

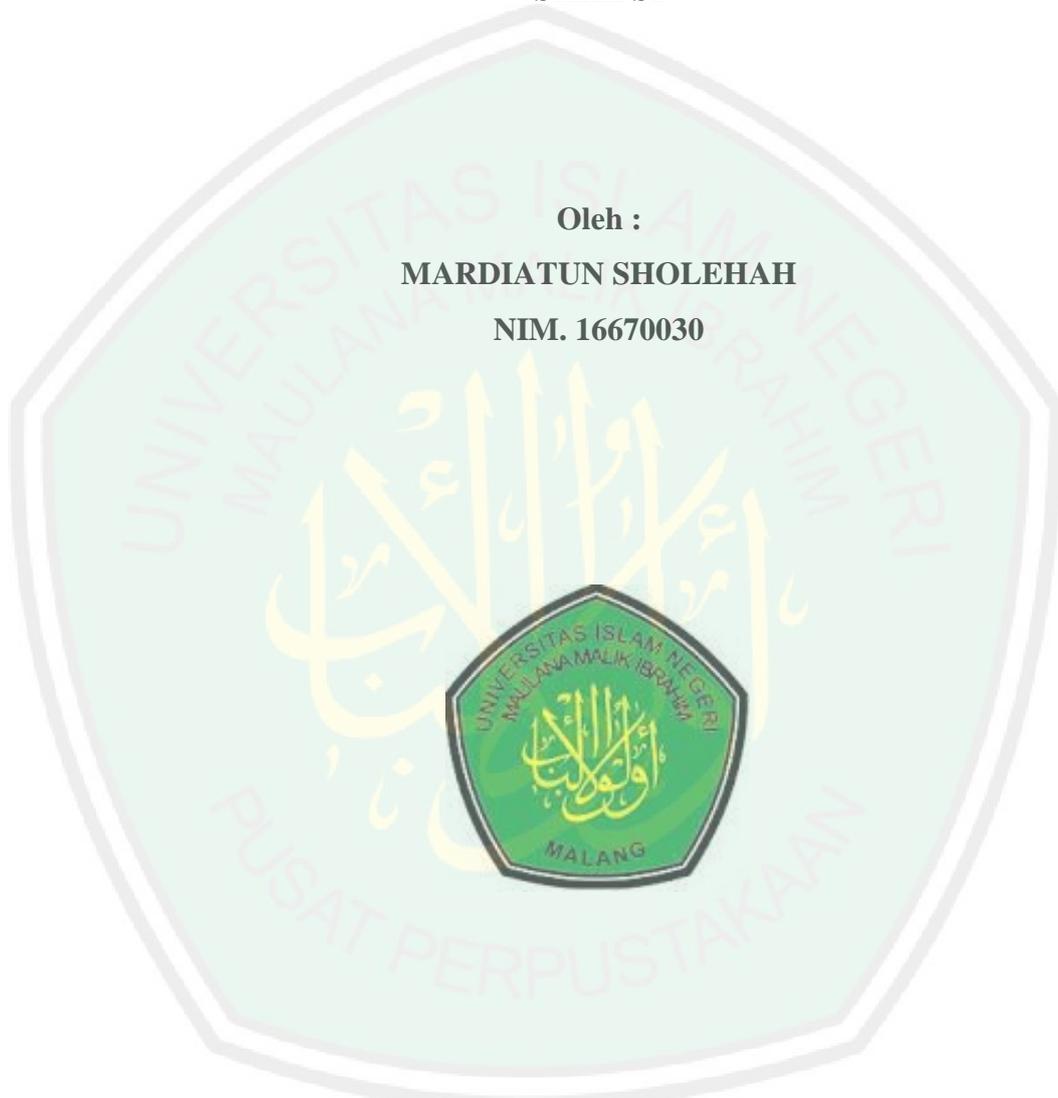
**EKSPRESI ESTROGEN RESEPTOR  $\beta$  (ER- $\beta$ ) BEBAS OLEH FRAKSI  
*n*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) PADA SEL  
OSTEOBLAS (hFOB 1.19)**

**SKRIPSI**

Oleh :

**MARDIATUN SHOLEHAH**

**NIM. 16670030**



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

**EKSPRESI ESTROGEN RESEPTOR  $\beta$  (ER- $\beta$ ) BEBAS OLEH FRAKSI  
*n*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) PADA SEL  
OSTEOBLAS (hFOB 1.19)**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**MARDIATUN SHOLEHAH**

**NIM. 16670030**

**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**

**EKSPRESI ESTROGEN RESEPTOR  $\beta$  (ER- $\beta$ ) BEBAS OLEH FRAKSI  
*n*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) PADA SEL  
OSTEOBLAS (hFOB 1.19)**

**SKRIPSI**

Oleh :

**MARDIATUN SHOLEHAH**

**NIM. 16670030**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:

Tanggal : 25 Juli 2020

**Ketua Penguji** : Apt. Rahmi Annisa, M. Farm (  )  
NIP. 1989-416 20170101 2 123

**Anggota Penguji** : Apt. Burhan Ma'arif Z.A, M. Farm (  )  
NIP. 19900221 201801 1 001

Dewi Sinta Megawati, M. Sc. (  )  
NIP. 19840116 20180101 2 125

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

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Farmasi

  
Apt. Abdul Hakim, M.P.I. M. Farm.  
NIP. 19761214 200912 2 004

**EKSPRESI ESTROGEN RESEPTOR  $\beta$  (ER- $\beta$ ) BEBAS OLEH FRAKSI  
*n*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) PADA SEL  
OSTEOBLAS (hFOB 1.19)**

SKRIPSI

Oleh:

**MARDIATUN SHOLEHAH**  
NIM. 16670030

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 25 Juli 2020

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Dewi Sinta Megawati, M.Sc.  
NIP. 19840116 20170101 2 125

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Farmasi

Apt. Abdul Hakim, M.P.I. M. Farm.  
NIP. 19761214 200912 2 004

## LEMBAR PERSEMBAHAN

ALHAMDULILLAHIROBBIL'ALAMIN....

Dengan memanjatkan puji serta syukur kehadirat Allah SWT beserta Baginda Rasullullah Muhammad SAW yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Dengan rasa syukur yang tiada tara, penulis juga mempersembahkan tulisan karya sederhana ini kepada :

Kedua orang tua ,ayahanda Ahmad Alim (alm.) dan ibunda tercinta Maryam yang selalu mengingatkan, memberi semangat serta selalu mengucapkan nama penulis dalam setiap doanya dan kasih sayang yang tiada tara yang selalu diberikan tanpa henti. Kepada kakak Nurindah Amalia, Indrawan Hariadi, Fauzul Marom, dan Dinda Kiranasari yang selalu mendengarkan keluh kesah serta selalu memberikan motivasi untuk maju pantang menyerah dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

Terimakasih juga kepada sahabat (Hannik, Putri, Karin), rekan-rekan tersayang anggota ABB UNNIOR UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, teman-teman proyek fitoestrogen16 (Kamil, Dian, Bela, Aam, Riki, Qodir), fitoestrogen '17 yang telah memberikan bantuan doa dan semangat selama menjalani proses perkuliahan.

Kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis ucapkan terimakasih.

**Mardiatun Sholehah / 16670030**

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Mardiatun Sholehah

NIM : 16670030

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : Ekspresi Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER-  $\beta$ ) Oleh Fraksi *n*-Heksana Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C Presl) Pada Sel Osteoblas (hFOB 1.19)

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

Malang, 25 Juli 2020  
Yang Membuat Pernyataan,



Mardiatun Sholehah  
NIM. 16670030

## MOTTO

SEMUANYA PASTI BERJALAN.

SEMUANYA PASTI BERLALU.

KITA HANYA PERLU BERUSAHA DAN BERDOA



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan pada kehadiran Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayahnya-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal skripsi. Proposal ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian Sarjana Farmasi, Program Studi Farmasi di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Proposal skripsi ini bisa terselesaikan tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih 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. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, 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. Apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm., Dewi Sinta Megawati, M.Sc selaku dosen pembimbing proposal skripsi, Apt. Rahmi Annisa, M. Farm., selaku penguji utama, Dr. Apt. Roihatul Muti'ah, M. Kes selaku penguji agama skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.

5. Choirul Chotimah, M. Si, Helly Nurul Karima, M. P beserta staff maupun laboran Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya yang telah memberikan pengalaman dan arahan kepada penulis.
6. Segenap sivitas 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 Ahmad Alim (alm.) dan Ibu Maryam dan juga saudara yang selalu memberikan semangat dalam menyelesaikan kewajiban ini.
8. Teman-teman Asosiasi Bola Basket (Cilgoo, Plar, Bursa, Mali, Ndasem, Jeti, Bungus, Jintong, Balid, Kosin) UKM UNIOR yang selalu memberi semangat dan menemani ketika mengerjakan naskah ini.
9. 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 proposal skripsi masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, namun penulis tetap berharap semoga proposal 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, 25 Juli 2020

Penulis

## DAFTAR ISI

|   |             |
|---|-------------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b>  |             |
| <b>HALAMAN PERSETUJUAN</b>  |             |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b>   |             |
| <b>LEMBAR PENGESAHAN</b>  |             |
| <b>LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b>                               |             |
| <b>MOTTO</b>  |             |
| <b>KATA PENGANTAR.....</b>  | <b>i</b>    |
| <b>DAFTAR ISI.....</b>  | <b>iii</b>  |
| <b>DAFTAR GAMBAR.....</b>   | <b>vi</b>   |
| <b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>DAFTAR TABEL.....</b>  | <b>xx</b>   |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>   | <b>x</b>    |
| <b>ABSTRAK.....</b>   | <b>xi</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>xii</b>  |
| <b>مستخلص البحث.....</b>  | <b>xiii</b> |
| <b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Latar Belakang.....   | 1           |
| 1.2 Rumusan Masalah.....  | 6           |
| 1.3 Tujuan .....  | 6           |
| 1.3.1 Tujuan Umum.....  | 6           |
| 1.3.2 Tujuan Khusus.....  | 6           |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....  | 6           |
| 1.5 Batasan Penelitian.....   | 7           |
| <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>                                     | <b>8</b>    |
| 2.1 Tinjauan Tanaman Semanggi.....                                      | 8           |
| 2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi Tanaman.....                           | 9           |
| 2.1.2 Morfologi Tanaman <i>M. crenata</i> .....                         | 9           |
| 2.1.3 Manfaat dan Kandungan Tanaman.....                                | 10          |
| 2.2 Tinjauan Metode Ekstraksi.....                                      | 13          |
| 2.3 Tinjauan Ekstraksi <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i> (UAE)..... | 14          |
| 2.4 Tinjauan Ekstrak.....   | 16          |
| 2.5 Tinjauan Fraksinasi Cair-Cair.....                                  | 17          |
| 2.6 Tinjauan Defisiensi Estrogen.....                                   | 18          |
| 2.7 Tinjauan Osteoporosis.....  | 19          |
| 2.8 Tinjauan Pembentukan Tulang (Osteogenesis).....                     | 21          |
| 2.9 Tinjauan Remodeling Tulang.....                                     | 22          |
| 2.10 Tinjauan Fitoestrogen.....   | 23          |
| 2.11 Tinjauan Estrogen.....   | 24          |
| 2.12 Tinjauan Reseptor Estrogen.....                                    | 26          |
| 2.13 Tinjauan Sel hFOB 1.19.....  | 28          |
| 2.14 Tinjauan Sel Osteoblas.....  | 29          |
| 2.15 Tinjauan <i>Immunocytochemistry</i> (ICC).....                     | 30          |
| 2.16 Tinjauan <i>Confocal Scanning Laser Microscopy</i> (CLSM).....     | 31          |
| <b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....</b>                                 | <b>33</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1 Kerangka Konseptual.....   | 33        |
| 3.2 Uraian Kerangka Konseptual.....  | 34        |
| <b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>   | <b>35</b> |
| 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....  | 35        |
| 4.1.1 Jenis Penelitian.....  | 35        |
| 4.1.2 Rancangan Penelitian.....  | 35        |
| 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....   | 35        |
| 4.3 Sampel Penelitian.....   | 36        |
| 4.3.1 Sampel Tanaman.....  | 36        |
| 4.3.2 Sampel Sel.....  | 36        |
| 4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....                                      | 36        |
| 4.4.1 Variabel Penelitian.....   | 36        |
| 4.4.2 Definisi Operasional.....  | 36        |
| 4.5 Alat dan Bahan.....  | 37        |
| 4.5.1 Alat.....  | 37        |
| 4.5.1.1 Kultur Sel hFOB 1.19.....  | 37        |
| 4.5.1.2 Uji Aktivitas dengan Menggunakan Metode ICC.....                                   | 38        |
| 4.5.2 Bahan.....   | 38        |
| 4.5.2.1 Kultur Sel hFOB 1.19.....  | 38        |
| 4.5.2.2 Uji Aktivitas dengan Menggunakan Metode ICC.....                                   | 38        |
| 4.6 Prosedur Penelitian.....   | 39        |
| 4.6.5 Kultur Sel hFOB 1.19.....  | 40        |
| 4.6.6 Pembuatan Sampel.....  | 41        |
| 4.6.7 Uji Aktivitas dengan Metode ICC.....   | 41        |
| 4.6.7.1 Peletakan Sel Dalam 24 <i>Well-Microplate</i> .....                                | 41        |
| 4.6.7.2 Pemberian Fraksi N-Heksana <i>M. crenata</i> .....                                 | 42        |
| 4.6.7.3 Pewarnaan ER- $\beta$ Bebas Menggunakan Metode<br><i>Immunocytochemistry</i> ..... | 42        |
| 4.6.7.4 Pengamatan <i>Confocal Laser Scanning</i><br><i>Microscopy</i> .....               | 42        |
| 4.7 Skema Alur Penelitian.....   | 43        |
| 4.8 Analisa Data.....  | 44        |
| <b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>  | <b>46</b> |
| 5.1 Perlakuan dan Preparasi Sampel.....  | 46        |
| 5.2 Analisa Data Ekspresi ER- $\beta$ .....  | 52        |
| 1. Uji Normalitas.....   | 52        |
| 2. Uji Homogenitas.....  | 52        |
| 3. Uji Korelasi Data.....  | 54        |
| 4. Uji <i>Least Significant Difference</i> .....   | 55        |
| 5. Uji Beda Nonparametrik.....   | 56        |
| 6. Uji Probit.....   | 56        |
| 5.3 Aktivitas Estrogenik Fraksi n-Heksana Daun Semanggi.....                               | 57        |
| 5.4 Tumbuhan Obat Menurut Perspektif Islam.....  | 60        |
| <b>BAB VI PENUTUP.....</b>   | <b>64</b> |
| 6.1 Kesimpulan.....  | 64        |
| 6.2 Saran.....   | 64        |

**DAFTAR PUSTAKA..... 65**

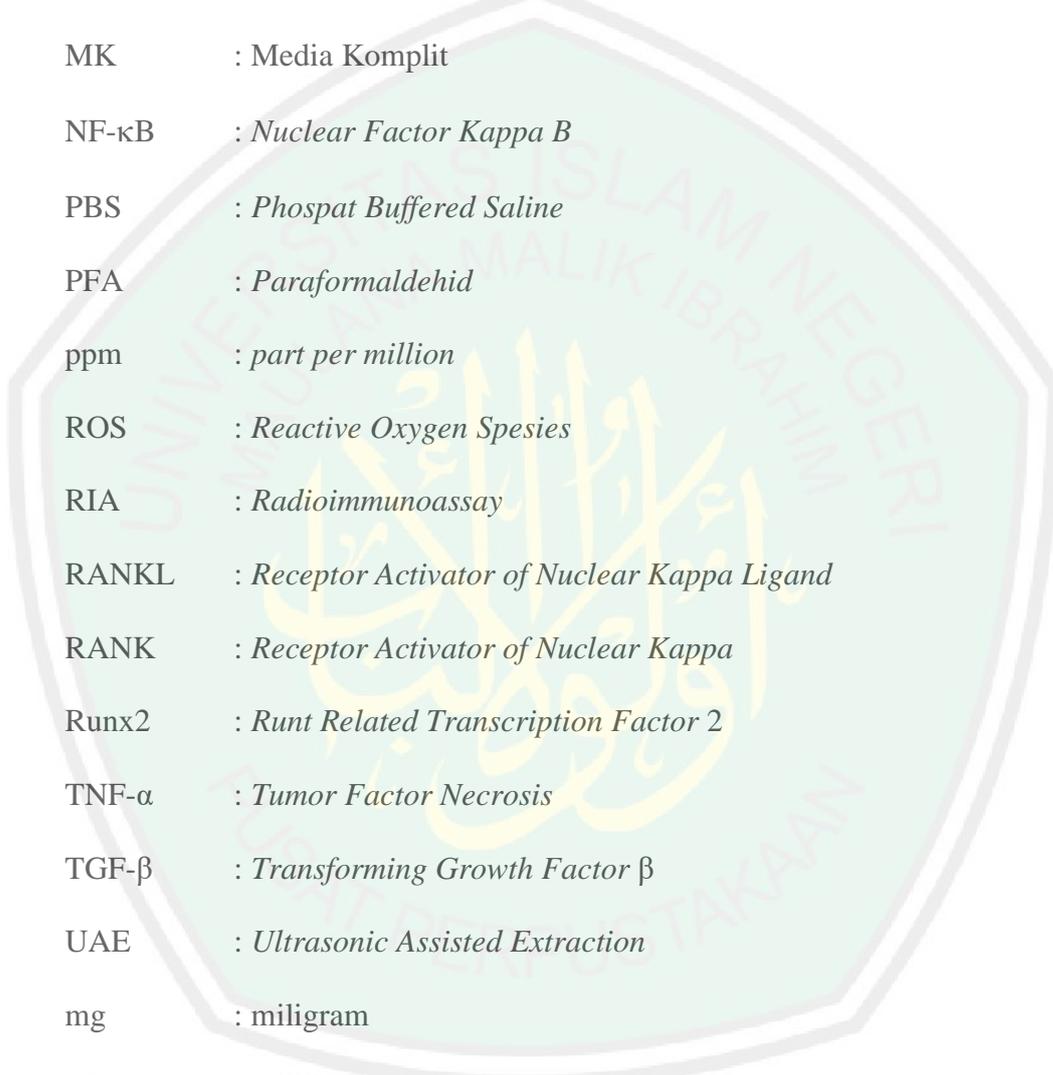


## DAFTAR GAMBAR

|  |    |
|--|----|
| <b>Gambar 2.1</b> Tanaman Semanggi ( <i>M. crenata</i> ) .....             | 9  |
| <b>Gambar 2.2</b> Struktur Isoflavon .....                                 | 12 |
| <b>Gambar 2.3</b> Proses terjadinya ekstraksi menggunakan metode UAE ..... | 11 |
| <b>Gambar 2.4</b> Proses mekanisme ekstraksi UAE .....                     | 15 |
| <b>Gambar 2.5</b> Perbandingan tulang normal dengan osteoporosis .....     | 21 |
| <b>Gambar 2.6</b> Proses remodeling tulang.....                            | 23 |
| <b>Gambar 2.7</b> Struktur Estradiol .....                                 | 25 |
| <b>Gambar 2.8</b> Mekanisme pemberian efek hormon estrogen.....            | 29 |
| <b>Gambar 2.9</b> Pengamatan CLSM.....                                     | 32 |
| <b>Gambar 5.1</b> Sel hFOB 1.19 dengan konfluensi 70-80%.....              | 51 |
| <b>Gambar 5.2</b> Ekspresi ER- $\beta$ dengan CLSM.....                    | 54 |
| <b>Gambar 5.3</b> Ekspresi ER- $\beta$ Pada masing-masing dosis.....       | 56 |

**DAFTAR SINGKATAN**

|                    |  |
|--------------------|--|
| $\alpha$           | : Alfa                                       |
| $\beta$            | : Beta                                       |
| $^{\circ}\text{C}$ | : derajat celsius                            |
| ..%                | : Persen                                     |
| ANOVA              | : <i>Analysis of Variance</i>                |
| ALP                | : <i>Alkaline Phosphatase</i>                |
| AU                 | : <i>Arbiturary Unit</i>                     |
| BMD                | : <i>Bone Mineral Density</i>                |
| BMUs               | : <i>Bone Multiceluller Units</i>            |
| BSC                | : <i>Bio Safety Cabinet</i>                  |
| CLSM               | : <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>  |
| DMEM               | : <i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i> |
| DMSO               | : Dimetil Sulfoksida                         |
| ED <sub>50</sub>   | : <i>Effective Dose 50</i>                   |
| ER                 | : Estrogen Reseptor                          |
| ER- $\beta$        | : Estrogen Reseptor $\beta$                  |
| ER*                | : Estrogen Reseptor Teraktivasi              |
| FBS                | : <i>Fetal bovine serum</i>                  |
| hFOB               | : <i>Human Fetal Osteoblast</i>              |
| HRT                | : <i>Hormon Replacement Therapy</i>          |
| ICC                | : <i>Immunochytochemistry</i>                |
| IGF                | : <i>Insulin Growth Factor</i>               |



|       |   |
|-------|---|
| IL-1  | : <i>Interleukin-1</i>                              |
| IL-6  | : <i>Interleukin-6</i>                              |
| kHz   | : kilo hertz  |
| LSD   | : <i>Least Signifikan Different</i>                 |
| MK    | : Media Komplit                                     |
| NF-κB | : <i>Nuclear Factor Kappa B</i>                     |
| PBS   | : <i>Phospat Buffered Saline</i>                    |
| PFA   | : <i>Paraformaldehyd</i>                            |
| ppm   | : <i>part per million</i>                           |
| ROS   | : <i>Reactive Oxygen Spesies</i>                    |
| RIA   | : <i>Radioimmunoassay</i>                           |
| RANKL | : <i>Receptor Activator of Nuclear Kappa Ligand</i> |
| RANK  | : <i>Receptor Activator of Nuclear Kappa</i>        |
| Runx2 | : <i>Runt Related Transcription Factor 2</i>        |
| TNF-α | : <i>Tumor Factor Necrosis</i>                      |
| TGF-β | : <i>Transforming Growth Factor β</i>               |
| UAE   | : <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>             |
| mg    | : miligram  |
| mL    | : mililiter   |
| μL    | : microliter  |

## DAFTAR TABEL

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabel 5.1</b> Ekspresi ER- $\beta$ Dosis Perlakuan Fraksi n-Heksana daun <i>M. crenata</i> ..... | 51 |
| <b>Tabel 5.2</b> Hasil Uji Normalitas Ekspresi ER- $\beta$ .....                                    | 56 |
| <b>Tabel 5.3</b> Hasil Uji Homogenitas <i>Levene's Test</i> .....                                   | 56 |
| <b>Tab4l 5.4</b> Uji Korelasi <i>Spearman Rho</i> .....   | 58 |
| <b>Tabel 5.5</b> Hasil Uji <i>Least Signifficant Difference (LSD)</i> .....                         | 59 |
| <b>Tabel 5.6</b> Hasil Uji <i>Kruskal Wallis Test</i> .....   | 60 |
| <b>Tabel 5.7</b> Hasil Nilai Probabilitas.....  | 60 |

**DAFTAR LAMPIRAN**

|  |    |
|--|----|
| <b>Lampiran 1.</b> Perhitungan dan Preparasi Sampel..... | 70 |
| <b>Lampiran 2.</b> Dokumentasi Penelitian.....           | 72 |
| <b>Lampiran 3.</b> Analisa Data.....                     | 75 |



## ABSTRAK

Sholehah, Mardiatun. 2020. **Ekspresi Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER-  $\beta$ ) Bebas Fraksi *n*-Heksana Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C Presl) Pada Sel Osteoblas (hFOB 1.19). *Skripsi*. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang Pembimbing (I) apt. Burhan Ma'arif ZA, M. Farm. (II) Dewi Sinta Megawati, M. Sc. Penguji : apt. Rahmi Annisa, M. Farm.**

Pada wanita pascamenopause yang mengalami defisiensi estrogen dapat menyebabkan berbagai macam masalah, diantaranya adalah osteoporosis. Salah satu alternatif yang muncul dan berpotensi untuk menggantikan hormon estrogen adalah fitoestrogen. Daun semanggi (*Marsilea crenata* C Presl) mengandung berbagai macam senyawa yang memiliki fungsi mirip dengan estrogen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melaporkan peran pada fraksi *n*-heksana daun semanggi (*Marsilea crenata* C Presl) dalam meningkatkan aktivitas osteoblas pada proses pembentukan tulang terhadap sel hFOB 1.19. Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *True experimental post test only* dengan menggunakan metode ICC dan instrumen CLSM. Penelitian ini dilakukan dengan pemberian fraksi *n*-heksana dengan varian dosis 62,5; 125; dan 250 ppm, serta pemberian genistein sebagai kontrol positif pada sel hFOB 1.19. Analisa statistika menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada semua kelompok perlakuan dengan uji *Kruskall Wallis* sebesar 0,006. Hasil uji LSD pada penelitian ini menunjukkan ketiga dosis mampu untuk menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19. Penelitian ini membuktikan bahwa fraksi *n*-heksana daun semanggi (*Marsilea crenata* C Presl) memiliki kandungan senyawa estrogenik sebagai agen untuk meningkatkan aktivitas osteoblas (sel hFOB 1.19) melalui penurunan ekspresi ER- $\beta$  bebas sel hFOB 1.19 pada dosis 125 ppm sebagai dosis optimal.

**Kata kunci** : *Marsilea crenata* C Presl, fitoestrogen, sel hFOB 1.19.

## ABSTRACT

Sholehah, Mardiatun. 2020 **Expression of Free Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) n-Hexane Fraction of Cloverleaf (*Marsilea crenata* C Presl) in Osteoblast Cells (hFOB 1.19)**. *Thesis*. Study Program of Pharmacy. Faculty of Medical and Health Sciences. Maulana Malik Ibrahim Islamic State University of Malang. Advisor (I) apt. Burhan Ma'arif ZA, M. Farm. (II) Dewi Sinta Megawati, M. Sc. Examiner: apt. Rahmi Annisa, M. Farm.

Postmenopausal women with estrogen deficiency are able to face many problems, including osteoporosis. One of the alternatives which appear and potentially substitute the estrogen hormone is phytoestrogen. Cloverleaf (*Marsilea crenata* C Presl) contains various compounds that have function similar to estrogen. This research aimed to report the role in n-hexane fraction of cloverleaf (*Marsilea crenata* C Presl) in increasing the osteoblast activity in bone formation process on hFOB 1.19 cell. It used *True experimental post-test only* with ICC method and CLSM instrument. This research was conducted by distributing n-hexane fraction with dose variance of 62,5; 125; and 250 ppm, and giving genistein as the positive control in hFOB 1.19 cell. Statistical analysis showed a significant difference in all treatment groups with Kruskal Wallis test of 0,006. The LSD result of this research stated that all doses of the n-hexane fraction of cloverleaf can increase expression of free ER- $\beta$  hFOB. This research approve that n-hexane fraction contained estrogenic compound as the agent to increase the osteoblast activity (hFOB 1.19 cell) by expression reduction of free ER- $\beta$  hFOB 1.19 cell and optimal dose of 125 ppm.

**Keywords:** *Marsilea crenata* C Presl, phytoestrogen, hFOB 1.19 cell

### مستخلص البحث

مرضيتن صالحة. 2020. التعبير عن الاستروجين ل (ER-  $\beta$ ) جزء n Hexane من برسيم  
 (Marsilea crenata C Presl) في خلايا Osteoblast (hFOB 1.19). بحث جامعي. قسم  
 الصيدلة. كلية الطب والعلوم الصحية. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. (I) apt برهان  
 معاريف ZA، الماجستير. (II) ديوي سينتا ميجاواقي، الماجستير. المناقشة: apt رحمي أنيسة، الماجستير.

في النساء بعد سن اليأس اللاتي يعانين من نقص هرمون الاستروجين يمكن أن يسبب من المشاكل  
 المتنوعة، بينها هي هشاشة العظام. أحد البدائل التي تظهر القدرة على استبدال هرمون الاستروجين هو  
 فيتويستروغين (fitoestrogen). تحتوي البرسيم (Marsilea crenata C Presl) على مجموعة متنوعة  
 من المركبات التي لها الوظائف المشابهة للإستروجين. الهدف من هذا البحث هو الإبلاغ عن دور فصيل البرسيم  
 (Marsilea crenata C Presl) n- في زيادة نشاط الخلايا الآكلة للعظم في عملية تكوين العظام ضد  
 خلايا hFOB 1.19. تستخدم الباحثة هذا البحث نوع البحث اختبارًا تجريبيًا صحيحًا فقط ( True  
 experimental post test only) باستخدام طريقة ICC وأداة CLSM. وقد تمت الباحثة إجراء  
 هذا البحث عن طريق إدارة أجزاء n-hexane مع تفاوت جرعة 62.5 ؛ 125 ؛ و 250 ppm، وإدارة  
 الجينيستين (genistein) كعنصر تحكم إيجابي في خلايا hFOB 1.19. أظهر التحليل الإحصائي فرقًا كبيرًا  
 في جميع مجموعات العلاج باستخدام اختبار Kruskal Wallis 0.006. أظهر اختبار LSD اختلافًا  
 كبيرًا بين الجرعات الثلاث ذات التحكم السليبي و 125 جرعة كجرعة مثالية لتقليل تعبير ER-free المجاني.  
 أظهرت نتائج هذا البحث أن جزء n-hexane من البرسيم تحتوي على مركبات الاستروجينية كعوامل لزيادة  
 نشاط بانيات العظم (خلية hFOB 1.19) عن طريق تقليل التعبير عن خلية hFOB خالية من ER-1.19  
 وجرعة فعالة بقيمة 125 ppm.

الكلمات الرئيسية: Marsilea crenata C Presl، فيتويستروغين، hFOB cells 1.19.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Seiring dengan bertambahnya usia, proses penuaan diikuti proses degenerasi, perubahan fisik serta penurunan produksi hormon dalam tubuh dan disertai fenomena menopause (Baziad, 2003). Fase menopause dibagi menjadi 3 tahap yaitu perimenopause, menopause dan pascamenopause. Pada tahun 2030 jumlah wanita pascamenopause akan diperkirakan meningkat hingga 1.200 juta orang (Mahajan *et al.*, 2012). Pada periode pascamenopause produksi estrogen benar-benar berhenti dan dapat menyebabkan munculnya beberapa penyakit diantaranya adalah osteoporosis yang ditandai dengan penurunan massa tulang akibat tidak seimbangnya antara resorpsi dan formasi tulang (Sherwood, 2016; Sihombing dan Wangko, 2012). Agen yang berpengaruh dalam menjaga keseimbangan remodeling tulang yakni hormon estrogen (Sihombing dan Wangko, 2012).

Estrogen telah lama dikenal sebagai agen antiresorptif yang menghambat resorpsi tulang oleh osteoklas. Pada wanita pascamenopause terdapat resiko terjadinya penyakit seperti sarkopenia, osteoarthritis, dan osteoporosis. Osteoporosis ditandai dengan kepadatan tulang/*bone mineral density* (BMD) yang berkurang, serta kerusakan jaringan mikro pada arsitektur tulang yang dapat berakibat pada tingkat kepatahan tulang. Pada wanita pascamenopause juga terdapat bukti-bukti yang kuat turunnya sekresi estrogen dan menyebabkan peningkatan laju resorpsi tulang (Sihombing dan Wangko, 2012). Prevalensi insiden osteoporosis meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi usia lanjut. Pada tahun 2005 terdapat 18 juta

dengan usia harapan hidup mencapai 70 tahun. Lansia di Indonesia sebanyak 19,7% atau sekitar 3,6 juta orang diantaranya menderita osteoporosis (Utomo dkk, 2010). Prevalensi usia wanita yang menderita osteoporosis di Indonesia pada golongan umur 50-59 tahun yakni 24% sedangkan pada usia 60-70 tahun sebesar 62% (Depkes, 2005).

Proses deaktivasi estradiol menjadi estron dan estriol merupakan tanda dari suatu kondisi penurunan aktivitas dari hormon estrogen biasa dikenal dengan istilah defisiensi estrogen (Cui *et al.*, 2013). Selama keadaan defisiensi estrogen, akan berlangsung proses penurunan produksi hormon estrogen yang berfungsi dalam menjaga keseimbangan tubuh (Villa *et al.*, 2016). Defisiensi estrogen menjadi salah satu faktor utama penurunan densitas tulang (Manolagas, 2000; Finkelstein, 2008). Pada kondisi defisiensi estrogen terjadi ketidakseimbangan remodeling tulang dan proses resorpsi tulang oleh sel osteoklas lebih dominan daripada proses pembentukan tulang oleh sel osteoblas (Baziad, 2003). Sel osteoblas berperan penting dalam pembentukan tulang melalui proses proliferasi dan diferensiasi (Thung *et al.*, 2009).

Jenis pengobatan yang sering digunakan bagi defisiensi estrogen adalah *Hormone replacement therapy* (HRT) (Rachman *et al.*, 2014). Penggunaan HRT menggunakan hormon estrogen dapat menghambat resorpsi tulang, meningkatkan densitas tulang, dan menurunkan resiko patah tulang (Anderson *et al.*, 2004; Rossouw *et al.*, 2002 ; Rodan and Martin, 2000), namun selain dengan harga yang cukup mahal (Farhat *et al.*, 2013) penggunaan HRT dalam jangka panjang dapat

menimbulkan permasalahan yakni dapat meningkatkan risiko kanker ovarium dan kanker endometrium (Zarate *et al.*, 2014; Hartiningsih dan Anggraeni, 2013).

Sumber pengobatan alternatif yang kemudian muncul untuk menggantikan terapi sulih hormon (TSH) adalah senyawa fitoestrogen yang dapat ditemukan dalam senyawa tumbuhan (Alledredge *et al.*, 2013). Fitoestrogen adalah senyawa pada tanaman yang diketahui memiliki aktivitas dan fungsinya mirip dengan estrogen (Trisnuwati, 2017). Isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida merupakan senyawa kelompok fitoestrogen yang dapat ditemukan pada tanaman. Namun, pada kelompok tersebut isoflavon merupakan senyawa yang sering digunakan karena kadar fitoestrogen yang cukup banyak (Achdiat, 2007). Fitoestrogen ini terbukti bisa memperbaiki keluhan menopause. Fitoestrogen dapat merangsang aktivitas osteoblas dan menghambat pembentukan osteoklas. Model sel mesenkimal progenitor manusia dapat menggunakan sel hFOB 1.19 yang merupakan *cell line* dengan karakteristik homogen, konsistensi, *reliable*, serta mudah diterapkan dalam investigasi fungsi osteoblas dan regulasinya. Sel hFOB 1.19 merupakan sel progenitor yang dapat diinduksi dan berdiferensiasi menjadi sel osteoblas matur ditandai dengan terbentuknya ALP dan osteokalsin (Yang *et al.*, 2012).

Tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat oleh manusia, tertuang dalam Al-Qur'an surah Asy-Syu'ara ayat 7 yang berbunyi

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Berdasarkan tafsir Shihab (2002) mengartikan bahwa tumbuhan yang dapat tumbuh subur dan memiliki manfaat merupakan tumbuhan yang baik. Segala sesuatu yang ada di bumi dapat dimanfaatkan manusia dengan sebaik mungkin, salah satunya adalah tanaman *M. crenata*. *M. crenata* adalah tanaman yang banyak hidup di beberapa daerah di Indonesia (Trisunuwati, 2017). *M. crenata* merupakan salah satu jenis tumbuhan air yang termasuk ke dalam paku-pakuan dan banyak ditemukan pada pematang sawah, kolam, danau, rawa, dan sungai. Tumbuhan ini memiliki morfologi yang sangat khas yaitu bentuk daunnya menyerupai payung yang tersusun dari empat kelopak anak daun yang berhadapan. Di daerah Jawa daun *M. crenata* muda banyak digunakan sebagai bahan pangan campuran pecel di daerah Surabaya (Nurjannah dkk, 2012). Tanaman ini memiliki potensi besar sebagai sumber makanan atau sebagai tanaman obat dan sangat mudah tumbuh (Ma'arif, 2016).

Penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa pemberian ekstrak etanol 96% terbukti mampu meningkatkan kadar estrogen pada wanita pascamenopause sehingga memberikan efek osteogenik untuk menunda *remodelling* tulang (Putra, 2011). Pada penelitian lain, fraksi n-heksana daun *M. crenata* dilaporkan memiliki

aktivitas antiosteoporosis dengan meningkatkan kepadatan tulang mencit betina (Puspitasari dkk, 2015). Ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat memberikan hasil pada uji aktivitas uji *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* pada penelitian Ma'arif *et al* (2016) bahwa ekstrak dan fraksi tersebut memiliki ikatan yang tinggi dengan estrogen reseptor  $\beta$  (ER-  $\beta$ ), serta adanya peningkatan kepadatan tulang mencit karena dapat menginduksi proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas. Pada penelitian Guhir (2019) mengenai aktivitas antineuroinflamasi fraksi n-heksana daun semanggi secara *in vitro* pada sel mikroglia HMC3 dengan menggunakan dosis 62,5; 125; 250 ppm memberikan intensitas terbaik pada dosis 125 ppm. Asam palmitat merupakan salah satu golongan senyawa yang diduga memiliki peran sebagai pencegah osteoporosis dan merupakan salah satu senyawa yang dapat ditemukan pada daun semanggi (Ma'arif *et al.*, 2016).

Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui aktivitas fraksi n-heksana daun semanggi dengan varian dosis 62,5; 125; dan 250 ppm terhadap ekspresi ER- $\beta$  bebas yang dapat mengurangi dampak defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause. Penggunaan fraksi n-heksana pada penelitian ini agar dapat menarik senyawa fitoestrogen pada daun semanggi yang bersifat non polar. Penggunaan sel hFOB 1.19 karena merupakan sel yang berasal dari janin manusia dan dapat merepresentasikan keadaan manusia. Ekspresi Estrogen Reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) bebas diamati dengan mekanisme jalur *ER-dependent* untuk menunjukkan adanya ikatan senyawa fitoestrogen dengan estrogen reseptor yang nantinya teraktivasi dengan menggunakan metode *Immunocytochemistry* (ICC) dan dibantu dengan pengamatan pada *Confocal Laser Scanning Microscopy*

(CLSM) (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2016). Senyawa fitoestrogen yang semakin banyak dapat berikatan dengan estrogen reseptor, maka akan semakin menurunkan ekspresi dari ER- $\beta$  bebas. Penelitian ini diharapkan mampu meningkatkan produksi hormon estrogen dalam tubuh dengan menggunakan bahan alam.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah fraksi n-heksana daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19?
2. Berapakah dosis optimum fraksi n-heksana daun *M. crenata* yang dapat menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui kemampuan fraksi n-heksana daun *M. crenata* dalam meningkatkan aktivitas sel hFOB 1.19 pada proses pembentukan tulang.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan fraksi n-heksana daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19.
2. Untuk mengetahui dosis optimum fraksi n-heksana daun *M. crenata* yang dapat menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Menjadi data dalam penelitian perkembangan obat pembentukan tulang dengan menggunakan sel hFOB 1.19.
2. Menjadi acuan peneliti lainnya mengenai sel hFOB 1.19.

#### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tanaman yang digunakan sebagai sampel adalah *M. crenata* yang didapatkan dari daerah Benowo, Surabaya.
2. Penelitian ini mengambil parameter perubahan morfologi sel dan penurunan ekspresi ER- $\beta$  bebas serta peningkatan Estrogen Reseptor teraktivasi (ER\*) dengan metode *Immunocytochemistry* (ICC) menggunakan instrumen *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).
3. Sel uji yang digunakan dalam parameter ini adalah sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection*, USA yang dikultur di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang.
4. Konsentrasi dosis yang digunakan adalah 62,5; 125; dan 250 ppm.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

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

##### **2.1.1 Penyebaran dan Klasifikasi Tanaman**

Tapak itik merupakan nama daerah yang dikenal oleh masyarakat di Indonesia dari tanaman yang bernama latin *Marsilea crenata* (Setijati dan Johar, 1985). Semanggi dapat ditemukan di lingkungan air tawar seperti danau, sungai dan kolam. Tanaman padi sering menganggap tanaman semanggi sebagai gulma ketika disandingkan dengannya namun dengan nilai yang bermacam-macam. Tumbuhan ini biasanya dapat tumbuh dengan jenis-jenis tumbuhan air lainnya seperti eceng kecil, genjer, rumput air, serta teki alit. Semanggi memiliki nama lain seperti jukut calingcingan (Sunda), *tapak itek* (Malaysia), *upat-upat* (Filipina), *chutul phnom* (Kamboja), *pak vaen* (Laos), *phak wen* (Thailand), dan *water clover fern* (Inggris). Tumbuhan semanggi tumbuh tersebar di Asia Tenggara di daerah dengan ketinggian 900 meter di atas permukaan air laut dan biasanya tumbuh merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm (Afriastini, 2003).

Klasifikasi Tanaman Semanggi (*United States Department of Agricultur*) :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Filicopsida

Ordo : Hydropteridales

Famili : Marsileaceae

Genus : *Marsilea crenata* C. Presl



**Gambar 2.1** Gambar tanaman *M. crenata*

### 2.1.2 Morfologi Tanaman *M. crenata*

Tanaman *M. crenata* biasanya hidup merambat di lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm dan bagian yang mucul ke permukaan air setinggi 3-4 cm. Daun semanggi memiliki 4 helai anak daun dengan ukuran rata-rata panjang 2,5 cm dan lebar 2,3 cm. Daun tersebut tipis dan lembut berwarna hijau gelap. Akarnya biasa tertanam dalam substrat di dasar perairan. Sporocarps yang merupakan struktur reproduksi berbentuk panjang dan bulat pada bagian ujung terdapat sebanyak 1 sampai 6 buah dengan ukuran 3-4 mm, dan panjang tangkai sporocarpsnya 5 mm. Bentuknya melingkat seperti gigi kecil dan kecil yang ditutupi dengan rambut *caducous* yang tegak lurus dengan tangkai dan saling berhimpitan, serta tangkainya yang tidak bercabang (Afriastini, 2003).

### 2.1.3 Manfaat dan Kandungan Tanaman

*Marsilea crenata* adalah tanaman yang unik. Daunnya biasa dimanfaatkan sebagai salah satu bahan makanan tradisional (Ma'arif, 2018). Pemanfaatan *M. crenata* bukan sekedar sebagai bahan makanan, namun daun serta batang pada tanaman semanggi juga dapat dimanfaatkan sebagai diuretik (Afriastini, 2003; Nurjannah, 2012). Kandungan fitokimia yang terdapat pada tanaman semanggi segar dapat berupa gula pereduksi, karbohidrat, flavonoid, dan steroid (Yacoeb et al., 2010).

Terlepas dari kegunaan *M. crenata* tidak banyak dilaporkan penelitian tentang kandungan kimia *M. crenata*. Skrining fitokimia *M. crenata* yang pernah dilakukan dan menghasilkan bahwa ekstrak metanol daun *M. crenata* mengandung senyawa terpenoid, saponin dan polifenol. Ekstrak n-heksana daun *M. crenata* juga dilakukan skrining, dan dilaporkan mengandung minyak atsiri, dan steroid tak jenuh bebas, sedangkan fraksi n-heksana daun *M. crenata* mengandung senyawa terpenoid dan saponin steroid (Puspitasari dkk, 2015).

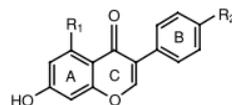
*M. crenata* yang mengandung kalium dan flavonoid yang berfungsi sebagai diuretik. Kandungan tersebut menghambat proses supersaturasi urin dimana urin dalam kondisi jenuh dan menghambat ikatan antara kalsium dengan asam oksalat sehingga kristal kalsium oksalat tidak terbentuk. Kalium dan flavonoid berikatan dengan senyawa oksalat membentuk senyawa garam yang bersifat mudah larut dalam air dan akan keluar bersama urin. Flavonoid bekerja menghambat urolithiasis dengan cara menghentikan produksi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sehingga tidak terjadi stres oksidatif yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan sel seperti

obstruksi pada saluran perkemihan. Kandungan lain dalam semangi air adalah kalium yang berfungsi sebagai diuretik. Kadar kalium yang sangat tinggi akan menurunkan kadar kalsiuria, sehingga pembentukan kristal kalsium oksalat dapat dihambat (Agarwal, 2011). *M. crenata* juga memiliki rasa yang sejuk dan seikit pedas. Khasiatnya juga diketahui untuk menghilangkan bengkak, antiinflamasi, peluruh air seni, antibiotika, penurun demam, serta penetralisir racun (Kusuma, 2005).

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

Daun *M. crenata* 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 tanpa efek pada uterotrofik. Suplemen makanan ini telah digunakan pada wanita pascamenopause untuk menangkal efek tingkat estrogen yang rendah dan pengeroposan tulang (Bianchi, 2014). Struktur isoflavon dapat dilihat pada gambar

2.2



| Isoflavone   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   |
|--------------|----------------|------------------|
| Biochanin A  | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| Daidzein     | H              | OH               |
| Formononetin | H              | OCH <sub>3</sub> |
| Genistein    | OH             | OH               |

**Gambar 2.2** Struktur Isoflavon (Ososki *et al.*, 2003)

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

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

Menurut Ma'arif (2016) *M. crenata* mengandung banyak senyawa kelompok mudah menguap, contohnya diterpenoid, monoterpenoid dan senyawa golongan asam lemak yang memiliki beragam aktivitas. Asam palmitat salah satu lemak yang terkandung dalam *M. crenata* diduga memiliki peran sebagai agen

antiosteoporotik, khususnya pada peningkatan osteogenesis. Pada Laswati (2011) penelitian menggunakan *radioimmunoassay* (RIA), terdeteksi bahwa konsentrasi senyawa seperti estradion yang cukup tinggi pada wanita pascamenopause berpotensi dalam menunda peningkatan ketidakseimbangan proses remodeling tulang.

## 2.2 Metode Ekstraksi

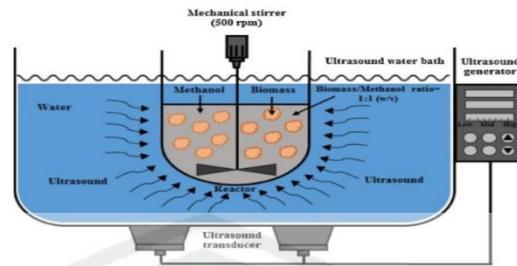
Penyarian zat-zat aktif atau zat yang berkhasiat pada bagian hewan, tanaman obat, dan beberapa jenis ikan atau pada biota laut dikenal dengan sebutan ekstraksi. Zat-zat aktif yang akan diekstraksi pada umumnya dapat dijumpai di dalam sel. Namun ada perbedaan antara sel tanaman dan hewan. Demikian juga dengan metode yang digunakan. Umumnya pemilihan metode ekstraksi bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014). Ada beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan ialah maserasi, perkolasi, dan sokletasi.

Secara umum, ekstraksi akan semakin bagus apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan itu, serbuk simplisia semakin halus, dan ekstraksinya semakin baik. Tetapi dalam pelaksanaannya tidak selalu demikian karena ekstraksi juga bergantung pada sifat fisika dan kimia simplisia yang digunakan (Ahmad, 2006). Proses ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif (Nielsen, 2003).

### 2.3 Tinjauan Ekstraksi *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

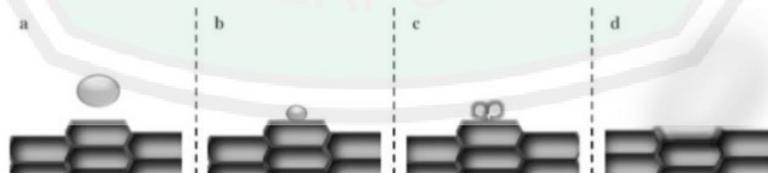
Ekstraksi ultrasonifikasi adalah suatu metode ekstraksi dengan menggunakan gelombang ultrasonik pada frekuensi 20-20.000 kHz (Banu dan Catherine, 2015). Prinsip kerja dari ekstraksi ini yaitu dengan meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga muncul interfase (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, pelarut, tingkat penggilingan dan ukuran partikel merupakan faktor yang penting sekali untuk memperoleh proses ekstraksi yang efektif serta efisien. Selain itu, suhu, frekuensi, waktu sonikasi, dan tekanan merupakan faktor yang juga mempengaruhi kerja UAE (Azmir *et al.*, 2013).

Faktor penentu keberhasilan metode ekstraksi dengan UAE adalah *moisture content* bahan, ukuran partikel, dan pelarut yang digunakan (Ngaha *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 sebagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al.*, 2017).



**Gambar 2.3** Skema *Ultrasound Assisted Extraction (UAE)* (Chemat *et al.*, 2017)

Keuntungan dari metode UAE ini adalah aman, ekonomis dan mudah ditangani (Vieira *et al.*, 2013). Keuntungan yang lain adalah dapat mengurangi energi, waktu ekstraksi, dan penggunaan pelarut. *Energy ultrasonic* dapat memberikan beberapa manfaat yang lain seperti transfer energi yang lebih cepat, pengurangan gradien termal, pencampuran yang lebih efektif, temperatur ekstraksi-ekstraksi selektif, pengurangan ukuran peralatan, respon yang lebih cepat terhadap pengendalian proses ekstraksi, peningkatan produksi serta menghilangkan langkah-langkah proses seperti metode lainnya (Chemat *et al.*, 2008). Adapun mekanisme terjadinya metode ini secara sederhana dapat dilihat pada gambar 2.4 berikut.



**Gambar 2.4.** Proses mekanisme ekstraksi UAE (Eclsapez *et al.*, 2011)

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

## 2.4 Tinjauan Ekstrak

Menurut depkes RI (1995) ekstrak merupakan suatu sediaan yang didapatkan dengan cara melakukan proses ekstraksi zat aktif dari suatu simplisia nabati atau simplisia hewani dengan pelarut yang sesuai, lalu pelarut tersebut diuapkan dan hasil yang didapatkan diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Terdapat beberapa macam jenis ekstrak, yaitu ekstrak cair dengan kadar air lebih dari 30%, ekstrak kental dengan kadar air 5-30% dan ekstrak kering yang mengandung air kurang dari 5% (Voight, 1994).

Faktor kimia dan biologi merupakan faktor-faktor yang dapat memengaruhi ekstrak. Cakupan dari faktor biologi adalah spesies tumbuhan, waktu panen, tempat pertumbuhan, penyimpanan bahan tumbuhan, bagian yang digunakan dan juga umur tumbuhan. Adapun cakupan dari faktor kimia adalah jenis senyawa yang aktif pada bahan, kadar total senyawa yang aktif, komposisi kualitas senyawa aktif, komposisi kuantitas senyawa aktif, kandungan logam berat, kadar kekeringan pelarut, ukuran kekerasan bahan, pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi, dan perbandingan ukuran alat ekstraksi. (Depkes RI, 2000).

## 2.5 Tinjauan Fraksinasi Cair-cair

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan senyawa yang didasarkan pada kelarutan senyawa pada dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Fraksinasi ini biasa dikenal juga dengan istilah ekstraksi cair-cair. Pelarut yang biasa digunakan adalah pelarut organik dan pelarut air (Dey, 2012).

Corong pisah merupakan alat yang biasa digunakan pada teknik pemisahan cair-cair ini. Pelarut yang tidak saling campur itu dimasukkan ke dalam corong

pisah, lalu digojok selama beberapa menit dan didiamkan hingga terlihat adanya pemisahan fase pelarut. Lapisan atas dan lapisan bawah merupakan fase yang dihasilkan pada teknik ini. ketika sudah terbentuk lapisan itu, kunci dari corong pisah dapat dibuka dan dapat menampung hasil dari fraksinasi cair-cair ini (Odugbemi, 2008).

Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti petroleum eter, *n*-heksana, kloroform, dietil eter, etil asetat dan etanol. Pelarut yang biasanya digunakan berdasarkan pada sifat analitnya karena analit dan pelarut harus memiliki sifat yang sama, misalnya analit dengan sifat lipofilitas yang tinggi akan terekstraksi pada pelarut yang lebih bersifat non polat contohnya *n*-heksana, sedang pada analit yang bersifat semipolar dapat terlarut pada pelarut yang semipolar contohnya diklorometana atau pelarut *n*-heksana (Venn, 2008).

## 2.6 Tinjauan Defisiensi Estrogen

Hormon estrogen adalah hormon steroid yang diproduksi oleh sel teka internal dari folikel ovarium, corpus luteum, plasenta dan juga sedikit dihasilkan oleh korteks adrenal. Kekurangan estrogen akan menyebabkan peningkatan kadar hormon paratiroid, sehingga dapat meningkatkan resorpsi tulang yang nantinya akan menyebabkan penurunan massa tulang (Trisnuwati, 2017).

Defisiensi estrogen dapat mempengaruhi keindahan maupun kesehatan payudara dan memicu terjadinya gangguan kesehatan alat reproduksi. Kekurangan estrogen pada wanita menopause dapat menyebabkan sulit tidur, berkeringat malam, gangguan fungsi seksual, kekeringan vagina, penyakit kardiovaskular dan kekeroposan tulang (Achdiat, 2003). Ketidaknyamanan akibat defisiensi estrogen

biasa diatasi dengan memberikan estrogen dari luar badan yang dikenal sebagai *hormon replacement therapy* (HRT) (Pratama, 2011).

Dalam keadaan normal estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat dalam sitosol sel tersebut yang mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Tumor Factor Necrosis* (TNF- $\alpha$ ), yang merupakan sitolin yang berfungsi dalam proses penyerapan tulang. Dilain pihak, estrogen meningkatkan *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) yang merupakan faktor pertumbuhan (*growth factor*) dan sebagai mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat lubang tulang yang telah diserap oleh osteoklas. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin seperti yang disebutkan diatas, walaupun secara langsung atau idak juga dapat berpengaruh pada sel osteoklas (Waters *et al.*, 1999).

## 2.7 Tinjauan Osteoporosis

Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai dengan berkurangnya massa tulang karena adanya perubahan dari sel mikroarsitektur jaringan tulang yang berakibat menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang (Lestari *et al.*, 2014). Osteoporosis dapat terjadi karena adanya gangguan metabolisme dimana tubuh tidak mampu melakukan penyerapan dan pembentukan sel tulang baru untuk proses pematang tulang, sehingga dapat dikatakan osteoporosis merupakan kondisi pengeroposan pada tulang (Permana, 2014).

Penurunan massa maupun kekuatan tulang dapat disebabkan oleh beebropa hal. Pertama yaitu kegagalan dalam mencapai massa tulang optimal pada saat

dewasa muda, kedua adalah proses resorpsi tulang yang terus menerus setelah mencapai massa tulang dan yang terakhir adalah akibat ketidakseimbangan proses resorpsi dan formasi pada saat remodeling tulang (Kini dan Nandeesh, 2012). Osteoporosis adalah kondisi dimana tulang menjadi tipis, rapuh, keropos, dan mudah patah akibat berkurangnya massa tulang yang terjadi dalam waktu yang lama. Secara statistik, osteoporosis didefinisikan sebagai keadaan dimana *Bone Mineral Density* (BMD) berada dibawah nilai rujukan menurut umur atau standar deviasi (Depkes RI, 2002).

Osteoporosis pada dasarnya dibagi menjadi dua tipe berdasarkan dari penyebabnya yaitu osteoporosis primer dan sekunder. Osteoporosis primer yaitu osteoporosis yang diketahui sebab terjadinya sedangkan osteoporosis sekunder belum diketahui penyebabnya atau akibat dari hal-hal tertentu yang lainnya. Seiring dengan berkembangnya pengetahuan, osteoporosis primer dibedakan menjadi dua tipe klasifikasi yaitu tipe I dan tipe II. Beberapa literatur lain menyebutkan bahwa osteoporosis dibagi dalam beberapa jenis yang berbeda, diantaranya yaitu osteoporosis *postmenopause* (tipe I), osteoporosis involutinal (tipe II), osteoporosis idiopatik, osteoporosis juvenil, osteoporosis sekunder (Permana, 2014).

Patogenesis terjadinya osteoporosis melibatkan proses resorpsi dan formasi dari tulang itu sendiri. Sepanjang perjalanan hidup, sel yang bertanggung jawab dalam remodeling tulang yaitu sel osteoblas dan sel osteoklas. Sel osteoblas bertanggung jawab dalam proses pembentukan tulang sedangkan untuk sel osteoklas berperan dalam proses resorpsi tulang. Pada orang normal tulang

megalami pertumbuhan dan pada masa tertentu akan mengalami puncak peningkatan masa tulang pada usia 30-35 tahun, namun setelah masa ini akan terjadi penurunan masa tulang dimana proses resorpsi tulang lebih tinggi dibandingkan dengan proses remodeling tulang. Hilangnya masa tulang dapat disebabkan beberapa faktor lokal dan sistemik. Faktor lokal yaitu usia, menopause, kecelakaan, sitokin, dan hal lain. Faktor sistemik yaitu hormon-hormon yang berkaitan dengan metabolisme kalsium, seperti hormon parathroid, vitamin D, kalsitonin, estrogen, androgen, hormon pertumbuhan dan hormon tiroid (Permana, 2014).



**Gambar 2.5** Perbandingan tulang normal dengan osteoporosis  
(<http://penyakitosteoporosis.com/>)

## 2.8 Tinjauan Pembentukan Tulang (Osteogenesis)

Tulang bukanlah jaringan lunak yang tidak aktif, tetapi secara dinamis memetabolisme jaringan penghubung seluruh hidup. Matriks tulang yang sudah tua selalu digantikan oleh pembentukan matriks tulang baru. Proses berkelanjutan ini dinamakan remodeling tulang (Djuwita *et al.*, 2012)..

Osteogenesis merupakan proses pembentukan tulang baru dengan sel yang disebut osteoblas. Sel ini dan matriks tulang merupakan dua elemen krusial yang terlibat dalam pembentukan tulang. Tiga langkah utama dalam osteogenesis yaitu sintesis dari matriks organik ekstraseluler (osteoid), matriks mineralisasi memulai

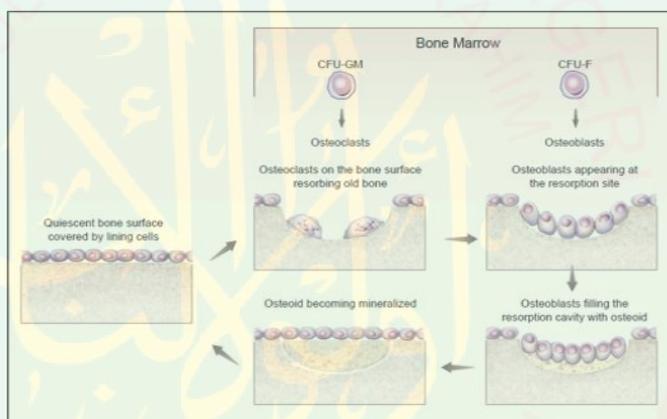
pembentukan tulang, dan remodeling tulang dengan proses resorpsi dan reformasi (Usha Kini dan Nandeesh, 2012).

## 2.9 Tinjauan Remodeling Tulang

Jaringan tulang dapat bersifat dinamis mengalami pembaharuan secara konstan atau biasa disebut dengan proses *remodelling*. *Remodelling bone* adalah sesuatu proses yang kompleks yang melibatkan resorpsi tulang dan diikuti oleh proses pembentukan tulang baru. Remodeling tulang ditujukan untuk pengaturan homeostasis kalsium, memperbaiki jaringan rusak yang diakibatkan oleh pergerakan fisik, kerusakan kecil karena faktor *stress* dan pembentukan kerangka pada masa pertumbuhan. Jaringan tulang memiliki tiga tipe sel yakni osteosit, osteoblas, dan osteoklas. Proses remodeling melibatkan osteoblas dan osteoklas melalui mekanisme sinyal parakrin dan endokrin. Osteoklas merupakan sel dengan beberapa inti sel dan berkembang dari *hematopoietic stem cells* serta memiliki fungsi dalam meresorpsi tulang, sedangkan osteoblas memiliki fungsi sebagai penghasil matriks organik (yang terdiri atas protein kolagen dan nonkolagen) serta mengatur proses mineralisasi (kalsium-fosfat) pembentuk osteoid. Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat di bagian dalam periosteum dan sumsum tulang (Djuwita *et al.*, 2012).

Remodeling adalah proses dimana terjadi *turn-over* dari tulang dan 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). Proses remodeling tulang diawali dengan pengaktifan osteoklas oleh sitokin tertentu. Osteoklas akan meninggalkan rongga yang disebut *lacuna 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 tulang yang disebut osteoid 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 (Rosen, 2011).



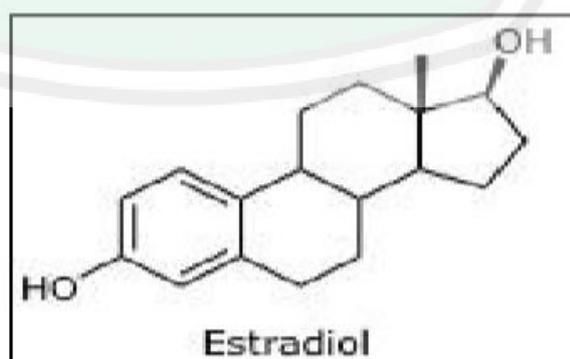
**Gambar 2.6** Proses remodeling tulang (Sihombing dan Wangko, 2012)

## 2.10 Tinjauan Fitoestrogen

Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini, salah satunya adalah fitoestrogen (Glover dan Assinder, 2006). Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen atau dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen (Biben, 2012). Aktifitas fitoestrogen didalam otak memiliki banyak manfaat dengan meningkatkan kadar katekolamin dalam sel-sel otak maupun menghambat pembentukan NF-kB dengan cara menghambat aktifitas *Toll Like*

*Receptors* (TLR) 4 dengan reaksi fosforilasi pada protein p38. Aktifitas untuk menghambat aktifitas TLR ini kemudian menjadi dasar awal fitoestrogen dapat bertindak sebagai neuroprotektor (Villa *et al.*, 2016). Menurut Jefferson *et al.*, (2002) fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan 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 diketahui terdapat beberapa kelompok fitoestrogen diantaranya adalah isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida dan senyawa lain yang memberikan efek estrogenik, seperti *flavones, chalcones, diterpenoids, triterpenoids, coumarins dan acyclics*. Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen atau dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen (Biben, 2012). Fitoestrogen banyak ditemukan pada tanaman kelompok biji-bijian, buah-buahan dan sayuran. Secara struktural, fitoestrogen serupa dengan estradiol (17 $\beta$ -estradiol) dan merupakan senyawa difenolik non-steroid (Kuntana, 2005).



**Gambar 2.7** Struktur Estradiol (Ososki and Kennelly, 2003)

## 2.11 Tinjauan Estrogen

Estrogen merupakan salah satu hormon reproduksi pada wanita. Hormon ini terutama disekresi oleh sel-sel granulosa penyusun folikel ovarium. Struktur hormon estrogen tersusun atas 18 atom C gugus -OH fenolik pada C-3, sifat aromatik cincin A dan tidak mempunyai gugus metil pada C-10. Bentuk hormon estrogen dalam tubuh berupa  $17\beta$ -estradiol, estron dan estriol, namun yang paling poten dan dijumpai dengan jumlah yang cukup tinggi dan paling poten dalam tubuh adalah  $17\beta$ -estradiol (Hiller, 1995; Ganong, 2003 dalam Sitasiwi, 2007; Hamilton *et al.*, 2017).

Estrogen dibentuk oleh sel-sel granulosa dalam folikel ovarium melalui serangkaian konversi melalui reaksi enzimatik. Substrat utama pembentuk estrogen adalah kolesterol. Kolesterol secara berurutan mengalami perubahan menjadi pregnenolon, progesteron,  $17\alpha$ -hidroksi progesteron, androstenedion dan testosteron diubah menjadi  $17\beta$ -estradiol baik di sel teka maupun sel granulosa adalah folikel ovarium. Sintesis hormon estrogen akan meningkat seiring dengan perkembangan folikel dalam ovarium (Hamilton *et al.*, 2017)

Estrogen mempengaruhi proses pembongkaran tulang dengan cara menghambat pematangan osteoklas sehingga bisa menghambat resorpsi tulang. Estrogen dalam keadaan normal pada sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol tersebut, dan berakibat pada penurunan sekresi sitokin seperti : Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang. Disisi lain, estrogen dapat meningkatkan sekresi

*Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ), yang merupakan satu-satunya faktor pertumbuhan yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat lubang tulang yang telah diserap oleh osteoklas. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin seperti di atas, sekalipun secara langsung maupun tidak langsung juga dapat berpengaruh pada sel osteoklas (Waters, 1999).

## 2.12 Tinjauan Reseptor Estrogen

Estrogen tersebut perlu berikatan dengan protein tertentu yang kemudian menghasilkan atau mengekspresikan suatu protein yang dapat mempengaruhi fungsi dari suatu sel bahkan organ. Protein yang dimaksud adalah reseptor estrogen yang akan berikatan dengan estrogen kemudian membentuk kompleks aktif dan mempengaruhi transkripsi gen dari suatu sel (Johan, 2016). Terdapat dua subtipe reseptor estrogen (Bustamam, 2008), yaitu:

- a. Reseptor  $\alpha$ : terdapat banyak pada saluran reproduksi wanita diantaranya adalah uterus, vagina, ovarium dan juga dikelenjar mammae, hipotalamus, sel-sel endotel dan otot polos vascular.
- b. Reseptor  $\beta$ : terletak menyebar yakni terdapat di ginjal, tulang, mukosa, otak, tulang dan pembuluh darah. ER- $\beta$  memiliki jumlah lebih banyak, lebih sensitif dalam berikatan dengan Estrogen dan akan mengalami penurunan seiring dengan terjadinya penambahan usia. (Bustaman, 2008). ER- $\beta$  dikloning dari prostat tikus dan ovarium pada tahun 1996. ER- $\beta$  terletak pada kromosom 14q23.2 (Jia *et al.*, 2015). ER- $\beta$  terletak di uterus, tulang, mukosa, otak,

pembuluh darah (Ariyanti and Apriliana, 2016). Dalam diferensiasinya sel osteoblas mengekspresikan ER- $\beta$  10 kali lipat dari ER $\alpha$  (Kawiyana, 2009).

Mekanisme pemberian efek hormon estrogen secara umum terbagi menjadi 4 sebagai berikut :

1. *ER dependent, nuclear initiated estrogen signaling*

Jalur pertama menggambarkan estrogen dapat memberikan efek setelah estrogen menembus membran lalu berikatan dengan Estrogen *Receptor* yang berada pada inti sel. Jalur ini memberikan efek secara langsung walaupun memberikan pemberian efek yang tergolong cukup lama. Proses ini diawali dengan masuknya estrogen melewati membran plasma yang kemudian berikatan dengan ER $\alpha$  dan ER- $\beta$  kemudian membentuk ER teraktivasi. Kemudian ER teraktivasi akan memasuki 2 jalur proses yaitu secara klasik dan non klasik. Estrogen pada proses klasik akan berikatan dengan ER yang akan melakukan transkripsi maupun ekspresi DNA sedangkan estrogen pada proses non klasik yakni ER teraktivasi akan berikatan dengan faktor transkripsi lain untuk mensintesis protein tertentu (Cui *et al.*, 2013)

2. *ER dependent, membran initiated estrogen signaling*

Jalur ini memberikan gambaran ketika estrogen memberikan efek setelah berikatan dengan ER pada membran serta melibatkan *second messenger*, yang akan berefek diantaranya adalah :

- a. Aktivasi faktor transkripsi dan berpindah ke nukleus kemudian berikatan dengan promotor DNA serta melakukan sintesis protein tertentu
- b. Aktivasi reseptor membran yang mengakibatkan rangkaian mekanisme dan ekspresi protein.

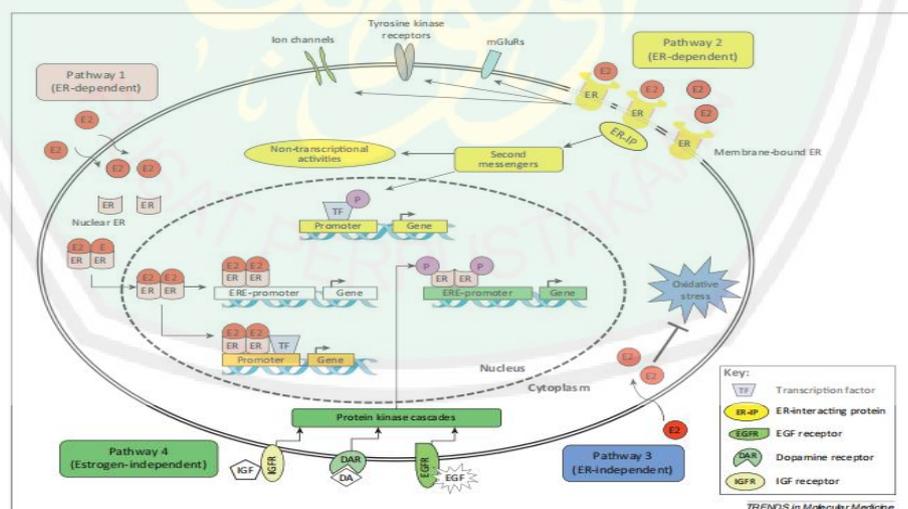
c. Aktivasi jalur mekanisme lain yang bersifat non transkripsional (Cui *et al.*, 2013)

### 3. ER independent

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

### 4. Ligand Independent Activation of ER

Jalur ini menjelaskan berbagai faktor bahwa ER dapat diaktivasi melalui jalur *crascade* yang diaktivasi berbagai faktor seperti EGF maupun yang lain lalu senyawa tersebut akan berikatan dengan reseptor masing-masing dan diakhiri dengan terjadinya fosforilasi ER yang kemudian berikatan dengan ERE dan mensintesis protein tertentu (Cui *et al.*, 2013). Secara sederhana keempat mekanisme di atas dapat dilihat pada gambar 2.8



**Gambar 2.8** Mekanisme pemberian efek hormon estrogen (Cui *et al.*, 2013)

### 2.13 Tinjauan Sel hFOB 1.19

- Organisme asal : *Homo sapiens* (manusia)
- Jaringan : Tulang
- Tipe Sel : Osteoblas
- 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 (ATCC, 2016)

### 2.14 Tinjauan Sel Osteoblas

Sel osteoblas adalah sel pembentuk tulang. Osteoblas bekerja membentuk dan mensekresikan kolagen dan non kolagen (komponen matriks tulang). Osteoblas berasal dari jalur sel mesenkim stroma 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 (Fernandez *et al.*, 2006). Dalam keadaan aktif, osteoblas merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar sedangkan dalam keadaan tidak aktif berbentuk pipih (Djuwita *et al.*, 2012).

Osteoblas memiliki fungsi sebagai penghasil matriks organik (yang terdiri atas protein kolagen dan nonkolagen) serta mengatur proses mineralisasi (kalsium-fosfat) pembentuk osteoid. Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat di bagian dalam periosteum dan sumsum tulang. Osteoblas dalam struktur epitel terorganisir mengeluarkan matriks organik tulang, dan tetap sebagai epitel ketat untuk mengontrol lingkungan matriks untuk mineralisasi. Dengan pertumbuhan yang berkelanjutan, beberapa osteoblas masuk ke dalam matriks sebagai sel hidup, osteosit, yang merupakan bagian permanen dari organ hidup. Osteoblas baru direkrut secara terkoordinasi dari sel puncak mesenkim dan prekursor osteoblas untuk mempertahankan lapisan epitel lanjutan melalui pembentukan tulang secara aktif. Sel-sel ini menjadi osteosit setelah masuk ke dalam matriks tulang dan berkomunikasi satu sama lain dan lapisan osteoblas permukaan melalui proses sel yang berjalan dalam kanalikuli yang menembus matriks (Blair *et al.*, 2017).

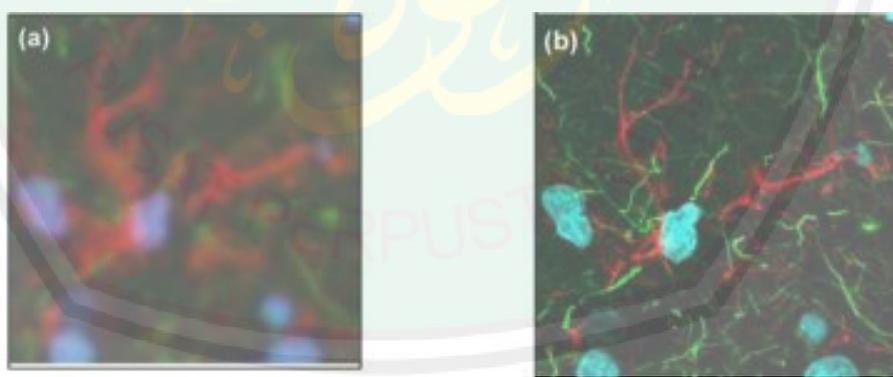
### 2.15 Tinjauan *Immunocytochemistry* (ICC)

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

dikonjugasi dengan *fluorophore* atau senyawa yang dapat berflouresensi (Burry, 2010).

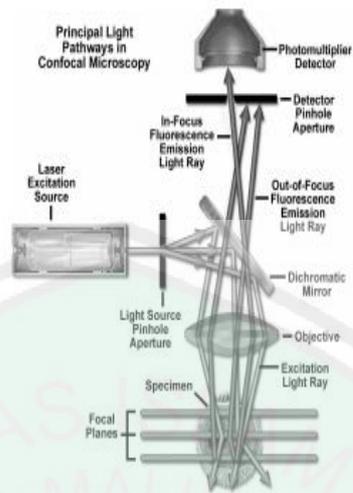
### 2.16 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

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



**Gambar 2.9** (a) Pengamatan SEM

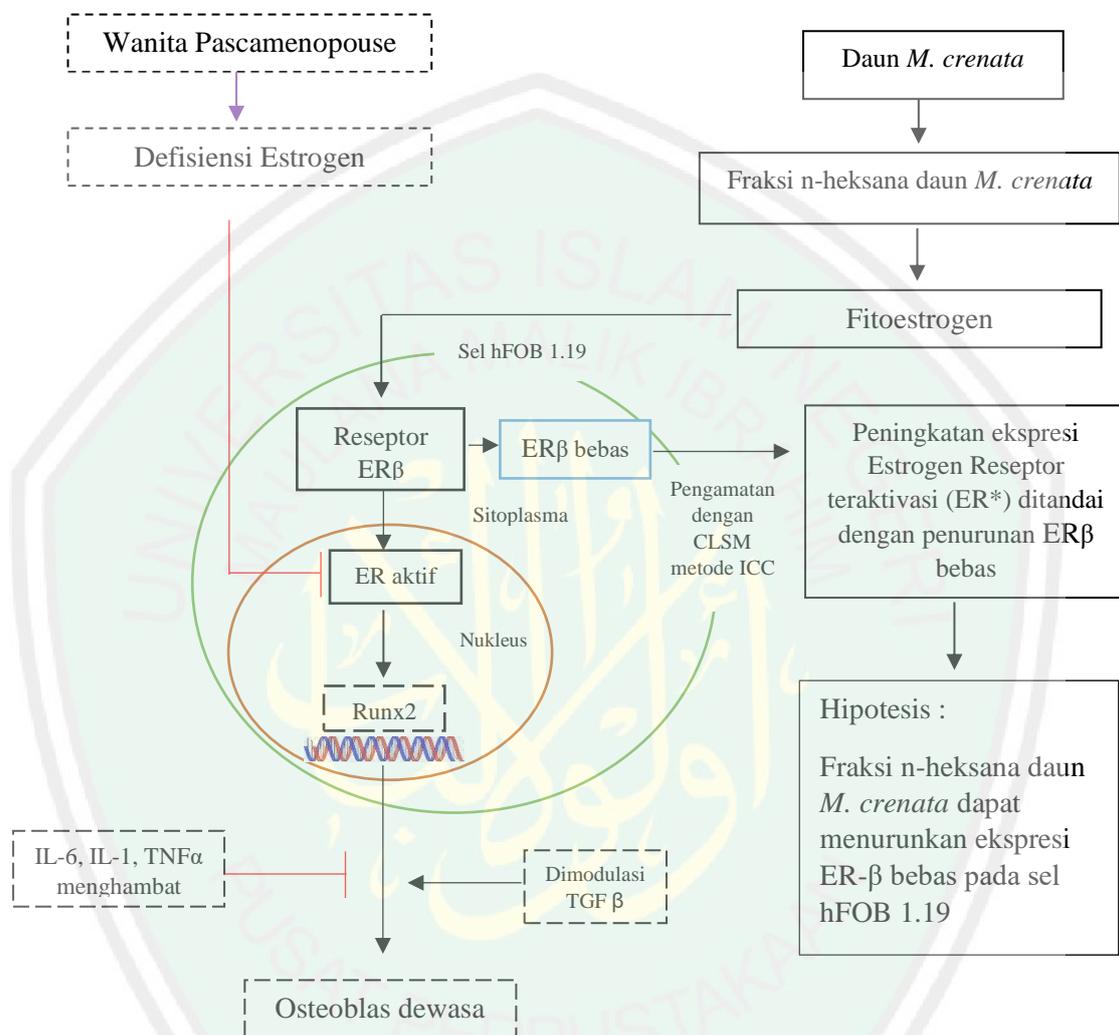
(b) Pengamatan CLSM



(c) Diagram CLSM (Claxton *et al.*, 2010)

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

**3.1 Kerangka Konseptual**



Keterangan gambar:

- = variabel pendukung
- = jalur efek defisiensi estrogen
- = variabel yang diteliti
- | = menghambat
- = jalur yang diteliti

**Gambar 3.1** Skema Kerangka Konseptual

### 3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Wanita akan mengalami masa pascamenopause, dimana pada masa itu banyak fungsi organ maupun hormon yang menurun dan kekurangan hormon ini biasa dikenal dengan defisiensi estrogen. Kejadian ini dapat menghambat teraktivasinya reseptor estrogen yang dapat meningkatkan sel osteoblas dan meningkatkan sitokin-sitokin yang dapat menghambat proses pembentukan tulang.

Pemberian fraksi n-heksana daun *M. crenata* Benowo sebagai fitoestrogen akan berikatan dengan estrogen reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) dalam sitoplasma dan mengaktifkan hormon reseptor yang kompleks/ estrogen reseptor teraktivasi (ER\*). Hormon reseptor kompleks ini nantinya akan bertranslokasi menuju nukleus lalu mengaktifkan Runx2 yang akan berikatan dengan DNA lalu bertranskripsi dan menghasilkan TGF- $\beta$  yang dapat memodulasi sel preosteoblas menuju osteoblas dewasa untuk meningkatkan osteogenesis atau pembentukan tulang pada sel hFOB 1.19 dengan mengamati ER- $\beta$  bebas dalam sitoplasma.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Fraksi n-heksana daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi ER- $\beta$  bebas pada sel hFOB 1.19

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

##### **4.1.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *True Experimental Post Test Only* untuk mengetahui aktivitas ER- $\beta$  bebas fraksi n-heksana daun *M. crenata* yang diambil dari daerah Benowo terhadap sel hFOB 1.19 yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan dengan dosis 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm. Dengan desain tersebut, dalam penelitian ini terdapat dua kelompok yaitu kelompok pertama yang diberi *treatment* yang disebut kelompok kelas eksperimen dan kelompok kedua yang tidak diberi *treatment* dan disebut kelas kontrol (Purwanto dan Sulistyastuti, 2011).

##### **4.1.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang akan dilakukan terdiri atas preparasi sampel fraksi n-heksana varian dosis 62,5;125;250 ppm, serta uji aktivitas induksi fraksi n-heksana daun *M. crenata* Benowo melalui penurunan ekspresi ER- $\beta$  dengan metode ICC dibantu instrumen CLSM.

#### **4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari hingga Mei 2020. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, dan

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 yaitu Daun *M. crenata* yang diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya lalu diidentifikasi di Materia Medika Batu, Malang. Varian dosis yang digunakan dalam penelitian ini dengan konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm.

#### **4.3.2 Sampel Sel**

Sampel sel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari ATCC dan dikultur di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

### **4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

#### **4.4.1 Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah fraksi n-heksana *M. crenata* dengan variasi dosis tertentu yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, dan 250 ppm.
2. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi pada ER- $\beta$  bebas sel hFOB 1.19.
3. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu dan lama inkubasi sel, keadaan lingkungan sel dan media kultur sel.

#### **4.4.2 Definisi Operasional**

1. Dosis merupakan jumlah atau takaran ekstrak yang diberikan kepada objek dalam satuan atau unit tertentu. Dosis yang digunakan adalah 62,5 ppm, 125

ppm, dan 250 ppm. Replikasi dosis dilakukan sebanyak tiga kali dengan tujuan untuk mengetahui dosis efektif yang ditandai dengan penurunan ekspresi ER- $\beta$  bebas.

2. Ekspresi ER- $\beta$  bebas merupakan pendaran cahaya/ intensitas fluoresensi dari CLSM yang menunjukkan terjadinya aktivitas pada sel hFOB 1.19.

#### **4.5 Alat dan Bahan**

##### **4.5.1 Alat**

###### **4.5.1.1 Kultur Sel hFOB 1.19**

Alat-alat yang digunakan dalam proses kultur sel hFOB 1.19 yaitu *Conical Tube* 15 mL, *Conical Tube* 50 mL, *Micropipet* 1000  $\mu$ L, *Flask Culture*, spuit 10 mL dan *Microfilter* 0,22  $\mu$ m. Selain itu instrumen yang digunakan diantaranya *Olympus IX 71 Inverted Microscope*, *L W Centrifuge*, *Thermoscientific Hera Safe KS Bio Safety Cabinet (BSC)*, *Thermoscientific Hera Cell 150i CO<sub>2</sub> Incubator*, dan *Thermoscientific Aquabath 18022AQ Waterbath*.

###### **4.5.1.2 Uji Aktivitas dengan Menggunakan Metode ICC**

Alat-alat yang digunakan dalam proses ini yaitu *microplate 24 well*, *Micropipet* 1000  $\mu$ L, tabung reaksi, aluminium foil, rak tabung, *coverslip*, *Hemacytometer*, *Incubator*, BSC dan CLSM.

##### **4.5.2 Bahan**

###### **4.5.2.1 Kultur Sel hFOB 1.19**

Bahan yang digunakan dalam proses ini yaitu sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari LSIH Universitas Brawijaya Malang, *Dulbecco's Minimum Essential Medium*

(DMEM), L-glutamine, Neomycin G418 (geneticin), *Fetal bovine serum* (FBS) 10% sebagai medium komplit.

#### 4.5.2.2 Uji Aktivitas dengan menggunakan Metode ICC

Bahan yang digunakan dalam proses ini yaitu *paraformaldehid* 4%, media kultur yaitu Dimetil Sulfoksida (DMSO) 0,5%, Triton X-100 0,1%, *phosphatase buffer saline* (PBS), BSA 1%, kit antibodi dan *aluminium foil*.

### 4.6 Prosedur Penelitian

#### 4.6.1 Kultur Sel hFOB 1.19

Tahapan kultur sel hFOB 1.19 adalah disiapkan media kultur (MK) yang terdiri dari media DMEM, *L- glutamine*, FBS 10%, dan Neomycin G418 (geneticin), dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 mL dengan melalui proses filtrasi menggunakan *microfilter* 0,22  $\mu$ L, dilakukan pemanasan *vial cell* (sel beku) dengan *waterbath* 37°C selama 2 menit, dipindahkan sel yang telah hangat dan mencair menggunakan *microfilter* 0,22 nm ke dalam *conical tube* 15 mL yang berisi MK steril, dihomogenkan dan disentrifugasi dengan 1.500 rpm selama 5 menit, dibuang *supernatant* hingga tersisa *pellet* sel dalam *conical tube*, ditambahkan MK steril  $\pm 3$  ml, dipindahkan campuran MK steril dan sel dari *conical tube* 15 mL ke *flask culture* yang berisi  $\pm 2$  mL MK steril, diberi label (nama sel, tanggal kerja), diamati dengan mikroskop *inverted*, diinkubasi pada suhu 37°C, dilakukan pengamatan setiap 24 jam, serta diganti media jika terjadi perubahan warna media pada *flask culture*, dilakukan pengamatan hingga mendapatkan 80-90% *confluence* sel.

#### 4.6.2 Pembuatan Varian Dosis Sampel Fraksi n-Heksana

Pembuatan sampel fraksi n-heksana daun *M. crenata* adalah ditimbang 50 mg sampel fraksi n-heksana daun *M. crenata*, ditambahkan 50  $\mu$ L Tween 80, lalu diaduk homogen, dilarutkan dalam 1 mL DMSO 0,5 % dan diaduk dan di ad hingga 10 mL DMSO untuk selanjutnya dijadikan larutan induk 5.000 ppm, difiltrasi larutan menggunakan 0,22  $\mu$ L *microfilter*, disimpan dalam tabung steril dan diencerkan larutan induk dengan variasi dosis 62,5; 125; dan 250 ppm.

#### 4.6.3 Uji Aktivitas dengan Metode ICC

##### 4.6.7.1 Peletakan Sel dalam 24 *well-microplate*

Peletakan sel dalam 24 *well-microplate* dilakukan dengan cara diambil *supernatant* dan medium dalam *flask culture*, dicuci *flask culture* dengan PBS sebanyak 2 kali, ditambahkan Tripsin-EDTA 2 mL dan dihomogenkan perlahan dan dilakukan *scraper* selama 2 menit, ditambahkan 5 mL MK steril ke dalam *flask* dan dipindahkan dalam *conical tube* 15 mL, disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit, lalu dibuang *supernatant* dan diambil *pellet*, ditambahkan 15 mL media ke dalam *pellet* sel, ditanam pada 24 *well-microplate* dan diberi label kemudian diinkubasi.

##### 4.6.7.2 Pemberian Fraksi n-Heksana Daun *M. crenata* dan Kontrol Sel

Diambil 24 *well-microplate* dari inkubator, ditambahkan sampel fraksi n-heksana daun *M. crenata* yang sudah diencerkan dengan variasi dosis 62,5; 125; 250 ppm sebanyak 3 kali pengulangan. Lalu dimasukkan juga kontrol sel positif yaitu genistein dengan 3 kali replikasi dan kontrol negatif (tanpa perlakuan)

dengan replikasi 3 kali, kemudian diberi label atau tanda (nama sel, tanggal kerja), diinkubasi 48 jam dengan suhu 37°C dengan CO<sub>2</sub> 5%.

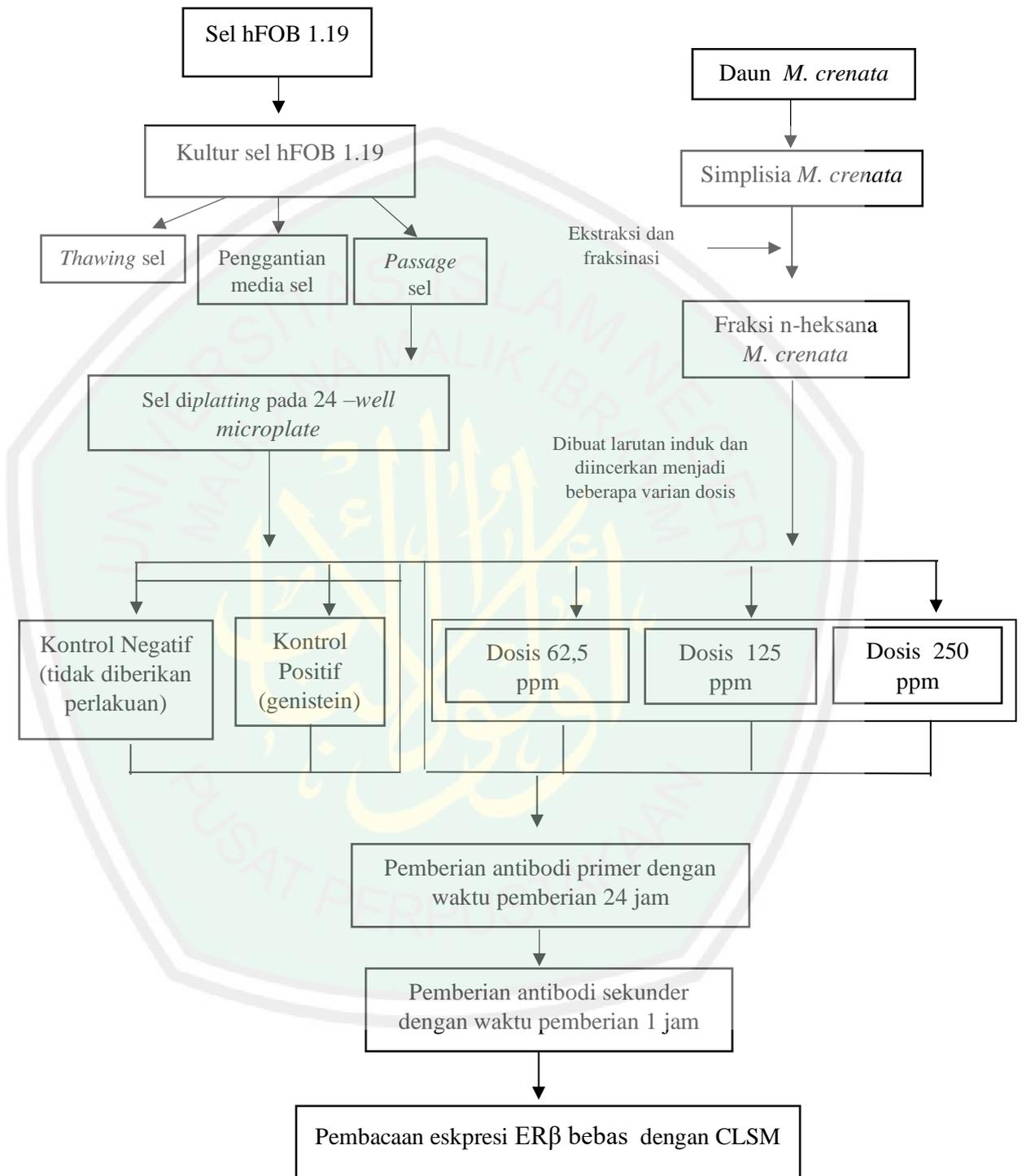
#### **4.6.7.3 Pewarnaan ER-β Bebas Menggunakan Metode ICC**

Difiksasi sel dengan PFA 4% selama 10 menit, dicuci dengan PBS sebanyak 3 x 5 menit, ditambahkan 0,1% Triton x-100 untuk permeabilitas membran selama 10 menit, dicuci dengan PBS sebanyak 3 x 5 menit, diinkubasi dengan *blocking buffer* 1% BSA selama 30 menit, diinkubasi antibodi primer selama 24 jam dalam suhu 4°C, dicuci PBS dan ditambah antibodi sekunder selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3x 5 menit.

#### **4.6.7.4 Pengamatan CLSM**

Diambil *coverslip* dalam 24 *well-microplate*, diletakkan di kaca preparat dengan posisi terbalik, ditetaskan sedikit PBS dan diamati menggunakan CLSM.

#### 4.7 Skema Alur Penelitian

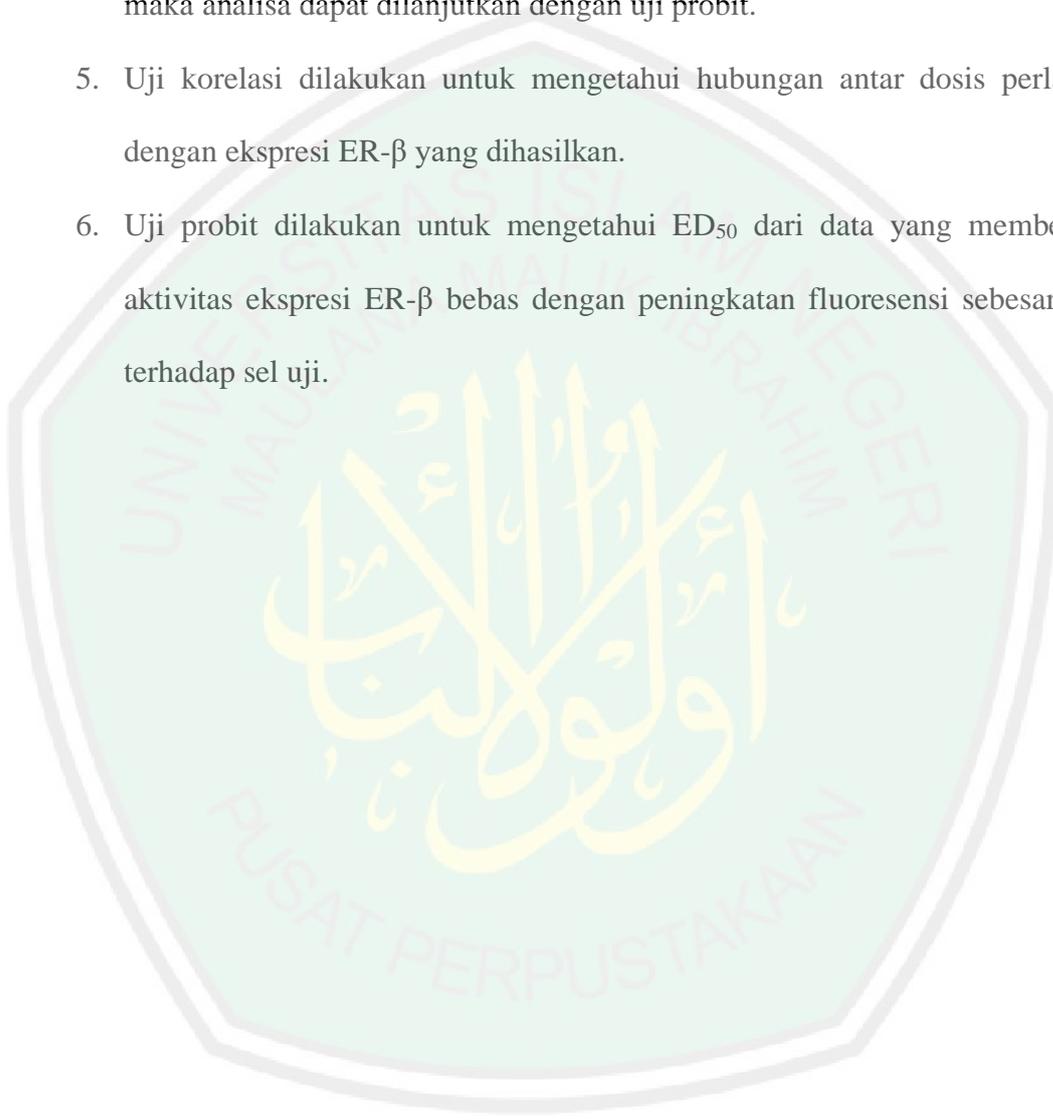


#### 4.8 Analisa Data

Analisis data menggunakan IBM SPSS *Statistics* 24. untuk mengetahui nilai intensitas fraksi yang telah diuji aktivitasnya. Jenis data dalam penelitian ini adalah rasio yaitu data bersifat angka dalam arti yang sesungguhnya, sehingga termasuk dalam data parametrik. Dalam uji parametrik dilakukan analisis data dengan cara sebagai berikut (Dahlan, 2014):

1. Uji normalitas data, bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Pada pengujian hipotesis, jika 50 sebaran data normal maka digunakan uji parametrik. Namun jika sebaran data tidak normal maka digunakan uji nonparametrik.
2. Uji homogenitas varian, bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-Way* ANOVA, bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikansi maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau lebih dikenal dengan uji *Least Significance Different* (LSD).

4. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Apabila *P value* < 0,05 berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji probit.
5. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antar dosis perlakuan dengan ekspresi ER- $\beta$  yang dihasilkan.
6. Uji probit dilakukan untuk mengetahui ED<sub>50</sub> dari data yang memberikan aktivitas ekspresi ER- $\beta$  bebas dengan peningkatan fluoresensi sebesar 50% terhadap sel uji.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, 2006. Dasar- Pengetahuan Ilmu Taksonomi. Bandung: Angkasa
- Achdiat, C. M. 2003. *Fitoestrogen untuk wanita menopause*. <http://www.situs.kesrepro.info/aging/jul/2003/ag01.html> [diakses pada tanggal 30 Nopember 2007].
- Aemi, N. Y. 2012. Uji Aktivitas Antiosteoporosis Fraksi *n*-heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. dalam Meningkatkan Kepadatan Tulang Trabekular Vertebra Mencit Betina. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Afriastini, J. J. 2003. *Marsilea crenata* Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. Cryptograms: Ferns and fern allies. Bogor : LIPI.
- Ahmad, M.M.2006. Anti Inflammatory Activities of *Nigella sativa* Linn (Kalongi, black seed), (Online), (<http://lailanurhayati.multiply.com/journal>, diakses 13 November 2007).
- Allredge, B. K., Corelli, R. L., Ernst, M. E., Guglielmo, B. J., Jacobson, P. A., Kradjan, W. A., Williams, B. R. 2013. *Applied Therapeutics*. PA : Lippincot Williams Dan Wilkins.
- Anderson, G.L., Chlebowski, R.T. and Rossouw, J.E. (2006) Prior Hormone Therapy and Breast Cancer Risk in The Women's Health Initiative Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin. *Maturitas*. Volume 55
- Ariyanti, H. and Apriliana, E. 2016. Pengaruh Fitoestrogen Terhadap Gejala Menopause. *Majority*. Volume 5 (5).
- Arteaga-Lopez, Paola, Handal-Silva, Anabella y Morán-Perales, José Luis. 2003. Differential cholinergic system regulation of mRNA Expression Of Estrogen Receptors In The Hypothalamus Of The Female Rat. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*.
- ATCC. hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372™) American Type Culture Collection. [www.atcc.org](http://www.atcc.org).
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norularni, N.A.N., Omar, A.K.M. 2013. "Technique for Extractions of Bioactive Compound from Plantt Material". *J. Food Engineering*. Volume 2 (5)
- Banu, K. S., dan Cathrine, L., 2015. "General Techniques Involved in Phytochemical Analysis. *International Journal od Advanced Research in Chemical Science*". Volume 2 (5)
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawiroharjo.
- Biben, H. A. 2012. Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan keamanan penggunaannya. *Estrogen sebagai sumber*

- hormon alami*. Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami.
- Blair, Harry C., Quitterie C. Larrouture, Yanan Li, Hang Lin, Donna Beer-Stoltz, Li Liu, Rocky S. Tuan, Lisa J. Robinson, Paul H. Schlesinger, and DBeborah J. Nelson. 2017. "Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro*." *Tissue Engineering Part B: Reviews*. Volume 23 (3).
- Bustamam N. 2008. Fitoestrogen dan kesehatan tulang. *Bina Widya*. Volume 19 (3).
- Bruderer, M., Richards RG., Alini M., Stoddart MJ. 2014. Role and Regulation of Runx2 in Osteogenesis. *European Cells and Material*. Volume 28
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A review. *Ultrason Sonochem*. Volume 34.
- Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. 2010. Laser Scanning Confocal Microscopy. *Der Hautarzt*.
- Corwin, E. J. 2009. Buku Saku Patofisiologi. 3<sup>rd</sup> Edition. Jakarta: EGC.
- Cosman. F. 2009. *Osteoporosis: Panduan Lengkap agar Tulang Anda Tetap Sehat*. Solo: Bintang Pustaka.
- Cui, J., Shen, Y. and Li, R. 2013. Estrogen Synthesis And Signaling Pathways During Aging: From Periphery To Brain. *Trends in Molecular Medicine*. Volume 19 (3).
- 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
- Depkes. 1 dari 3 wanita dan 1 dari 3 Pria Memiliki Kecendrungan Menderita Osteoporosis. 2005. <http://www.depkes.go.id>. Diakses 16 Februari 2010.
- Dey, P. M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I. USA: Academic Press
- Djuwita, I., Irma A.P., Adi, W., and Mustafa, S. 2012. "Proliferasi Dan Diferensiasi Sel Tulang Tikus Dalam Medium Kultur In Vitro Yang Mengandung Ekstrak Batang Cissus Quadrangula Salisb. (Sipatah-Patah)." *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*. Volume 6 (2).
- Engler-Chiurazzi, E.B., Brown, C.M., Povroznik, J.M., Simpkins, J.W. 2016. Estrogens as Neuroprotectants: Estrogenic Actions In The Context Of Cognitive Aging And Brain Injury. *Progress in Neurobiology, Elsevier*.

- Esclapez, M. D., Garcia-Perez, J. V., Mulet, A., Carcel, J. A. 2011. Ultrasound Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Review*. Volume 3.
- 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.
- Filiano, A. J., Gadani, S. P. and Kipnis, J. 2015. Interactions of Innate and Adaptive Immunity in Brain Development and Function. *Brain Res*. Volume 1617
- Finkelstein J S, Brockwell S E, Mehta V, Greendale G A, Sowers M R, Ettinger B, Lo J C, Johnston J M, Cauley J A, Danielson M E, Neer R M. 2008. Bone Mineral Density Changes During The Menopause Transition In A Multiethnic Cohort Of Women. *J Clin Endocrinol Metab* 93.
- Gibbons, and Gray, A.I., 1998. Isolation by Chromatography, In: Cannel, Richard, J.P., 1998. *Natural Product Isolation*. Tatawa New Jersey: Human Press.
- Glover, A. and Assinder S. J. 2006. Acute Exposure Of Adult Male Rats To Dietary Phytoestrogen Reduces Fecundity And Alters Epididymal Steroid Hormon Receptor Expression. *Jour. Endoc*. Volume 189
- Guhir A, M. 2019. Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi *n*-Heksana Daun Semanggi (*Marsilea Crenata* C Presl) Secara *In Vitro* Pada Sel Mikroglia HMC3. *Skripsi*. Program Studi Farmasi : UIN Malang.
- Hartiningih dan Anggraeni, D. 2013. Kombinasi *Calcitriol* dan *Ethynil Ethyl Estradiol* untuk Mencegah Osteoporosis Tikus Ovariectomi. Penelitian pengembangan bagian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- Imani, A. K. F. 2005. Tafsir Nurul Qur'an. Jakarta: Penerbit Al-Huda.
- Jantaratnotai, N., Utaisincharoen P., Sanvarinda, P., Thampithak, A., Sanvarinda, Y. 2013. Phytoestrogens Mediated Anti-Inflammatory Effect Through Suppression Of IRF-1 And Pstat1 Expressions In Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology*: Elsevier.
- 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)
- Johan, A. K. 2016. Uji *In Silico* Senyawa Genistein sebagai Ligan pada Reseptor Estrogen Beta. *Skripsi*. Yogyakarta: Univesitas Sanata Dharma.
- Kawiyana, I. K. S. 2009. Osteoporosis Patogenesis Diagnosis Dan Penanganan Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam*. Volume 10 (2).
- Kini, U. and Nandeesh, B. N. 2012. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Springer: Radionuclide and Hybrid Bone Imaging.

- Kuntana, YP., Gani, YY., Alipin, K. 2009. Respon Pemberian Phytoestrogen Berasal dari Tepung Kedelai pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Luas Jaringan Interstitial, permatogenesis dan Kualitas Sperma. Retrieved from <http://bionatura.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2014/10/3-yasmi>.
- Lattante, S., Perulli, A., Anni, M. 2014. Characterization by Confocal Laser Scanning Microscopy of the Phase Composition at Interfaces in Thick Films of Polymer Blends. *Journal of Polymers*. 541248.
- Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H, Chen, C-P., Wang, PH. 2013. Hormone Therapy For Postmenopausal Women And Unanswered Issue. Elsevier: Gynecology and Minimally Invasive Therapy. Vol. 2: 13- 17.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Volume 47 (2)
- Liza ,P., Achmad.,F, Ronny,M., Suwidjiyo, P. 2016. Ethanol Extract, Ethyl Acetate Extract, Ethyl Acetate Fraction, and n-Heksan Fraction Mangosteen Peels (*Garcinia mangostana* L.) As Source of Bioactive Substance Free-Radical Scavengers. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 01, 71 – 82.
- Ma'arif, B., Mangestuti, A., dan Laswati, H. 2018. "Alkaline Phosphate Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Volume 8 (3)
- Ma'arif, B. 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid dari Ekstrak *n*-Heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga
- Ma'arif, Burhan., Mangestuti, A., dan Hening, L. 2016. "Phytochemical Assessment on *n*-heksana ekstrak and fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS". *Journal Traditional Medicine*. Volume 21(2)
- Ma'arif,B., Agil, M., dan Laswati,H. 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Volume 8 (3).
- Mahajan *et al.*, 2012. Health Issues in Menopausal Women in North India. *Journal of Mid-Life Health*. Volume 3 (2)
- Manolagas S C. 2000. Birth and death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. Volume 21 (2)
- 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*. Volume 7(47)

- Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., 2013. New Concepts, Experimental Approaches, And Dereplication Strategies For The Discovery Of Novel Phytoestrogens From Natural Sources. *Planta Med.* Vol. 79
- Mukhriani, 2014. "Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif". *Jurnal Kesehatan.* Volume 7 (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.*
- Nielsen, S. S. 2003. *Food Analysis 3<sup>rd</sup> Edition.* Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, USA.
- Nisa, Ghallisa Khoirun, Wahyunanto Agung Nugroho, Yusuf Hendrawan. 2014. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper crocatum*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis.* Vol.2, No.1
- Nurjanah., Aulia, Azka., Asadatun, Abdullah. 2012. "Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Masilea crenata* C.Presl)". *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan.* Volume 1 (3)
- Odugbemi, T. 2008. *A Textbook of Medicinal Plants from Nigeria.* Yoba-Lagos: University of Lagos Press.
- Ososki, A. L., Kennelly, E. J. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research.* Volume 17
- Permana, Hikmat. 2014. Patomekanisme Osteoporosis Sekunder Akibat Steroid dan Kondisi Lainnya. *Workshop.* Garut.
- Purwanto, E, A., Sulistyastuti, D. 2011. Metode Penelitian Kuantitatif Untuk Administrasi Publik dan Masalah-Masalah Sosial. Gava Media: Yogyakarta.
- Putra, HL. 2011. Green Clover Potentiates Delaying The Increment Of Imbalance Bone Remodeling Process In Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana* Volume 47 (2)
- Putra, Kurniawan Hidayat Perdana. 2018. *Skripsi .* Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Puspitasari, Y., Suciati, Agil, M. 2015. Isolasi Senyawa Terpenoid Dari Fraksi n-Heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. Pada Hasil Kcv Fraksi No.2. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia.* Volume 2 (1)
- Putra H L. 2011. Green Clover Potentiates Delaying The Increment of Imbalance Bone Remodelling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indosiana.* Volume 47 (2)

- Rachman, I. A., Soewondo, P., Setiati, S., Kusumawijaya, K., Baziad, A., Witjaksono, J., Sukarya, W. S., Silvia. 2004. *Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause*. HTA Indonesia.
- Rohman, A. dan Riyanto, S., 2005, Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) Secara *In Vitro*. *Majalah Farmasi Indonesia*. Volume 16 (3)
- Rossouw, J.E, Anderson, G.L., Prentilce, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M. and Ockene, J. 2002. Risk And Benefits Of Estrogen Plus Progesterin In Healthy Postmenopausal Women:Principal Results From The Women's Health Inisiative Randomized Controlled Trial. *Jama*. Volume 288.
- Saleh, N.J., dan Moses, S. 2017. "Serbuk Semanggi Sebagai Minuman Herbal". *TEKNOBUGA*. Volume 4 (1)
- Setijati dan Johar Jumiati Afriastini. 1985. *Kerabat Paku*. Bogor: Proyek Studi Potensi SDA Indonesia Studi Potensi Sumber Daya Nabati Lembaga Biologi Nasional-LIPI.
- Sihombing I, Wangko S. Kalangi S. 2012. Peran Estrogen Pada Remodeling Tulang. *Jurnal Biomedik*. Volume 4 (3)
- Sherwood, L. 2016. *Human Physiology From Cell to The System 9th Edition*. Boston: Cengage Library.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan, dan Keserasian AlQur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Stevenson, J.C. 2007. *An Atlas Of Osteoporosis*. Third Edition. Informa UK Ltd.
- Sugiyono. 2011. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Afabeta
- Taylor, C.R., and Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako Denmark: IHC Handbook Sixth edition.
- 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*. Volume 9 (6)
- Trisunuwati, Pratiwi. 2017. "Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Againts Blood Estrogen-Progesterone Balance, Blood Calcium Levels and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Ratus norvegicus*)". *Research Journal of Life Science*. Volume 4 (1)

- Utomo, M, Meikawati, W, Putri, Z. 2010. Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Kepadatan Tulang Pada Wanita Pascamenopause. *Jurnal Kesehatan masyarakat Universitas Muhammadiyah Semarang*. Volume 6 (2).
- Venn, R.F. 2008. *Principles and Practices of Bioanalysis. Edisi kedua*. Paris: Taylor and Francis Group Ltd.
- 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.* Volume 119.
- Villa, Alessandro., Vegeto, Elisabetta., Poletti, Angelo., Maggi, Adriana. 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Reviews*.
- Voight,R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press .
- Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. 2014. The Many Faces of Estrogen Signaling. *Biochemica Medica*. Volume 24 (3).
- Waters KM, Gebhart JB, Rickard DJ. 1999. Potential Roles of Estrogen Reseptor a and -B in the Regulation of Human Oteoblast Functions and Gene Expression. The Menopause at the Millenium. *In The Proceeding of the 9th International Menopause Society World Congress on Menopause*. Yokohama, Japan.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, CY., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects Of Standardized Phytoestrogen On Taiwanese Menopausal Women. *Elsevier : Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Volume 51.
- Yacoeb AM, Nurjanah, Arifin M, Sulistiono W, Kristiono SS. 2010. Deskripsi Histologis Dan Perubahan Komposisi Kimia Daun Dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata Presl.*, Marsileaceae) Akibat Rebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. Volum 12 (2).
- Zarate, A., Hernandez-Valencia, M., Saucedo, R.,Basurto, L. and Manuel-Apolinar, L. 2014. Current Position About The Use Of Estrogen Therapy In Women During The Menopause Period. *Rev. Med. Inst.* Volume 52 (1)