

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl) PADA SEL hFOB 1.19 DENGAN METODE
MICROTETRAZOLIUM (MTT) ASSAY**

SKRIPSI

Oleh :

NABILA ROSA MAULIDIA

NIM. 16670025



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata*
C. Presl) PADA SEL hFOB 1.19 DENGAN METODE *MICROTETRAZOLIUM* (MTT)
ASSAY**

SKRIPSI

Oleh:

**NABILA ROSA MAULIDIA
NIM. 16670025**

Diajukan Kepada:

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

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl) PADA SEL hFOB 1.19 DENGAN METODE
MICROTETRAZOLIUM (MTT) ASSAY**

SKRIPSI

Oleh:

**NABILA ROSA MAULIDIA
NIM. 16670025**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 22 Juni 2020**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



**Meilina Ratna D., S.Kep., Ns. M.Kep
NIP. 19820523 200912 2 001**

Mengetahui,

Ketua Program Studi Farmasi



**apt. Abdurrahman, M.P.I., M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl) PADA SEL hFOB 1.19 DENGAN METODE
MICROTETRAZOLIUM (MTT) ASSAY**

SKRIPSI

Oleh:

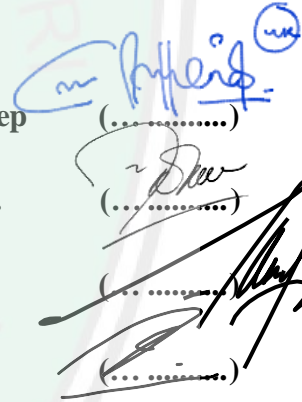
**NABILA ROSA MAULIDIA
NIM. 16670025**

Telah dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

Tanggal : 22 Juni 2020

Ketua Penguji : 1. Meilina Ratna D., S.Kep., Ns. M.Kep
NIP. 19820523 200912 2 001

Anggota Penguji : 1. apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm.
NIP. 19900221 201801 1 001
2. apt. Alif Firman F., M.Biomed.
NIP. 19920607 201903 1 206
3. Ach. Nasichuddin, MA
NIP. 19730705 200003 1 000



Mengetahui,

Ketua Program Studi Farmasi



apt. Abdul Hakim, M.P.I., M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nabila Rosa Maulidia

NIM : 16670025

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi
(*Marsilea crenata* C.Presl) pada Sel hFOB 1.19 dengan Metode
Microtetrazolium (MTT) Assay.

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

Malang, 22 Juni 2020

Yang membuat pernyataan


Nabila Rosa Maulidia

LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil 'alamiin

Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT serta mencurahkan shalawat serta salam kepada Nabi Muhammad SAW sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Dengan ucapan rasa syukur, penulis mempersembahkan tulisan ini kepada:

Kedua orangtua Bapak Riyadi dan Ibu Rulik Yuliati yang senantiasa mendukung baik berupa do'a, motivasi, materi dan masih banyak yang lain yang tidak dapat disebutkan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1 ini dengan lancar.

Keempat saudara saya yang selalu menemani, memberikan semangat, memberikan hiburan dalam penyelesaian skripsi ini, sehingga penulis mampu membangkitkan semangat kembali untuk menyelesaikannya.

Keluarga besar, tetangga-tetangga, dan yang kenal dengan penulis yang sering menanyakan kapan wisuda. Terima kasih telah mendoakan saya

Saya ucapkan terima kasih juga kepada Bapak/Ibu dosen yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, teman-teman Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim dan teman-teman serta kakak-kakak dan adik-adik dalam proyek Fitoestrogen yang memberikan motivasi dan semangat selama penyelesaian skripsi ini.

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

Nabila Rosa Maulidia
16670025

MOTTO

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

"Maka Sesungguhnya Beserta Kesulitan Ada Kemudahan"

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

"Sesungguhnya Beserta Kesulitan Ada Kemudahan"

(Surat Al-Insyirah ayat 5-6)

Menghindari masalah atau cobaan dalam hidup tidak akan mengubah suatu apapun, yang harus kita lakukan adalah menghadapinya

(Jiraiya Sensei)

Aku tidak khawatir akan jadi apa aku di masa depan nanti, apa aku akan berhasil atau gagal. Tapi yang pasti, apa yang aku lakukan sekarang akan membentukku di masa depan nanti

(Naruto Uzumaki)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan pada kehadiran Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayahnya-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C.Presl) Pada Sel hFOB 1.19 dengan *Microtetrazolium* (MTT) Assay”. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian Sarjana Farmasi, Program Studi Farmasi di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penyusunan skripsi ini bisa terselesaikan tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W, M.Kes, Sp.Rad(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. apt. Abdul Hakim, M.P.I., M.Farm selaku ketua program studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm dan Ibu Meilina Ratna D., S.Kep., Ns. M.Kep selaku dosen pembimbing skripsi dan Bapak apt. Alif Firman F.,

M.Biomed selaku penguji skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.

5. Prof.Ir. Yenny Risjani, DEA, PhD, selaku kepala Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan Helly Nurul Karima, SPt., MP dan Choirunil Chotimah, S.Si., M.Si selaku Laboran Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya
6. Segenap civitas akademika Program Studi Farmasi terutama seluruh dosen yang telah memberikan ilmu yang tidak terbatas selama kuliah di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Orang tua tercinta, Bapak Riyadi dan Ibu Rulik Yuliati dan keempat saudara saya yang senantiasa memberikan doa, semangat kepada penulis dalam menuntut ilmu
8. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu namun telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa di dalam naskah skripsi ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, namun penulis tetap berharap semoga naskah skripsi ini bisa bermanfaat kepada para pembaca, khususnya bagi penulis secara pribadi. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik-kritik yang dapat menyempurnakan karya ini.

Malang, Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
MOTTO	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
ABSTRAK	xviii
ABSTRACT	xix
مستخلص البحث.....	xx
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif	6
1.5. Batasan Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Tanaman Semanggi	7
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Semanggi	7
2.1.2 Habitus dan Morfologi	7
2.1.3 Manfaat Kandungan	8
2.2. Metode Ekstraksi	10

2.3. <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>	10
2.4. Ekstrak	11
2.5. Fitoestrogen.....	12
2.6. Tulang	15
2.6.1 <i>Remodelling Tulang</i>	16
2.6.2 Komponen Penyusun Tulang	18
2.7. Osteoporosis	19
2.7.1 Pengertian Osteoporosis.....	19
2.7.2 Patogenesis Osteoporosis	20
2.7.3 Patofisiologi Osteoporosis	20
2.7.4 Jenis Osteoporosis	22
2.8. Sel hFOB 1.19	24
2.9. Uji Sitotoksitas	25
2.10. Metode <i>Microtetrazolium assay</i>	26
2.11. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reader</i>	27
2.12. Pemanfaatan Tumbuhan dalam Perspektif Islam.....	29
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1. Kerangka Konseptual	31
3.2. Uraian Kerangka Konseptual	32
3.2. Hipotesis	32
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitan	33
4.2. Waktu dan Tempat	33
4.3. Sampel Penelitian	34
4.3.1 Sampel Tanaman.....	34
4.3.2 Sampel Sel.....	34
4.3.3 Teknik Pengambilan Sampel.....	34
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
4.4.1 Variabel penelitian	34
4.4.2 Definisi Operasional Variabel.....	35
4.5. Alat dan Bahan Penelitian	36
4.5.1 Alat	36

4.5.1.1 Preparasi Sampel.....	36
4.5.1.2 Analisis Kadar Air dengan <i>Moisture Analyzer</i>	36
4.5.1.3 Ekstraksi Ultrasonik <i>M.crenata</i>	36
4.5.1.4 Kultur sel hFOB 1.19	37
4.5.1.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay.....	37
4.5.2 Bahan Penelitian	37
4.5.2.1 Ekstraksi Ultrasonik <i>M.crenata</i>	37
4.5.2.2 Kultur sel hFOB 1.19	37
4.5.2.3 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay	37
4.6. Prosedur Penelitian	37
4.6.1 Determinasi Tanaman	38
4.6.2 Preparasi Sampel	38
4.6.3 Analisis Kadar Air dengan <i>Moisture Analyzer</i>	38
4.6.4 Prosedur Ekstraksi	39
4.6.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay	39
4.6.5.1 Pembuatan Media Kultur	39
4.6.5.2 Subkultur Sel hFOB 1.19	40
4.6.5.3 Pembuatan dan Penambahan Larutan Sampel pada <i>Plate</i> berisi Sel hFOB 1.19	41
4.6.5.4 Pemberian Larutan MTT	44
4.6.5.5 Pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA	44
4.7. Analisis Data	45
4.8. Alur Penelitian	46
DAFTAR PUSTAKA	47

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 <i>Plate 96-well</i> untuk uji sitotoksisitas <i>M. crenata</i>	43
Tabel 5.1 Jumlah daun <i>M.crenata</i>	49
Tabel 5.2 Hasil uji kadar air serbuk simplisia <i>M.crenata</i>	50
Tabel 5.3 Hasil perhitungan randemen ekstrak <i>M.crenata</i>	53
Tabel 5.4 Hasil Analisa Probit	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Semanggi	7
Gambar 2.2 Proses mekanisme ekstraksi UAE.....	10
Gambar 2.3 Sel Tulang (ob : osteoblas; oc : osteoklas).....	19
Gambar 2.4 Reaksi reduksi tetrazolium menjadi <i>formazan</i>	27
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian.....	46
Gambar 5.1 Gambaran mikroskopik sel hFOB 1.19.....	59
Gambar 5.2 Grafik viabilitas sel	60



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Determinasi Tanaman	74
Lampiran 2 Analisa Kadar Air	75
Lampiran 3 Skema Kerja	77
Lampiran 4 Pengenceran Ekstrak.....	83
Lampiran 5 Perhitungan Randemen.....	85
Lampiran 6 Pembuatan Larutan MTT dan Reagen SDS 10%	86
Lampiran 7 Perhitungan IC ₅₀ dengan program SPSS.....	87
Lampiran 8 Dokumentasi Alat dan Proses Penelitian.....	93

DAFTAR SINGKATAN

Mg	= mikrogram
ALP	= <i>Alkaline Phosphatase</i>
ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	= Adenosin Triphosphate
BMD	= <i>Bone Mineral Density</i>
BMPs	= <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BMUs	= <i>Bone Multicellular Units</i>
BSC	= <i>Bio Safety Cabinet</i>
cm	= centimeter
DMEM	= <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	= <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ELISA	= <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER β	= <i>Estrogen Receptor β</i>
ERE	= <i>estrogen response element</i>
FBS	= <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	= <i>Fibroblast Grow Factor</i>
FHI	= Farmakope Herbal Indonesia
g	= gram
GH	= <i>Growth Hormone</i>
HCl	= Hydrochloric Acid
hFOB	= <i>Human Fetal Bone Osteoblast</i>

HRT	= <i>Hormonal Replacement Therapy</i>
Kg	= Kilogram
IC ₅₀	= <i>Inhibitory Concentration</i>
IGF	= <i>Insulin Growth Factor</i>
kHz	= Kilohertz
LSIH	= Laboratorium Sentra Ilmu Hayati
MC	= <i>Moisture content</i>
Mg	= miligram
mL	= Mililiter
MK	= Media Komplit
MTT	= <i>Microtetrazolium</i>
Na-EDTA	= Natrium Kalsium edetat
NCI	= <i>American National Cancer Institute</i>
Nm	= nanometer
OPG	= Osteoprotegerin
Osx	= <i>Osterix</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PenStrep	= <i>Penicillin-Streptomycin</i>
Ppm	= Part Per Milion
Psi	= Pounds per Square Inch
RANK-L	= <i>RANK-ligand</i>
Rpm	= Revolusi per menit
SDS	= <i>Sodium Deodecyl Sulfate</i>
SPSS	= Statistical Package for the Social Sciences

TGF- β = *Transforming Growth Factor Beta*
UAE = *Ultrasound Assisted Extraction*
UPT = Unit Pelaksana Teknis



ABSTRAK

Maulidia, Nabila Rosa. 2020. **Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C.Presl) Pada Sel hFOB 1.19 dengan Metode *Microtetrazolium* (MTT) Assay**. Skripsi. Program studi Farmasi Fakultas Kesehatan dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm., Apt; Pembimbing II: Meilina Ratna D., S.Kep., Ns. M.Kep

Semanggi (*Marsilea crenata* C.Presl) merupakan salah satu tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia, khususnya Jawa Timur. Tanaman ini sering digunakan sebagai bahan makanan dan obat tradisional. Semanggi diketahui memiliki kandungan senyawa fitoestrogen yang fungsi dan strukturnya sama dengan estrogen dalam tubuh manusia. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah agar diketahui nilai IC₅₀ dan sitotoksisitas dari ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* terhadap sel hFOB 1.19. Metode yang digunakan untuk uji sitotoksisitas ini adalah metode *microtetrazolium* (MTT) Assay dan pembacaan menggunakan ELISA Reader. Sel pada *microplate-96 well* diberikan ekstrak dengan variasi dosis 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm dan 4000 ppm. Kemudian ditambahkan reagen MTT 100 μ L, diinkubasi selama 2-4 jam dan ditambahkan SDS 10% sebagai *stopper* serta dilakukan pembacaan menggunakan ELISA Reader. Hasil dari pembacaan tersebut digunakan sebagai perhitungan nilai IC₅₀ yang dapat menunjukkan tingkat sitotoksisitas ekstrak etanol 96% *M.crenata*. Nilai IC₅₀ yang didapatkan adalah 151,171 μ g/ml . Berdasarkan hasil tersebut ekstrak etanol 96% *M.crenata* dapat dikatakan aman dan tidak bersifat toksik jika dikembangkan menjadi bahan obat.

Kata Kunci : *Marsilea crenata* C.Presl, Uji Sitotoksisitas, Sel hFOB 1.19, MTT Assay

ABSTRACT

Maulidia, Nabila Rosa. 2020. **Cytotoxicity of Semanggi Ethanol 96% Extract (*Marsilea crenata* C.Presl) in hFOB 1.19 Cell With *Microtetrazolium* (MTT) Assay.** Sarjana's Thesis. Faculty of Health and Health Sciences Faemation of State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisors: (1) apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm; (2) Meilina Ratna D., S.Kep., Ns. M.Kep

Semanggi (*Marsilea crenata* C.Presl) is one of the plants that have been used by Indonesian people, especially East Java. This plant is often used as food and traditional medicine. Semanggi contains phytoestrogen compounds whose function and structure are the same as estrogen in human body. The purpose of this study is to determine the value of IC50 and the cytotoxicity of 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* against hFOB cells 1.19. The method used for the cytotoxicity test is the microtetrazolium (MTT) Assay and reading using ELISA Reader. Cells on microplate-96 well were given extracts with a dose variation of 62.5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm and 4000 ppm. Then the 100 μ L MTT reagent was added, incubated for 2-4 hours and 10% SDS was added as a stopper and read using ELISA Reader. The results of these readings are used as the calculation of IC50 values which can indicate the level of cytotoxicity of 96% *M. crenata* ethanol extract. The IC50 value obtained was 151,171 μ g / ml. Based on these results the ethanol extract 96% *M. crenata* can be said to be safe and un-toxic if it is developed into a medicinal ingredient.

Keywords : *Marsilea crenata* C.Presl, Cytotoxicity test, hFOB 1.19 Cell, MTT Assay

مستخلص البحث

موليدية، نبيلة روشا. 2020. اختبار سمية مستخرجة الإيثانول 96 % ورقة السراخس المائية (*Marsilea crenata* C.Presl) على خلية hFOB 1.19 بطريقة *Microtetrazolium* (MTT) Assay. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف ز. أ.، الماجستير. المشرف الثاني: ميلينا راتناد، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: السراخس المائية، اختبار السمية، خلية hFOB 1.19، MTT Assay.

السراخس المائية (*Marsilea crenata* C.Presl) هي النبات الذي استخدمه شعب إندونيسي، خاصة في جاوى الشرقية. وغالبا ما يستخدم هذا النبات كعنصر غذائي و طب تقليدي. والسراخس المائية لها محتوى مركب فيتويستروجين، حيث كانت وظيفته وبنيته تساوي هرمون الاستروجين في جسم الإنسان. الهدف من هذا البحث هو معرفة قيمة IC50 والسمية الخلوية من مستخرجة الإيثانول 96% ورقة السراخس المائية على خلية hFOB 1.19. الطريقة المستخدمة لاختبار هذه السمية الخلوية هي طريقة *Microtetrazolium* (MTT) Assay وقراءتها باستخدام ELISA Reader. تم إعطاء المستخرجة على الخلية في *microplate-96 well* مع تباين جرعة من 62.5 ففم؛ 125 ففم؛ 250 ففم؛ 500 ففم؛ 1000 ففم؛ 2000 ففم و 4000 ففم. ثم أضاف كاشف MTT 100µL، الاختضان لمدة 2-4 ساعات، وأضاف SDS 10%. كالتسادة وأجريت القراءة باستخدام ELISA Reader. تستخدم نتائج هذه القراءات لحساب قيمة IC50 التي تشير إلى مستوى السمية الخلوية من مستخرجة الإيثانول 96% ورقة السراخس المائية. وكانت قيمة IC50 المحسولة هي 151.171 ميكروجرام / مل. واستنادا من تلك النتيجة فإنها آمنة وغير سامة إذا وضعت في المواد الأدوية.

، اختبار السمية الخلوية، خلية *Marsilea crenata* C. Presl:الكلمات الرئيسية
hFOB 1.19

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan keadaan menurunnya kadar estrogen dalam tubuh (Hipoestrogenik) akibat penurunan fungsi dari ovarium. Masa menopause dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu premenopause, perimenopause, menopause dan pascamenopause. Pada tahap pascamenopause terjadi defisiensi estrogen. Defisiensi estrogen adalah penurunan produksi hormon estrogen hingga tidak ada lagi produksi hormon estrogen. (Baziad, 2003).

Defisiensi estrogen ini dapat memicu terjadinya osteoporosis. Osteoporosis merupakan masalah kesehatan global utama ditandai dengan hilangnya tulang progresif dengan penurunan kekuatan tulang yang menyebabkan kerapuhan dan patah tulang. Osteoporosis ditandai dengan pengurangan kepadatan mineral tulang / *Bone Mineral Density* (BMD) dan kerusakan jaringan mikro arsitektur tulang, yang mengakibatkan resiko tinggi patah tulang. Osteoporosis biasanya terjadi pada wanita usia 60-70 tahun dan jumlah penderita diperkirakan akan meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk pada tahun 2020 yakni sebesar 5-11 juta dan pada tahun 2050 sebesar 5,2-11,5 juta (Bianchi, 2014; Mustofa, 2019).

Gangguan-gangguan yang terjadi pada wanita pascamenopause yang terjadi akibat defisiensi estrogen seperti, penyakit jantung, kanker payudara, kanker leher rahim, obesitas, diabetes dan osteoporosis dapat diminimalisir dengan asupan pengganti estrogen. Salah satu terapi yang sering digunakan

adalah *Hormonal Replacement Therapy* (HRT). Penggunaan HRT ini dapat meningkatkan kualitas hidup wanita pascamenopause, namun terapi ini memberikan efek yang kurang baik bagi tubuh diantaranya, penyakit jantung koroner, thromboemboli vena, stroke dan kanker payudara (Wulandari, 2015). Munculnya efek yang kurang baik dari HRT ini maka dibutuhkan alternatif lain pengganti estrogen yang lebih aman yaitu fitoestrogen (Achdiat, 2003).

Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover dan Assinder, 2006). Selanjutnya menurut Jefferson, *et al.* (2002) fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Fitoestrogen sangat beragam dari segi struktur, kekuatan estrogenik, dan ketersediaan sumber-sumber pada makanan seperti kedelai, sereal, dan biji-bijian (Helmy, dkk., 2014). berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, fitoestrogen banyak ditemukan di Tanaman Semanggi (*M.crenata*). Penggunaan fitoestrogen yang berasal dari tanaman-tanaman yang tersedia di alam ini mengacu pada firman Allah dalam surat Asy-Syuara ayat 7 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi berbagai macam tumbuhan yang baik”

Dalam “tafsir Al Misbah : Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur’an” (Quraish Shihab, 2002) ditafsirkan bahwa diciptakannya berbagai macam tumbuhan itu memiliki manfaat masing-masing dan hanya Tuhan Yang Maha Esa yang dapat melakukan ini semua.

Marsilea crenata adalah salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Jawa Timur Indonesia. Daunnya banyak digunakan sebagai bahan tradisional makanan. *Marsilea crenata* adalah sejenis pakis yang biasanya tumbuh di lingkungan akuatik. Berbeda dengan tanaman *Marsilea* lainnya seperti *Marsilea minuta* Linn, *Marsilea quadrifolia*, *Marsilea rajasthanensis* Gupta dan *Marsilea drummondii*, sifat fisika kimia *Marsilea crenata* belum diketahui. Padahal tanaman ini memiliki potensi besar sebagai sumber makanan atau sebagai tanaman obat dan sangat mudah tumbuh (Ma'arif, 2016).

Tanaman semanggi ini dapat digunakan sebagai antibakteri, anti inflamasi, anti tumor dan mencegah osteoporosis (Titisari, 2016). Daun *Marsilea crenata* ini dapat digunakan sebagai terapi osteoporosis akibat penurunan kadar estrogen, hal ini dibuktikan pada penelitian Trisunuwati (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak daun semanggi dapat meningkatkan kalsium dalam darah dan memberikan perubahan kepadatan tulang menjadi lebih tebal. Hal ini juga dibuktikan pada penelitian Bianchi (2014) yang menggunakan *Marsilea crenata* sebagai suplemen makanan pada wanita pascamenopause dapat menangkal efek tingkat estrogen rendah dan keropos tulang.

Penggunaan tanaman *Marsilea crenata* sebagai terapi osteoporosis pada wanita pascamenopause ini diharapkan akan memberikan efek yang lebih baik dibandingkan HRT yang pada penelitian ini akan diujikan pada Sel hFOB 1.19. Sel hFOB 1.19 merupakan sel preosteoblast progenitor yang dapat diinduksi dan berdiferensiasi menjadi osteoblast matur ditandai dengan terbentuknya *Alkaline Phosphatase* (ALP) dan osteocalcin. Sel hFOB 1.19 memiliki karakteristik

homogen, konsistensi, reliable, serta mudah diterapkan dalam investigasi fungsi osteoblas dari regulasinya (ATCC, 2006; Yen *et al.*, 2006).

Prinsip pembuatan obat yang baik haruslah memenuhi persyaratan keamanan (*safety*), mutu (*quality*), dan khasiat (*efficacy*) sehingga tidak menimbulkan resiko yang membahayakan penggunaannya (Badan POM, 2012). Salah satu faktor yang perlu diperhatikan yaitu keamanan bahan obat yang dapat dilihat dari toksisitasnya. Untuk mengetahui tingkat toksisitas dari zat kimia perlu dilakukan uji sitotoksitas. Salah satu metode uji sitotoksitas yang banyak digunakan yaitu *MTT assay*. Dalam metode ini, garam tetrazolium MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yang berwarna kuning direduksi oleh sel hidup menjadi kristal *formazan* berwarna ungu (K Bopp dan Teresa, 2008).

Pengujian *MTT assay* dibaca absorbansinya dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Parameter yang diperoleh berupa nilai IC_{50} yang menyatakan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% sehingga menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. The *American National Cancer Institute* (NCI) *guidelines* menyatakan bahwa kriteria sitotoksitas IC_{50} dari suatu ekstrak yaitu $<30 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Sudha, *et al.* 2012; Fadeyi, *et al.* 2013; Halimatusshadyah, dkk. 2018). Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (Amir dan Murcitra, 2017). Semakin kecil harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin toksik dan sebaliknya jika semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Huda dan Wahyuningsih, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti ingin melakukan penelitian tentang uji sitotoksisitas ekstrak etanol 96% daun semanggi (*Marsilea crenata* C.Presl) pada sel hFOB 1.19 menggunakan metode *microtetrazolium assay*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan penelitian ini adalah :

1. Berapakah nilai IC_{50} ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* terhadap sel hFOB 1.19?
2. Apakah ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* bersifat toksik terhadap kultur sel hFOB 1.19 secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui nilai IC_{50} ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* terhadap sel hFOB 1.19.
2. Mengetahui toksisitas ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* terhadap kultur sel hFOB 1.19 secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Menambah wawasan bagi peneliti tentang sitotoksisitas ekstrak etanol 96% daun semanggi.
2. Sebagai sumber bagi peneliti lain untuk melakukan penelitian lanjutan tentang daun semanggi.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

1. Menambah pengetahuan masyarakat akan manfaat tanaman semanggi

2. Memperkaya dunia kesehatan terkait kandungan fitoestrogen pada tanaman semanggi agar dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan osteoporosis

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini, antara lain :

1. Bagian tanaman semanggi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun yang memiliki warna hijau muda yang diperoleh dari Desa Kendung, Benowo, Kota Surabaya, Provisnsi Jawa Timur.
2. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%.
3. Metode ekstraksi yang digunakan adalah *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE).
4. Sel yang digunakan adalah sel hFOB 1.19

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

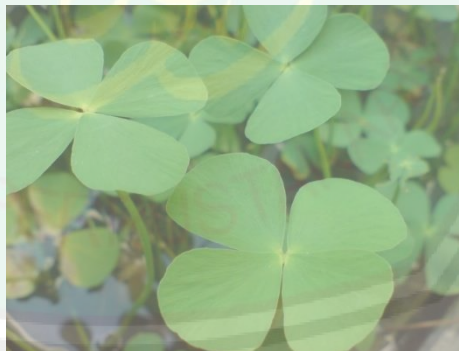
2.1 Tinjauan Tanaman Semanggi

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Semanggi

Klasifikasi tanaman semanggi adalah sebagai berikut (Afriastini, 2003) :

- Divisi : Pteridophyta
- Kelas : Filicinae
- Bangsa : Salviniaceae
- Suku : Marsileaceae
- Marga : *Marsilea*
- Jenis : *Marsilea crenata* Presl.
- Nama dagang : Semanggi
- Nama daerah : Semanggi

2.1.2 Habitus dan Morfologi



Gambar 2.1 Tanaman Semanggi

Tanaman *Marsilea crenata* memiliki daun yang berbentuk bulat menyerupai payung dan terdiri dari empat helai anak daun yang disebut sebagai *clover*. *Marsilea crenata* memiliki akar tunggang yang berserabut.

Batangnya tegak dan sangat mudah dipatahkan dengan tinggi 2 hingga 18 cm. Semanggi bersifat heterospore, dimana spora jantan dan betina menjadi satu tanaman (Saleh, 2017)

Marsilea crenata mampu hidup pada kisaran tanah yang tergolong liat, memiliki tingkat kesuburan yang baik, pH mendekati netral, dan pengairan yang cukup, *Marsilea crenata* dapat dijumpai pada lahan basah maupun saluran irigasi sawah yang merupakan habitat aslinya, akar tanaman Semanggi berbeda dengan tanaman air lain yang mengapung di air melainkan melekat pada tanah habitat yang merupakan tanah alfisol (Hidayati, 2017)

2.1.3 Manfaat dan Kandungan

Menurut Trisunuwati (2017) *Marsilea crenata* memiliki kandungan mineral dalam daun dan batang yaitu kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalsium, seng, dan tembaga. *Marsilea crenata* juga mengandung *phytochemical* seperti alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino. Kandungan mineral dan *phytochemical* yang berfungsi sebagai kalsium kristal oksalat adalah kalium dan flavonoid.

Daun semanggi memiliki kandungan bioaktif yaitu isoflavon yang termasuk flavonoid yang mempunyai aktivitas di dalam tubuh mirip dengan estrogen. Isoflavon adalah sejenis estrogen yang berasal dari tumbuhan senyawa dari tumbuhan senyawa tanpa efek pada uterotrofik. Suplemen makanan ini telah digunakan pada pascamenopause wanita untuk menangkal efek tingkat estrogen rendah dan keropos tulang (Bianchi, 2014)

Menurut Titisari (2016) Kandungan fitokimia *Marsilea crenata* seperti gula, steroid, karbohidrat dan flavonoid. Flavonoid juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiinflamasi, antitumor, alergen, dan mencegah osteoporosis. Kandungan utama isoflavon *Marsilea crenata* adalah genistein dan daidzein. *Marsilea crenata* lebih banyak genistein daripada daidzein. Isoflavon adalah fitoestrogen yang merupakan bagian yang memiliki fungsi penting dalam mekanisme pertahanan tanaman.

Menurut Saleh (2017) *Marsilea crenata* memiliki kandungan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti inflamasi. Selain itu, *Marsilea crenata* juga mengandung isoflavon yang dapat digunakan sebagai perlindungan gejala klinis menopause dan mencegah osteoporosis. Nutrisi di dalam *Marsilea crenata* dapat mencegah perkembangan sel kanker payudara, tuberkolosis dan mengurangi resiko kanker getah bening di dalam tubuh. *Marsilea crenata* juga dapat digunakan sebagai peluruh air seni.

Menurut Nurjanah (2012) *Marsilea crenata* mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas.

Menurut Ma'arif (2016) *Marsilea crenata* mengandung banyak senyawa kelompok volatil, diantaranya monoterpenoid, diterpenoid, dan senyawa golongan asam lemak yang memiliki beragam aktivitas. Asam palmitat salah satu lemak yang terkandung dalam *Marsilea crenata* diduga memiliki peran sebagai agen antiosteoporotik, terutama dalam perbaikan osteogenesis.

2.2 Metode Ekstraksi

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

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

2.3 *Ultrasound 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 interfase (Ma'arif, 2012; Medina-Torres *et al.*, 2017). 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 factor yang sangat penting untuk memperoleh ekstraksi yang efisien dan efektif. Selain itu, suhu,

tekanan, frekuensi dan waktu sonikasi adalah factor yang juga mempengaruhi kerja UAE (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). UAE memiliki kekuatan kavitasi akustik sebagai kekuatan pendorong utama yang mampu menginduksi serangkaian kompresi dan *rarefactions* dalam molekul pelarut, sehingga menyebabkan pembentukan gelombang senagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al.*, 2017).

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).

2.4 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang

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

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

2.5 Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover dan Assinder, 2006). Selanjutnya menurut Jefferson, *et al.* (2002) fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*). Pada

tanaman dikenal ada beberapa kelompok fitoestrogen yaitu; isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti flavon, *chalconcs*, diterpenoid, triterpenoid, *coumarins* dan *acyclics*. Pada kelompok fitoestrogen tersebut isoflavon merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, dikarenakan kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi. Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesa oleh tanaman (Glover dan Assinder, 2006).

Struktur kimia fitoestrogen yang paling khas adalah adanya cincin fenolik yang menjadi prasyarat ikatan pada reseptor estrogen. Cincin fenolik inilah yang menjadikan fitoestrogen dapat bekerja seperti estrogen di dalam tubuh. Fitoestrogen bersifat paradoxal, artinya mempunyai efek estrogenik dan antiestrogenik (antagonis dengan estrogen) tergantung dari kadar estrogen dalam tubuh. Kadar estrogen yang tinggi akan menyebabkan fitoestrogen mempunyai efek antiestrogenik dengan cara mengikat reseptor dan mengadakan blocking terhadap molekul estrogen (Whitten dan Pattisaul, 2001). Sebaliknya dalam keadaan defisiensi estrogen seperti yang terjadi pada menopause, fitoestrogen akan mempunyai efek estrogenik dengan menggantikan estrogen untuk mengikat reseptor. Kehadiran agen estrogenik dari fitoestrogen pada tahap awal perkembangan dapat memacu berbagai reaksi di dalam tubuh tikus usia muda. Salah satunya dengan merangsang percepatan pertumbuhan organ reproduksi, selain itu adanya kemungkinan terjadinya onset pubertas (Hughes *et al.*, 2004). Fitoestrogen golongan isoflavonoid dan lignan bersifat antioksidan sehingga dapat mencegah kanker dan penurunan fungsi reproduksi akibat penuaan (Biben, 2012).

Fitoestrogen memiliki 3 kelompok utama yaitu isoflavon, lignan, dan coumestan, dan beberapa herbal lain. Tiga kelompok tersebut terdapat pada 300 tanaman, terutama tumbuhan keluarga polong-polongan. Menurut Tsourounis (2004) kelompok dari fitoestrogen tersebut adalah:

1. Isoflavon terdapat pada : *soybean* (kacang kedelai), *lentil* (miju - miju), *chickpeas/garbanio bean* (buncis), *red clover* (semanggi merah)
2. Lignan terdapat pada : *Flaxseed* (biji rami), *cereal* (padi - padian), sayur-sayuran, dan buah-buahan.
3. Coumestan terdapat pada : *sunflower seed* (biji bunga matahari), *bean sprout* (kecambah taoge).
4. Bentuk lain terdapat pada herbal Black cohosh, Dong Quai, ginseng, Evening primrose (Kligler 2003). Black cohosh tumbuh di hutan-hutan Amerika Selatan dan sekarang telah diekstraksi serta dikemas menjadi produk obat untuk menopause

Metabolisme Fitoestrogen yaitu secara garis besar semua fitoestrogen diabsorpsi sebagai metabolit prekursor yaitu dalam bentuk awal dari fitoestrogen yang belum aktif atau kurang bersifat estrogenik (merupakan fitoestrogen dalam bentuk glikosida terkonjugasi). Fitoestrogen kelompok lignan akan diabsorpsi sebagai matairesinol, secoisolaricinol. Selanjutnya metabolit prekursor ini akan dimetabolisme oleh bakteri intestinum menjadi senyawa aktif yang bersifat estrogenik yaitu enterolakton dan enterodiol. Sedangkan fitoestrogen kelompok isoflavon akan diserap sebagai formononetin, daidzin, genistin dan biochanin A yang akan dimetabolisme oleh bakteri intestinum menjadi daidzein dan genistein. Selanjutnya senyawa ini

akan dimetabolisme atau diekskresi tanpa perubahan bentuk biokimiawi dalam urin dan feses (Wolf 2005). Daidzein dapat mengalami perubahan lebih lanjut menjadi equol dan ODM-angiotensin sedangkan genistein berubah menjadi Pethylphenol untuk diekskresikan melalui urin.

Secara *in vitro* fitoestrogen dapat menginduksi sintesis protein sehingga terjadi pembentukan sel osteoblast baru. Senyawa ini juga diketahui dapat menghambat aktivasi dari sel osteoklas, yaitu sel penyerap tulang. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kandungan fitoestrogen dapat meningkatkan kepadatan mineral tulang dengan pengujian pada beberapa parameter yaitu ALP, osteocalcin, osteopontin dan kolagen (Sirotkhin *et al.*, 2014).

Pada dosis rendah, kandungan fitoestrogen pada ekstrak *M. crenata* akan berikatan dengan *estrogen receptor* β (ER β) dengan afinitas yang besar, umumnya menghasilkan aktivitas yang besar juga. Sedangkan pada dosis tinggi, akan berikatan dengan beberapa reseptor sekaligus dalam sel osteoblas, diantaranya yaitu ER β , ER α , *thyroid hormone receptors*, sehingga menyebabkan aktivitas menurun (Ma'arif *et al.*, 2018).

2.6 Tulang

Tulang merupakan bentuk kaku jaringan ikat yang membentuk sebagian besar kerangka vertebrata yang lebih tinggi. Jaringan ini terdiri atas sel-sel dan matriks intersel. Matriks mengandung unsur organik, yaitu terutama serat-serat kolagen, dan unsur anorganik yang merupakan dua pertiga berat tulang itu. Garam-garam anorganik yang bertanggungjawab atas kaku dan kejurnya tulang ialah kalsium fosfat (kira-kira 85%), kalsium karbonat (10%), dan sejumlah kecil

kalsium florida serta magnesium florida. Serat-serat kolagen sangat menambah kekuatan tulang itu (Sihombing, *et al.* 2012)

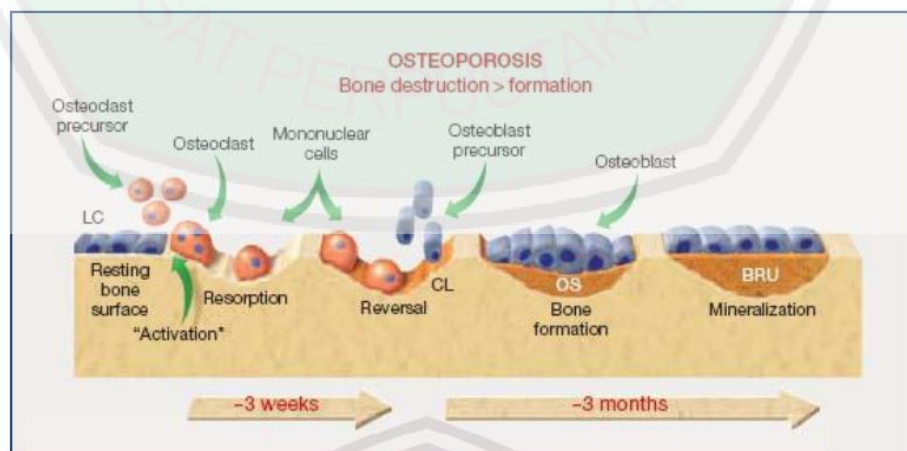
2.6.1 Remodelling Tulang

Remodeling tulang merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan penyerapan tulang yang diikuti dengan pembentukan tulang baru. Remodeling tulang ditujukan untuk pengaturan homeostatis kalsium, memperbaiki jaringan yang rusak akibat pergerakan fisik, kerusakan minor karena faktor stres dan pembentukan kerangka pada masa pertumbuhan (Sihombing, *et al.* 2012; Fernandez *et al.*, 2006).

Remodeling adalah proses dimana terjadi turn-over dari tulang yang memungkinkan pemeliharaan bentuk, kualitas dan jumlah kerangka. Proses ini ditandai oleh aktivasi yang terkoordinasi dari osteoklas dan osteoblas, yang terjadi dalam unit multiseluler tulang (*bone multicellular units*/BMUs) dimana terjadi peristiwa aktivasi proses resorpsi dan formasi yang berurutan dan terus menerus (Stevenson, 2007).

Pada proses pembentukan tulang, osteoblast mulai bekerja. Untuk diferensiasi dan maturasi osteoblas membutuhkan faktor pertumbuhan lokal, seperti *Fibroblast Grow Factor* (FGF), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) dan Wnt protein. Selain itu, juga dibutuhkan faktor transkripsi, yaitu core binding factor-1 atau *Runx2* atau *Osterix* (Osx). Prekursor osteoblas ini akan berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk preosteoblas dan kemudian akan menjadi osteoblas matur. Osteoblas selalu tampak melapisi matrik tulang (osteoid) yang diproduksinya sebelum dikalsifikasi, proses kalsifikasi ini membutuhkan waktu 10 hari (Roland, 2008).

Setelah pertumbuhan terhenti dan puncak massa tulang sudah tercapai, maka proses pembentukan tulang akan dilanjutkan pada permukaan endosteal. Tulang mengalami proses resorpsi dan formasi secara terus menerus yang disebut sebagai remodeling tulang. Proses remodeling tulang merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi tulang oleh osteoklas dan diikuti formasi tulang oleh osteoblas. Proses remodeling diawali dengan pengaktifan osteoklas oleh sitokin tertentu. Osteoklas akan meninggalkan rongga yang disebut lakuna howship pada tulang trabekular atau rongga kerucut (*cutting cone*) pada tulang kortikal. Setelah resorpsi selesai, maka osteoblas akan melakukan formasi tulang pada rongga yang ditinggalkan osteoklas dengan membentuk matriks yang disebut osteosit, yang dilanjutkan dengan mineralisasi primer dalam waktu singkat kemudian dilanjutkan dengan mineralisasi sekunder dalam waktu yang lebih lama dan proses yang lebih lambat sehingga tulang menjadi keras (Setiyohadi, 2006; Rosen, 2011; Roland, 2008; Setiyohadi, 2010).



Gambar 2.2 Skema proses remodeling tulang. (Epstein, 1995)

2.6.2 Komponen Penyusun Tulang

Terdapat dua tipe tulang dalam tubuh, yaitu *cortical* dan *trabecular*.

Tulang korteks adalah tulang yang padat dan rapat yang merupakan bagian terluar dari tulang. Sedangkan tulang trabekular merupakan bagian dalam tulang yang berongga. Tulang manusia terdiri atas 80% tulang kortikular dan 20% tulang trabekular. Tulang kortikal dan tulang trabekular terbuat dari sel-sel yang sama dan elemen matriks yang sama, tetapi ada perbedaan struktural dan fungsional.

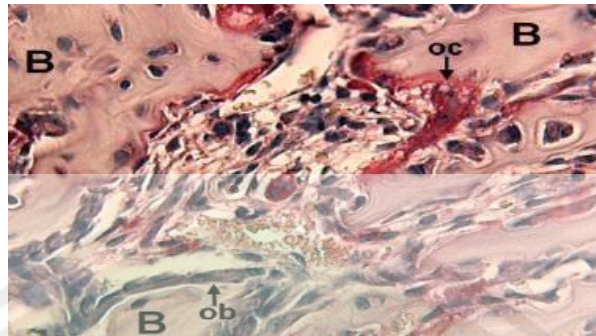
Perbedaan struktural utama secara kuantitatif adalah 80%-90% dari volume tulang kortikular adalah kalsifikasi, sedangkan hanya 15% sampai 25% dari volume trabekular adalah kalsifikasi (sisanya adalah sumsum tulang, pembuluh darah, dan jaringan ikat). Fungsi utama tulang kortikal berfungsi sebagai mekanik (alat gerak) dan pelindung, sedangkan tulang trabekular sebagai fungsi metabolik dan juga berperan dalam proses biomekanik tulang, terutama tulang belakang (Setiyohadi, 2006).

Tulang merupakan bagian dinamis yang selalu berubah dan mengalami pembaruan. Sel-sel utama yang berperan dalam tulang adalah (Fernandez *et al.*, 2006).

a. Sel Osteoklas

Sel osteoklas (sel pemecah tulang) adalah sel terpenting pada resorpsi tulang yang berasal dari sel induk sumsum tulang (penghasil makrofag-monosit). Osteoklas merusak matriks tulang, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks, menurunkan pH 7 menjadi pH 4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan merusak matriks

sel sehingga protease keluar. Osteoklas memiliki reseptor yaitu *RANK-ligand* (RANK-L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis.



Gambar 2.3 Sel Tulang (ob : osteoblas; oc : osteoklas)

b. Sel Osteoblast

Sel osteoblas adalah sel pembentuk tulang. Osteoblas bekerja membentuk dan mensekresikan kolagen dan non kolagen organik (komponen matrik tulang) Osteoblas berasal dari jalur sel mesenkim stoma sumsum tulang. Osteoblas memproduksi osteoid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral, terpisah dari matriks yang telah mengalami mineralisasi. Osteoblas berfungsi mensintesis dan mensekresi matriks organik tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi. Osteoblas mengandung retikulum endoplasmik, membran golgi dan mitokondria. Osteoblas memiliki reseptor estrogen, sitokin, paratiroid hormon, *Insulin Growth Factor* (IGF), dan vitamin D3.

2.7 Osteoporosis

2.7.1 Pengertian Osteoporosis

Osteoporosis adalah masalah kesehatan global utama ditandai dengan hilangnya tulang progresif dengan penurunan kekuatan tulang yang menyebabkan kerapuhan dan patah tulang. Osteoporosis diperkirakan

mempengaruhi 200 juta wanita di seluruh dunia. Sekitar sepersepuluh dari wanita berusia 60, seperlima dari wanita berusia 70, dua perlima wanita berusia 80 dan dua pertiga wanita berusia 90 (Bianchi, 2014)

Secara statistik, osteoporosis didefinisikan sebagai keadaan dimana BMD (*Bone Mineral Density*) berada dibawah nilai rujukan menurut umur atau standar deviasi (Limbong, 2015). Menurut Departemen Kesehatan RI (2013), dampak osteoporosis di Indonesia sudah dalam tingkat yang patut di waspadai, yaitu mencapai 19,7% dari populasi (Soke, 2016)

2.7.2 Patogenesis Osteoporosis

Kesehatan tulang adalah ekspresi kompleks interaksi banyak faktor. Sedangkan osteoporosis memiliki komponen heritable tinggi, memiliki relevansi besar, steroid seks, poros GH/IGF-1, sitokin, aktivitas fisik dan imobilisasi dan merokok. Meski sedang dievaluasi, kekurangan gizi memainkan peran penting dalam demineralisasi tulang yang mendasari banyak proses hormonal dan biologis (Bianchi, 2014)

2.7.3 Patofisiologi Osteoporosis

Antara usia 8 dan 18 tahun, kandungan mineral tulang (BMC) lebih dari dua kali lipat, sedangkan volumetrik yang sebenarnya kepadatan mineral tulang (vBMD) nyaris tidak berubah. Ini akumulasi massa tulang terutama berkaitan dengan peningkatan ukuran tulang (diameter) dan ketebalan kortikal, ke trabecular pembentukan dan penebalan tulang. Sementara itu, endosteal permukaan menjalani permodelan dan renovasi untuk mencapai kira-kira pada usia 20, massa tulang, geometri dan struktur mikro kerangka dewasa. Gantinya, massa tulang puncak adalah penentu

utama kekuatan dan kerapuhan tulang sepanjang hidup. Pada pria, pertumbuhan tulang pada area yang sama dan tingkat yang sama seperti pada wanita lebih bertahan lama 10-15% dibandingkan pada wanita. Tidak hanya itu, sebagai akibat dari remodeling tulang terus menerus kehilangan tulang kortikal dan trabekuler dimulai segera setelah massa tulang puncak dicapai dalam kedua jenis kelamin, meskipun dalam proporsi variabel dalam tulang yang menahan beban yang tidak berbobot dan mempercepat pada wanita pascamenopause dan pada pria lanjut usia (Ferrari, 2012)

Keturunan, yaitu efek aditif dari gen mereka dan polimorfisme menyumbang 50-80% dari variasi dalam massa dan struktur tulang diantara individu dan kemungkinan berkontribusi terhadap beberapa perbedaan fenotip antara kerangka pria dan wanita. Namun, ekspresi gen tergantung pada lingkungan internal dan eksternal, yaitu pada kadar hormon, khususnya hormon steroid gonad (pubertas) dan sumbu hormon pertumbuhan (GH)-IGF-1; nutrisi, seperti asupan kalsium dan protein, aktivitas fisik, khususnya latihan beban, gaya hidup, dan lain sebagainya. Begitu pun gangguan muncul selama pertumbuhan yang mengubah satu atau lebih dari parameter ini akan memberikan pengaruh negatif dari permodelan tulang dan remodeling mempengaruhi akuisisi massa tulang dan distribusi di kompartemen kortikal, dan atau trabekuler, dan dengan demikian dapat menyebabkan kerapuhan tulang tidak hanya selama pertumbuhan tetapi kemudian pada orang dewasa muda. Demikian pula, endokrin, nutrisi, dan gangguan lain muncul pada awal dewasa akan mempercepat keropos tulang pada usia yang lebih muda (Ferrari, 2012)

2.7.4 Jenis Osteoporosis

Berdasarkan penyebabnya, osteoporosis dibagi menjadi dua tipe, yaitu (Ramadani, 2010) :

1. Osteoporosis Primer

Sekitar 65-80% wanita dan 45-60% pria dengan osteoporosis menderita osteoporosis primer. Pada wanita dengan fraktur kompresi karena osteoporosis primer didapat masa tulang kortikal dan trabekular yang kurang. Jumlah trabekula yang kurang dan pertanda biokimiawi serta histologik merupakan bukti terjadinya resorpsi tulang yang meningkat dibandingkan kontrol pada umur yang sama. Hormonestron dan androstendion berkurang secara bermakna pada wanita dengan osteoporosis, dan hal ini merupakan sebagian sebab didapatkannya resorpsi tulang yang bertambah banyak dan pengurangan masa tulang. Absorpsi kalsium pada wanita dengan kondisi ini menjadi lebih rendah. Osteoporosis primer dibagi lagi menjadi:

- a. Osteoporosis tipe 1, disebut juga post menoposal osteoporosis. Osteoporosis tipe ini bisa terjadi pada dewasa muda dan usia tua, baik laki-laki maupun perempuan. Pada perempuan usia antara 51-75 tahun beresiko 6 kali lebih banyak daripada laki-laki dengan kelompok umur yang sama. Tipe osteoporosis ini berkaitan dengan perubahan hormon setelah menopause dan banyak dikaitkan dengan patah tulang pada ujung tulang pengumpil lengan bawah. Pada osteoporosis jenis ini terjadi penipisan bagian keras tulang yang paling luar (kortek) dan perluasan rongga tulang.

b. Osteoporosis tipe 2, disebut juga senile osteoporosis (involutional osteoporosis). Tipe 2 ini banyak ditemui pada usia di atas 70 tahun dan dua kali lebih banyak pada wanita dibanding laki-laki pada umur yang sama. Kelainan pertulangan terjadi pada bagian kortek maupun di bagian trabikula. Tipe ini sering dikaitkan dengan patah tulang kering dekat sendi lutut, tulang lengan atas dekat sendi bahu, dan patah tulang paha dekat sendi panggul. Osteoporosis jenis ini, terjadi karena gangguan pemanfaatan vitamin D oleh tubuh, misalnya karena keadaan kebal terhadap vitamin D (vit D resisten) atau kekurangan dalam pembentukan vitamin D (vit D synthesa) dan bisa juga disebabkan karena kurangnya sel-sel perangsang pembentukan vitamin D (vit D reseptor).

2. Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder lebih jarang ditemukan, hanya 5% dari seluruh osteoporosis. Osteoporosis sekunder terdapat pada 20-35% wanita dan 40-55% pria, dengan gejalanya berupa fraktur pada vertebra dua atau lebih. Diantara kelainan ini yang paling sering terjadi adalah pada pengobatan dengan steroid, mieloma, metastasis ke tulang, operasi pada lambung, terapi antikonvulsan, dan hipogonadisme pada pria. Osteoporosis sekunder ini disebabkan oleh faktor di luar tulang diantaranya: Karena gangguan hormon seperti hormon gondok, tiroid, dan paratiroid, insulin pada penderita diabetes melitus dan glukokortikoid, Karena zat kimia dan obat-obatan seperti nikotin, rokok, obat tidur, kortikosteroid, alkohol, Penyebab lain seperti istirahat total

dalam waktu lama, penyakit gagal ginjal, penyakit hati, gangguan penyerapan usus, penyakit kanker dan keganasan lain, sarcoidosis, penyakit sumbatan saluran paru yang menahun, berkurangnya daya tarik bumi dalam waktu lama seperti pada awak pesawat ruang angkasa yang berada di luar angkasa sampai berbulan-bulan.

2.8 Sel hFOB 1.19

Sel hFOB 1.19 merupakan *cell line* dengan karakteristik homogen, konsistensi, *reliable*, serta mudah diterapkan dalam investigasi fungsi osteoblas dan regulasinya. Sel hFOB 1.19 merupakan sel preosteoblast progenitor yang dapat diinduksi dan berdiferensiasi menjadi sel osteoblas matur ditandai dengan terbentuknya ALP dan *osteoclast* (ATCC., 2006; Yen, *et al.*, 2006).

Sel hFOB 1.19 yang digunakan didapatkan dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dengan spesifikasi sebagai berikut :

Organisme asal : *Homo sapiens* (manusia)

Jaringan : Tulang

Tipe Sel : Osteoblast

Usia : *Fetus*

Sifat Pertumbuhan : Melekat

Penggunaan : Produk ini digunakan hanya untuk penelitian tentang tulang, tidak dimaksudkan untuk keperluan terapeutik atau diagnosa baik hewan maupun manusia.

Sumber : ATCC

2.9 Uji Sitotoksitas

Sitotoksitas adalah sifat toksik atau beracun suatu senyawa terhadap sel hidup. Uji sitotoksitas adalah suatu uji secara *in vitro* menggunakan kultur sel dalam mengevaluasi keamanan obat, makanan, kosmetik, maupun bahan kimia lainnya (Freshney, 2000)

Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro* karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain prosesnya cepat, sel dapat dikondisikan, membutuhkan sampel yang sedikit, dan dapat memberikan gambaran terhadap sel secara langsung (Doyle dan Griffiths, 2000). Uji sitotoksitas perlu dilakukan pada senyawa kimia untuk mengetahui batas keamanannya. Ada dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksitas adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay* (Doyle dan Griffiths, 2000).

Uji sitotoksitas digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). IC_{50} merupakan konsentrasi yang dapat menunjukkan kemampuan senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50%. Nilai IC_{50} menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin kecil harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin toksik dan sebaliknya jika semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Padmi, 2008; Dona, *et al.*, 2016) The American National Cancer Institute (NCI) *guidelines* menyatakan bahwa kriteria sitotoksitas IC_{50} dari suatu ekstrak yaitu $<30 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Sudha, *et al.* 2012; Fadeyi, *et al.* 2013; Povi, *et al.* 2015).

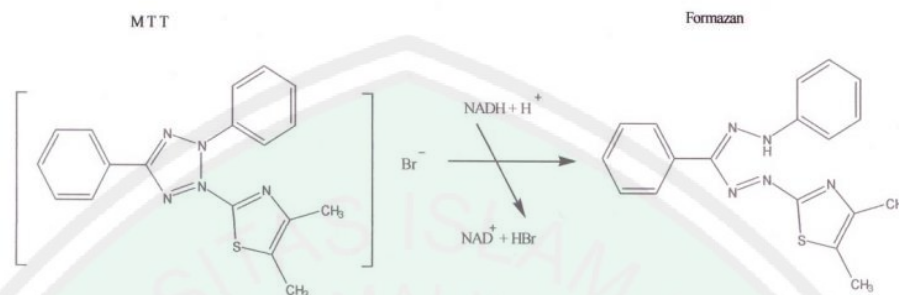
2.10. Metode *Microtetrazolium* assay

MTT adalah molekul larut berwarna kuning, yang dapat digunakan untuk menilai aktifitas enzimatik selular, didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT. Prinsip metode MTT adalah pengukuran yang dilakukan secara kolorimetri menentukan keadaan fungsional mitokondria dan menunjukkan viabilitas sel yang mekanismenya adalah garam tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning tersebut akan direduksi di dalam sel yang mempunyai aktifitas metabolik. Reduksi garam tetrazolium terjadi intraseluler menyangkut enzim suksinat dehidrogenase dari mitokondria. Mitokondria dari sel hidup yang berperan penting dalam hal ini, adalah yang menghasilkan dehidrogenase. Bila dehidrogenase tidak aktif karena efek sitotoksik, maka formazan tidak akan terbentuk. Jumlah formazan yang terbentuk, proporsional dengan aktifitas enzimatik. Reagen MTT hanya bereaksi dengan sel yang masih hidup kemudian dipecah melalui reaksi reduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan (Doyle and Griffiths, 2000; Siregar dan Hadijono, 2000; Meizarini, *et al.*, 2005; Vajhrabaya dan Suwana, 2018).

Keuntungan menggunakan metode MTT ini adalah cepat, sensitif, akurat dan banyak sampel yang bisa diuji. Kelemahan metode ini jika senyawa yang diteliti berwarna, dapat menyebabkan adanya absorbansi yang diberikan oleh sampel, sehingga harus menggunakan kontrol sampel pada pembacaan. Hal ini dilakukan agar nilai absorbansi yang diperoleh pada perhitungan benar-benar berasal dari warna ungu formazan hasil metabolisme garam tetrazolium oleh sel hidup setelah dikurangi absorbansi kontrol sampel, dengan kata lain

nilai absorbansi tersebut menunjukkan hasil pengaruh sampel saja (Siregar, 2000).

Berikut reaksi yang terjadi pada MTT Assay:



Gambar 2.4 Reaksi reduksi tetrazolium menjadi *formazan* (Dona *et al.*, 2016)

Presentase sel yang hidup dapat dihitung menggunakan rumus (Hapidin *et al.*, 2015):

$$\text{Presentase sel hidup} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = Absorbansi kontrol media (media kultur)

C = Absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

2.11 Microplate Reader

Microplate Reader disebut juga pembaca plat mikro yang pada dasarnya melakukan sejumlah fungsi diantaranya, mengukur fluoresensi dan luminesensi tempat bahan kimia pewarna berfluoresensi atau yang memancarkan suatu panjang gelombang bila terkena cahaya. Jumlah refleksi, penyerapan dan warna kemudian digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur jumlah suatu zat (Berg, *et al.*, 2015).

Awalnya, *microplate reader* dirancang untuk mengukur test antibodi, namun belakangan ini fungsinya telah disesuaikan untuk melakukan fungsi lanjutan, diantaranya mendeteksi dan memproses data biologis dan kimia menggunakan absorbansi (elisas, aktivitas enzim dan kuantifikasi asam nukleat dan protein), pendaran dan metode deteksi fluoresensi, termasuk intensitas, TRF dan polarisasi. *microplate reader* juga digunakan dalam deteksi narkoba, penelitian dan validasi bioassay dan pembuatan biofarmasi (Berg, *et al.*, 2015).

Prinsip dasar dalam pembacaan *microplate reader* adalah penyaringan khusus hanya dengan 5-6 panjang gelombang standar untuk semua *microplate reader* (yang tergantung dari jenis media yang digunakan). Sebelum penggunaan *microplate reader* harus diperhatikan instruksi KIT dengan pembaca filter. Misalnya, untuk mengukur sensitivitas tertinggi fotometer ELISA dapat dengan meletakkan substrat berwarna pada pelat pembaca untuk spektrum serapan. Fotometer ELISA memiliki filter yang cocok hampir untuk semua media (Berg, *et al.*, 2015; Research Gate, 2016).

Perbedaan *microplate reader* dengan spektrofotometer adalah, jika spektrofotometer lebih akurat, dapat mengukur pada semua panjang gelombang, dapat merekam spektrum, dapat mengukur kinetik secara terus menerus dan lebih sensitif. Sedangkan *microplate reader* lebih cepat dibandingkan spektrofotometer, dapat menggunakan banyak sampel sekaligus, dapat menggunakan volume yang lebih kecil seperti 200-500 μl untuk *microplate 96-well* (Berg, *et al.*, 2015).

Pembacaan *microplate reader* biasanya menggunakan *microplate 96-well*. Penggunaan *microplate* ini biasanya digunakan untuk mengukur banyak

sampel pada jumlah dan waktu yang sama. Hal ini dikarenakan *microplate reader* mempunyai fitur khusus dimana mereka dapat mengukur lebih banyak sampel dalam periode waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan spektrofotometer yang hanya mengukur satu hingga enam sampel sekaligus (Berg, *et al.*, 2015; Neoscientific, 2016)

2.12 Pemanfaatan Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Berbagai jenis tumbuhan telah hidup di alam ini dengan banyak manfaat yang ia bawa. Namun, masih banyak tumbuhan yang belum banyak dimanfaatkan oleh manusia karena kurangnya ilmu pengetahuan untuk memanfaatkan tumbuhan tersebut. Sebagai manusia yang dikaruniai akal oleh Allah SWT, kita wajib memanfaatkan apapun yang ada di bumi ini untuk kebaikan, salah satunya yaitu memanfaatkan tumbuhan sebagai bahan obat, sebagaimana firman Allah SWT dalam Surat Asy-Syuara ayat 7 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi berbagai macam tumbuhan yang baik”

Dalam “tafsir Al Misbah : Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur’an” (Quraish Shihab, 2002) menafsirkan bahwa maksud adri ayat ini adalah Allah telah menciptakan berbagai macam jenis tumbuhan dan manfaatnya sebagai bukti kekuasaan-Nya. Allah juga membuktikan dengan kekuasaan-Nya dengan menghidupkan dan membangkitkan siapa yang telah mati, namun masih banyak manusia yang enggan memperhatikan dan lalai dari bukti tersebut.

Kata “زَوْجٍ” memiliki arti pasangan, dalam tafsir Al-Misbah diartikan sebagai pasangan tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul di celah tanah yang

terhampar di bumi. Dengan demikian ayat ini mengisyaratkan bahwa tumbuhan juga memiliki pasangan, seperti ada yang memiliki benang sari dan putik. Yang jelas, tumbuhan juga diciptakan berpasangan dan itu dapat terlihat kapan saja. Sedangkan kata “كَرِيمٌ” memiliki arti baik dan digunakan untuk mengambarakan segala ssesuatu yang baik bagi setiap objek yang ditafsirnya dalam hal ini adalah tumbuhan. Tumbuhan yng baik adalah yumbuhan yang subur dan bermanfaat.

Kata “زَوْجٍ كَرِيمٍ” memiliki arti tumbuhan yang baik. Dalam tafsir ilmi “Tumbuhan Dalam Perspektif Al-Qur’an dan Sains” (Lajnah dan LIPI, 2010) makna dari tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan sedap dipandang. Kata ini juga disebutkan kembali dalam surat Al Luqman ayat 10 :

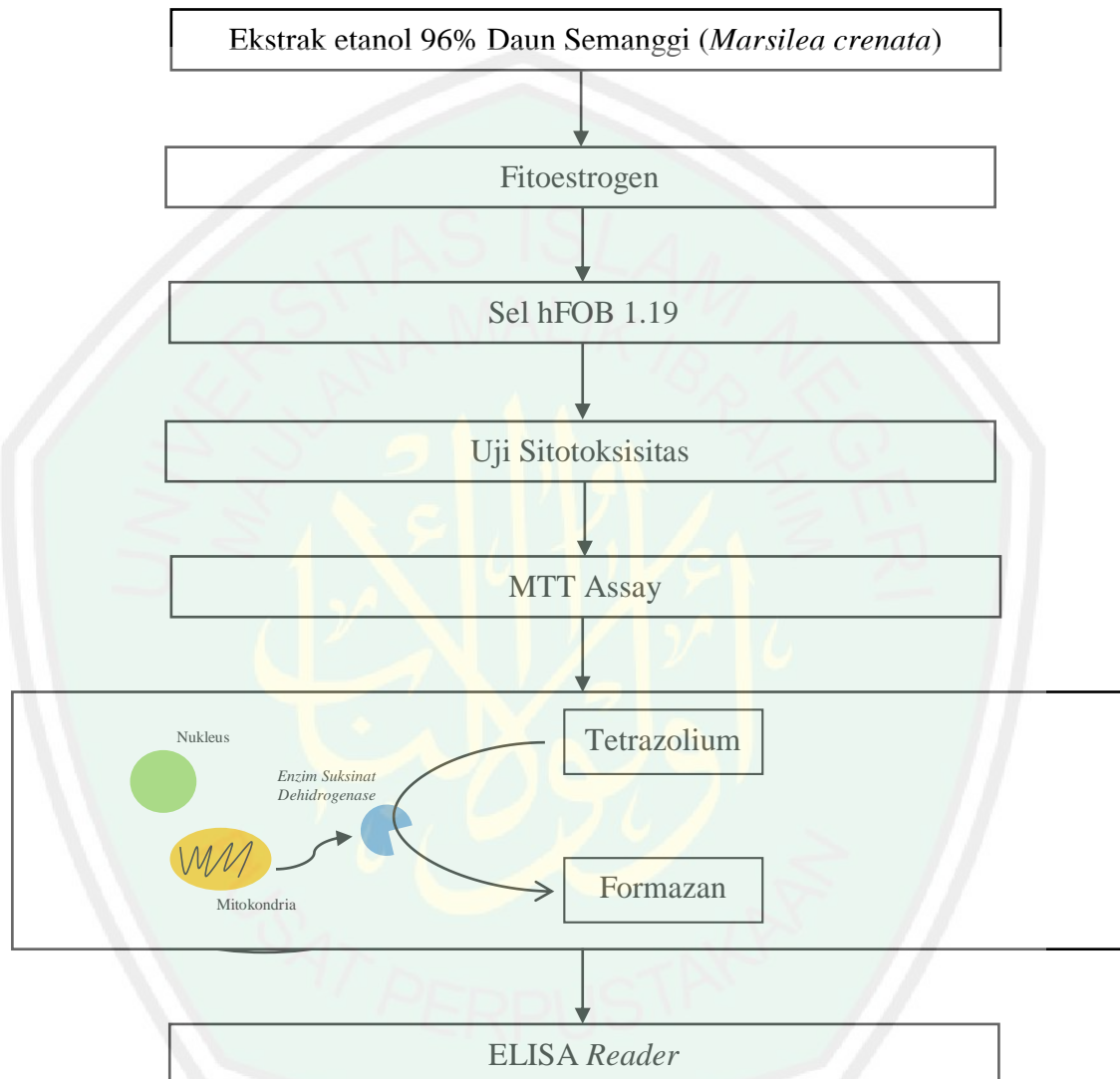
خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَأَلْقَى فِي الْأَرْضِ رَوْسًا أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : *Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik.*

Dalam tafsir Al Muyassar, menjelaskan bahwa makna kata “زَوْجٍ كَرِيمٍ” ialah tumbuhan yang berpasangan yang berwarna hijau hingga sedap dipandang mata dan memiliki banyak manfaat.

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



3.2 Uraian kerangka konseptual

Ekstrak etanol 96% tanaman semanggi (*Marsilea crenata*) diketahui memiliki senyawa yang berperan sebagai fitoestrogen. Meskipun berasal dari tanaman, fitoestrogen juga dapat memberikan efek negatif jika dikonsumsi dalam jumlah yang berlebihan, untuk itu perlu dilakukan uji sitotoksitas untuk mengetahui batas keamanan penggunaan fitoestrogen pada sel hFOB 1.19. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 96% *M. crenata*, dosis yang dipakai adalah 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 ppm.

Metode yang digunakan adalah metode MTT Assay. Uji ini berdasar pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan formazan yang berwarna biru ungu dan tidak larut. Reduksi garam tetrazolium terjadi intrasel dan melibatkan enzim suksinat dehidrogenase dari retikulum endoplasma dan mitokondria. Dengan demikian, jumlah sel yang hidup dapat diukur sebagai konsentrasi hasil produk MTT. Hasil ini kemudian akan dibaca oleh ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm yang akan menunjukkan jumlah sel yang mampu bertahan hidup setelah penambahan ekstrak etanol 96% daun semanggi. Hasil dari uji sitotoksitas ini berupa nilai IC_{50} , nilai ini menunjukkan potensi senyawa sebagai sitotoksik, semakin tinggi nilai IC_{50} , maka senyawa semakin bersifat tidak toksik.

3.3 Hipotesis

Ekstrak etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata*) tidak bersifat toksik terhadap sel hFOB 1.19 ditunjukkan dengan nilai $IC_{50} < 30\mu\text{g/ml}$

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *experimental research* yaitu penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali (Sugiono, 2010). Penelitian ini dilakukan dengan melibatkan kelompok kontrol dan kelompok eksperimen yang telah dipilih dengan teknik acak. Perlakuan terhadap sampel dilakukan secara serentak dalam waktu dan cara yang sama, dilanjutkan dengan pengamatan yang dilakukan secara bersama-sama menggunakan jenis *Control Grup Posttest Obly Design* (Notoatmojo, 2002)

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas preparasi bahan, ekstraksi bahan, dan uji sitotoksisitas ekstrak etanol 96% *M.crenata* Presl terhadap sel hFOB 1.19 dengan metode *MTT Assay* dibantu dengan instrumen *ELISA reader*.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari-Mei 2020. Penelitian ini dilaksanakan di dua laboratorium, yaitu :

1. Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Laboratorium Kultur dan Laboratorium *Bio Imaging* Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang

4.3 Sampel Penelitian

4.3.1 Sampel Tanaman

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

4.3.2 Sampel Sel

Sampel sel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dan di kultur di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *random sampling*

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun *M.crenata* Presl dengan variasi konsentrasi yaitu 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 ppm
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai absorbansi yang merepresentasikan presentase viabilitas sel hFOB 1.19
3. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu, lama inkubasi sel, keadaan lingkungan sel dan media kultur sel

4.4.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 96% *M.crenata* diperoleh dari proses ekstraksi daun *M.crenata* menggunakan metode ekstraksi Ultrasonik (UAE)
2. Variasi konsentrasi larutan sampel merupakan perbedaan kelarutan sampel pada pelarut DMSO yang dibuat sebelum ditambahkan pada sel hFOB 1.19.
3. Kontrol sel merupakan sel yang tidak diberi perlakuan.
4. Kontrol media merupakan media tanpa sel.
5. Kontrol pelarut merupakan sel yang ditambahkan pelarut DMSO 0.5% dan tween 80 0.5%.
6. Viabilitas sel diamati dengan ELISA *reader*. Pengukuran tingkat viabilitas sel bergantung pada intensitas warna ungu yang terbentuk dari reduksi garam tetrazolium menjadi kristal *formazan* dengan MTT *assay*.
7. Nilai IC_{50} merupakan besar konsentrasi yang menunjukkan 50% penghambatan terhadap populasi sel setelah diberi perlakuan. IC_{50} didapatkan dari hasil absorbansi menggunakan ELISA *reader*.
8. Inkubasi merupakan suatu teknik perlakuan bagi mikroorganisme yang telah diinokulasikan pada media (padat atau cair), kemudian media tersebut disimpan pada suhu tertentu dalam jangka waktu tertentu untuk dapat melihat pertumbuhannya. Jika suhu inkubasi tidak sesuai dengan suhu yang dibutuhkan, mikroorganisme tidak dapat tumbuh dengan baik.
9. Media kultur merupakan suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi berbentuk cair yang digunakan untuk mengembangbiakkan sel-sel di laboratorium.

10. MTT merupakan molekul larut berwarna kuning, yang dapat digunakan untuk menilai aktifitas enzimatis selular, didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT
11. *Microplate reader* merupakan instrument yang berfungsi untuk melihat fluoresensi

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Preparasi Sampel

Alat yang digunakan dalam preparasi sampel yaitu mesin grinding

4.5.1.2 Analisis Kadar Air dengan *Moisture Analyzer*

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

4.5.1.3 Ekstraksi Ultrasonik *M.crenata*

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi daun *M. crenata* diantaranya adalah neraca analitik, kaca arloji, spatula, batang pengaduk, erlenmeyer 500 ml, gelas beker 100 ml, gelas ukur, labu ukur, aluminium foil, UAE, kertas saring *whatmann*, rotary evaporator, corong gelas, corong pisah, gelas vial, oven, kaca arloji, dan pipet ukur.

4.5.1.4 Kultur sel hFOB 1.19

Alat-alat yang digunakan dalam kultur sel hFOB 1.19 adalah *conical tube* 15 ml, *conical tube* 50 ml, mikropipet 1000 µl, mikropipet 200 µl, *flask culture*, spuit 10 ml, *microfilter* 0,22 µm, *blue tip*, *yellow tip*, pipet ukur, dan *scraper*. Sedangkan instrumen yang digunakan yaitu *ThermoScientific Hera Safe KS Bio Safety Cabinet* (BSC), *L W C5 Centrifuge*, *ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂*

Incubator, ThermoScientific Aquabath 18022AQ Waterbath, Olympus IX 71 Inverted Microscope.

4.5.1.5 Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT Assay

Alat-alat yang digunakan yaitu mikropipet 200 μ l, mikropipet 1000 μ l, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *microplate 96-well, conical tube, yellow tip* dan *blue tip*. Sedangkan instrumen yang digunakan yaitu *ThermoScientific Hera Safe KS Bio Safety Cabinet (BSC), ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂ Incubator, Olympus IX 71 Inverted Microscope, hemacytometer, dan ELISA reader.*

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Ekstraksi Ultrasonik *M.crenata*

Bahan yang digunakan dalam proses ini yaitu *M.crenata* yang diambil dari sawah daerah Benowo, Surabaya, sedangkan pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%.

4.5.2.2 Kultur hFOB 1.19

Bahan-bahan yang digunakan dalam kultur sel yaitu sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari ATCC dan di subkultur di LSIH Universitas Brawijaya Malang, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) 9%, Antibiotik Penicillin-Streptomycin (PenStrep) 1%, Tripsin Na-EDTA, Kit MTT, PBS, dan alkohol 70%.*

4.5.2.3 Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT Assay

Bahan-bahan yang digunakan dalam uji sitotoksisitas dengan metode MTT assay adalah kultur sel hFOB 1.19, *Dimethyl Sulfoxide (DMSO), pereaksi MTT 5 mg/ml, Phosphate Buffer Saline (PBS) (50 mg MTT dan 10 ml PBS), Sodium Deodecyl Sulfate (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl.*

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Determinasi Tanaman

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

4.6.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dapat dilakukan sebagai berikut :

1. Daun *M.crenata* dipanen dan dicuci sebanyak 4kg
2. Dikeringkan dibawah sinar matahari pada jam 7-11 pagi
3. Diserbuk dan ditimbang serbuk simplisia *M.crenata*
4. Disimpan di tempat yang kering dan terlindung dari paparan sinar matahari

4.6.3 Analisis Kadar Air dengan *Moisture Analyzer*

Analisis kadar air ini menggunakan *moisture analyzer* bermerek *mettler toledo* dengan prosedur penggunaan sebagai berikut :

1. Dinyalakan alat *moisture analyzer*
2. Dilakukan kalibrasi dan layar menunjukkan tampilan 0,000 g
3. Dibuka penutup alat
4. Dimasukkan *sample pan* kosong ke dalam *sample pan hadler*
5. Diturunkan penutup alat dan secara otomatis alat akan menunjukkan tampilan 0,000 g pada layar monitor
6. Dimasukkan simplisia sejumlah $\pm 0,500$ gram ke dalam *sample pan*
7. Diturunkan penutup alat dan kemudian alat akan secara otomatis mengukur kadar air simplisia
8. Pengukuran selesai ditandai dengan muncul angka pada % MC pada monitor

4.6.4 Prosedur Ekstraksi

Langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak etanol 96% *M.crenata* adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang serbuk simplisia *M.crenata* sebanyak 30 gram
2. Dimasukkan simplisia ke dalam gelas beaker dan ditambahkan 200 mL etanol 96%
3. Diatur waktu untuk proses ekstraksi menggunakan UAE yaitu 2x3 menit sambil diaduk pada setiap jeda waktunya
4. Disaring hasil ekstraksi menggunakan kertas saring
5. Residu ditambahkan kembali dengan pelarut 2x150 mL Disertai pengulangan proses 3 dan 4
6. Filtrat yang terkumpul dimasukkan dalam *rotary evaporator* dengan pengaturan suhu 50° C dengan kecepatan putaran 70 rpm
7. Ekstrak hasil proses *rotary evaporator* diuapkan kembali (dikeringkan) dalam oven pada suhu 40° C

4.6.5 Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT Assay

4.6.5.1 Pembuatan Media Kultur

Prosedur pembuatan media kultur adalah sebagai berikut :

1. Disterilkan alat kultur dengan etanol 70% sebelum masuk BSC
2. Disiapkan FBS dan medium DMEM dalam *conical tube*
3. Dipindahkan PenStrep 100 µL dalam *conical tube*
4. Ditambahkan FBS 1000 µL
5. Ditambahkan medium DMEM ad 10 mL
6. Disterilisasi media menggunakan mikrofilter 0,22 µm.

4.6.5.2 Subkultur Sel hFOB 1.19

Sebelum dilakukan proses subkultur, langkah yang harus dilakukan adalah *thawing* sel dahulu dengan prosedur sebagai berikut :

1. Dikeluarkan sel dari freezer (-80⁰ C)
2. Dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37⁰ C selama 2-3 menit
3. Dimasukkan 5 mL Media Komplit (2,4 mM l-glutamine; 0,3 mg/ml g418; FBS 10%)
4. Dipindahkan sel dengan mikropipet ke *conical tube* 15 mL.
5. Dihomogenkan
6. Disentrifugasi 1600 rpm/ 5 menit
7. Dibuang supernatan dan disisakan pelet sel
8. Ditambahkan 5 mL media komplit dan dihomogenkan
9. Disiapkan *flask culture* dan dimasukkan suspensi sel ke *flask culture*
10. Diberi label (nama sel, tanggal kerja, *passage* sel) dan diamati dengan mikroskop *inverted*.

Selanjutnya dilakukan subkultur sel hFOB 1.19 dengan prosedur sebagai berikut :

1. Diambil *flask culture* berisi sel dengan konfluen 70-80%
2. Dicuci dengan PBS
3. Ditambahkan 2-3 mL 0,2% (w/v) tripsin 0,53 mM EDTA
4. Dilakukan pembersihan menggunakan *scraper*
5. Ditambahkan 5 mL MK
6. Dipipet suspensi sel dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 mL
7. Disentrifugasi 1600 rpm/ 5 menit

8. Dibuang supernatan dan disisakan pelet sel
9. Ditambahkan 10 mL MK dan dihomogenkan
10. Disiapkan *flask culture* baru dan dimasukkan suspensi sel ke *flask culture*
11. Diberi label (nama sel, tanggal kerja, *passage* sel) dan diamati dengan mikroskop *inverted*.

4.6.5.3 Pembuatan dan Penambahan Larutan Sampel pada *Plate* berisi sel hFOB 1.19

A. Pembuatan larutan sampel

Prosedur pembuatan larutan sampel adalah sebagai berikut

1. Ditimbang 2,5 mg ekstrak pekat etanol 96%
2. Ditambahkan tween 80 0,5% dan diaduk ad homogeny
3. Dilarutkan ekstrak pekat dalam 10 mL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) 0,5% (b/v) dalam *deionized water* pada labu ukur 50 ml. Untuk mendapatkan larutan DMSO 0,5% (b/v) yaitu dengan mengambil 0,5 ml DMSO dan ditambahkan *deionized water* hingga 100 mL.
4. Disaring larutan sampel induk ekstrak dengan *milipore* 0,22 μm dan disimpan dalam tabung steril.
5. Dibuat larutan 40.000 ppm dan diencerkan larutan sampel untuk perlakuan dengan beberapa konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, dan 4000 ppm dari larutan baku yang telah dibuat.

B. Pemberian larutan sampel pada plate

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Diambil sel dari incubator

2. Dibuang media sel menggunakan spuit
3. Dimasukkan PBS 100 μ L ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali
4. Dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 μ L dengan konsentrasi sebesar 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; dan 4000 ppm dan diulang sebanyak 3 kali
5. Diinkubasi kembali selama 24 jam.


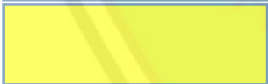



Kontrol sel berisi sel dan media kultur DMEM. Kontrol pelarut yaitu *well* yang berisi tween 80 0,5% dan DMSO 0,5%. Selanjutnya, disediakan *well* yang hanya berisi media kultur tanpa sel sebagai kontrol media.



Tabel 4.1 Plate 96-well untuk uji sitotoksitas *M. crenata*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanko		Kontrol media				Kontrol pelarut					
B												
C	125 ppm		Kontrol sel									
D	250 ppm								Kontrol sel			
E	500 ppm		Kontrol sel									
F	1000 ppm								Kontrol sel			
G	2000 ppm		Kontrol sel									
H	4000 ppm								Kontrol sel			

Keterangan:

	= Blanko
	= Perlakuan (sel + MK + ekstrak etanol 96% <i>M. crenata</i>)
	= Kontrol sel (sel + MK)
	= Kontrol pelarut (sel + tween 80 0.5% + DMSO 0.5 %)
	= Kontrol media (MK)

4.6.5.4 Pemberian Larutan MTT

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Dicuci setiap *well* yang telah ditambahkan larutan sampel
2. Ditambahkan larutan MTT 100 μL ke setiap sumuran
3. Diinkubasi kembali selama 3-4 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C
4. Diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted* apabila telah terbentuk *formazan*
5. Ditambahkan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam 0,1 M HCl sebagai reagen *stopper*
6. Ditutup dengan alumunium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu 37° C) selama 1 x 24 jam

4.6.5.5 Pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *progressing* selesai
2. Dibuka *alumunium foil* yang berfungsi sebagai pembungkus dan dimasukkan ke ELISA
3. Dibaca dengan panjang gelombang 595 nm pada masing-masing sumuran
4. Dimatikan kembali ELISA *reader*

Hubungan antara absorbansi dengan jumlah sel hidup adalah jika panjang gelombang tinggi, maka dapat dipastikan jumlah sel yang bertahan memiliki jumlah yang banyak. Kemudian dihitung prosentase sel hidup.

$$\text{persentase sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Hasil persentase sel hidup kemudian dimasukkan ke dalam aplikasi SPSS di analisis dengan menggunakan analisis probit, kemudian ditentukan nilai IC_{50} dari ekstrak etanol 96% *M. crenata*.

4.7 Analisis Data

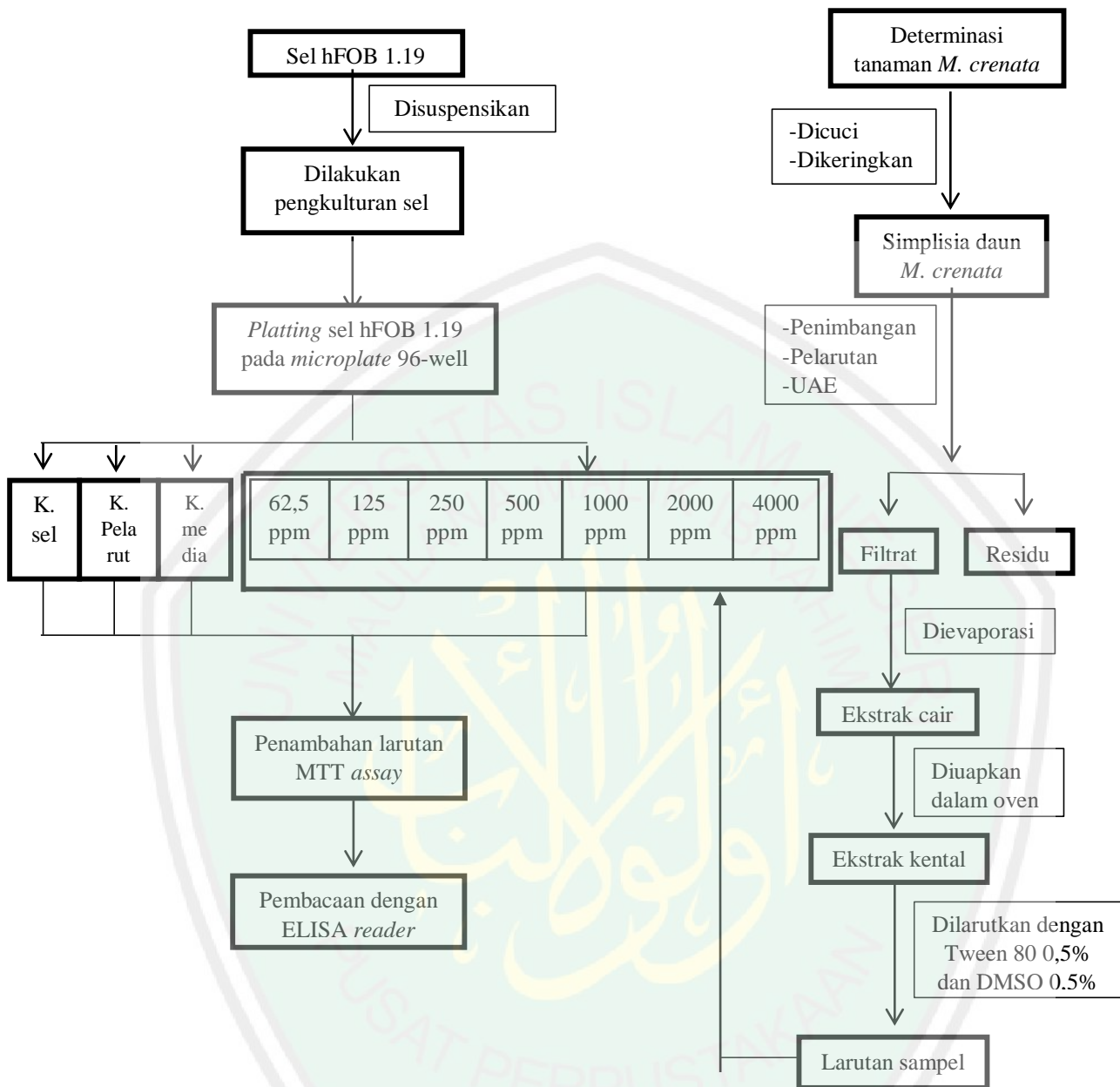
Hasil data yang diperoleh dari pengukuran berupa nilai absorbansi yang dapat digunakan untuk menghitung persentase sel hidup dengan rumus:

$$\text{persentase sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan analisis probit menggunakan SPSS versi 25.0. Analisis probit digunakan dalam pengujian biologis untuk mengetahui respon subyek yang diteliti oleh adanya stimulus berupa dosis yang diberikan (Paputungan, dkk. 2017). Sehingga diketahui nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol 96% *M. crenata*.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema alur penelitian

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, Agnis Pondinekaria., Agil Mangestuti., dan Laswati Hening.2016. “An *in Vitro* Antiosteoporotic Activity of 96% Ethanol of *Abelmoschus manihot* L. Medik Leaves Using MC3T3 Preosteoblast Cells. *Traditional Medicine Journal*”. Vol 21(3)
- Afriastini JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. *Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. Cryptograms: Ferns and fern allies*. Bogor : LIPI
- Amir, Hermansyah dan Murcitra, Bambang Gonggo. 2017. “Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7”. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 1(1): 27-32.
- Andiana,M. 2017. “Kultur Sel Baby Hamster Kidney (BHK) menggunakan Media Dulbelcco’s Modified Eagle Medium (DMEM)”. *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*. Vol 1(1)
- Ardhiyanto, HB. 2012. “Stimulasi Osteoblas Oleh Hidroksiapatit Sebagai Material *Bone Graft* Pada Proses Penyembuhan Tulang”. *Stomatognatic*. Vol 9(3)
- ATCC. *MTT Asssay* (ATCC® 30-1010K) American Type Culture Collection. www.atcc.org.
- Azmir, J, *et al.* 2013. “Technique for Extractions of Bioactive Compound from Plantt Material”. *J. Food Engineering*. Vol 2(5)
- Badan POM. 2012. *Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.
- Banu, K. S., dan Cathrine, L., 2015. “General Techniques Involved in Phytochemical Analysis”. *International Journal od Advanced Research in Chemical Science*”. Vol 2(5)
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropouse. 1st ed*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono.
- Bianchi,V.E., L,J,Dominguez., M.Barbagallo. 2014. “Nutrition and Osteoporosis”.*Journal of Aging Research and Clinical Practice*.
- Biben. 2012. “Fitoestrogen: Khasiat terhadap sistem reproduksi, Non reproduksi dan keamanan penggunaanya”. *Seminar ilmiah Naional estrogen sebagai sumber hormon alami*. Bandung
- Chemat, F, *et al.* 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products, Mechanisms, techniques, combinations, protocols, and applications. A review *Ultrasonic Sonochemistry*. Elsevier B.V

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan*. Jakarta: Direktorat Jendral POM Republik Indonesia
- Depkes RI.1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Diantini, Ajeng, dkk. 2013. “Sitotoksisitas Kombinasi Ekstrak Puspa (*Schiima wallichii*) dan Kecambah Brokoli (*Brassica oleracea*) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7”. *Fitofarmaka*. Vol 3(1)
- Diniatik, 2015. “Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (BL) Hook f & Th.) dengan Metode Spektrofotometri”. *Jurnal Ilmiah Farmasi* Vol 3(1)
- Dona, Rahma, dkk. 2016. “Uji Sitotoksisitas dan Antiproliferatif Ekstrak Etanol Daun Leucnca (*Solanum nigrum* L.) terhadap Sel Raji”. *Pharmaciana* Vol. 6 No. 2 h. 181-190.
- Doyle, A., dan Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York:John Willey and Sons
- Duffy, C, Perez K, and Partridge A. 2003 “Implications of Phhytoestrogen Intake FOR Breast Cancer”. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. Vol 73(2)
- Fadeyi, 2013. “*In Vitro* anticancer screening of 24 locally used Nigerian medical plants”. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol 13 (79)
- Fahroji dan Hendri. 2016. “Kinerja Bebebrapa Tipe Moisture Meter dala Penentuan Kadar Air Padi”. *Jurnal Lahan Suboptimal*. Vol 5(1)
- Fernandez, I., M.A.A. Gracia, M.C. Pingarron, and L.B. Jerez. 2006. “Physiological bases of bone regeneration II”. The remodeling process. *Med, Oral Patol, Cir, Bucal*. 11:E151-157.
- Fitriasarai, *et al.* 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta : Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM
- Freshney, RI. 2000. *Culture of Animal Cells, A manual of Basic Technique*, 4th edition. New York: A john Wiley & Sons inc
- Glover A. and Assinder S.J. 2006. “Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression”. *Jour. Endoc.* 189: 565-573
- Hadisaputri, YE dan Risk H, 2018. *Sel Kultur Dasar*. Sleman: CV Budi Utama
- Halimatushadyah, dkk. 2018. “Sitotoksisitas dan Induksi Apoptosis Ekstrak Etanol

- Teripang *Holothuria atra* JEIGER, 1833 pada beberapa Sel Kanker”. *JPB Kelautan dan Perikanan*. Vol 13(2)
- Hapidin, Hermizi, dkk. 2015. “*Quercus infectoria* Gall Extract Enhanced The Proliferation and Activity of Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB 1.19)”. *malays J. med Sci* 22(1):12-22.
- Hidayati, R.K., Fida, R., dan Yuni, S.R. 2017. “Profil Protein Semanggi Air (*Marsilea crenata*) yang ditanam pada Kombinasi Media Tanam Lumpur Lapindo dan Tanah Alfisol”. *LenteraBio*. Vol 6(1)
- Huda, N dan Wahyuningsih, 2016. “Karakteristik *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Sistem* (SNEEDS) Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam)”. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 3(2)
- Hughes CL., Liu G., Beall S, Foster WG, and Davise V. 2004. “Effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat”. *Exp Biol Med*. Vol 229 (108-117) Informa UK Ltd.
- Jamalidoust, M., Ravanshad, M., Namayandeh, M., Zare, M., Asaei, S., Ziyaeyan, M. 2016. “Construction of AAV-rat-IL4 and Evaluation of its Modulating Effect on A₁ (1-42)-Induced Proinflammatory Cytokines in Primary Microglia and the B92 Cell Line by Quantitative PCR Assay”. *Microbiology*. Vol9(3)
- Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Clark G., and Newbold R.R. 2002. “Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses”. *Journal of Chromatography. B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 777(1-2):179- 189.
- K Bopp, Stephanie dan Lettieri, Teresa. 2008. “Comparison of Four Different Colorimetric and Fluorometric Cytotoxicity Assays in a Zebrafish Liver Cell Line: Methodology Article”. *BMC Pharmacology* Vol. 8 No. 8.
- Kligler B. 2003. “Black Cohosh”. *American Family Physician* : 68(1): 114 - 6.
- Keil, F. J. 2007. “Modeling of Process Intensification. In Alupului, A., Ioan Calinescu, and Vasile Lavric. 2009. Ultrasonic Vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles From Medicinal Plants”. *AIDIC Conference Series*, Vol. 9 2009 page 1-8.
- Lee, W.Y., Park, H.J., Lee, R., Lee, K.H., Kim, Y.H., Ryu, B.Y., et al. 2013. “Establishment and in vitro culture of porcine spermatogonial germ cells in low temperature culture conditions”. *Stem Cell Research*. Vol 11 (1234-1249)
- Lijnah dan LIPI, 2010. *Tafsir Ilmi: Tumbuhan dalam Perspektif Al-Qur'an dan*

Sains. Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an

- Ma'arif, B., Mangestuti A., Hening L., 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 No.3 pages 55-59.
- Ma'arif, B.2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid dari Ekstrak n-Heksan Daun *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga
- Ma'arif, Burhan., Mangestutu, A., dan Hening, L. 2016. "Phytochemical Assessment on n-heksana ekstrak and fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS". *Journal Traditional Medicine*. Vol 21(2)
- Ma'arif, Burhan., Mangestutu, A., dan Hening, L. 2016. "Phytochemical Assessment on n-heksana ekstrak and fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS". *Journal Traditional Medicine*. Vol 21(2)
- Ma'at, Suprpto, 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR
- Medina-Torres, N., Ayora Talavera, T., Espinosa Andrews, H., Sanchez, A., Pacheo, N. 2017. "Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. Vol 7(47)
- Meizarini, *et al.* 2005. Sitotoksisitas Bahan Restorasi *Cyanoacrylate* Dengan Variasi Perbandingan *Powder* Dan *Liquid* Menggunakan MTT Assay
- Mufidah, T., Wibowo, H., Subekti, D.T. 2015. Jurnal pengembangan metode ELISA dan Teknik deteksi cepat dengan Imunostik Antibodi Anti *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas (*Cyprinid carpio*). Vol 10
- Mukhriani, 2014. "Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif". *Jurnal Kesehatan*. Vol VII(2)
- Najib,A. dkk. 2016. "Standarisasi Ekstrak Daun Jati Belanda dan Teh Hijau". *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Vol 4(2)
- Ngaha Njila, M.L., Mahdi, E., Massoma Lembe. D., Nde, Z., Nyonseu, D.2017. Review On Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. ACBES-2017
- Notoatmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta
- Padmi, A. 2008. Uji sitotoksisitas Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L) terhadap sel HeL. *Skripsi; Universitas Muhammadiyah Surakarta*.

- PERKA BPOM RI. 2014. *Persyaratan Mutu Obat Tradidional*. Berita Negara Republik Indonesia
- Poelengan, M., Andriani, K., Susanti, S., Sussan,L., Komala, M., 2007, Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Bungur (*Largerstormenia speciosa* Pers) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro, Laporan Penelitian, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Pradana, D.L.C. 2016. “Skrining Triterpenoid dan Formulasi Granul dari Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L) sebagai neuroprotektor pada perokok”. *Bio-site*. Vol 02(2)
- Rachmawati, S., Widiyanti, P.M, dan Munawar, H. 2013. Pengembangan Indirect Dipstick ELISA untuk Deteksi aflatoksin B1 pada pakan dan jagung. Vol 30(2)
- Ramadani, Meri. 2010. Faktor-faktor resiko osteoporosis dan upaya pencegahannya. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. Vol 4(2)
- Rani PS., Nagasowjanya g, Ajitha A, Maheswarrao VU. 2015. Aquametry-the Moisture Content Detrmination. *World J Pharm and Pharmaceu Sci*. Vol 4(8)
- Rohman 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Roland, B R. 2008. Chapter 1: Anatomy And Ultrasturcture Of Bone Histogenesis, Growth And Remodelling. In: Arnold A. editor. Disease of bone and mineral metabolism.
- Rosen C. 2011. Chapter 11: The Epidemilogy And Pathogenesis Of Osteoporosis. In: Arnold A. editor. Disease of Bone and Mineral Metabolisme.
- Saifudin, Aziz., R. Viesa., H. Yuda. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Saleh, N.J., dan Moses, S. 2017. “Serbuk Semanggi Sebagai Minuman Herbal”. *TEKNOBUGA*. Vol 4(1)
- Setiyohadi, B. 2006. *Osteoporosis. Dalam: Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Jilid II, Edisi IV, Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1259-73.*
- Setiyohadi, B. 2010. “Peran Osteoblas Pada Remodeling Tulang”. Dalam: *Kumpulan Makalah Temu Ilmiah Reumatologi; 32-7.*
- Shihab, Quraish. 2002. *Tafsir Al Mishbah; Pesan, Kesan dan Keserasian Alqur'an*. Jakarta: Lentera Hati

- Sihombing, *et al.* 2012. Peran Estrogen pada Remodeling Tulang. *Jurnal Biomedik*. Vol 4(3)
- Siregar dan Hadijono, 2000. “Uji Sitotoksisitas dengan esei MTT”. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. Vol 7 (28-32)
- Sirotkin AV, Harrath AH. 2014. Phytoestrogens and their effects. *Elsivier: European Journal of Pharmacology* 741; 230–236
- Srisawat, T., Chumkaew, P., Heed-Chim, W., Sukpondma, Y., and Kanokwiroon, K. “Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica diospyroides symington type LS*”. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Vol 12(1)
- Stevenson J.C and Marsh M.S. 2007. *An Atlas Of Osteoporosis*. Third Edition.
- Sudha, S dan Selvam S. 2012. “Characterization of Cytotoxic Compound From Marine Sediment Derived Actinomycete *Streptomyces Avidinii* Strain SU4”. *Asian Pac J Trop Biomed*. Vol 2 (10)
- Sudjadi dan Rohman, 2018. *Analisis Derivat Babi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Sugiarto, Djaja. 2017. *Preparasi Sampel*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada
- Sugiarto., Aulia, Azka., Asadatun, Abdullah. 2012. “Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Masilea crenata* C.Presl)”. *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1 (3)
- Sugiono, DR. 2010. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Jakarta : Alfabeta
- Suryadi, Y., Manzila, Y dan Machmud, M.2009. Jurnal Potensi Pemanfaatan perangkat diagnostik ELISA serta variannya untuk deteksi patogen tanaman. Vol 5(1)
- Syafhan, 2005. *Uji Sitotoksisitas Sediaan Jadi Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boert) terhadap Sel MCF-7 (sel kanker payudara) secara in vitro*. Fakultas Farmasi. Universitas Indonesia
- Tahar, dkk.2015. “Uji Aktivitas Penghambatan Fraksi Non Polar Ekstrak Klika Anak Dara (*Croton oblongus* BURM F.) Terhadap Sel Kanker Hela”. *JF FKIK UINAM*. Vol 3(3)
- Titisari, N., Ahmad, F., Anom, A., Pratiwi, T. 2016. “The Effects of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Again Estrogen, Progesterone and Uterine Histology on Rat (*Rattus norvegicus*)”. *International Journal of PharmTech Research*. Vol 9(6)

- Trisunuwati, Pratiwi. 2017. "Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Againsts Blood Estrogen-Progesterone Balance, Blood Calcium Levels and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Ratus novvergicus*)". *Research Journal of Life Science*. Vol 4(1)
- Tsourounis C. 2004. "Clinical effects of fitoestrogens". *Clinical Obstetric and Gynecology* 44(4):836-42
- Vajhrabaya dan Suwanna, 2018. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology*. Vol 9 (15)
- 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.
- Voight,R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Wahjuningsih, 2011. "Suplementasi *Fetal Bovine Serum* (FBS) Terhadap Perumbuhan *In Vitro* Sel Folikel Kambing PE". *Jurnal Ternak Tropika*. Vol 12(1)
- Wahyuni, Fatma Sri., Triastuti, Dini Hara., dan Arifin, Helmi. 2015. "Cytotoxicity Study of Ethanol Extract of The Leaves of Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) on T47D Breast Cancer Cell line". *Pharmacognosy Journal* Vol. 7 No.6.
- Wahyuni, R, dkk. 2014. "Pengaruh cara pengeringan dengan oven, kering angin dan cahaya matahari langsung terhadap mutu simplisia herba sambiloto". *Jurnal Farmasi Higea*. Vol 6(2)
- Walker, John M and Ralph Rapley. 2008. *Handbook of Molecular Biomethods Second Edition*. University of Herthfordshire Hartfield, Herthfordshire, UK: Humana Press
- Whitten, P.L dan Patisaul, H.B. 2001. "Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior dan estrogen receptor α and β dependent gene expression in the brain". *Endocrinology*. Vol 142(7)
- Winangsih., E. Prihastanti., S. Parman. 2013. "Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.)". *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. Vol 21(1)
- Wulandari, R.C.L, 2015. "Terapi Sulih Hormon Alami Untuk Menopause". *Jurnal Involusi Kebidanan*. Vol 5 No 10

Yati, 2014. "Formulasi Hard Molded Lozenges Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) dengan Penambahan Kombinasi Corn Syrup dan Manitol". *Pharmacy*. Vol 11(2)

Zulfikar, 2008. *Kimia Kesehatan Jilid 3*. Jakarta : Departemen Pendidikan Nasional



