml.
3. Dikocok dan didiamkan hingga terpisah 2 fase.
4. Diambil fase n-heksan.
5. Kemudian fase air dicampur dengan etil asetat 700 ml.
6. Dikocok dan didiamkan hingga terpisah 2 fase.
7. Diambil fase etil asetat.
8. Kemudian fase air dicampur dengan n-butanol 700 ml.
9. Dikocok dan didiamkan hingga terpisah 2 fase.
10. Dipisahkan antara fase air dengan fase n-butanol.
11. Fraksi air di evaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan 72 mbar.

4.6.6 Subkultur Sel Mikroglia

Prosedur kultur dimulai dari pembuatan medium komplet, *Thawing cell*, dan subkultur. Langkah-langkahnya sebagai berikut :

4.6.6.1 Pembuatan Medium Komplit

Medium Komplit (MK) merupakan sumber nutrisi yang mendukung perkembangbiakan sel. Langkah pembuatannya sebagai berikut:

1. Disterilkan alat kultur dengan etanol 70% sebelum masuk *Bio Safety Cabinet*.
2. Disiapkan *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan Medium EMEM dalam *conical tube* 50 mL.
3. Dipindahkan Penicilin-Streptomycin (PenStrep) 150 μ L dalam *conical tube* 15 mL.
4. Ditambahkan FBS 1350 μ L dan ditambah ad 15 mL medium EMEM dalam *conical tube* 15 mL.
5. Dihomogenkan dan dilakukan pemanasan dengan waterbath 37°C selama 10 menit.

4.6.6.2 Thawing Cell

Thawing cell memiliki arti mencairkan sel. Langkah ini dilakukan saat sel pertama kali di terima dilaboratorium kultur. Langkahnya sebagai berikut :

1. Dilakukan pemanasan *vial cell* dengan *waterbath* 37°C selama 2 menit.
2. Dipindahkan 5 mL MK dengan *sput* dalam *conical tube* 15 mL, kemudian jarum diganti filter berukuran 0,22 μ m.
3. Dipindahkan 2 mL MK ke *conical tube* 15 mL.
4. Dipindahkan sel dengan mikropipet ke *conical tube* 15 mL.
5. Ditambahkan 3 mL MK tersisa ke *conical tube* 15 mL lalu dihomogenkan.

6. Dilakukan sentrifugasi 800 rpm / 5 menit, dibuang *supernatant* dan diambil *pellet* sel.
7. Dipindahkan 2 mL ke *conical tube* 15 mL, dimasukkan *pellet* kedalamnya dan di homogenkan.

4.6.5 Preparasi Fraksi Air *Marsilea crenata* C. Presl

Prosedur preparasi merupakan proses pembuatan larutan sampel dengan berbagai varian dosis, langkahnya sebagai berikut:

1. Ditimbang 50 mg sampel fraksi air *M. crenata* C. Presl.
2. Ditambahkan 50 μ L 0,5% Tween 80 dan 1 mL DMSO 0,5% kemudian diaduk hingga homogen.
3. Dipindahkan fraksi dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambah dengan DMSO 0,5% hingga tanda batas.
4. Larutan sampel difiltrasi menggunakan 0,22 μ L millipore.
5. Disimpan dalam tabung steril dan diencerkan larutan induk dengan variasi dosis 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm.

4.6.6 Analisis dengan *Immunocytochemistry* melalui *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM)

Langkah analisis dengan menggunakan ICC melalui CLSM, adalah sebagai berikut:

1. Dimasukkan coverslip ke dalam 24-well microplate.
2. Ditambahkan sel pada 24-well microplate.
3. Dimasukkan inkubator selama 24 jam.
4. Difiksasi dengan penambahan 4% Paraformaldehyde (PFA) selama 10 menit.

5. Dicuci dengan PBS 3 X 5 menit.
6. Ditambahkan 0,1 % Tritron X-100 selama 10 menit.
7. Dibilas dengan PBS 3 X 5 menit.
8. Ditambahkan *blocking buffer* 1% BSA selama 30 menit.
9. Ditambahkan Anti Rabbit MHC *Class II* (1:200) selama 24 jam dalam suhu 4°C
10. Dibilas dengan PBS 3 X 5 menit.
11. Ditambahkan antibodi sekunder Anti Rb FITC (1:500) selama 1 jam pada ruang gelap
12. Dibilas dengan PBS 3 X 5 menit.
13. Diambil *coverslip* objek tempat melekat sel dan diletakkan dikaca preparat secara terbalik
14. Dianalisis dengan CLSM

4.7 Analisis Data

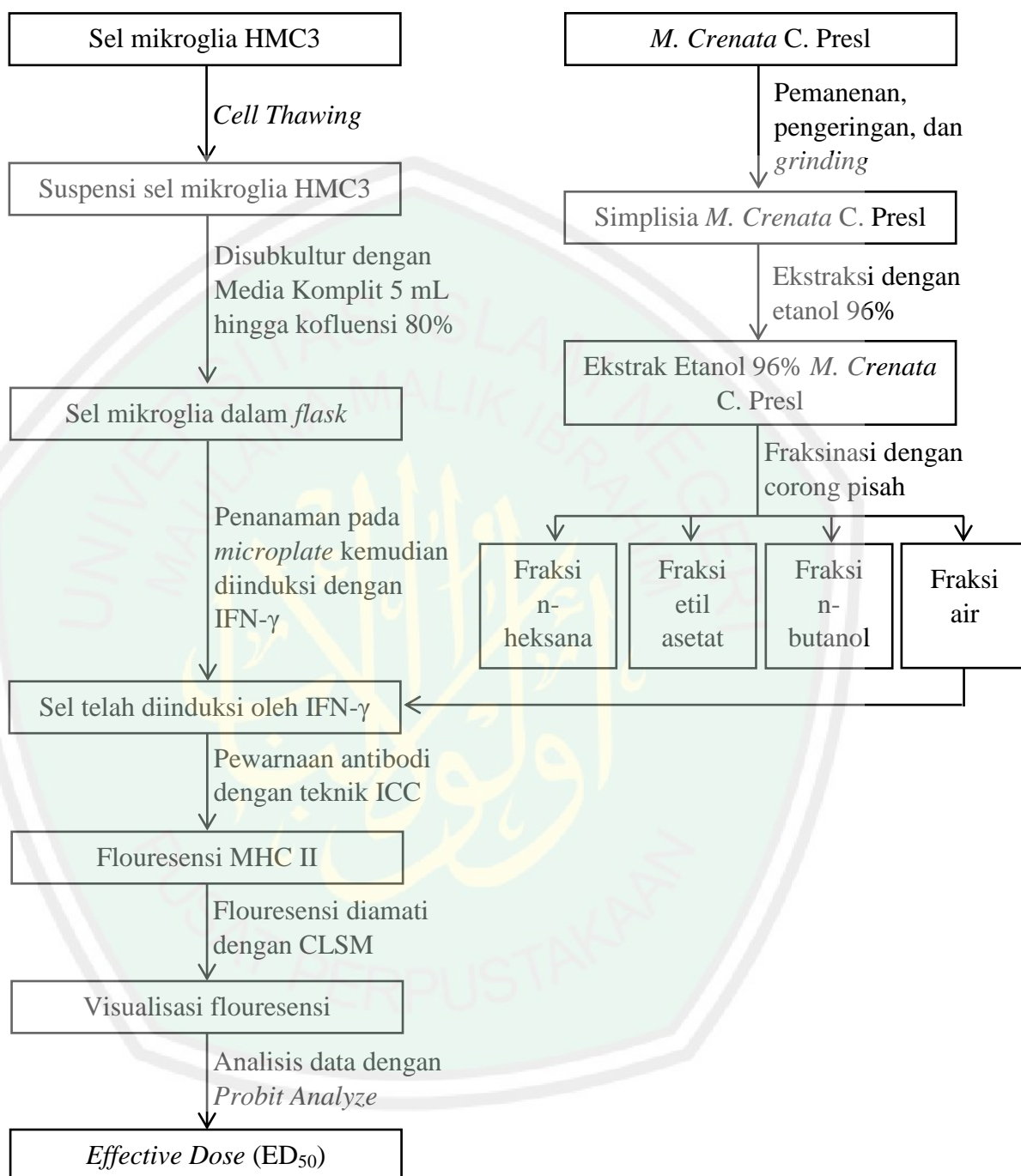
Analisis data hasil penelitian ini dilakukan menggunakan program IBM SPSS Statistic 24. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah sebagai berikut (Dahlan, 2014):

1. Uji normalitas data bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal, digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran

pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika 50 sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non-parametrik.

2. Uji homogenitas varian bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Bila tidak homogen, maka menggunakan alternatif Uji *Kruskal Wallis*.
3. Regresi: bertujuan untuk melihat korelasi antara dosis dengan aktivitas.
4. Uji *Kruskal Wallis* bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
5. Uji *U Mann Whitney* 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.
6. Uji Probit dilakukan untuk mengetahui dosis efektif (ED_{50}) dari data yang memberikan aktivitas penurunan *major histocompatibility complex* II (MHC II) berdasarkan fluoresensi dari sel mikroglia HMC3 dalam satuan persentase.

4.8 Gambar Alur Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman dan Preparasi Sampel

Daun semanggi yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini didapat dari persawahan di daerah Kecamatan Benowo, Kota Surabaya, Jawa Timur. Kemudian determinasi dilakukan di UPT Materia Medica Batu, Jawa Timur. Determinasi tanaman sampel merupakan langkah klarifikasi bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian benar tanaman yang dimaksud yaitu *M. crenata* C. Presl. Metode yang digunakan dengan menggunakan kunci determinasi dimana setiap tumbuhan akan digolongkan secara bertahap dari bangsa, suku, marga, jenis, hingga derivat terbawahnya. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1. Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di UPT Materia Medica Batu Malang menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah benar *Marsilea Crenata* C. Presl sehingga sampel dapat digunakan dalam penelitian.

Pemanenan dilakukan dengan cara mengambil daun yang memiliki batang dengan tinggi sekitar 20 cm. Kemudian dilakukan tahap preparasi agar didapatkan simplisia yang siap untuk diekstraksi. Proses preparasi terdiri dari pencucian, pengeringan, dan penyerbukan. Proses pencucian dilakukan dengan air mengalir. Pencucian dilakukan agar pengotor berupa tanah, kotoran, maupun debu hilang. Setelah daun semanggi bersih, dilakukan proses pengeringan dibawah sinar matahari dari jam 07.00 – 11.00. Hal ini dimaksudkan agar terik matahari tidak terlalu menyengat sehingga tidak merusak senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman (Dean, *et al.*, 2014). Pengeringan dilakukan hingga daun kering dan mudah rapuh saat dipegang dengan tujuan agar mengurangi hingga

menghilangkan kadar air. Selanjutnya daun semanggi yang sudah kering digrinding dengan menggunakan blender. Penyerbukan dilakukan agar luas permukaan menjadi besar sehingga mempermudah tahapan ekstraksi. Serbuk simplisia daun semanggi berwarna hijau. Dari 4 kg daun semanggi sawah didapatkan 1,7 kg serbuk daun semanggi.

5.2 Penentuan Kadar Air Simplisia *M. crenata* C. Presl

Penentuan kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar air simplisia *M. crenata* C. Presl. Penentuan ini dilakukan dengan alat *Moisture Analyzer*. *Moisture Analyzer* bekerja dengan prinsip gravimetri. Gravimetri merupakan suatu metode analisis kuantitatif penentuan massa dari analit berdasarkan pada perhitungan massa sebelum dan sesudah perlakuan. Penerapan metode gravimetri dapat digunakan dalam penentuan kadar senyawa anorganik baik kation maupun anion, bahkan dapat digunakan dalam penentuan kadar senyawa netral seperti air (Skoog et al., 2004). Oleh karena itu prinsip ini dapat diterapkan dalam penentuan kadar air secara digital pada instrumen *Moisture Analyzer*. Sampel yang mengandung air akan dipanaskan hingga 105 °C pada *sample pan*, sehingga air akan menguap dan disusul dengan munculnya angka kadar air (%) yang ditentukan dari berkurangnya kadar sampel selama pemanasan, sehingga instrumen secara otomatis akan menampilkan nilai kadar air dalam satuan persen (%).

Berdasarkan keputusan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor 12 tahun 2014 tentang persyaratan mutu obat tradisional menyatakan bahwa kadar air yang diperbolehkan pada simplisia tidak boleh lebih dari atau sama dengan 10%. Hasil yang didapatkan dalam penelitian

ini adalah 8,6%. Sehingga nilai kadar air simplisia *M. crenata* C. Presl memenuhi persyaratan dari BPOM. Nilai kadar air diatas 10% akan meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme didalamnya (Jessica et al., 2016), akibatnya simplisia akan mudah membusuk atau dapat menyebabkan perubahan pada beberapa parameter organoleptis serta masa simpan bahan (Chandra, 2015).

Tabel 5.1 Nilai Kadar Air Serbuk Simplisia Kering *M. crenata* C Presl

Ulangan	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
1	8,45	8,6
2	8,30	
3	9,07	

5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% *M. crenata* C. Presl

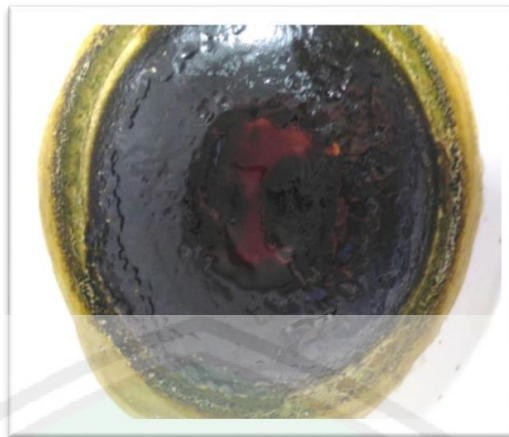
Ekstraksi sonikasi penelitian ini dilakukan dengan pelarut etanol 96%. Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut karena memiliki sisi polar (adanya gugus OH) dan sisi non-polar (rantai C-C) sehingga dapat melarutkan sebagian besar analit yang dikandung, selain itu etanol 96% juga membutuhkan titik didih yang rendah dan cenderung aman (tidak beracun dan berbahaya) (Ramadhan dan Phaza, 2010). Etanol 96% memiliki kandungan air yang lebih sedikit menyebabkan titik didihnya lebih rendah daripada etanol 80%, 70%, atau 50% sehingga senyawa yang termolabil tidak terdegradasi.

Serbuk simplisia seberat 30 gram diekstraksi dengan 500 mL etanol 96%, yang mana pada saat ekstraksi dibagi 3 *cluster* (200 mL, 150 mL, 150 mL). Tiap *cluster* diekstraksi selama 2 menit dengan 3 kali replikasi. Tujuannya agar optimum proses ekstraksi yang dilakukan (Rukiana, 2018). Ekstrak etanol dikumpulkan dengan cara filtrasi dengan kertas saring menggunakan corong

pisah. Tujuannya agar filtrat dan residu terpisah satu sama lain. Hasil ekstraksi sonikasi berupa ekstrak cair etanol 96% yang berwarna hijau tua.

Ekstrak etanol cair dipekatan sekaligus dihilangkan pelarutnya dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan putaran 175 psi. Alat tersebut bekerja dengan prinsip yang sama dengan distilasi (pemisahan) dengan ditambahkan pompa vakum untuk menurunkan titik didih pelarut 5 – 10 °C dibawahnya dan rotasi pada *evaporation flask* agar kerusakan sampel akibat pemanasan dapat diminimalkan. Perpaduan antara pompa vakum dan rotasi pada alat ini mempercepat penguapan pelarut sehingga efisien (Vogel, 1979; Abeysena and Darrington, 2014).

Pelarut yang menguap dalam bentuk gas akan melewati pendingin atau sistem kondensor dan kembali menjadi cairan yang turun ke bawah menuju *waste jar* dan labu tempat menampung pelarut hasil penguapan (Abeysena dan Darrington, 2014). Suhu yang diatur pada *waterbath* untuk pemanasan *evaporation flask* adalah 50 °C, karena titik didih etanol sebesar 78,37 °C (Mulyono, 2006). Dilakukan penguapan sampai ekstrak konsistensinya berubah menjadi lebih kental dan pekat. Sebagai langkah optimalisasi penghilangan pelarut, maka sampel dioven dengan suhu 40 °C hingga ekstrak menjadi kering.



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol 96% *M. crenata* C. Presl
(Sumber: Dokumentasi Putra, 2018)

Hasil yang diperoleh setelah dioven adalah ekstrak kering berwarna hijau tua pekat. Kemudian ekstrak tersebut ditimbang dan dihitung rendemennya. Rendemen digunakan sebagai salah satu parameter untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi yang dinyatakan dengan perbandingan antara jumlah ekstrak yang dihasilkan (berat akhir ekstrak) dengan jumlah bahan yang digunakan (berat awal simplisia) dikalikan dengan 100% (Warsono, 2013).

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

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

5.4 Pembuatan Fraksi Air *M. crenata* C. Presl

Metode yang digunakan untuk membuat fraksi air dari ekstrak etanol *M. crenata* C. Presl adalah ekstraksi cair-cair. Fraksinasi cair-cair merupakan suatu pemisahan yang didasarkan pada perbedaan kelarutan komponen dua pelarut yang

tidak saling bercampur. Alat yang digunakan adalah alat yang sederhana yaitu corong pisah. Prinsip fraksinasi menggunakan pelarut didasarkan pada distribusi zat terlarut dan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Harborne, 2006). Fraksinasi dimulai dari pelarut non-polar, dilanjutkan dengan pelarut semi-polar, dan ditutup dengan pelarut polar (Purwanto, 2015).

Dua pelarut yang tidak saling bercampur dalam penelitian ini adalah air dan pelarut lainnya secara berturut-turut n-heksan, etil asetat, dan n-butanol. Pemilihan pelarut ini karena memiliki kelarutan secara berturut turut 0,001%, 8,7%, dan 0,43% dengan air. Sementara nilai kepolaran berturut-turut dari n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan air adalah 0; 4,4; 4; dan 9 (Sadek, 2002). N-heksan menjadi pelarut pertama karena memiliki sifat non-polar dilihat dari nilai kepolaran. Etil asetat menjadi pelarut kedua karena memiliki sifat semi-polar ditinjau dari nilai kepolaran. N-butanol menjadi pelarut ketiga karena memiliki ikatan hidrogen yang kuat sehingga memiliki sifat polar. Ekstrak etanol 96% dibuat suspensi dengan penambahan air. Dilarutkan dengan pelarut lainnya dengan jumlah yang sama dalam corong pisah. Proses fraksinasi berlangsung saat dilakukan pengocokan. Senyawa akan terdistribusi berdasarkan kesamaan sifat polaritas dengan pelarut yang tidak saling campur tersebut tersebut

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk mengetahui keberadaan senyawa dalam fraksi. Fraksi yang ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄ 1 x 6 cm, plat tersebut dapat menampakan fluoresensi, sehingga senyawa-senyawa organik yang terikat dapat divisualisasikan dan diamati dengan sinar UV-Vis dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pada panjang gelombang, 254 nm plat

silika akan berflouresensi dan noda akan tampak gelap, sementara di panjang gelombang 365 nm noda akan berflouresensi dan plat silika akan tampak gelap. Langkah ini dilakukan setiap memisahkan 2 fase sebagai langkah klarifikasi. Jika fraksi yang telah difraksinasi masih terlihat noda maka dilakukan pengulangan fraksinasi hingga plat KLT bebas dari noda. Sehingga ditambahkan kembali pelarut yang sesuai kedalam corong pisah.

Fraksi air sebagai fraksi penutup dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan pengeringan dengan oven untuk menghilangkan pelarut. Setelah semua fraksi kering, kemudian dihitung rendemen dengan cara perhitungan berat akhir berbanding berat awal dalam persen. Perhitungan % rendemen dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Perhitungan Persen Rendemen

Fraksi	Total Fraksinasi	Berat Ekstrak (g)	Berat Fraksi (g)	Rendemen (%)
n-heksana	17	70	11,9032	17,004
Etil asetat	4		2,1215	3,0357
n-butanol	6		5,9733	8,5332
Air	-		27,7095	39,5850
Total				68,1534



Gambar 5.2 Hasil Pengeringan dengan Oven

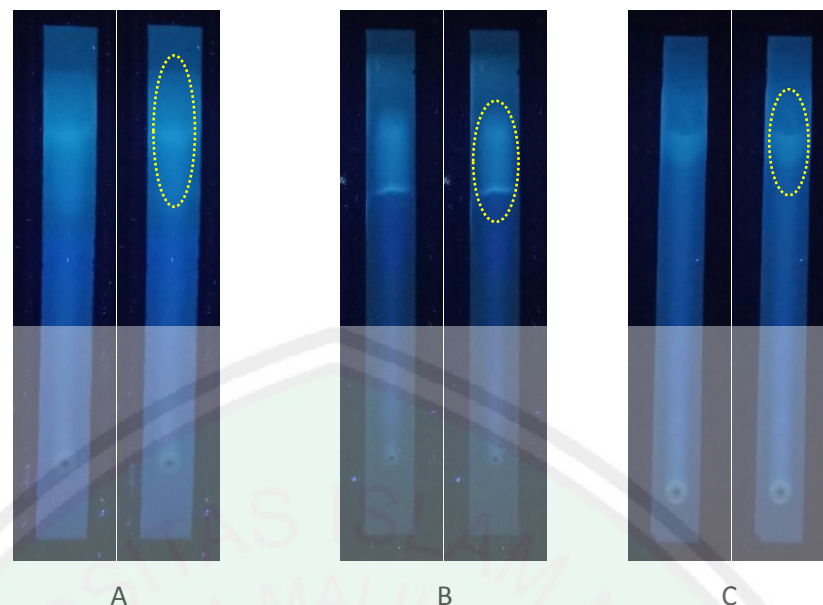
Hasil yang diperoleh setelah dioven adalah ekstrak kering berwarna coklat tua pekat. Kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya. Berdasarkan tabel 5.3

diatas, dapat diketahui adanya perbedaan persen rendemen pada tiap fraksi. Dimana persen rendemen tertinggi yang diperoleh secara berturut-turut yaitu fraksi air, fraksi n-heksan, fraksi n-butanol, dan fraksi etil asetat. Hal ini diduga karena sifat pelarut yang *like dissolve like*. Alasan tersebut menyebabkan suatu senyawa tertarik dengan *solvent* tertentu. Sehingga rendemen yang dihasilkan merupakan jumlah senyawa yang terekstrak oleh berbagai macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Harborne, 2006).

5.5 Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi air *M. crenata* C. Presl. Analisis fitokimia yang dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang divisualisasikan dengan *UV cabinet*. Analisis fitokimia dengan KLT ini memiliki prinsip adsorpsi dan partisi dimana sampel akan berpisah berdasarkan kepolaran antara fase diam dan fase geraknya (Depkes RI, 1979).

Fase diam menggunakan plat silica gel F₂₅₄ dan fase gerak dilakukan optimasi hingga didapatkan plat dengan spot noda yang jelas. Hasilnya didapatkan 3 terbaik fase gerak diantaranya metanol (7) : etanol (1) : air (2), metanol (7) : etanol (2) : air (1), dan metanol (9) : air (1). Perbandingan fase gerak tersebut untuk 10 mL. Ketiga pelarut tersebut memberikan hasil sebagai berikut.



Gambar 5.3 Hasil KLT Berbagai Fase Gerak (A) Metanol {7} : Etanol {2} : Air {1}, (B) Metanol {7} : Etanol {1} : Air {2}, dan (C) Metanol {9} : Air {1}.

Hasil yang didapatkan merupakan hasil yang kurang sempurna karena bercak sampel membentuk *tailing* atau ekor. Namun masih dapat dikenali golongan senyawanya yang dapat dilihat dalam Tabel 5.4. *Tailing* atau ekor dikarenakan oleh afinitas mol senyawa pada fase diam (silika gel) lebih besar dibandingkan dengan kemampuan fase gerak untuk membawa senyawa yang dikandung sampel. Hal ini menyebabkan senyawa tertinggal di silika gel dan membentuk ekor (Sudarmadji, 2007). Silika gel F₂₅₄ yang bersifat polar diduga memiliki afinitas yang kuat pada fraksi air yang juga bersifat polar. Sehingga diperlukan fase diam dengan sifat yang non-polar.

Tabel 5.4 Hasil Analisis KLT

No	Fase gerak	Rf	Warna di UV	Golongan
1	Metanol (7) : Etanol (2) : Air (1)	0,73	Biru muda	Flavonoid
2	Metanol (7) : Etanol (1) : Air (2)	0,68	Biru muda	Flavonoid
3	Metanol (9) : Air (1)	0,71	Biru muda	Flavonoid

Hasil KLT yang diperoleh pada 3 plat tersebut pada cahaya tampak adalah tidak terlihat. Sementara pada UV_{366nm} terlihat bercak yang berflouresensi biru muda pada ketiga plat dengan fase gerak yang berbeda tersebut. Pada sinar UV 366 nm dengan noda flouresensi biru muda hingga biru tua merupakan jenis flavonoid isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas (Mabry *et al.*, 1970).

5.6 Subkultur Sel

Kultur sel merupakan proses atau perpindahan sel dari manusia, hewan, atau tanaman ke dalam medium terkontrol yang sesuai untuk menumbuhkan sel tersebut. Kultur sel primer merupakan kultur sel langsung dari jaringan tubuh. Setelah subkultur pertama, kultur sel primer dikenal sebagai sel atau *subclone* (Khumairoh and Puspitasari, 2016). Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HMC3 yang didapatkan dari *American Type Culture Collection*. Sel ini merupakan *cell line* yang dikembangkan dari sel kultur primer mikroglia di laboratorium Prof. Tardieu tahun 1995 di Paris (Russo, *et al.* 2018).

Sel dikultivasi (biakan) dalam 15 mL Media Komplit (MK) dalam *flask*. *Flask* memiliki keuntungan pada volume sel yang yang ditampung lebih banyak dan lebih mencegah kontaminasi mikroba. Menurut ATCC (2017) MK berisi *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) dan penambahan *Fetal Bovine Serum* (FBS) serta antibiotik penisillin-streptomisin (penstrep). EMEM merupakan media berwarna merah yang mengandung 12 jenis asam amino non esensial, glutamin, 8 vitamin, dan beberapa garam anorganik (Liu, *et al.*, 2018). FBS merupakan serum yang diisolasi dari darah manusia didalamnya terdapat *growth factor* yang mampu meningkatkan proliferasi sel (Mojica-Henshaw, *et al.*

2013). Sementara penstrep digunakan untuk mencegah kontaminasi bakteri dan fungi (Freshney, 2008).

Media diganti setiap 2 hari sekali atau saat media telah berubah warna. Perubahan warna ini menandakan nutrisi pada media telah habis dan hasil dari respirasi sel (glikolisis). Pengamatan sel dilakukan dengan mikroskop *inverted* setiap hari. Mikroskop *inverted* merupakan mikroskop yang letak objektifnya berada di bawah plat, sehingga dapat mengamati sel yang melekat di dasar *flask* (Thorn, 2015). Pada saat pengamatan, apabila telah sampai tingkat pertumbuhan (kofluensi) 80 - 90%, maka pasase dapat dilakukan.

Pasase atau subkultur merupakan pemindahan beberapa atau semua sel dari medium lama ke medium baru. Tujuannya untuk memperpanjang hidup sel dan memperbanyak sel. Sel HMC3 memiliki sifat melekat (ATCC, 2017). Sehingga langkah pasase yang ditempuh adalah *scrapping* dengan penambahan Tripsin-EDTA. Tripsin merupakan enzim proteolitik untuk merusak ikatan peptida pada sel berfungsi untuk melepaskan sel yang telah melekat di *flask*. Sementara EDTA merupakan komplemen tripsin yang berfungsi meningkatkan aktivitas dari tripsin (Motyan dan Toszer, 2013).

Sel yang telah di pasase dapat ditanam dan dikultivasi kembali di flask baru atau disimpan. Penyimpanan sel HMC3 dengan metode pembekuan, metode tersebut dapat menghentikan proses metabolisme sel namun tidak mematikannya. Diperlukan tambahan DMSO sebagai agen krioprotektan. DMSO 10% dapat menjadikan komponen air dalam sel cenderung untuk membentuk struktur gelas (vitrifikasi) daripada membentuk struktur kristal sehingga menghambat formasi *intracellular es* (Hamidi, 2010).

5.7 Preparasi Sampel dan Uji Efek Neuroprotektif

Sampel yang akan diujikan ke dalam kultur sel harus memenuhi persyaratan utama yaitu larut dalam media kultur (CRCC, 2008). Sehingga untuk meningkatkan kelarutannya dibantu dengan DMSO 0,5% dan Tween 80 0,5%. DMSO merupakan pelarut yang bersifat bipolar atau sifat nonpolar dan polar. DMSO sering digunakan karena tidak memberikan efek yang berarti terhadap sampel atau sel uji, sehingga tidak mempengaruhi hasil pengujian (Tahar, *et al.*, 2015). Sementara Tween merupakan surfaktan yang mampu menurunkan tegangan permukaan. Tween 80 memiliki nilai HLB yang tinggi, sehingga memiliki sifat yang lipofilik. Hal tersebut membantu sampel melewati membran semipermeabel sel yang bersifat lipofilik juga (Rowe, *et al.*, 2009). Kemudian dilakukan pengenceran dengan DMSO hingga diperoleh dosis 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm.

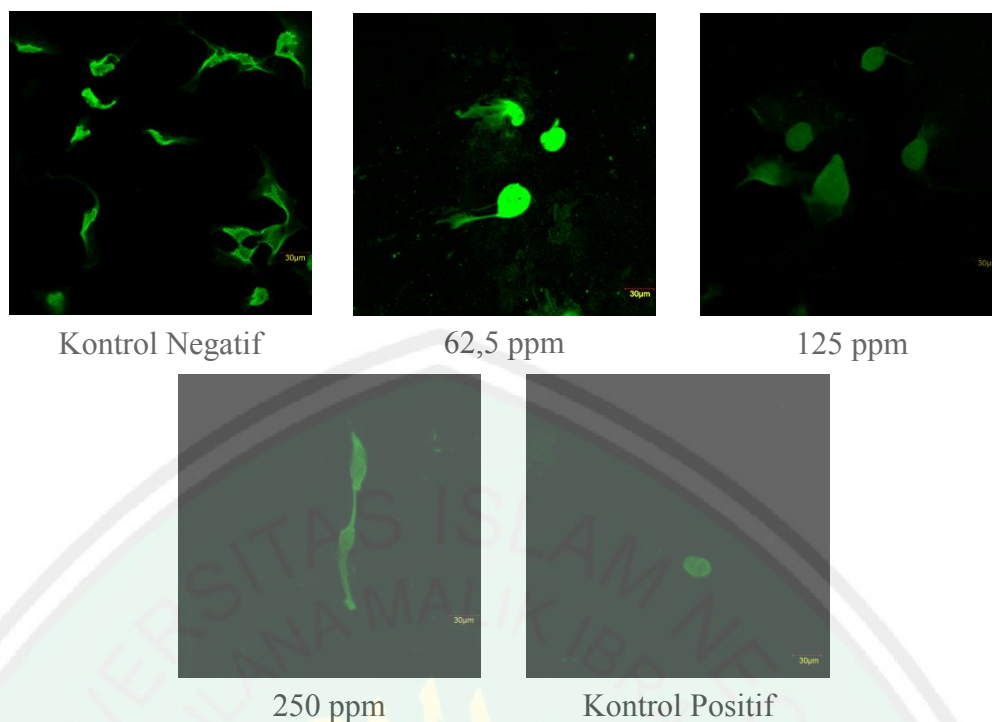
Sel ditanam dalam *24-well microplate* yang telah dimasukkan *coverslip* selama 48 jam. *Coverslip* difungsikan sebagai media sel melekat saat pengujian dengan CLSM. Masing-masing *well* diberikan IFN- γ sebagai pemicu neuroinflamasi. IFN- γ merupakan sitokin pro inflamasi yang mampu mengaktivasi makrofag dan menginduksi keluarnya marker MHC I maupun MHC II (Klaassen and Watkins, 2015). Lalu diberi perlakuan mulai dari kontrol negatif, dosis 62,5 ppm, dosis 125 ppm, dosis 250 ppm, dan kontrol positif dengan genistein.

Sel yang telah menerima perlakuan sampel kemudian aktivitasnya diamati dengan metode *immunocytochemistry* (ICC). ICC merupakan metode identifikasi aktivitas atau reaksi molekuler yang memanfaatkan reaksi antigen dengan

antibodi yang dianalisis dengan mikroskop dengan pembacaan label atau biomarker spesifik (Brooks, 2012). Reaksi imunologis ini mampu memvisualisasi biomarker untuk pengamatan aktivitas dalam bentuk fluoresensi. Protein yang dijadikan biomarker dalam penelitian ini adalah MHC II. Hal ini karena di mikroglia lebih dominan mengeluarkan MHC II saat terjadi inflamasi (Hayes, *et al.*, 1987). Terdapat 4 dasar perlakuan yang dilakukan.

Pertama, fiksasi dengan cara penambahan larutan PFA 4%. Fiksasi berguna untuk mencegah enzim proteolitik yang mampu memicu autolisis pada sel dan pemicu proses pembusukan atau kerusakan sel (Howat, *et al.*, 2014). Lalu, dilakukan tahapan permeabilisasi dengan pemberian triton X-100. Dalam kondisi normal, molekul antibodi terlalu besar dan bersifat ionik sehingga sulit menembus membran sel. Permeabilisasi membuat celah agar antibodi mampu melewati membran semipermeabel tersebut. (Koley dan Bard, 2010). Lalu, dilakukan tahapan *blocking* dengan pemberian BSA. Fungsinya untuk mencegah ikatan non-spesifik antigen dengan antibodi yang dapat menyebabkan positif palsu (Xiao dan Isaacs, 2012).

Tahapan selanjutnya adalah *immunostaining* dengan pemberian antibodi primer MHC II dan antibodi sekunder MHC II berlabel *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Tujuan pemberian antibodi primer untuk mengikat antigen spesifik MHC II. Kemudian, antibodi sekunder mengikat antibodi primer dan memancarkan fluoresensi warna tertentu (Brooks, 2012). Kemudian diambil *coverslip* dan diletakkan pada kaca preparat dan diamati di bawah CLSM. Diatur perbesaran mikroskop pada perbesaran 40 X pada panjang gelombang di 488 nm.



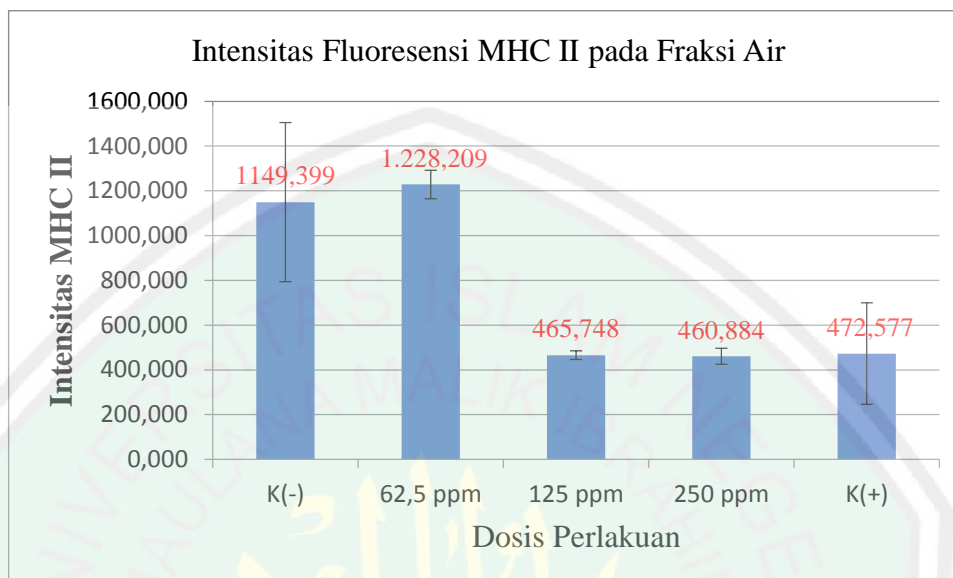
Gambar 5.4 Visualisasi MHC II pada HMC3 *sel* setelah pemberian berbagai perlakuan.

Tabel 5.5 Hasil Uji Aktivitas Fraksi Air *M. crenata* C. Presl

Dosis Perlakuan	Intensitas dari MHC II (AU) \pm SD
Kontrol (-) dengan IFN- γ	1.149,399 \pm 355,810
Dosis 62,5 ppm	1.228,209 \pm 63,748
Dosis 125 ppm	465,748 \pm 19,887
Dosis 250 ppm	460,884 \pm 35,259
Kontrol (+) dengan Genistein	472,577 \pm 226,701

Hasil yang diperoleh dari CLSM berupa gambar sel yang sedang berpendar berwarna hijau. Pendaran pada objek gambar tersebut lalu dianalisis secara kualitatif dengan *software* Olympus Fluoview Ver.4.2a. Hasil tersebut ditampilkan pada bentuk tabel di Tabel 5.5 dan grafik pada Gambar 5.5. Hasil yang diperoleh tidak linear, karena terjadi peningkatan MHC II pada dosis 62,5 ppm. Hal ini karena pengaruh *Non Monotonic Dose Response* (NMDR) yang

terjadi karena selektifitas reseptor. Namun dosis setelahnya linear dan untuk menentukan efek neuroprotektif memerlukan analisis data lebih lanjut supaya hasil lebih valid.



Gambar 5.5 Grafik Intensitas MHC II Fraksi Air *M. Crenata* C. Presl

5.7 Analisis Data

Analisis data terhadap hasil yang diperoleh dari perhitungan intensitas fluoresensi MHC II dilakukan menggunakan *software* IBM SPSS Statistic 24. Terdapat 3 hal yang ingin didapat dari pengolahan data ini diantaranya perbedaan per kelompok, korelasi per kelompok, dan ED₅₀. Analisis data diawali dengan uji beda (perbedaan per kelompok). Sebelum melakukan uji beda perlu diketahui jenis data bersifat parametrik atau non-parametrik. Untuk menyeleksi data ke dalam 2 kelompok tersebut maka dilakukan uji asumsi (syarat) meliputi uji normalitas dan uji homogenitas.

Menurut Ghazali (2016) uji normalitas dilakukan untuk menguji apakah dalam model regresi variabel independen dan variabel dependen atau keduanya

mempunyai distribusi normal atau tidak. Apabila variabel tidak berdistribusi secara normal maka hasil uji statistik akan mengalami penurunan. Interpretasi dari Uji *Shapiro Wilk* menyatakan apabila nilai signifikansi diatas 0,05 maka data terdistribusi normal. Sedangkan jika nilai signifikansi dibawah 0,05 maka data tidak terdistribusi dengan normal.

Tabel 5.6 Uji Normalitas dengan Uji *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Sig.
K (-) IFN- γ	0,529
62,5 ppm	0,993
125 ppm	0,544
250 ppm	0,217
K (+) Genistein	0,471

Berdasarkan tabel 5.6 diperoleh nilai signifikansi dari kelima perlakuan lebih besar dari 0,05, yang berarti bahwa data dari masing – masing perlakuan yang didapat adalah berdistribusi normal. Kemudian, dilanjutkan analisis data homogenitas dengan Uji *Levene*. Menurut Sugiyono (2013) Uji homogenitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Interpretasi dari Uji *Levene* menyatakan apabila nilai signifikansi dibawah 0,05, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama. Apabila nilai signifikansi diatas 0,05, maka dikatakan bahwa varian dari dua atau

lebih kelompok populasi data adalah sama. Berikut data hasil uji homogenitas Uji *Levene* ditunjukkan pada tabel 5.7 sebagai berikut.

Tabel 5.7 Uji Homogenitas dengan Uji *Levene*

<i>Leven's test</i>	Sig.
6,286	0,006

Berdasarkan dari uji homogenitas yang ditunjukkan pada tabel 5.7 menunjukkan bahwa data memiliki nilai signifikansi 0,006. Nilai signifikansi yang didapat lebih rendah dari 0,05, maka varian dari dua atau lebih dosis perlakuan data tidak homogen. Sehingga diketahui bahwa data memiliki distribusi yang normal dan tidak homogen. Menurut Sugiyono (2013) data dengan distribusi normal dan tidak homogen masuk kedalam golongan data non parametrik. Maka analisis data yang sesuai adalah uji *Kruskal Wallis*. Interpretasi dari nilai *Kruskal Wallis* menyatakan bahwa apabila nilai signifikansi diatas 0,05, maka tidak terdapat perbedaan antar perlakuan. Apabila nilai signifikansi dibawah 0,05, maka terdapat terdapat perbedaan antar perlakuan.

Tabel 5.8 Uji *Kruskal Wallis*

Uji <i>Kruskal Wallis</i>	Sig.
	0,023

Berdasarkan tabel 5.8 data diatas memiliki nilai signifikansi 0,000, yang berarti berada dibawah 0,023, maka terdapat perbedaan antar dosis perlakuan. Sehingga fraksi air *M. crenata* C. Presl memiliki efek neuroprotektif terhadap sel mikroglia HMC3 yang diinduksi oleh IFN- γ . Analisis data dilanjutkan dengan Uji *post hoc* (uji lanjutan) dengan metode Uji *U Mann Whitney*. uji ini bertujuan

untuk mengetahui secara nilai signifikansi perbedaan antar perlakuan dari data dosis perlakuan dan intensitas tanpa asumsi homegenitas varian. Intepretasi dari Uji *U Mann Whitney* menyatakan bahwa apabila nilai signifikansi dibawah 0,05, maka terdapat perbedaan yang signifikan antar data.

Tabel 5.9 Uji *U Mann Whitney*

	K (-) IFN- γ	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	K (+) Genistein
K (-) IFN- γ		0,513	0,034*	0,034*	0,050*
62,5 ppm	0,513		0,034*	0,034*	0,050*
125 ppm	0,034*	0,034*		0,773	0,480
250 ppm	0,034*	0,034*	0,773		0,480
K (+) Genistein	0,050*	0,050*	0,480	0,480	

*Beda signifikansi jika nilai signifikansi < 0,05

Berdasarkan tabel 5.9 secara umum menyatakan adanya perbedaan yang signifikan antar dosis perlakuan karena memiliki nilai signifikansi dibawah 0,05. kecuali dosis perlakuan antara kontrol negatif dengan dosis 62,5 ppm, dosis 125 ppm dengan 250 ppm, 125 ppm dengan kontrol positif dan 250 ppm dengan kontrol positif karena memiliki nilai signifikansi diatas 0,05. Nilai signifikansi 0,050 dianggap beda signifikan berdasarkan pengamatan data.

Kemudian analisis kedua yaitu analisis korelasi. Menurut Yamin (2018) analisis ini merupakan metode statistik yang digunakan untuk mengukur besarnya hubungan antara dua variabel atau antarset-variabel. 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 5.10 Klasifikasi Uji Korelasi

Nilai Korelasi	Makna
0,00 – 0,24	Sangat lemah
0,25 – 0,49	Lemah
0,5 – 0,74	Kuat
0,75 – 1,00	Sangat Kuat

(Gani, 2015)

Pemilihan metode korelasi data berdasarkan asumsi. Menurut Yamin (2018) Apabila data termasuk dalam data non parametrik maka menggunakan Uji *Spearman Rho*.

Tabel 5.11 Uji *Spearman's Rho*

Spearman's Rho	Sig.
- 0,645	0,005

Berdasarkan hasil analisis dari Uji *Spearman's Rho* didapat korelasi antara dosis dengan intensitas MHC II (r) adalah - 0,645. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi hubungan yang kuat antara penambahan dosis dengan intensitas MHC II yang kuat. Sedangkan arah hubungan adalah negatif karena r negatif, maka semakin tinggi dosis akan semakin rendah intensitas MHC II. Sementara angka signifikansi 0,000 menyatakan bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara dosis dengan intensitas MHC II.

Tabel 5.12 Nilai *Effective Dose*

Probability	Estimasi (ppm)
0,400	4,010
0,450	3,673
0,500	3,341
0,550	3,010
0,600	2,678

Terakhir, dilakukan analisis ED₅₀ dengan Regresi Probit. Menurut Tinungki (2010) regresi probit adalah suatu analisis regresi yang digunakan untuk menggambarkan hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Hasil nilai uji probabilitas yang ditunjukkan pada tabel 5.12 yaitu nilai ED₅₀ bernilai 3,341. Jadi nilai ED₅₀ yang menunjukan nilai dosis efektif yang dapat diberikan yaitu sebesar 3,341 ppm. Sehingga dengan dosis 3,341 ppm menyebabkan 50% efek neuroprotektif dari fraksi air *M. crenata* C. Presl pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi IFN- γ . Nilai signifikansi yang bermakna dari keseluruhan kelompok uji menunjukan bahwa kandungan senyawa fitoestrogen yang diduga terdapat pada fraksi air daun *Marsilea crenata* C. Presl memiliki aktivitas farmakologi dalam neuroprotektif.

5.8 Mekanisme Aksi Neuroprotektif

Estrogen merupakan hormon primer pada perempuan dan memiliki peran yang penting terhadap inflamasi, khususnya neuroinflamasi. Karena estrogen merupakan faktor transkripsi yang mampu berinteraksi dengan faktor transkripsi lainnya. Faktor transkripsi yang berinteraksi dan dipengaruhi aktivitasnya oleh

estrogen adalah Nf- κ B (Kalaitzidis and Gilmore, 2005). Nf- κ B merupakan faktor transkripsi yang mengendalikan produksi sitokin yang mampu merangsang respon inflamasi. Nf- κ B berwujud sekelompok heterodimer yang tersusun dari berbagai macam protein yang berlokasi di sitoplasma (Tilstra et al., 2011).

Nf- κ B yang berada di sitoplasma merupakan Nf- κ B yang belum aktif dan memerlukan stimulus berupa sitokin pro inflamasi, salah satunya IFN- γ . Hadirnya IFN- γ menyebabkan fosforilasi pada ikatan heterodimer Nf- κ B. Hal ini menyebabkan Nf- κ B melepaskan ikatan dengan regulatornya, yakni I κ B. Nf- κ B yang telah dalam keadaan tunggal (sendiri) akan melakukan translokasi ke nukleus. Bersama-sama dengan ko-aktivator menuju *target gene* di rantai DNA tertentu untuk mengaktifasi mikroglia (Kalaitzidis and Gilmore, 2005). Aktifnya makrofag dapat diketahui dari tereskresinya beberapa biomarker, yang spesifik di neuron ialah MHC II (Green, et al. 2017).

Estrogen yang terdapat di otak dapat berlekatan dengan ER sehingga mampu meregulasi proses neuroinflamasi dalam jumlah yang tepat. Namun, pada wanita pasca menopause yang telah kehilangan kemampuan memproduksi estrogen secara endogen kehilangan regulator yang menyebabkan neurodegeneratif. Fitoestrogen dalam *M. crenata* C. Presl memiliki afinitas dengan ER- β . Aktivitas yang ditimbulkan sama dengan aktivitas estrogen. Fitoestrogen berikatan dengan ER- β di membran atau sitoplasma dengan jalur *ER dependent, membrane-initiated estrogen signaling* (Cui, et al., 2013). Estrogen yang teraktivasi mampu mencegah fosforilasi, sehingga Nf- κ B tetap berpasangan dengan I κ B.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini tidak linear pada control negative dengan dosis 62,5 ppm. Hal ini karena terjadi fenomena *non-monotonic dose response* (NMDR). Secara matematik NMDR merupakan perubahan arah *slope* (positif atau negatif) antara aktivitas dengan pemberian obat yang linear (Lagarde, *et al.*, 2015). NMDR dapat terjadi pada sel, jaringan, hewan, dan populasi manusia karena pemberian nutrisi, vitamin, hormon, maupun bahan kimia yang berinteraksi dengan reseptor termasuk hormon yang bersifat mengganggu. Sehingga hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan hipotesis awal. Hal tersebut dapat dilihat pada pemberian fraksi air *M. crenata* C. Presl pada dosis 62,5 ppm yang memberikan intensitas yang melampaui kontrol negatif. Salah satu penyebabnya adalah selektivitas reseptor (Vandenberg, *et al.* 2012).

Hal tersebut diduga fitoestrogen dosis rendah berikatan dengan ER-X, bukan dengan ER- β . ER-X banyak terdapat di membran sel dan memiliki afinitas tinggi terhadap senyawa estrogen (Cui, *et al*, 2013). Namun, memiliki aktivitas yang berbeda dengan ER- β . Senyawa estrogen yang berlekatan dengan ER-X menyebabkan fosforilasi tirosin pada jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK/ERK). Fosforilasi tersebut mengaktivasi *Extracelular Signal-Reguated Kinase* (ERK) yang dapat menentukan arah transkripsi sel. ERK mampu memberikan signal kepada sel untuk melakukan apoptosis (Subramaniam and Unsicker, 2009). Sehingga sitokin pro-inflamasi meningkat, dalam hal ini adalah MHC II.

5.9 Efek Neuroprotektif Fraksi Air *M. Crenata* C. Presl dalam Perspektif Islam

Seorang muslim percaya adanya Allah SWT melalui berbagai macam penciptaannya yang dapat dilihat, bukan berdasarkan zat atau wujud-Nya yang tak ada manusia dapat melihatnya di alam dunia. Penciptaan alam semesta dan isinya merupakan bukti dari keagungan Allah SWT. Hal ini tercantum dalam Al-Qur'an Surah Shad 27, bahwa Allah SWT berfirman:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ
لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٥٦﴾

Artinya: “Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.”

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidaklah sia-sia, setiap penciptaan yang ada di langit dan bumi memiliki hikmah yang dapat diambil pelajaran. Sehingga sebagai manusia yang percaya akan adanya Allah SWT maka wajib bagi setiap muslim memahami dan merenungkan apa saja yang telah diciptakan oleh-Nya. Salah satu bentuk keagungan Allah SWT adalah tumbuh-tumbuhan. Allah SWT berfirman dalam surah Asy-Syu'ara' ayat 7:

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

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

Lafadz كُلُّ زَوْجٍ كَرِيمٍ menurut tafsir jalalain berarti pelbagai tumbuh-tumbuhan yang baik berarti berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat. Salah satu manfaatnya adalah sebagai agen neuroprotektif yang ditemukan dalam *M. Crenata* C. Presl. Berdasarkan penelitian yang dilakukan terdapat dosis yang efektif dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada sel mikroglia. Ini menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di muka bumi ini memiliki kadar dan ukuran masing-masing. Hal ini sesuai dengan firman Allah dalam Al-Qur'an surah Al-Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

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

Menurut Shihab (2002), bahwa ayat ini menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah. Ukuran yang sesuai dengan hikmah bisa diartikan bahwa ukuran dan takaran yang telah ditetapkan yang dapat berkhasiat atau bermanfaat bagi makhluk Allah SWT. Konteks ukuran yang sesuai dengan hikmah merupakan dosis efektif (ED₅₀) fraksi air *M. Crenata* C. Presl yang memberikan pengaruh neuroprotektif pada sel mikroglia HMC3 sebesar 3,341 ppm.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Fraksi air *Marsilea crenata* C. Presl mempunyai efek neuroprotektif pada sel yang diinduksi oleh IFN- γ .
2. *Effective dose 50* (ED₅₀) pada fraksi air *Marsilea crenata* C. Presl yang mempunyai efek neuroprotektif pada sel yang diinduksi oleh IFN- γ didapat 3,341 ppm.

6.2 Saran

Saran dalam penelitian ini lebih pada kolaborasi dengan data *metabolite profiling* dan *docking molecule* secara *in silico* untuk memastikan senyawa yang bertanggungjawab terhadap efek neuroprotektif. Serta lebih komprehensif dilakukan uji sitotoksik terhadap fraksi air *M. crenata* C. Presl agar dapat mengetahui indeks terapi. Sebagai kontrol positif, optimasi kadar isolat genistein pada sel mikroglia pada HMC3 perlu dilakukan karena studi pendahuluan tentang penggunaan genistein masih terbatas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeseyna, I. dan Darrington, R. 2014. *Understanding Evaporation and Concentration Technologies. Part 1-Basic Principle of Commonly Used Evaporation Technologies*. Ipswich: Genevac Ltd.
- Adityara, R. A. 2017. Uji Aktivitas Antiosteoporosis Fraksi Etil Asetat Daun *Marsilea crenata* Presl. dalam Meningkatkan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Mencit Betina (Skripsi). Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Aemi., N., Y. 2012. Uji Aktivitas Antiosteoporosis Fraksi N-Heksan Daun *Marsilea crenata* Presl. dalam Meningkatkan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Mencit Betina. (Skripsi). Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Afriastini JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. Di dalam: *de Winter WP, Amoroso VB, editor. Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI
- Aryani, Benita. 2013. Penentuan Faktor dan *Setting* Parameter Optimal untuk Meminimalkan Jumlah Cacat Roti Smeer dengan Desain Eksperimen (Skripsi). Yogyakarta: Program Studi Teknik Industri, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Atma Jaya
- Asl, S. Z., Khaksari, M., Khachki, A. S., Shahrokhi, N and Nourizade, S. 2013. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 119:353–361.
- Astuti, F. 2013. Analisis fitokimia dan aktivitas antibakteri semanggi air *Marsilea crenata* Presl (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- ATCC. HMC3 (ATCC® CRL-3304™) American Type Culture Collection. www.atcc.org.
- 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).
- Best, B., P. 2015. Cyroprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*. Vol 18. No 5.
- 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

- Bolin, A. and Whelehan P. 2015. *Human Sexuality: Biological, Pshycological, and Cultural Perspectives*. New York: Taylor & Francis.
- Brooks, S. A., Dwek, M., dan Schumacher, U. 2012. *Basic Immunochemistry for Light Microscopy*.
- Burry, R. W. 2010. *Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research*. New York: Springer.
- Cersosimo, M. G. and Bennaroch, E. E. 2015. Estrogen Action in The Nervous System. *Clinical Implication of Neuroscience Research*. Vol. 85.
- Chamniansawat, Siriporn and Chongthammakun, Sukumal., 2015. Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis by Reactive Microglia Leads to Down-Regulation of Synaptic Protein Expression. Chonburi: *NeuroToxicology* 46 (25 – 34).
- Chandra, A. 2015. Studi Awal Ekstraksi Batch Daun Stevia *Rebaudiana* dengan Variabel Jenis Pelarut dan Temperatur Ekstraksi. *Pro Sem Nas Masy Biodiv Indon*. Vol 1. No 1.
- 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 Viroto, M., 2008. In: Otles, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*. CRC Press, pp. 85–94.
- Chen, Wei-Wei., Zhang, Xia., and Huang, Wen-Juan. 2016. Role of Neuroinflammation in Neurogenerative Disease. *Jiangsu: Molecular Medicine Report* 13 : 3391 – 3396.
- Choi, Y. S., Cho, H. Y., Hoyt, K. R., Naegele, J. R. and Obrietan, K. 2008. IGF-1 Receptor-Mediated ERK/MAPK Signaling Couples Status Epilepticus to Progenitor Cell Proliferation in the Subgranular Layer of the Dentate Gyrus. *Glia*. Vol. 56. Hal 791 – 800.
- Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. 2010. *Laser Scanning Confocal Microscopy*. Der Hautarzt.
- Coeling Benning, H. J. T., Holinka, C. F. and Diczfalusy, E. 2008. Estetrol Review: The Profile and Potential Clinical Applications. *Climateric*. Vol. 1. No. 1.
- Cos, P., Bruyne, T. D., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., Vlietinck, A. J. 2003. *A Review : Phytoestrogen Recent Developments*.

- Cui, J., Shen, Y and Li, Rena. 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways During Ageing: from Periphery to Brain. *Trends Mol Med.* 19(3): 197–209. doi:10.1016/j.molmed.2012.12.007.
- Czlonkowska, A., Ciesielska, A., Joniec., I. 2003. Influence of Estrogens on Neurodegenerative Processes. New York: *Medical Science Monitor.* Vol. IX: 10.
- D, Farfara., V. Lifshitz., D. Frenkel. 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell Mol. Med.* 12(3), 762-780.
- Dean, J. C., Kusaka, R., Walsh, P. S., Allais, F., Zwier, T. S. 2014. Plant Sunscreen in The UV-B: Ultraviolet Spectroscopy of Jet-Cooled Sinapoyl Maleate, Sinapic Acid, and Sinapate Ester Derivatives. *Journal of The American Chemical Society.* Vol 136. No 42.
- DeFranco, A., Locksley, R., Robertson, M. 2007. *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease.* Oxford: New Science Press
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes, RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes, RI. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dey, P. M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry.* Vol I. USA: Academic Press. Halaman 81-82.
- Dipiro, T. Joseph., Talbert, L. Robert., Yee, C. Gary. 2007. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach 7th Edition.* New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- DiSabato, D. J., Quan, N., Godbout, J. P. Neuroinflammation: The Devil is in The Details. *Journal of Neurochemistry.* doi: 10.1111/jnc.13607.
- El Khoury, J. dan Luster, A., D. 2008. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci.* 29(12), 626-632.
- Endang, L, E. 2016. *Imunitas: Sarana Organ Beraktivitas.* Surabaya: Sandira Surabaya.
- Esclapez, M. D., Garcia-Perez, J. V., Mulet, A. and Carcel, J. A. 2011. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev.* Vol. 3 Hal. 108 – 120.

- Eyo, U. B dan Long-JunWu. 2013. Bidirectional Microglia-Neuron Communication in the Healthy Brain. *Hindawi Publishing Corporation*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/456857>.
- Filiano, A., Gadani, S., Kipnis, J. 2015. Interactions of Innate and Adaptive Immunity in Brain Development and Function. *Brain Res*. Vol 1617.
- Filliano, A. J., Gadani, S. P. and Kipnis, J. 2015. Interactions of Innate and Adaptive Immunity in Brain Development and Function. *Brain Res*. Vol. 1617. Hal. 18 – 27.
- Freshney, R.I. 2008. *Culture of Animal Cells, A Manual Of Basic Technique And Specialized Application 6th ed*. New York: Wiley-Blackwell.
- Gani, I. dan Amalia, S. 2015. Alat Analisis Data: Aplikasi Statistik untuk Bidang Ekonomi dan Sosial. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Ghani, Lannywati. 2009. Seluk Beluk Menopause. Jakarta: *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. Vol. XII : 4.
- Ghisletti, Serena., Meda, Clara., Maggi, Adriana., and Vegeto., Elisabetta. 2005. 17β -Estradiol Inhibit Inflammatory Gene Expression by Controlling NF- κ B Intracellular Localization. Washington: *American Society for Microbiology*. Vol. XXV: 8.
- Ghozali, Imam. 2016. *Aplikasi Analisis Multivariete Dengan Program IBM SPSS 23 Edisi 8*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Gorenstein, Clarice., Renno, Joel., and Gianfaldoni, Arlete. 2011. Estrogen Replacement Therapy and Cognitive Functions in Healthy Postmenopausal Women: A Randomized Trial. Muenchen: *Archives of Women's Mental Health* 14 (367-373).
- Green, Daniel S., Youn, Howard A. and Valencia, Julio C. 2017. Current Prospect of Type II Interferon Gamma Signaling and Autoimmunity. *The Journal of Biology Chemistry*.
- Gundersen, V., Storm-Mathisen, J dan Bergerse, L. H. 2015. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*. No 95.
- Hamidi, N. 2010. Studi Inhibisi Formasi Kristal Es dengan Krioprotektan Sukrosa dan Gliserol. *Jurnal Rekayasa Mesin*. Vol 1. No 1.
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. oleh Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Harry, G. J., McPherson, C. A., Wine, R. N., Atkinson, K. dan Lefebvre d'Hellencourt, C. 2004. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotox. Res*. 5. 623–627.

- Hayes, G. M., Woodroffe, M. N., Cuzner, M. L. 1987. Microglia are The Major Cell Type Expressing MHC Class II in Human White Matter. *Journal of The Neurological Science*. Vol 80. No 1.
- Howat, W., J. dan Wilson, B., A. 2014. Tissue Fixation and The Effect of Molecular Fixative on Downstream Staining Procedure. *Methods*. Vol 30.
- Iswahyuni, N. 2011. Pemberian Ekstrak Plasenta Meningkatkan Estradiol dan FSH serta Mengurangi Gejala Menopause (Tesis). Denpasar: Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Jantarantotai A,N., Utaisincharoen B,P., Sanvarinda A,P., Thampithak C,A., Sanvarinda, Y. 2013. Phytoestrogens Mediated AntiInflammatory Effect Through Suppression Of IRF-1 and PSTAT 1 Expressions in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology* 17 : 483–488.
- Jessica, Chandra, A. dan Suharto, I. 2016. Pengaruh Variasi Ukuran Daun Stevia dan Perbandingan Umpan pada Karakteristik Produk Gula Cair Stevia. *Pro Sem Nas Teknik Kimia "Kejuangan"* (17 Maret 2016)
- Kalaitzidis, D and Gilmore, T., D. 2005. Transcription Factor Cross Talk: The Estrogen Receptor and Nf-kB. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. Vol.16 No.2.
- Kallioliias, George D. and Ivashkiv Lionel. B. 2010. Overview of The Biology of Type 1 Interferon. *Arthritis Research and Therapy*. Volume 12. Nomor 1.
- Kaltschmidt, B and Kaltschmidt, C. 2009. *NF-kB in The Central Nervous System*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a001271.
- Katno. and Pramono, S. 2008. Tingkat Manfaat dan Keamanan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. *Balai Penelitian Tanaman Obat Tawangmangu*.
- Kettenmann, H dan Verkhratsky, A. 2013. *Neurosciences in The 21st Century*. Singapore: Springer Science Business Media.
- Khaksari, M., Soltani, Z., Shahrokhi, N., Moshtaghi, G., Asadikaram, G. 2011. The Role of Estrogen and Progesterone, Administered Alone and in Combination, in Modulating Cytokine Concentration Following Traumatic Brain Injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 89:31–40.
- Khumairoh, I. and Puspitasari, I. M., 2016. Kultur Sel. *Farmaka*. Vol 14. No 2.
- Klaassen, C., Watkins, J, B. 2015. *Casarett & Doull's: Essential of Toxicology*. New York: McGrawHill Medical.
- Koley, D., dan Bard, A. J. 2010. Triton X-100 Concentration Effects on Membrane Permeability of Single HeLa Cell by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *PNAS*. Vol 107. No 39.

- Kreutzberg, G., W. 1996. Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS. *Trends in Neurosciences*. Vol 19. No 8.
- Kusumaningtyas, E. Widiati, R. and Gholib D. 2008. Uji daya hambat ekstrak dan krim ekstrak daun sirih (*Piper betle*) terhadap *C. Albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes*. Di dalam: *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Yogyakarta 11-10 Maret 2008.
- 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.
- Lagari, S.V. and Levis, S. 2010. Phytoestrogens and Bone Health. *Current Opinion in Endocrinolog, Diabetes, and Obesity*. 17: 546-553.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol. 47. No. 2. Page 112-117.
- Laswati, H. 2007. Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodelling Tulang Perempuan Pascamenopause Melalui Peran Reseptor Estrogen dan Sel Osteoblast (Disertasi). Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- 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 – An Unanswered Issue. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol 2 No 1.
- 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.
- Li, S and Zhang B. 2013. Traditional Chinese Medicine Network Pharmacology: Thory, Methodology, and Application. *Chinese Journal of Natural Medicines*. Vol 11. No 2.
- Liu, X., Kiefl, R., Roskopf, C., Tian, F., Huber, R. M. 2016. Interaction among Lung Cancer Cells, Fibroblast, and Macrophages in 3D Co-Cultures and The Impact on MMP-1 and VEGF Expression. *PLos One*. Vol 11. No 5.
- Ma'arif, B., Agil M., dan Laswati, H. 2016. Phytochemical Assessment On n-hexane Extract And Fractions Of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS. *Traditional Medicine Journal*, Volume 2, Pages 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).
- Ma'arif, Burhan Z., A. 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 : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Marbry, T., Markham, K., and Thomas, M. 1970. *The Systematic Identification of* : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrew, H., Sanchez-Contreras, A. and Patheco, N. 2017. Ultrasound Assisted Extraction for The Recovery of Phenolic Compound from Vegetables Sources. *Agronomy*. Vol. 7. No. 47.
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., Pfaff, D. W., Ogawa, S., Rohrer, S. P., Schaeffer, J. M., McEwen, B. S., Alves, S. E. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 144: 2055–2067.
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., and Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 8:112. doi: 10.3389/fncel.2014.00112.
- Motyán, J. A., Toth, F., Tozser, J. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*. Vol 3.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Makasar : Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar.
- Mulyono, HAM. 2006. Kamus Kimia. Jakarta: Bumi Aksara.
- Nakagawa, Y. dan Chiba, K. 2015. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 154, 21–35. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.06.010.
- Nantasomsaran P, Nakornsri K, Rujirapongchai P. 2013. *Utilization of Weeds in Thailand*. Thailand: The 4th Tropical Weed Science Conference.
- Ngaha Njila, M., Mahdi, E., Massoma-Lembe, D., Nde, Z. and Nyonseu, D. 2017. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolite. Di dalam: *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*. Kuala Lumpur, 22 – 24 Mei 2017.

- Nurjanah, A. A., and Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol. 1. No. 3. Page 152-158.
- Odugbemi, T. 2008. *A Textbook of Medicinal Plants from Nigeria*. Yoba-Lagos: University of Lagos Press.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., dan Harry, G. J. 2016. Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665. doi: 10.1111/bph.13139.
- 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., Comas-Hererra, A., Knapp, M., Guerchet, M., Karagiannidou, M. *World Alzheimer Report 2015*. London: Alzheimer's Disease International.
- Purwanto, Sigit. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggangi (*Melastoma malabathricum* L) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*. Vol 2. No 2.
- Ramadhan, A.E. dan Phaza, H.A. 2010. Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu, dan Jumlah Stage pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) secara Batch [Skripsi]. Semarang: Teknik Kimia, FT, UNDIP.
- 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.
- Rowe, R., Sheskey, P., dan Quinn, M. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipient Sixth Edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Rukiana. 2018. Metabolite Profiling Ekstrak Daun *Marsilea crenata* Presl. Menggunakan UPLC-QToF-MS/MS dengan Variasi Pelarut (Skripsi). Malang: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 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.
- Sadek, Paul. 2002. *The HPLC Solvent Guide*. New York: Wiley-Interscience.
- Sahetapi, M. Cynthia., Luhulima, M. June., Simatupang, Abraham. 2014. Apoptosis pada Penyakit Neurodegeneratif. Jakarta: *Majalah Kedokteran UKI*. Vol. XXX : 1.
- Saifudin, A., Rahayu, V. dan Teruna, H. Y. 2011. *Standarisasi Bahat Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

- Schoenborn, Jamie R. and Wilson, Christopher B. 2007. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*. Volume 96.
- Sherwood, L. 2016. *Human Physiology From Cell to The System 9th Edition*. Boston: Cengage Library.
- Shih R-H, Wang C-Y and Yang C-M. 2015. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front. Mol. Neurosci.* 8:77. doi: 10.3389/fnmol.2015.00077.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta : Lentera Hati.
- Shirwaikar A, Khan S, Malini S. Antiosteoporotic effect of ethanol extracts of *Cissus quadrangularis* Linn on ovariectomized rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89:245-50.
- Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P. dan Rivest, S. 2006. Bone Marrow-derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 49. 489–502.
- Skoog, D. A., 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Kanada: Brooks/Cole.
- Slone, Ethel. 1994. *Anatomy and Physiology*. Jakarta: EGC.
- Speroff Leon., Fritz Marc A. 2005. *Menopause and the Perimenopausal Transition*. New York : Lippincott Williams & Wilkins.
- Steenis, Van, C.G.G.J., 1975, *Flora: Untuk sekolah di Indonesia*. Jakarta: Paradnya Paramita.
- Subramaniam, S. and Unsicker, K. 2009. ERK and Cell Death: ERK 1/2 in Neuronal Death.
- Sudarmadji, S. 2007. *Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Surabaya: PT. Bina Ilmu.
- Sugiyono. 2010. *Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Suzumura, A. 2013. Neuron-Microglia Interaction in Neuroinflammation. *Current Protein and Peptide Science*. Vol. 14. Hal. 16-20.
- Syahidah, H. N., dan Hadisaputri, Y. E. 2016. Media yang Digunakan pada Kultur Sel. *Jurnal Farmaka*. Vol. 4. No 3.
- Tahar, N., Haeria., Hamdana. 2015. Uji Aktivitas Penghambatan Fraksi Non Polar Ekstrak Klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm. F) terhadap Sel Kanker Hela. *JF FIK UINAM*. Vol. 3. No. 3.

- Tang, Y dan Le, W. 2015. *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. New York : Springer Science and Business Media.
- Taylor, M. J., Minter, M. R., Newman, A. G., Zhang, M., Adlard, P. A. and Crack, P. J. 2014. Type-1 Interferon Signaling Mediates Neuro-inflammatory Events in Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. Volume 35: 1012 – 1023.
- Thorn, K. 2015. A Quick Guide to Light Microscopy in Cell Biology. *Molecular Biology of The Cell*. 219 – 222.
- ThyaGarajan, S., Hima, L., Pratap, U. P., Priyanka, H. P., Vasantarekha, R. 2018. Estrogen-induced Neuroimmunomodulation as Facilitator of and Barrier to Reproductive Aging in Brain and Lymphoid Organs. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Vol 95.
- 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., 2007. Studi Mikroskopis dan Skringing Fitokimia *Marsilea crenata Presl* (Skripsi). Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Trisunuwati, Pratiwi. 2017. Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Against Blood Estrogen-Pregesterone Balance, Blood Calcium Level and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Rattus novergicus*). *Research Journal of Life Science*. Vol : 1.
- 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.
- Varnum, M., and Ikezu, T. 2012. The Classification of Mikroglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer's Disease Brain. *Arch. Immunol. Ther. Exp*. Vol 60.
- Venn, R.F. 2008. *Principles and Practices of Bioanalysis. Edisi kedua*. Paris: Taylor and Francis Group Ltd. Halaman 23-25.
- Verkhatsky, A dan Parpura, V. 2014. Neurological and Psychiatric Disorders as a Neuroglial Failure. *National Institutes of Health*. No 116 (2).
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., Hubinger, M. D. 2013. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *J. Food Eng*. Vol 119. pp, 196–204.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simon, L. and Bates, D. 2008. Applications and Opportunities for Ultrasound Assisted Extraction in The Food Industry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol. 9. Hal. 161 -169.

- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Society*.
- Vogel. 1979. *Buku Teks Analisis Anorganik Makro dan Semimakro*. Jakarta: PT. Kalman Media Pustaka.
- Voight. 1994. *Buku Pengantar Teknologi Farmasi*. oleh Soedani. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Warsono, L. B., Atmaka, W., Amanto, B. S. 2013. Ekstraksi Chasew Nut Shell Liquid (CNSL) dari Kulit Biji Mete dengan Menggunakan Metode Pengrepesan. *Jurnal Teknosains Pangan*. Vol 2 No 2.
- Widiasari, F. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula vertebra mencit betina (Skripsi) : Universitas Airlangga.
- Wilkinson, B., Koenigsnecht-Talboo, J., Grommes, C., Lee, C. Y. & Landreth, G. 2006. Fibrillar β -amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J. Biol. Chem.* 281. 20842–20850.
- Xiao, Y., dan Isaacs, S., N. 2012. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Blocking with Bovine Serum Albumin (BSA) – Not All BSAs are Alike. *Journal of Immunology Methods*. Vol 384.
- 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. Description and Histological Changes in The Chemical Composition of The Leaves and Stalks of *Marsilea crenata* Presl. by Boiling. *Journal of Fishery Products Processing Indonesia XII*. 2: 81-95.
- Yamin, S. dan Kurniawan H. 2018. *SPSS Complete: Teknik Analisis Terlengkap dengan Software SPSS*. Jakarta: Salemba Infotek.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 51. Page 229-235.
- Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X and He C (2017) Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. *Front. Neuroanat.* 11:77. doi: 10.3389/fnana.2017.0007.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Determinasi Tanaman *M.crenata* C. Presl



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

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

KOTA BATU

65313

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

Memenuhi permohonan saudara :

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

1. Perihal determinasi tanaman semanggi air

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi : Pteridophyta (paku-pakuan)
Kelas : Pteridopsida
Ordo : Salviniales
Famili : Marsileaceae
Genus : Marsilea
Spesies : *Marsilea crenata* Presl
Sinonim : *Marsilea quadrifolia* Bl. ; *M. minuta* L.

Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi

Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1

2. Morfologi : Habitus ; Semak, menjalar, panjang ± 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 Simplicia : *Marsilea crenata* folium / Daun semanggi air.
4. Kandungan Kimia : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol
5. Penggunaan : Penelitian
6. Daftar Pustaka :
- Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/> salam, Diakses 14 Februari 2007
 - Anonim, <http://www.plantamor.com/semanggi> , diakses 11 Desember 2010
 - Steenis, CGGJ Van Dr , *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
 - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

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

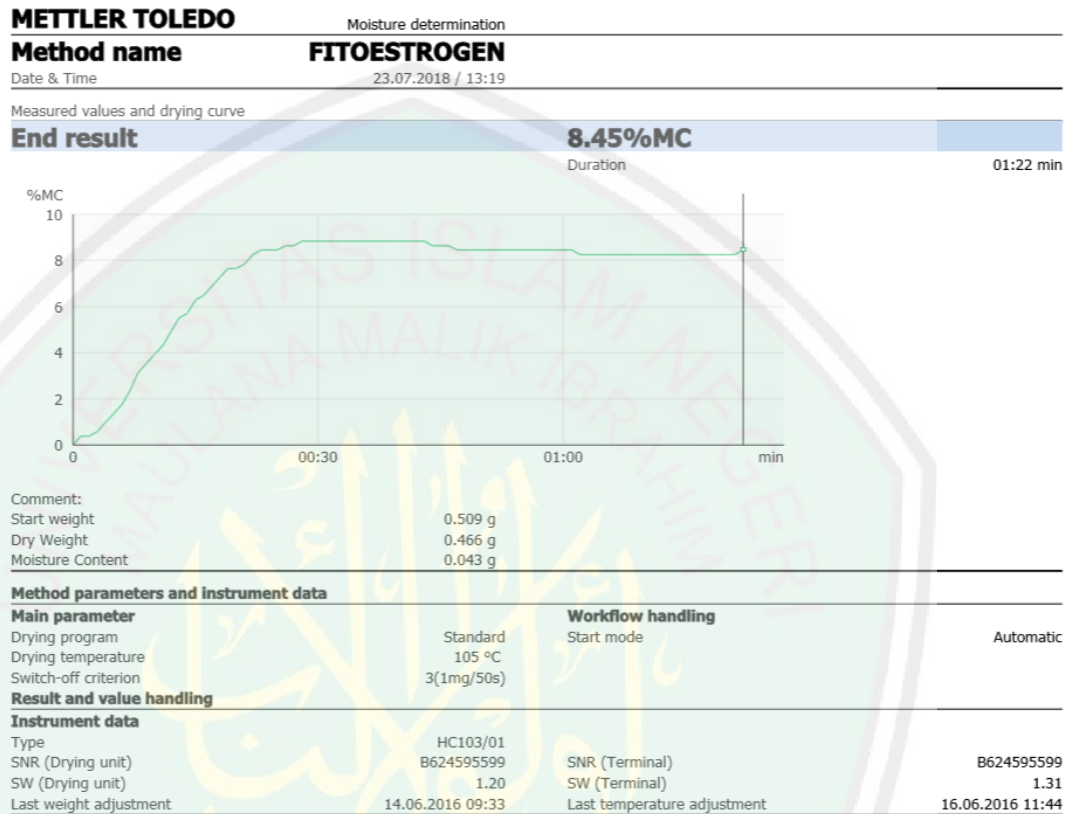
Batu, 05 Oktober 2017

Kepala UPT Materia Medica Batu

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

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

A. Replikasi 1



B. Replikasi 2

METTLER TOLEDO

Moisture determination

Method name**FITOESTROGEN**

Date & Time

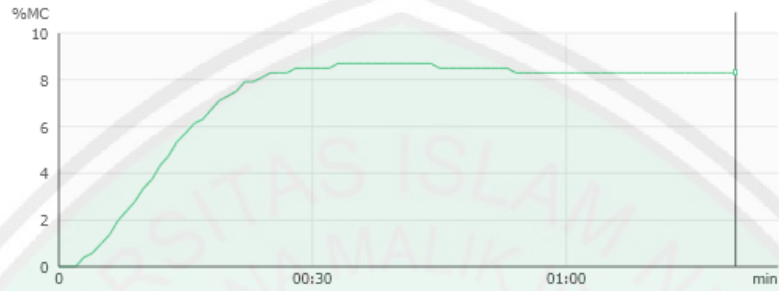
23.07.2018 / 13:24

Measured values and drying curve

End result**8.30%MC**

Duration

01:20 min



Comment:

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

Method parameters and instrument data**Main parameter**

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

Workflow handling

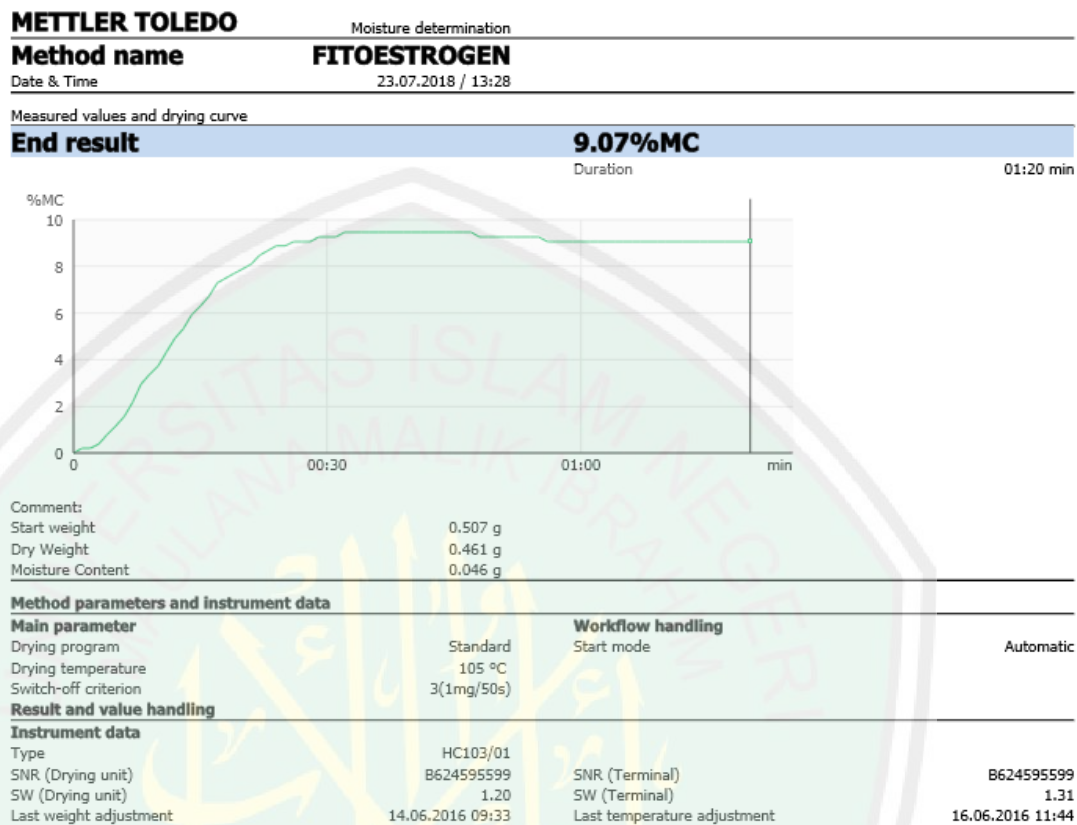
Start mode

Automatic

Result and value handling**Instrument data**

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

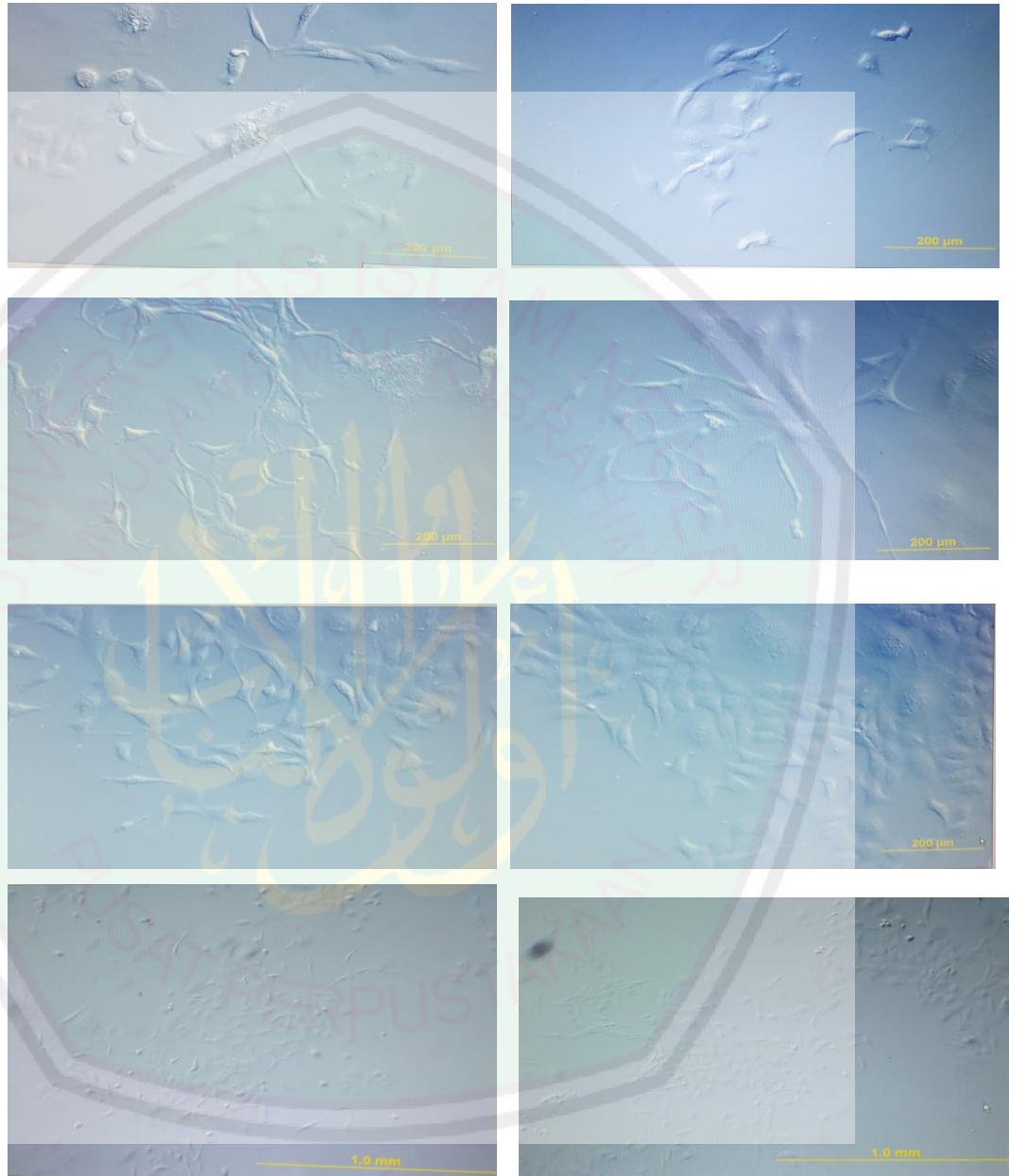
C. Replikasi 3

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

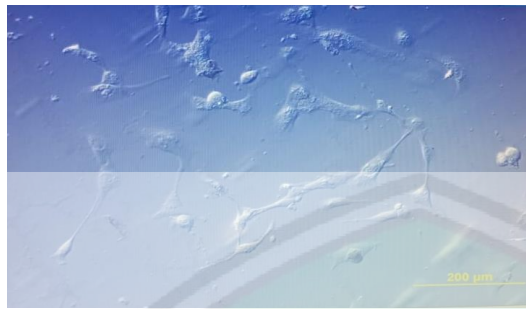
Nama Sampel	Replikasi	Berat Awal	Berat Akhir	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)
Serbuk kering simplisia daun <i>M.crenata</i>	1	0,509 g	0,466 g	8,45 %	8,6 %
	2	0,506 g	0,464 g	8,30 %	
	3	0,507 g	0,461 g	9,07%	

Lampiran 3 Hasil perlakuan uji aktivitas metode ICC

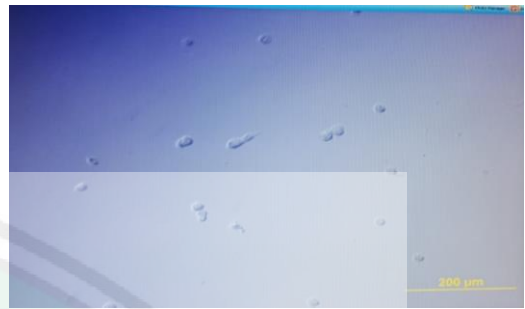
A. Pengamatan sel HMC3 sebelum pemberian IFN- γ



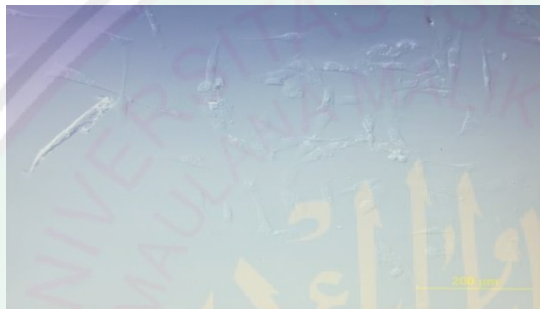
B. Pengamatan sel HMC3 setelah pemberian IFN- γ



Kontrol Negatif



Kontrol Positif



62,5 ppm



125 ppm



250 ppm

Lampiran 4. Perhitungan dan Preparasi Sampel

A. Pembuatan Larutan Induk Sampel 5.000 ppm

- $5.000 \text{ ppm} = 50 \text{ mg/ x}$
- $x = 50 \text{ mg}/5.000 \text{ ppm}$
- $x = 0,01 \text{ L}$
- $x = 10 \text{ mL}$

B. Pembuatan Media Perlakuan

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

C. Pembuatan PFA 4 %

- Ditimbang PFA 4 gram
- Disiapkan 100 mL PBS
- Dicampur 4 gram dengan 100 mL PBS dalam erlenmeyer.
- Dikocok pelan-pelan sampai agak larut (warna putih) dan ditutup aluminium foil.
- Dipanaskan dan distirrer hingga larutan berwarna bening.
- Setelah bening, matikan heating tunggu hingga dingin.
- Difilter dan disimpan di suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

D. Pembuatan PBS

- Ditimbang NaH_2PO_4 0,035 g
- Ditimbang Na_2HPO_4 0,128 g
- Ditimbang NaCl 0,8 g

- Dicampur semua yang telah ditimbang dan dilarutkan dengan WFI 10 mL.
- Ditambahkan WFI hingga tanda batas di labu ukur 50 mL dan dihomogenkan.

E. Pengenceran IFN- γ

- Induksi IFN- γ
 $9 \text{ well} \times 300 \mu\text{L} = 2.700 \mu\text{L} = 3 \text{ mL}$
- Stok IFN- γ 1 $\mu\text{g/mL} = 1000 \text{ ng/mL}$
- IFN- γ 10 μg (dosis literature)
 $V1 \times M1 = V2 \times M2$
 $V1 \times 1000 \text{ ng/mL} = 3 \text{ mL} \times 10 \text{ ng}$
 $V1 = 0,03 \text{ mL}$
 $V1 = 30 \mu\text{L}$
- Cara Pembuatan
 1. Diambil MK (penstrep + FBS) 3 ml, dikurangi 30 μL
 2. Diambil Media kultur sebanyak 3 ml, dikurangi 30 μL
 3. Ditambahkan dengan IFN- γ 30 μL dari stok 1 $\mu\text{g/mL}$
 4. Di *mix gentle*
 5. Diambil *well-microplate* dari inkubator
 6. Diambil media dari *well-microplate*
 7. Dimasukkan IFN- γ pada masing-masing *well-microplate*
 8. Diinkubasi kembali dalam inkubator 37°C

F. Pengenceran Fraksi Air

- Perhitungan Fraksi Air

1. Fraksi air konsentrasi 62,5 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

2. Fraksi air konsentrasi 125 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

3. Fraksi air konsentrasi 250 ppm

$$V1. M1 = V2. M2$$

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

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

- Pembuatan fraksi air

1. Fraksi air konsentrasi 62,5 ppm

- a. Diambil 350 μL dari fraksi 125 ppm

- b. Ditambah media 350 μL dalam eppendorf, dihomogenkan

2. Fraksi air konsentrasi 125 ppm

- a. Diambil 550 μL dari fraksi 125 ppm

- b. Ditambah media 550 μL dalam eppendorf, dihomogenkan

3. Fraksi air konsentrasi 250 ppm

- a. Diambil 62,5 μL dari fraksi 125 ppm

- b. Ditambah media 1187,5 μL dalam eppendorf,
dihomogenkan

G. Pengenceran DMSO

- $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
- $V_1 \times 100\% = 50 \text{ mL} \times 0,5\%$
- $V_1 = 0,25 \text{ mL}$

H. Pengenceran Genistein

- Genistein
 $2 \text{ well} \times 300 \mu\text{L} = 600 \mu\text{L} = 0,8 \text{ mL}$
- Stok Genistein 1 mM
- Genistein 50 μM
 $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
 $V_1 \times 1000 \mu\text{M} = 0,8 \text{ mL} \times 50 \mu\text{M}$
 $V_1 = 0,04 \text{ mL}$
 $V_1 = 40 \text{ mL}$

I. Pembuatan BSA 1 %

- Perhitungan BSA 1 %
 $\frac{1}{100} \times 3.100 = 0,031 \text{ g dalam } 3.100 \text{ mL PBS}$
- Cara pembuatan
 1. Ditimbang BSA 0,031 g.
 2. Dilarutkan dalam 3.100 mL PBS
 3. Dihomogenkan

J. Pembuatan Reagen Antibodi Primer

- Perhitungan Reagen Antibodi Primer

$$\frac{1}{200} \times 3.100 \mu\text{L} = 15,5 \mu\text{L}$$

- Cara Pembuatan

1. Diambil BSA 3.100 μL
2. Dikurangi 15,5 μL
3. Ditambah stok antibodi primer 15,5 μL
4. Dihomogenkan

K. Pembuatan Reagen Antibodi Sekunder

- Perhitungan Reagen Antibodi Sekunder

$$\frac{1}{500} \times 3.100 \mu\text{L} = 6,2 \mu\text{L}$$

- Cara Pembuatan

1. Diambil BSA 3.100 μL
2. Dikurangi 6,2 μL
3. Ditambah stok antibodi sekunder 6,2 μL
4. Dihomogenkan

L. Pembuatan 0,1% Triton

- Perhitungan 0,1% Triton

$$\frac{0,1}{100} \times 3.100 \mu\text{L} = 3,1 \mu\text{L}$$

- Cara Pembuatan

1. Diambil 3100 μL PBS
2. Dikurangi 3,1 μL PBS
3. Ditambahkan triton 3,1 μL kemudian dihomogenkan.

Lampiran 5. Hasil Analisis Data

A. Uji Normalitas dengan Uji *Shapiro-Wilk*

DOSIS		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
INTENSITAS	KONTROL NEGATIF	,278	3	.	,940	3	,529
	62,5 PPM	,175	3	.	1,000	3	,993
	125 PPM	,241	4	.	,921	4	,544
	250 PPM	,296	4	.	,847	4	,217
	GENISTEIN	,290	3	.	,925	3	,471

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas dengan Uji *Levene*

Test of Homogeneity of Variances				
INTENSITAS	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	6,286	4	12	,006

C. Uji Komparasi Non-parametrik menggunakan Uji *Kruskal-Wallis*

Test Statistics ^{a,b}	
INTENSITAS	
Chi-Square	11,366
df	4
Asymp. Sig.	,023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
DOSIS

D. Uji Post-hoc Komparasi dengan Uji *U Mann Whitney*

Test Statistics ^a		Test Statistics ^a		Test Statistics ^a	
	INTENSITAS		INTENSITAS		INTENSITAS
Mann-Whitney U	3,000	Mann-Whitney U	,000	Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	9,000	Wilcoxon W	10,000	Wilcoxon W	10,000
Z	-,655	Z	-,2121	Z	-,2121
Asymp. Sig. (2-tailed)	,513	Asymp. Sig. (2-tailed)	,034	Asymp. Sig. (2-tailed)	,034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,700 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b
Kontrol Negatif dengan 62,5 ppm		Kontrol Negatif dengan 125 ppm		Kontrol Negatif dengan 250 ppm	
	INTENSITAS		INTENSITAS		INTENSITAS
Mann-Whitney U	,000	Mann-Whitney U	,000	Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000	Wilcoxon W	10,000	Wilcoxon W	6,000
Z	-,2121	Z	-,2121	Z	-,1964
Asymp. Sig. (2-tailed)	,034	Asymp. Sig. (2-tailed)	,034	Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b
62,5 ppm dengan 125 ppm		62,5 ppm dengan 250 ppm		62,5 ppm dengan Genistein	
	INTENSITAS		INTENSITAS		INTENSITAS
Mann-Whitney U	7,000	Mann-Whitney U	4,000	Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	17,000	Wilcoxon W	14,000	Wilcoxon W	14,000
Z	-,289	Z	-,707	Z	-,707
Asymp. Sig. (2-tailed)	,773	Asymp. Sig. (2-tailed)	,480	Asymp. Sig. (2-tailed)	,480
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,886 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,629 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,629 ^b
125 ppm dengan 250 ppm		125 ppm dengan Genistein		250 ppm dengan Genistein	
	INTENSITAS		INTENSITAS		INTENSITAS
Mann-Whitney U	,000	Mann-Whitney U	,000	Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000	Wilcoxon W	6,000	Wilcoxon W	6,000
Z	-,1964	Z	-,1964	Z	-,1964
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050	Asymp. Sig. (2-tailed)	,050	Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b
Kontrol Negatif dengan Genistein					

E. Uji Korelasi dengan Uji *Spearman's Rho***Correlations**

			DOSIS	INTENSITAS
Spearman's rho	DOSIS	Correlation Coefficient	1,000	-,645**
		Sig. (2-tailed)	.	,005
		N	17	17
	INTENSITAS	Correlation Coefficient	-,645**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,005	.
		N	17	17

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



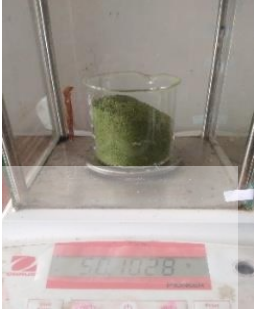





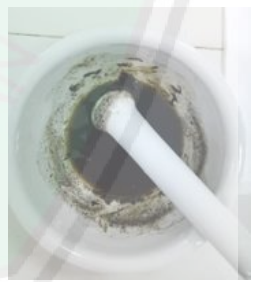






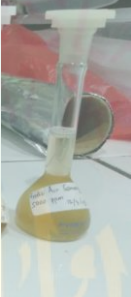



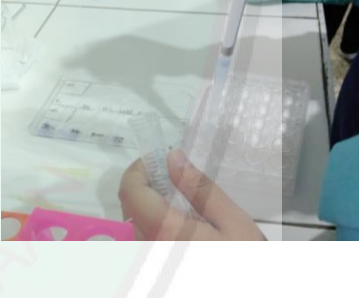


F. Uji Analisis Probit (ED₅₀)**Confidence Limits**

95% Confidence Limits for DOSIS				
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	,010	9,477	7,084	18,654
	,020	8,758	6,624	16,893
	,030	8,302	6,330	15,777
	,040	7,959	6,109	14,939
	,050	7,679	5,928	14,257
	,060	7,442	5,773	13,678
	,070	7,234	5,637	13,170
	,080	7,047	5,514	12,717
	,090	6,877	5,403	12,304
	,100	6,721	5,299	11,925
	,150	6,075	4,866	10,361
	,200	5,561	4,511	9,128
	,250	5,120	4,194	8,083
	,300	4,724	3,894	7,160
	,350	4,358	3,593	6,328
	,400	4,010	3,272	5,573
	,450	3,673	2,908	4,897
	,500	3,341	2,470	4,311
	,550	3,010	1,936	3,821
	,600	2,673	1,299	3,417
	,650	2,325	,571	3,070
	,700	1,958	-,245	2,753
	,750	1,563	-,158	2,443
	,800	1,122	-,2197	2,120
	,850	,608	-,3425	1,760
	,900	-,038	-,4986	1,324
	,910	-,195	-,5365	1,220
	,920	-,364	-,5776	1,107
	,930	-,551	-,6230	,984
	,940	-,759	-,6737	,848
	,950	-,997	-,7316	,693
	,960	-,1276	-,7997	,511
	,970	-,1619	-,8835	,289
	,980	-,2075	-,9950	-,005
	,990	-,2794	-,11,710	-,466

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 6. Dokumentasi Alat dan Penelitian

		
<p>(1) Proses pengeringan daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(2) Proses <i>grinding</i> simplisia menjadi serbuk daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(3) Proses penimbangan simplisia daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>
		
<p>(4) Proses ekstraksi daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(5) Proses penyaringan ekstrak cair daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(6) Proses pemisahan pelarut dari ekstrak menggunakan <i>Rotary Evaporator</i></p>
		
<p>(7) Proses pengeringan ekstrak etanol 96% daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(8) Penimbangan ekstrak etanol 96% daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>	<p>(9) Pembuatan suspensi air pada ekstrak etanol 96% daun <i>M.crenata</i> C. Presl</p>

		
(10) Proses fraksinasi air	(11) Proses penguapan pelarut pada fraksi air	(12) Penimbangan fraksi air
		
(13) Penambahan tween 80% dan DMSO pada fraksi air	(14) Pembuatan larutan induk 5000 ppm fraksi air	(15) Sterilisasi fraksi air
		
(16) Pengenceran sampel fraksi air 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm	(17) Pemberian larutan Triton X-100	(18) Pencucian dengan PBS sebelum diberikan antibodi sekunder
		
(19) <i>Plate</i> fraksi air	(20) Analisis dengan CLSM	

