

**PENGARUH EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*)
TERHADAP KONFLUENTITAS DAN VIABILITAS *MESENCHYMAL*
STEM CELL (MSC) MENCIT (*Mus musculus*) SECARA IN VITRO**

SKRIPSI



OLEH:

'IFFATUSY SYARIFA

NIM. 220602110034

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*)
TERHADAP KONFLUENTITAS DAN VIABILITAS *MESENCHYMAL*
STEM CELL (MSC) MENCIT (*Mus musculus*) SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

OLEH:

‘IFFATUSY SYARIFA

NIM. 220602110034

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

PROGRAM STUDI BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2026

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : 'Iffatusy Syarifa
NIM : 220602110034
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*) terhadap Konfluenitas dan Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell* (Msc) Mencit (*Mus Musculus*) Secara In Vitro

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada tanggal 24 Juni 2026 dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I: Maharani Retna Duhita, PhD.Med.Sc.
NIP. 19880621 202012 2 000

(.....)

Pembimbing II: Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd.
NIP. 19630114 199903 1 001

(.....)

Tim Penguji: Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si.
NIP. 19671113 199402 2 001

(Ketua) (.....)

Fitria Nungky Harjanti, M.Sc.
NIP. 198705282022032002

(Anggota) (.....)



Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan menyebut nama Allah Subhanahu wa ta'ala yang maha pengasih lagi maha penyayang. Alhamdulillah puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah *Subhanahu wa ta'ala*, yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dalam bentuk skripsi. Shalawat serta salam semoga senantiasa terlimpah curahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini saya persembahkan orang-orang yang istimewa yang telah memberi dukungan, motivasi, semangat, serta doa kepada penulis selama penyusunan skripsi ini, yaitu khususnya kepada:

1. Abi Abd Malik Ismail dan Nyik Maslulah yang telah menemani setiap proses dalam tahapan hidup penulis, yang telah memberikan dukungan penuh terhadap semua keinginan penulis serta selalu mendoakan yang terbaik bagi penulis. Terima kasih telah mengusahakan pendidikan penulis dengan sebaik mungkin.
2. Kakak dan adik penulis R.Fan, Diana, Aviv, Imel dan Zain yang juga selalu menjadi sumber motivasi, penyemangat penulis serta teman curhat dan selalu menjadi teman berproses sejak kecil bagi penulis. Dua keponakan penulis, Nada dan Naura yang tak jarang juga menjadi teman bercerita dan selalu menghibur penulis.
3. Keluarga besar yang tentunya juga selalu menjadi tempat pulang dan menjadi tempat yang selalu dirindukan oleh penulis. Terima kasih sudah menjadi keluarga yang penuh kehangatan dan penuh cinta. Terima kasih sudah menjadi bagian penting dalam perjalanan hidup penulis. Terima kasih untuk doa-doa yang pernah dipanjatkan untuk penulis serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
4. Teman-teman seperjuangan biologi Angkatan 2022 terutama teman-teman kelas D yang telah menjadi teman belajar selama perkuliahan yang tentunya tidak singkat ini.
5. Teman-teman rumah kecil; Uswah, Lisna, Yusri, Laely, Syafika, Rani dan Ulfa yang selalu menjadi penyemangat, teman curhat, teman belajar dan tempat *stress released* bagi penulis.

6. Kepada mahasiswa NIM. 220602110031 sebagai teman baik bagi penulis, terima kasih sudah menjadi teman diskusi bagi penulis, terima kasih sudah menjadi bagian dari perjalanan hidup penulis.
7. Terakhir kepada saya sendiri sebagai penulis. Terima kasih karena telah melangkah sejauh ini hingga hari ini penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini, terima kasih sudah memilih untuk tetap bertahan dan menghadapi semua kesulitan yang hadir hingga saat ini, terima kasih karena tidak menyerah dan terus optimis dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga setelah ini akan bertemu dengan banyak kebahagiaan-kebahagiaan diluar sana dan bisa terus belajar.

Malang, 24 Juni 2026

‘Iffatusy Syarifa

MOTTO

وَابْتَغِ فِيمَا آتَاكَ اللَّهُ الدَّارَ الْآخِرَةَ وَلَا تَنْسَ نَصِيبَكَ مِنَ الدُّنْيَا وَأَحْسِنْ كَمَا أَحْسَنَ
اللَّهُ إِلَيْكَ وَلَا تَبْغِ الْفُسَادَ فِي الْأَرْضِ ۚ إِنَّ اللَّهَ لَا يُحِبُّ الْمُفْسِدِينَ

“Dan, carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (pahala) negeri akhirat, tetapi janganlah kamu lupakan bagianmu di dunia. Berbuatbaiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik kepadamu dan janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berbuat kerusakan.” (Q.S. Al-Qashash: 77)

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : 'Iffatusy Syarifa
NIM : 220602110034
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*)
terhadap Proliferasi dan Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell*
(Msc) Mencit (*Mus Musculus*) Secara In Vitro

Menyatakan dengan sebenarnya 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. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 April 2026

Yang membuat pernyataan



'Iffatusy Syarifa
NIM. 220602110034

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

PENGARUH EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*) TERHADAP KONFLUENITAS DAN VIABILITAS MESENCHYMAL STEM CELL (MSC) MENCIT (*Mus musculus*) SECARA IN VITRO

Iffatusy Syarif, Maharani Retna Duhita, Eko Budi Minarno

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Remodelling tulang merupakan proses biologis yang melibatkan keseimbangan antara aktivitas osteoklas dan osteoblas. Osteoblas berasal dari diferensiasi *mesenchymal stem cell* (MSC) yang berperan penting dalam regenerasi jaringan tulang, proses ini berjalan beriringan dan seimbang, ketidakseimbangan dalam proses *remodelling* tulang dapat menyebabkan penyakit metabolik tulang seperti osteoporosis. Daun binahong (*Anredera cordifolia*) diketahui memiliki senyawa isoflavon yang dapat mengaktifkan aktivitas estrogen dalam pembelahan sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun binahong terhadap konfluenitas dan viabilitas MSC mencit (*Mus musculus*) secara in vitro. *Mesenchymal stem cell* dikultur dan diberi perlakuan ekstrak daun binahong dengan kadar 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL dan 1 mg/mL selama 48 jam. Konfluenitas sel diamati menggunakan *software imageJ* dan morfologi menggunakan, sedangkan viabilitas sel diamati menggunakan metode pewarnaan *trypan blue* dengan bantuan alat *cell counter*. Data dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan antarperlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 0,4 mg/mL merupakan dosis paling optimal dibandingkan konsentrasi lainnya dalam pemberian ekstrak daun binahong terhadap tingkat konfluenitas dan viabilitas MSC. Namun, hasil penelitian tersebut secara keseluruhan persentase viabilitasnya masih rendah, maka dari itu penting untuk dilakukan penelitian lanjutan untuk mengoptimalkan kondisi kultur, menentukan konsentrasi efektif, serta mengkaji mekanisme biologis yang terlibat.

Kata kunci: *Anredera cordifolia*, in vitro, konfluenitas sel, *mesenchymal stem cell*, viabilitas sel.

**THE EFFECT OF BINAHONG LEAF EXTRACT (*Anredera cordifolia*) ON
THE PROLIFERATION AND VIABILITY OF MICE (*Mus musculus*)
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) IN VITRO**

‘Iffatusy Syarif, Maharani Retna Duhita, Eko Budi Minarno

Biology Program Study, Faculty of Science and Technology, The State Islamic
University of Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Bone remodeling is a biological process involving a balance between osteoclast and osteoblast activity. Osteoblasts originate from the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), which play a crucial role in bone tissue regeneration. This process proceeds in tandem and in balance; an imbalance in bone remodeling can lead to metabolic bone diseases such as osteoporosis. Binahong leaves (*Anredera cordifolia*) are known to contain isoflavones that can activate estrogenic activity during cell division. This study aims to determine the effect of binahong leaf extract on the confluence and viability of mouse (*Mus musculus*) MSCs in vitro. Mesenchymal stem cells were cultured and treated with binahong leaf extract at concentrations of 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, and 1 mg/mL for 48 hours. Cell confluence was assessed using ImageJ software, cell morphology was evaluated, and cell viability was determined using the trypan blue staining method with the aid of a cell counter. The data were statistically analyzed to determine differences among treatments. The results of the study indicate that a concentration of 0.4 mg/mL is the most optimal dose compared to other concentrations of binahong leaf extract in terms of MSC confluence and viability. However, the overall viability percentage in this study remains low; therefore, it is important to conduct further research to optimize culture conditions, determine the effective concentration, and investigate the biological mechanisms involved.

Keywords: *Anredera cordifolia*, cell proliferation, cell viability, in vitro, mesenchymal stem cell.

تأثير مستخلص أوراق نبات البيناهونغ (*Anredera cordifolia*) على تكاثر وحيوية الخلايا الجذعية الوسيطة (MSC) في الفئران (*Mus musculus*) في المختبر

عفة الشريفة، ماهراني ريتنا دوهيتا، أكوي بودي مينارنوا

برنامج دراسة علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم مالانج الإسلامية الحكومية

ملخص

إعادة تشكيل العظام هي عملية بيولوجية تنطوي على توازن بين نشاط الخلايا الآكلة للعظام (الأوستيوكلاست) والخلايا البانية للعظام (الأوستيوبلاست). تنشأ الخلايا البانية للعظام من تمايز الخلايا الجذعية الوسيطة التي تلعب دورًا مهمًا في تجديد أنسجة العظام، وتسير هذه العملية بشكل متزامن ومتوازن، وقد (MSC) يؤدي عدم التوازن في عملية إعادة تشكيل العظام إلى الإصابة بأمراض استقلابية في العظام مثل هشاشة تحتوي على مركبات (*Anredera cordifolia*) العظام. من المعروف أن أوراق نبات البيناهونغ الإيسوفلافون التي يمكنها تنشيط نشاط الإستروجين في انقسام الخلايا. تهدف هذه الدراسة إلى معرفة تأثير (*Mus musculus*) للفأر (MSC) مستخلص أوراق البيناهونغ على اندماج الخلايا الجذعية الوسيطة وقابليتها للحياة في المختبر. تمت زراعة الخلايا الجذعية الوسيطة ومعالجتها بمستخلص أوراق البيناهونغ بتركيزات 0,4 مجم/مل، و0,6 مجم/مل، و0,8 مجم/مل، و1 مجم/مل لمدة 48 ساعة. تمت مراقبة تكاثر ومراقبة الشكل المورفولوجي، بينما تمت مراقبة قابلية الخلايا للحياة باستخدام *ImageJ* الخلايا باستخدام برنامج باستخدام طريقة تلوين التريبان الأزرق بمساعدة جهاز عد الخلايا. تم تحليل البيانات إحصائيًا لتحديد الاختلافات بين المعالجات. أظهرت نتائج الدراسة أن التركيز البالغ 0,4 مجم/مل هو الجرعة المثلى مقارنة بالتركيزات الأخرى عند إعطاء مستخلص أوراق البيناهونغ لتقييم مستوى اندماج الخلايا الجذعية الوسيطة وقابليتها للحياة. ومع ذلك، فإن النسبة المئوية لقابلية الحياة في هذه الدراسة لا تزال منخفضة بشكل (MSC) عام، ولذلك من المهم إجراء أبحاث إضافية لتحسين ظروف الاستزراع، وتحديد التركيز الفعال، ودراسة الآليات البيولوجية ذات الصلة.

الكلمات الرئيسية : ،الخلايا الجذعية الوسيطة، تكاثر الخلايا، حيوية الخلايا، *Anredera cordifolia* المختبر

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Allah SWT yang telah menganugerahkan Rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat Proposal penelitian skripsi, penulis menyampaikan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nur Diana, M.Si., CAHRM., CRMP., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. H. Agus Mulyono, M.Kes, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Prof. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si selaku Ketua Program Studi Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc. dan Bapak Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dengan penuh kesabaran dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga proposal skripsi ini dapat diselesaikan.
5. Ibu Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si. dan Ibu Fitria Nungky Harjanti, M.Sc. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan advis serta saran sehingga naskah skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Ibu Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan semangat dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
7. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan arahan dan masukan kepada penulis dalam melakukan rencana penelitian.

Semoga kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Swt. Skripsi ini ditulis dengan sebaik-baiknya, namun apabila ditemukan adanya kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

HALAMAN COVER	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
MOTTO	vi
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
ملخص.....	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Batasan Masalah	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 8
2.1 Tulang dan Remodelling Tulang.....	8
2.1.1 Tinjauan Penciptaan Tulang Pada Manusia dalam Perspektif Al-Quran.....	8
2.1.2 Anatomi Tulang.....	10
2.1.3 Sel Penyusun Tulang.....	12
2.1.4 Remodelling Tulang.....	13
2.2 <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	15
2.2.1 Definisi.....	15
2.2.2 Karakteristik.....	15
2.2.3 <i>Mesenchymal Stem Cell</i> pada Sumsum Tulang.....	18
2.2.4 Peran <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dalam Regenerasi Tulang.....	20
2.3 Konfluenitas dan Viabilitas	21
2.3.1 Konfluenitas	21
2.3.2 Viabilitas	22
2.3.3 Hubungan Konfluenitas dan Viabilitas <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dengan Regenerasi Tulang	23
2.4 Kultur <i>Mesenchymal Stem Cell</i> secara In Vitro	24
2.4.1 Kultur Sel Primer	24
2.4.2 Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari Sumsum Tulang	25
2.4.3 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	27
2.4.4 Media <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM).....	28
2.5 Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis).....	29

2.5.1 Tinjauan Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis) dalam Perspektif Al-Qur'an.....	29
2.5.2 Klasifikasi	34
2.5.3 Kandungan Fitokimia.....	35
2.5.4 Potensi Binahong terhadap Proliferasi dan Viabilitas Sel.....	37
2.6 Hipotesis	38
BAB III METODE PENELITIAN	40
3.1 Rancangan Penelitian.....	40
3.2 Variabel Penelitian	41
3.3 Waktu dan Tempat.....	41
3.4 Alat dan Bahan.....	41
3.4.1 Alat.....	41
3.4.2 Bahan	42
3.5 Prosedur Penelitian	42
3.5.1 Preparasi Ruang	42
3.5.2 Preparasi Alat dan Bahan.....	43
3.5.3 Pembuatan Media Stock DMEM	44
3.5.6 Pembuatan Stok Media Kerja	44
3.5.7 Isolasi Kultur <i>mesenchymal stem cell</i>	44
3.5.8 Pengamatan Konfluenitas Hasil Kultur	45
3.5.9 Perlakuan Ekstrak Daun Binahong (<i>Anredera cordifolia</i>) terhadap <i>mesenchymal stem cell</i> Mencit (<i>Mus musculus</i>)	46
3.6 Pengamatan	46
3.7 Analisis Data	48
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong <i>Anredera cordifolia</i> terhadap Konfluenitas Kultur <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC) mencit (<i>Mus musculus</i>)	49
4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong <i>Anredera cordifolia</i> terhadap Viabilitas Kultur <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC) mencit (<i>Mus musculus</i>)...	54
4.3 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur'an.....	58
BAB V PENUTUP	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA.....	64
LAMPIRAN-LAMPIRAN	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2 Anatomi tulang femur dilihat dari sisi melintang.....	11
Gambar 2.1.2 Mikroskopis kultur sel tulang.....	12
Gambar 2.1.4 Siklus <i>remodelling</i> tulang.....	14
Gambar 2.2.3 Sifat multipoten pada mesenchymal stem cell (MSC).....	18
Gambar 2.4.2 Kultur <i>mesenchymal stem cell</i> yang diisolasi dari sumsum tulang mencit	25
Gambar 2.5.2 Tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i>)	34
Gambar 2.5.3.1 Struktur kimia 17β -estradiol	36
Gambar 2.5.3.2 Struktur kimia senyawa isoflavon pada ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i>).....	36
Gambar 2.5.4 Mekanisme hormon estrogen dalam sel	37
Gambar 4.1.1 Tingkat konfluenitas <i>mesenchymal stem cell</i>	49
Gambar 4.1.2 Pengamatan mikroskopis kultur <i>mesenchymal stem cell</i>	52
Gambar 4.2.1 Uji viabilitas menggunakan <i>cell counter</i>	55
Gambar 4.2.2 Viabilitas <i>Mesenchymal Stem Cell</i> setelah pemberian ekstrak <i>Anredera cordifolia</i> selama 48 jam	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengamatan konfluenitas sel sebelum pemberian ekstrak.....	71
Lampiran 2. Olah data konfluenitas menggunakan SPSS.....	71
Lampiran 3. Dokumentasi penghitungan viabilitas menggunakan <i>cell counter</i>	72
Lampiran 4. Olah data viabilitas menggunakan SPSS.....	73
Lampiran 5. Kristal formazan pada uji MTT Assay	74
Lampiran 6. Nilai absorbansi MTT Assay	74
Lampiran 7. Kurva standar uji MTT Assay	74

DAFTAR SINGKATAN

μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i>
CO ₂	<i>Karbon dioksida</i>
DI Water	<i>Deionized Water</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	<i>Estrogen Reseptor</i>
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HCl	<i>Hydrochloric Acid</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
Mg	Milligram
mL	Milimeter
Mm	Milimeter
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
MTT Assay	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide Assay</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NaCl	<i>Sodium chloride</i>
NaHCO ₃	<i>Sodium bicarbonate</i>
NBCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
°C	<i>Derajat celcius</i>
OC	<i>Osteocalcin</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Rotation per minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SWT	<i>Subhanahu wa ta'ala</i>
TC dish	<i>Tissue Culture Dish</i>
UV	Ultraviolet

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Satu di antara tanda kebesaran Allah SWT adalah regenerasi sel tubuh, termasuk sel tulang. Aktivitas regenerasi sel tubuh ciptaan Allah SWT ini bertujuan memelihara, dan memperbarui kehidupan. Proses pergantian sel tua dengan sel baru yang sehat merupakan sunatullah yang menggambarkan bentuk kekuasaan-Nya dalam menjaga keseimbangan tubuh manusia. Dalam pandangan Islam, tubuh manusia adalah sistem dinamis yang terus diperbarui oleh Allah SWT. Firman Allah SWT dalam Al-Qur'an Surat Al-'Ankabut ayat 19 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا كَيْفَ يُبْدِئُ اللَّهُ الْخَلْقَ ثُمَّ يُعِيدُهُ إِنَّ ذَلِكَ عَلَى اللَّهِ يَسِيرٌ

Artinya: “Apakah mereka tidak memperhatikan bagaimana Allah memulai penciptaan (makhluk), kemudian mengembalikannya (menghidupkannya lagi)? Sesungguhnya yang demikian itu mudah bagi Allah”. (Q.S. Al-'Ankabut [29]: 19)

Imam Al-Hifnawi dalam Tafsir Al-Qurthubi berpendapat bahwa makna dari “Apakah kalian tidak melihat bagaimana Allah SWT menjadikan buah-buahan itu, menghidupkannya kemudian mematikannya dan mengulangi hal yang demikian itu terus-menerus” adalah Allah SWT menciptakan manusia kemudian mematikannya setelah memberikan anak yang lain. Demikian juga dengan binatang yang ada dipermukaan bumi ini, kita dapat menyaksikan bagaimana Allah SWT menciptakan segala jenis binatang, mereka dapat hidup dan berkembang biak hingga akhirnya mati dan dilanjutkan oleh keturunan berikutnya. Hal ini berlangsung terus menerus sampai hari kiamat. Semua ini menunjukkan betapa Allah SWT Maha Kuasa atas segalanya. Jika dikaji lebih lanjut pengulangan penciptaan sebagaimana ayat tersebut, sejalan dengan proses regenerasi sel, yakni sel-sel yang rusak atau tua

secara konstan digantikan oleh sel baru yang muda dan sehat, yang dikenal dengan proses *remodelling* tulang.

Proses *remodeling* tulang terdapat dua komponen utama yaitu resorpsi serta pembentukan tulang. Proses ini sangatlah penting bagi tubuh untuk menjaga homeostasis tulang (Djuwita *et al.*, 2012). *Remodelling* tulang melibatkan sel osteoklas dalam resorpsi sel tulang dan sel osteoblas untuk membentuk matriks tulang baru sebagai pengganti sel tulang yang sudah diresorpsi (Veni & Rajathi, 2017). Penurunan kepadatan tulang dan penyakit tulang metabolik seperti osteoporosis dapat terjadi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang selama proses *remodelling*. Hal tersebut mungkin terjadi jika osteoblas yang terbentuk lebih sedikit daripada osteoklas sehingga proses resorpsi akan berjalan lebih cepat dibandingkan pembentukan sel tulang baru sehingga dapat menyebabkan terjadinya osteoporosis (Djuwita *et al.*, 2012). Fenomena resorpsi sel tulang dan pembentukan sel tulang baru atau disebut *remodelling* tulang merupakan proses berpasangan, yang dalam Al-Qur'an difirmankan oleh Allah SWT pada Surat Adz-Dzariyat ayat 49 sebagai berikut:

وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ

Artinya: "Segala sesuatu Kami ciptakan berpasang-pasangan agar kamu mengingat (kebesaran Allah)". (Q.S. Adz-Dzariyat [51]: 49)

Tafsir Al-Qurthubi mengatakan pada ayat ini Allah SWT menjelaskan bahwa pada langit yang luas itu juga terdapat tanda dan pelajaran, yang menunjukkan bahwa Pencipta langit itu sangat sempurna dan mampu untuk melakukan segala sesuatu. Mujahid mengatakan bahwa satu diantara banyaknya contoh ciptaan Allah yang berpasang-pasangan adalah laki-laki dan perempuan,

langit dan bumi, siang dan malam serta masih banyak lagi. Contoh lain dari ciptaan Allah yang saling berpasang-pasangan lainnya adalah siklus sel seperti siklus *remodelling* tulang. Maka dari itu dibutuhkan alternatif pengobatan untuk meminimalisir terjadinya hal ini, satu diantaranya dengan cara meningkatkan pembentukan osteoblas. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mempercepat pertumbuhan osteoblas dari sel prekusornya yaitu *mesenchymal stem cell*.

Mesenchymal stem cell merupakan sel punca prekursor utama osteoblas melalui jalur diferensiasi osteogenik. Saat ini penelitian terkait potensi *mesenchymal stem cell* telah banyak dilakukan sebagai agen terapi seluler karena sifatnya yang multipotent sehingga dapat menggantikan sel-sel yang rusak. MSC merupakan sumber utama osteoblas melalui jalur diferensiasi osteogenik. Oleh karena itu peranan dari *mesenchymal stem cell* ini sangatlah penting bagi keseimbangan kepadatan tulang (Uccelli *et al.*, 2008). Indikator pertumbuhan sel secara *in vitro* dapat diamati melalui tingkat konfluenitas sel untuk mengetahui jumlah sel pada kultur, serta viabilitas sel untuk mengetahui persentase sel hidup pada kultur.

Konfluenitas merupakan salah satu parameter seluler pembentukan matriks tulang dan merupakan bagian penting dalam *remodelling*. Peningkatan konfluenitas sel tentunya dipengaruhi oleh laju proliferasi, dimana semakin tinggi laju proliferasi suatu sel maka semakin padat matriks tulang yang terbentuk. Selain itu viabilitas juga dapat menjadi indikator seluler tingkat kesehatan sel tulang, karena persentase viabilitas yang tinggi dapat menunjukkan bahwa proses *remodelling* tulang berjalan seimbang, karena sel-sel yang diresorpsi dapat digantikan dengan sel-sel yang terbentuk dari osteoblas (Aslanturk, 2018). Maka dari itu *mesenchymal stem cell*

sebagai prekursor osteoblas memiliki peran yang cukup penting dalam hal tersebut, populasi MSC yang memadai diperlukan sebelum terjadinya diferensiasi osteoblastik pada MSC. Peningkatan proliferasi *mesenchymal stem cell* berpotensi meningkatkan aktivitas regenerasi tulang melalui peningkatan pembentukan osteoblas. Perubahan jumlah osteoblas akibat penurunan proliferasi atau viabilitas dapat menyebabkan pengurangan kapasitas pembentukan tulang. Oleh karena itu, evaluasi proliferasi dan viabilitas osteoblas sering digunakan sebagai parameter pendukung dalam studi *remodelling* dan regenerasi tulang (Wang *et al.*, 2007).

Sejalan dengan hal tersebut, dibutuhkan alternatif pengobatan yang memiliki peranan penting dalam menyeimbangkan proses *remodelling* tulang (Aditama *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, senyawa metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan diketahui dapat meningkatkan kepadatan tulang dengan efek samping yang dapat diminimalisir (Djuwita *et al.*, 2012; Johannes De Villiers, 2009; Lee *et al.*, 2021; Susanti & Ciptono, 2018). Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan tersebut umumnya berasal dari kategori senyawa turunan flavonoid. Senyawa isoflavon yang merupakan senyawa turunan flavonoid diduga dapat meningkatkan proliferasi, viabilitas, dan diferensiasi osteogenik *mesenchymal stem cell* (MSC) melalui jalur estrogen dalam sel (Zhang *et al.*, 2022). Tanaman binahong diketahui memiliki senyawa metabolit sekunder isoflavon jenis genistein, daidzein dan glycitein (Gruber *et al.*, 2002). Berdasarkan penjelasan tersebut, senyawa metabolit berupa isoflavon pada tanaman binahong tentunya memiliki potensi yang sama dengan tanaman-tanaman yang memiliki kandungan senyawa isoflavon dan

memiliki aktivitas fitoestrogen, Allah SWT berfirman dalam Surah As-Syu'ara' ayat 7 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami telah menumbuhkan di sana segala jenis (tanaman) yang tumbuh baik?” (Q.S. As-Syu'ara [26]: 7)

Shihab (2002) menyatakan ayat tersebut mengisyaratkan bahwa Allah SWT mengeluarkan dari bumi ini beranekaragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Dan itu semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Maha Esa dan Maha Kuasa. Satu diantara banyaknya tanaman yang Allah SWT tumbuhkan di muka bumi ini adalah tanaman binahong (*Anredera cordifolia*). Binahong (*Anredera cordifolia*) merupakan tanaman yang diketahui memiliki kandungan senyawa fitokimia berupa flavonoid (Saidah *et al.*, 2022; Hanafiah *et al.*, 2022; Salim *et al.*, 2021). Senyawa flavonoid memiliki sifat antiinflamasi yang diduga dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas (Djuwita *et al.*, 2012). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan efek binahong terhadap fibroblas dan penyembuhan luka, namun studi yang mengevaluasi mengenai pengaruh ekstrak daun binahong terhadap konfluenitas dan viabilitas *mesenchymal stem cell* sumsum tulang sebagai prekursor utama osteoblas masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian mengenai evaluasi pengaruh senyawa daun binahong terhadap MSC penting untuk dilakukan sebagai dasar ilmiah dalam pengembangan fitofarmaka berbasis tanaman lokal yang berpotensi mendukung pencegahan maupun terapi metabolik tulang. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi osteogenik senyawa pada daun binahong untuk kemudian dikembangkan sebagai kandidat obat. Dalam penelitian ini dipilih pendekatan secara *in vitro* dengan kultur

mesenchymal stem cell Mus musculus. Pendekatan in vitro yang dilakukan untuk menilai efek langsung ekstrak daun binahong terhadap MSC dalam lingkungan yang terkendali dan bebas dari pengaruh sistemik organisme secara utuh.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap konfluenitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap konfluenitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah:

1. Manfaat Teoritis: dapat menambah informasi dan wawasan mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap konfluenitas dan viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro.

2. Manfaat Aplikatif: Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lanjutan mengenai pemanfaatan ekstrak daun binahong dalam bidang regenerasi tulang dan terapi berbasis *stem cell*.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. *Mesenchymal stem cell* didapatkan dari hasil isolasi sel primer dari sumsum tulang bagian femur, tibia dan fibula mencit (*Mus musculus*) yang berumur 6-8 minggu
2. Sel yg digunakan dalam penelitian ini adalah kultur sel primer
3. Daun binahong (*Anredera cordifolia*) diperoleh dari Materia Medica Batu.
4. Konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,4 mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8 mg/mL dan 1mg/mL.
5. Daun binahong diekstrak menggunakan pelarut etil asetat.
6. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah konfluenitas dan viabilitas.
7. Parameter yang diamati dalam penelitian ini tidak mencakup parameter diferensiasi *mesenchymal stem cell*.
8. Lama perlakuan ekstrak terhadap kultur sel adalah 48 jam.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tulang dan Remodelling Tulang

2.1.1 Tinjauan Penciptaan Tulang Pada Manusia dalam Perspektif Al-Quran

Manusia merupakan makhluk Allah yang diciptakan dengan sebaik-baiknya bentuk. Manusia diciptakan dengan berbagai kemampuan yang tidak dimiliki oleh makhluk-makhluk lain yaitu memiliki akal. Selain itu manusia juga diciptakan dengan segala sistem yang sangat kompleks dalam tubuhnya. Satu diantara sistem yang ada dalam tubuh manusia adalah sistem gerak yang diciptakan dengan fungsi bentuk yang sedemikian rupa agar dapat berfungsi dengan baik. Dalam penciptaan tulang pada manusia, Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat Al-Mu'minun ayat 14 sebagai berikut:

ثُمَّ خَلَقْنَا النُّطْفَةَ عَلَقَةً فَخَلَقْنَا الْعَلَقَةَ مُضْغَةً فَخَلَقْنَا الْمُضْغَةَ عِظْمًا
فَكَسَوْنَا الْعِظْمَ لَحْمًا ثُمَّ أَنْشَأْنَاهُ خَلْقًا آخَرَ فَتَبَارَكَ اللَّهُ أَحْسَنُ
الْخَالِقِينَ^{قل}

Artinya: “Kemudian, air mani itu Kami jadikan sesuatu yang menggantung (darah). Lalu, sesuatu yang menggantung itu Kami jadikan segumpal daging. Lalu, segumpal daging itu Kami jadikan tulang belulang. Lalu, tulang belulang itu Kami bungkus dengan daging. Kemudian, Kami menjadikannya makhluk yang (berbentuk) lain. Maha Suci Allah sebaik-baik pencipta”. (Q.S. Al-Mu'minun [23]: 14)

Tafsir Ibnu Katsir berpendapat bahwa ayat tersebut menjelaskan tentang proses tahapan pembentukan manusia secara bertahap dan menjadikan kepala, kedua tangan dan kedua kaki lengkap dengan tulang-tulang, sel dan urat-uratnya kemudian dilapisi oleh daging dan kulit. Kemudian Allah memberikan ruh kepada manusia sehingga dapat hidup sebagai makhluk dalam bentuk yang lain yang

memiliki penglihatan, pendengaran, akal, bisa bergerak, dan bisa bergejolak. Begitu juga dengan Tafsir Al-Mishbah yang memaknai ayat tersebut menjelaskan tentang bagaimana Allah menciptakan manusia sedemikian rupa dan berbeda dengan makhluk lainnya (Shihab, 2005). Dibalik proses penciptaan manusia yang kompleks juga memberikan sistem yang kompleks dalam tubuhnya sebagai bentuk pemeliharaan jaringan dalam tubuh agar dapat terus menjalankan fungsinya dengan baik. Begitu juga dengan jaringan tulang yang ada dalam tubuh manusia yang memiliki siklus tersendiri untuk menjaga stabilitas organ gerak dan penopang tubuh. Siklus yang terjadi dalam tulang adalah siklus *remodelling* tulang.

Siklus *remodelling* tulang tentunya melibatkan banyak faktor dalam tubuh terutama sel tulang itu sendiri. Secara umum tulang terbentuk dari tiga jenis sel utama yang berperan dalam proses *remodelling* tulang yaitu osteoblas, osteoklas dan osteosit. Ketiga sel tersebut masing-masing memiliki fungsi penting dalam menyusun jaringan tulang dan menjaga keseimbangan tulang dalam tubuh. Adanya komponen tulang beserta fungsinya tersebut tidak serta merta hanya ada tanpa tujuan. Penciptaan berbagai jenis sel tulang tersebut tentunya telah diatur oleh Allah SWT. Hal ini dapat dilihat pada Al-Qur'an Surat Al-Jasiah ayat 4 sebagai berikut:

وَفِي خَلْقِكُمْ وَمَا يَبُتُّ مِنْ دَابَّةٍ آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ^٤

Artinya: “Pada penciptaan kamu dan makhluk bergerak yang ditebarkan-Nya terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang meyakini”. (Q.S. Al-Jasiah [45]: 4)

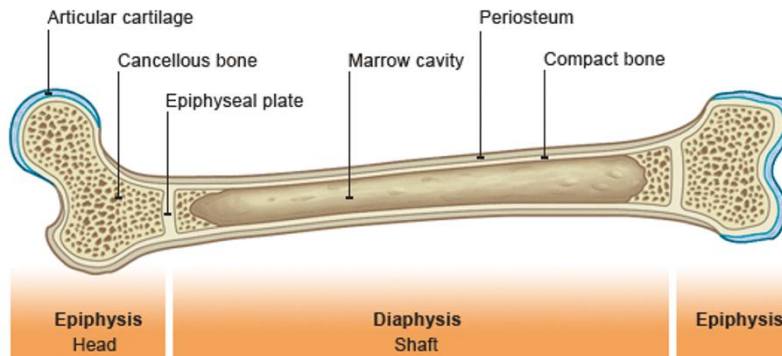
Tafsir Thabari mengartikan ayat tersebut bahwa Allah ingin menyampaikan sesuatu kepada manusia terkait penciptaan binatang melata diatas bumi yang berbeda dengan jenis kalian. Terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) untuk kaum yang meyakini yaitu, terdapat hujjah-hujjah dan dalil-dalil bagi kaum yang yakin

akan hakikat segala sesuatu sehingga mereka mengakui dan mengamalkan kebenaran. Dalam tafsir Fathul Qadir dikatakan bahwa “penciptaan langit dan bumi melalui beberapa tahapan termasuk penciptaanmu” yaitu dari tanah, kemudian dari mani hingga menjadi manusia. Hal tersebut merupakan bukti ekuasaan Allah SWT.

2.1.2 Anatomi Tulang

Secara biologis tulang didefinisikan sebagai jaringan ikat terspesialisasi yang hidup, dinamis dan terus berkembang (Wawrzyniak & Balawender, 2022). Struktur tulang terdiri dari matriks ekstraseluler yang kaya akan kolagen dan kristal hidroksiapatit. Dalam tubuh, tulang memiliki fungsi utama sebagai alat gerak pasif pelindung organ vital, sebagai tempat penyimpanan mineral dan fosfor serta sebagai penopang tubuh (Shao *et al.*, 2015). Selain itu tulang juga memiliki fungsi metabolik dan endokrin seperti pengaturan kadar kalsium fosfat. Tulang berfungsi sebagai tempat berlangsungnya hematopoiesis yang terjadi dalam sumsum tulang, serta sekresi molekul seperti osteokalsin yang berperan dalam pembentukan energi (Šromová *et al.*, 2023). Secara histologis tulang terdiri dari dua susunan utama, yaitu *compact bone* dan *spongy bone*. *Compact bone* atau tulang keras memiliki unit struktural yang disebut osteon. Struktur osteon terdiri dari kanal havers yang didalamnya terdapat pembuluh darah dan syaraf yang di kelilingi oleh lamela konsentris. Diantara lamela yang mengelilingi pembuluh darah dan syaraf tersebut terdapat lakuna yang berisi osteosit serta terdapat kanalikuli yang menghubungkan antar osteosit sebagai jalur pertukaran nutrisi dan sinyal seluler antar osteosit. Struktur ini memberikan kekuatan mekanik terhadap tekanan dan beban (Chang & Liu, 2022). *Spongy bone* atau tulang spons merupakan tulang yang tersusun

trabekula berisi sumsum tulang merah yang berperan dalam proses hematopoiesis (Florencio-Silva et al., 2015).

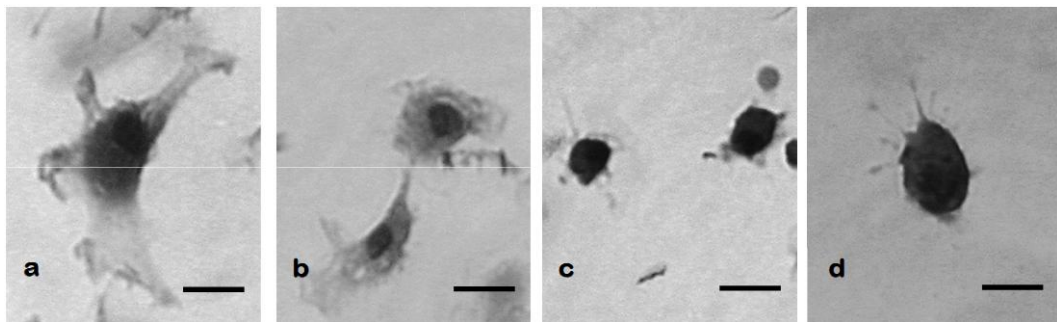


Gambar 2.1.2 Anatomi tulang femur dilihat dari sisi melintang (Purnomo dkk., 2016).

Secara anatomi makroskopis, tulang panjang terdiri atas beberapa bagian utama yaitu epifisis, metafisis, dan diafisis. Epifisis merupakan bagian ujung tulang yang susunan utamanya terdiri dari tulang spons (*spongy bone*) dan dilapisi oleh kartilago artikular. Diafisis merupakan bagian batang tulang yang didominasi oleh tulang kompak (*compact bone*) yang mengelilingi rongga medula sedangkan metafisis adalah daerah transisi antara epifisis dan diafisis yang mengandung lempeng epifisis (*growth plate*) pada individu yang masih dalam fase pertumbuhan. Selain komponen tersebut tulang juga dilapisi oleh dua struktur penting, yaitu periosteum dan endosteum. Periosteum adalah lapisan jaringan ikat padat yang melapisi permukaan luar tulang dan mengandung pembuluh darah serta saraf yang berperan dalam pertumbuhan dan perbaikan tulang. Endosteum merupakan lapisan yang ada pada permukaan dalam rongga medula dan berperan dalam aktivitas *remodelling* tulang (Florencio-Silva et al., 2015).

2.1.3 Sel Penyusun Tulang

Tulang secara histologis tersusun atas beberapa jenis sel, yaitu osteoprogenitor, osteoblas, osteoklas dan osteosit. Osteoprogenitor merupakan sel prekursor yang dapat berkembang menjadi osteoblas. Osteoblas berperan penting dalam sintesis matriks tulang dan proses mineralisasi melalui produksi kolagen tipe I dan protein non-kolagen seperti osteocalcin dan osteopontin (Dyasti *et al.*, 2021; Nguyen & Kampa, 2013). produksi kolagen tipe I dan protein non-kolagen yang dihasilkan oleh osteoblas mengalami mineralisasi melalui pengendapan kristal hidroksiapatit yang dipengaruhi oleh aktivitas alkaline phosphatase dan vesikel matriks, sehingga terbentuk matriks tulang yang terkalasi dan memiliki sifat mekanik tulang. (Florencio-Silva *et al.*, 2015; Komori, 2019).



Gambar 2. 1. 3 Mikroskopis kultur sel tulang (Djuwita *et al.*, 2012)

Osteosit merupakan sel tulang terbentuk dari diferensiasi osteoblas yang terperangkap dalam matriks mineral dan berdiferensiasi menjadi sel bertipikal dendritik. Osteosit dewasa menempati lakuna yang tersusun di antara lamela-lamela matriks mineral yang saling terhubung melalui kanalikuli untuk membentuk suatu jaringan fungsional yang disebut dengan *lacuno-canalicular network*. Jaringan ini penting dalam mekanosensing serta pengaturan aktivitas osteoblas dan osteoklas (Schaffler *et al.*, 2014). Perubahan sel osteoblast menjadi osteosit melibatkan perubahan organel sel juga diantaranya adalah diameter sel mengecil, perubahan

organel intraseluler serta peningkatan proses selulernya. Osteosit dewasa memiliki retikulum endoplasma kasar dan apparatus golgi yang lebih sedikit dibandingkan preosteosit atau osteosit muda. Namun pada osteosit dewasa memiliki jumlah lisosom yang lebih banyak dibandingkan preosteosit (Djuwita *et al.*, 2012).

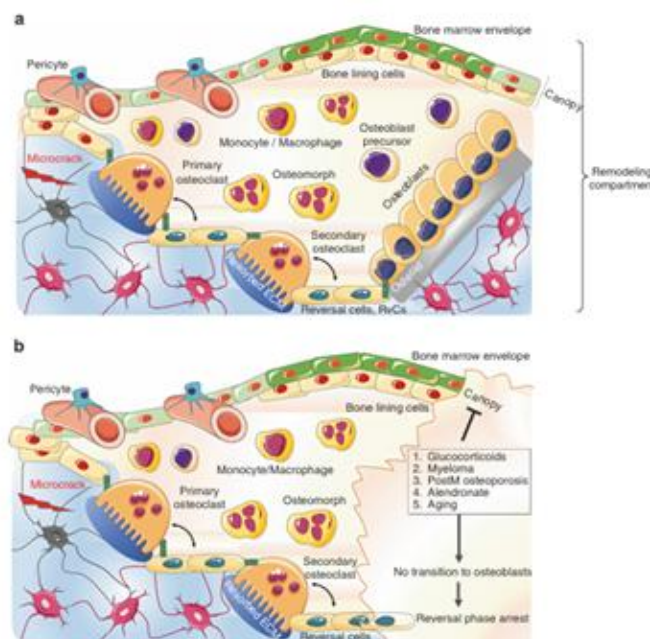
Osteoklas merupakan sel multinukleat yang bertanggungjawab terhadap resorpsi tulang dengan cara melarutkan komponen mineral dan mendegradasi matriks organik, sehingga memungkinkan terjadinya perombakan dan perbaikan tulang (Kodama & Kaito, 2020). Osteoklas merupakan sel fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus dengan ukuran besar dan berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Bolamperti *et al.*, 2022). Osteoklas memiliki struktur penting berupa *sealing zone* dan *ruffled border*. *Sealing zone* berfungsi untuk mengunci area permukaan tulang membentuk lakuna resorpsi sedangkan *ruffled border* merupakan tempat terjadinya sekresi asam dan enzim. Mekanisme resorpsi yang terjadi dalam tulang meliputi demineralisasi, yaitu proses apatit yang terjadi akibat penurunan pH. Kemudian proses degradasi matriks organik berupa kolagen tipe I dan protein nonkolagen yang dilakukan oleh katepsin dan MMPs. Tahap terakhir yaitu transport transeluler (Bolamperti *et al.*, 2022).

2.1.4 Remodelling Tulang

Remodeling tulang merupakan siklus yang terjadi dalam tubuh manusia untuk mempertahankan keseimbangan, di mana jaringan tulang lama diresorpsi oleh osteoklas dan kemudian digantikan oleh jaringan tulang baru osteoblas atau yang dikenal dengan *bone formation*. *Remodeling* tulang merupakan proses peting untuk mempertahankan kekuatan struktur tulang, memperbaiki kerusakan mikro akibat beban mekanik, dan memastikan keseimbangan mineral dalam tubuh. Dalam

tingkat seluler *remodeling* tulang dikendalikan oleh unit multiseluler tulang yang terdiri dari osteoklas, osteoblas, dan osteosit. Ketiga sel tersebut saling berinteraksi melalui sinyal molekuler dan hormon sistemik. Salah satu regulator hormonal yang berperan dalam *remodeling* tulang adalah hormon estrogen, yang memodulasi aktivitas sel-sel tulang dan jalur signal intrinsik maupun imun sepanjang proses *turnover* atau proses resorpsi dan formasi tulang sehingga homeostasis jaringan tulang tetap terjaga (Khosla *et al.*, 2012).

Selain berperan dalam pembentukan matriks, osteoblas juga berfungsi sebagai regulator lokal pada proses *remodelling* tulang dengan cara berinteraksi dengan osteoklas dan osteosit (Bolamperti *et al.*, 2022). Perubahan jumlah atau fungsi osteoblas akibat penurunan proliferasi atau viabilitas dapat menyebabkan pengurangan kapasitas pembentukan tulang serta dapat menyebabkan ketidakseimbangan pada siklus *remodelling* tulang. Hal ini merupakan salah satu kondisi yang berkontribusi pada penyakit metabolik tulang seperti osteoporosis (Wang *et al.*, 2007).



Gambar 2.1.4 Siklus *Remodelling* tulang (Bolamperti *et al.*, 2022)

2.2 Mesenchymal Stem Cell

2.2.1 Definisi

Mesenchymal stem cell atau sel punca mesenkimal merupakan sel punca non-hematopoetik yang diketahui memiliki sifat yang dapat berdiferensiasi menjadi jaringan-jaringan osteoblastik, kondrogenik serta adipogenik (Santricca, 2010). Seiring perkembangan penelitian, MSC diketahui tidak hanya berasal dari sumsum tulang, tetapi juga dapat diisolasi dari jaringan adiposa, amnionic tissue, periosteum, dan jaringan fetal (Chamberlain *et al.*, 2007). Isolasi *mesenchymal stem cell* dari sumsum tulang dapat diambil dari tulang femur dan tibia (Rinendyaputri & Noviantari, 2015). Sumsum tulang juga diketahui sebagai sumber *mesenchymal stem cell* yang melimpah, sehingga banyak digunakan sebagai sumber isolasi dalam penelitian secara invitro.

Mesenchymal stem cell dibedakan menjadi *adult MSC* dan MSC prenatal. Hal ini dibedakan berdasarkan sumber isolasinya, *adult MSC* diisolasi dari sumsum tulang dan jaringan adiposa. Sedangkan MSC prenatal umumnya diisolasi dari jaringan-jaringan neonatal seperti tali pusat dan plasenta. Saat ini *Mesenchymal stem cell* sudah banyak digunakan sebagai model penelitian, diantaranya regenerasi tulang, terapi luka, penyakit degeneratif dan sebagai terapi penyakit autoimun karena sifatnya yang multipoten (Uccelli *et al.*, 2008).

2.2.2 Karakteristik

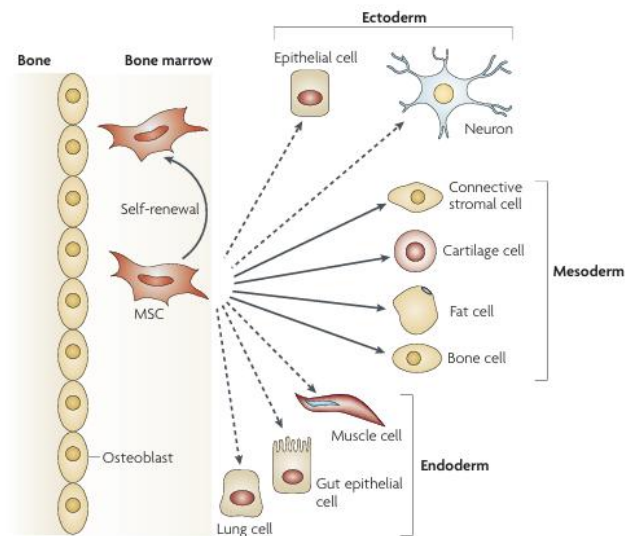
Mesenchymal stem cell (MSC) merupakan kelompok sel punca dewasa multipoten yang memiliki kemampuan proliferasi, self-renewal, serta diferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan mesenkimal seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit (Kolf *et al.*, 2007). MSC pertama kali diidentifikasi pada sumsum tulang

(*bone marrow*) sebagai populasi sel stromal non-hematopoietik (Dominici et al., 2006). Karakteristik utama MSC ditentukan oleh kriteria minimal yang ditetapkan oleh *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), yaitu memiliki sifat *plastic-adherent* pada kondisi kultur standar, mengekspresikan penanda permukaan spesifik, serta tidak mengekspresikan marker hematopoietik (Dominici et al., 2006). Sifat multipoten MSC menjadikan sel ini memiliki potensi besar dalam bidang rekayasa jaringan, terapi regeneratif, dan pengobatan berbagai penyakit degeneratif karena MSC mampu memperbaiki jaringan melalui mekanisme diferensiasi maupun sekresi faktor bioaktif (Liu et al., 2022). Selain kemampuan diferensiasi, MSC juga memiliki kapasitas proliferasi tinggi dengan tingkat imunogenisitas rendah sehingga relatif aman digunakan pada transplantasi alogenik. Kemampuan ini berkaitan dengan rendahnya ekspresi molekul MHC kelas II dan molekul kostimulator imun sehingga MSC mampu menghindari respons imun berlebihan dari tubuh resipien (Chamberlain et al., 2007).

Mesenchymal stem cell juga diketahui memiliki sifat imunomodulator melalui sekresi sitokin antiinflamasi, faktor pertumbuhan, dan mediator parakrin lainnya yang berperan dalam menghambat aktivasi sel T, sel B, sel NK, serta makrofag proinflamasi (Hass & Otte, 2012). Oleh karena itu, MSC tidak hanya berfungsi sebagai sel pengganti jaringan, tetapi juga sebagai regulator lingkungan mikro seluler yang mendukung proses regenerasi jaringan dan penyembuhan luka. Kemampuan migrasi atau *homing* MSC menuju area cedera jaringan turut menjadi karakteristik penting yang mendukung efektivitas terapi berbasis MSC (Chamberlain et al., 2007). Proses tersebut dipengaruhi oleh interaksi kemokin, reseptor permukaan, serta molekul adhesi yang memungkinkan MSC bermigrasi

menuju lokasi inflamasi atau kerusakan jaringan. Karakteristik biologis yang kompleks tersebut menyebabkan MSC menjadi salah satu jenis sel punca dewasa yang paling banyak diteliti dalam bidang biomedis modern.

Secara morfologi MSC memiliki bentuk menyerupai fibroblas dengan struktur memanjang (*spindle-shaped*) dan inti sel oval yang terletak di bagian sentral sitoplasma (Kolf *et al.*, 2007). Pada kultur primer, populasi MSC umumnya tampak heterogen, namun setelah beberapa kali subkultur akan terbentuk populasi sel yang lebih homogen dengan morfologi fusiform dan pola pertumbuhan menyerupai koloni fibroblastik (*colony forming unit-fibroblast/CFU-F*) (Chamberlain *et al.*, 2007). Morfologi ini menjadi salah satu indikator awal keberhasilan isolasi MSC dari jaringan asalnya. MSC memiliki ukuran sel relatif lebih besar dibandingkan sel hematopoietik dan memperlihatkan kemampuan adhesi kuat terhadap permukaan kultur. Dalam kultur jangka panjang, perubahan morfologi dapat terjadi akibat proses penuaan sel (*cellular senescence*) yang ditandai dengan ukuran sel membesar, bentuk lebih pipih, penurunan kemampuan proliferasi, serta penurunan potensi diferensiasi (Liu *et al.*, 2022). Karakteristik morfologi MSC ini juga dapat dipengaruhi oleh sumber isolasi jaringan, kondisi kultur, usia donor. MSC dari sumsum tulang umumnya memiliki kemampuan osteogenik lebih tinggi dibanding MSC jaringan adiposa, sedangkan MSC dari tali pusat cenderung memiliki kapasitas proliferasi lebih baik dan tingkat imunogenisitas lebih rendah (Liu *et al.*, 2022). Perbedaan ini menunjukkan bahwa sumber MSC dapat memengaruhi sifat biologis dan potensi terapinya.



Gambar 2.2.2 Sifat multipoten pada *mesenchymal stem cell* (MSC) (Ucelli *et al.*, 2008).

MSC diketahui bersifat multipoten dengan risiko tumorigenesis lebih rendah sehingga lebih aman digunakan dalam aplikasi klinis, berbeda halnya dengan *embryonic stem cell* (ESC) yang bersifat pluripoten. ESC mampu berdiferensiasi menjadi hampir seluruh jenis sel tubuh, tetapi penggunaannya sering menimbulkan kontroversi etik serta risiko pembentukan teratoma (Kolf *et al.*, 2007). Karakteristik sekretom MSC tersebut kini menjadi fokus utama penelitian karena efek terapeutik MSC diketahui sebagian besar dimediasi melalui mekanisme parakrin dibanding diferensiasi langsung menjadi sel target (Hass & Otte, 2012). Dengan kombinasi sifat multipoten, imunomodulator, kemampuan homing, proliferasi tinggi, serta keamanan biologis yang relatif baik, MSC menjadi kandidat utama dalam pengembangan terapi regeneratif untuk penyakit muskuloskeletal, neurodegeneratif, kardiovaskular, hingga gangguan autoimun.

2.2.3 *Mesenchymal Stem Cell* pada Sumsum Tulang

Mesenchymal stem cell (MSC) pertama kali diisolasi dari sumsum tulang oleh Friedenstein dan koleganya berdasarkan kemampuannya membentuk koloni

fibroblastik ketika dikultur secara *in vitro*. Sel ini termasuk kelompok sel stromal non-hematopoietik yang memiliki kemampuan adhesi terhadap permukaan plastik kultur serta mampu mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi berbagai jenis sel mesenkimal seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit (Dominici *et al.*, 2006). Di dalam sumsum tulang, MSC menempati niche khusus yang berasosiasi dengan pembuluh darah, trabekula tulang dan sel hematopoietik sehingga membentuk lingkungan mikro yang mendukung proses hematopoiesis serta regenerasi jaringan tulang (Kolf *et al.*, 2007). Keberadaan MSC dalam sumsum jaringan lemak lebih sedikit dibanding total populasi MSC pada sumsum tulang, yaitu diperkirakan hanya sekitar 0,001–0,01%, namun MSC memiliki kapasitas proliferasi tinggi sehingga dapat diperbanyak secara *in vitro* untuk kepentingan penelitian maupun terapi regeneratif (Pittenger *et al.*, 1999).

Mesenchymal stem cell yang diisolasi dari sumsum tulang diketahui memiliki kemampuan osteogenik lebih tinggi dibandingkan sumber MSC lainnya seperti jaringan adiposa atau tali pusat sehingga MSC dari sumsum tulang lebih banyak digunakan dalam penelitian regenerasi tulang dan rekayasa jaringan skeletal. Selain itu, MSC mampu mensekresikan berbagai faktor bioaktif seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor* (IGF), dan bone morphogenetic protein (BMP) yang berperan penting dalam proliferasi, angiogenesis, serta diferensiasi osteogenik (Hass & Otte, 2012). Oleh karena itu, MSC sumsum tulang tidak hanya berfungsi sebagai sumber sel progenitor pembentuk jaringan skeletal, tetapi juga sebagai regulator biologis yang mempertahankan keseimbangan mikroenvironment sumsum tulang dan mendukung proses regenerasi jaringan.

2.2.4 Peran *Mesenchymal Stem Cell* dalam Regenerasi Tulang

Mesenchymal stem cell memiliki peran sentral dalam proses regenerasi dan remodeling tulang karena MSC merupakan prekursor utama pembentukan osteoblas yang bertanggung jawab terhadap sintesis matriks tulang baru. Pada kondisi fisiologis maupun saat terjadi cedera tulang, MSC akan bermigrasi menuju area kerusakan melalui mekanisme *homing* yang dimediasi oleh interaksi kemokin, molekul adhesi, dan faktor pertumbuhan lokal (Chamberlain *et al.*, 2007). MSC yang sudah berada di lokasi cedera akan mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi osteoblas di bawah pengaruh berbagai faktor osteogenik seperti *bone morphogenetic protein* (BMP), *runt-related transcription factor 2* (Runx2), *alkaline phosphatase* (ALP), *osteocalcin*, serta signaling pathway Wnt/ β -catenin yang berperan penting dalam pembentukan jaringan tulang baru (Loi *et al.*, 2016). Osteoblas yang terbentuk dari diferensiasi *mesenchymal stem cell* akan mensekresikan komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen tipe I, osteopontin, dan osteocalcin yang menjadi dasar dari proses mineralisasi jaringan tulang. Selain berdiferensiasi langsung menjadi osteoblas, MSC juga mendukung regenerasi tulang melalui mekanisme parakrin dengan mensekresikan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan yang merangsang angiogenesis, proliferasi sel lokal, serta menghambat inflamasi berlebihan di area cedera (Hass & Otte, 2012). Faktor-faktor seperti VEGF, *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan TGF- β berperan dalam pembentukan vaskularisasi baru yang sangat penting untuk suplai oksigen dan nutrisi selama proses regenerasi tulang berlangsung. Selain itu aktivasi reseptor estrogen pada sel diketahui dapat

meningkatkan ekspresi gen yang berperan dalam pembentukan tulang (*Gruber et al.*, 2002).

Diferensiasi *mesenchymal stem cell* melalui jalur osteogenik akan meningkatkan pembentukan tulang, sedangkan gangguan terhadap fungsi MSC dapat menyebabkan penurunan massa tulang dan memicu terjadinya osteoporosis maupun keterlambatan penyembuhan fraktur (*Liu et al.*, 2022). Seiring perkembangan teknologi rekayasa jaringan, MSC menjadi fokus utama dalam terapi regeneratif tulang karena memiliki kemampuan proliferasi tinggi, imunogenisitas rendah, serta potensi diferensiasi osteogenik yang baik. MSC telah banyak diaplikasikan pada penelitian penyembuhan fraktur, defek tulang kritis, osteoarthritis, hingga osteoporosis melalui pendekatan transplantasi sel, biomaterial scaffold, maupun terapi berbasis sekretom dan eksosom MSC (*Loi et al.*, 2016). Penggunaan MSC dalam regenerasi tulang dinilai memiliki potensi yang cukup besar karena mampu mempercepat pembentukan jaringan tulang baru, meningkatkan vaskularisasi, serta memperbaiki kualitas penyembuhan jaringan skeletal secara keseluruhan. Oleh sebab itu, MSC dianggap sebagai salah satu komponen utama dalam pengembangan terapi berbasis sel untuk memperbaiki kerusakan tulang dan penyakit degeneratif skeletal.

2.3 Konfluenitas dan Viabilitas

2.3.1 Konfluenitas

Konfluenitas merupakan parameter yang digunakan untuk menggambarkan persentase luas permukaan kultur yang telah diisi oleh sel-sel yang tumbuh secara adhesif. Nilai konfluenitas dinyatakan dalam bentuk persentase, di mana 0% menunjukkan sel baru ditanam dan belum menyebar pada permukaan kultur,

sedangkan 100% menunjukkan seluruh permukaan kultur telah tertutupi oleh lapisan sel monolayer. Pengamatan konfluenitas sel sangat penting dalam kultur sel karena mencerminkan tingkat pertumbuhan, kepadatan sel, serta kondisi fisiologis sel selama pemeliharaan *in vitro* (Busschots *et al.*, 2015). Selain itu, tingkat konfluenitas sering digunakan sebagai indikator untuk menentukan waktu yang tepat dalam melakukan subkultur (*passaging*), pemberian perlakuan, maupun pengambilan sampel untuk analisis lanjutan. Pada umumnya, sel adhesif disubkultur ketika mencapai sekitar 70–80% konfluenitas untuk mempertahankan sel dalam fase pertumbuhan logaritmik dan mencegah terjadinya *contact inhibition* yang dapat menghambat proliferasi sel. Konfluenitas yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kompetisi terhadap ruang dan nutrisi, perubahan ekspresi gen, serta penurunan aktivitas proliferasi sel, sehingga berpotensi memengaruhi hasil penelitian (Trajkovic *et al.*, 2019). Oleh karena itu, pemantauan konfluenitas secara berkala menjadi salah satu aspek penting dalam menjaga konsistensi dan validitas eksperimen kultur sel.

2.3.2 Viabilitas

Viabilitas sel adalah kondisi sel dalam keadaan hidup dan mempertahankan fungsi biologis dasar dalam media tanam (Anwar & Hadi, 2024). Dalam kultur sel, viabilitas sering diukur menggunakan metode dye exclusion atau pengecualian warna untuk membedakan antara sel hidup (Kamiloglu *et al.*, 2020). Interpretasi dari pengamatan menggunakan metode pewarnaan adalah, jika sel hidup maka sel tidak akan terwarna karena sel masih memiliki membran yang utuh sehingga pewarna trypan blue tidak dapat masuk dan mewarnai sel. Jika sel mati, maka sel akan terwarna karena membran selnya sudah rusak sehingga pewarna trypan blue

dapat masuk kedalam membrane sel dan memberikan warna pada sel (Riss *et al.*, 2004).

2.3.3 Hubungan Konfluenitas dan Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell* dengan Regenerasi Tulang

Secara metodologis dan biologis, konfluenitas dan viabilitas merupakan dua konsep yang berbeda. Konfluenitas merupakan parameter untuk menggambarkan persentase luas permukaan kultur yang telah diisi oleh sel-sel yang tumbuh secara adhesive disebabkan terjadinya proliferasi pada sel. sedangkan viabilitas menunjukkan persentase sel hidup dari keseluruhan sel yang ada. Dalam sebuah populasi sel dapat menunjukkan viabilitas tinggi, namun tingkat proliferasi rendah, biasanya keadaan ini sel sedang dalam fase G0 atau dalam fase diferensiasi sehingga pembelahan menurun begitu juga sebaliknya (Freshney, 2010). Intervensi tertentu seperti pemberian ekstrak dapat menurunkan viabilitas tanpa mempengaruhi indeks proliferasi sel yang tersisa. Kombinasi kedua jenis pengukuran memberikan gambaran lebih komprehensif, dimana viabilitas menilai survival akut, sedangkan proliferasi menilai kemampuan pertumbuhan jangka pendek hingga menengah (Riss *et al.*, 2004).

Konfluenitas dan viabilitas sangatlah penting dalam kultur sel tulang karena keseimbangan antara proliferasi yang meningkatkan konfluenitas, diferensiasi dan regenerasi menentukan homeostasis dan *remodeling* jaringan tulang. Osteoblas sebagai sel pembentuk tulang akan melewati fase proliferasi awal sebelum memasuki jalur diferensiasi yang ditandai oleh ekspresi gen matriks ekstraseluler dan mineralisasi. Oleh karena itu, model kultur yang menilai efek suatu obat atau ekstrak terhadap osteoblas biasanya mengukur viabilitas untuk memastikan bahan tidak sitotoksik dan pengamatan proliferasi untuk menilai efek pada peningkatan

populasi sel. Dalam konteks penyakit tulang atau rekayasa jaringan, stimulasi proliferasi osteoblas yang diikuti oleh diferensiasi yang tepat merupakan tujuan terapeutik, namun proliferasi yang berlebihan tanpa diferensiasi dapat menghasilkan populasi sel yang tidak fungsional (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

2.4 Kultur *Mesenchymal Stem Cell* secara In Vitro

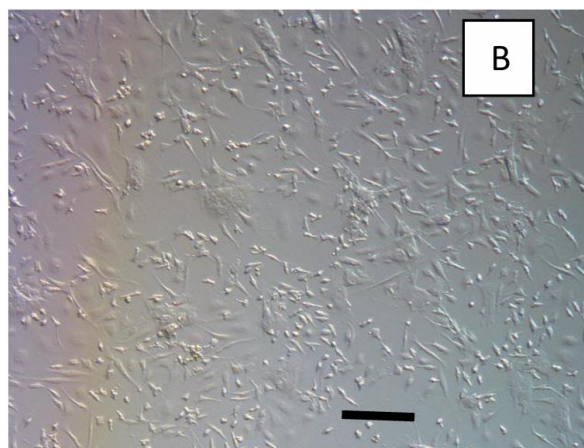
2.4.1 Kultur Sel Primer

Kultur sel *in vitro* merupakan suatu teknik biologis untuk menumbuhkan sel tertentu dalam lingkungan yang terkendali. Umumnya metode kultur ini dilakukan untuk mempelajari respon toksisitas, interaksi seluler serta mempelajari fisiologi suatu sel. Kultur sel ini dapat menjadi metode sebagai model dasar dalam penelitian terkait biologi sel, toksikologi, farmakologi dan rekayasa jaringan (Segeritz & Vallier, 2017). Dalam kultur sel berdasarkan jenis selnya terdapat dua klasifikasi, yaitu sel primer dan sel line. Kultur sel primer merupakan sel yang diisolasi langsung dari organ sel hewan sehingga sel tersebut memiliki fenotip yang mendekati sel dalam keadaan *in vivo*. Sedangkan sel line merupakan sel primer yang terus membelah dan sudah mengalami berkali-kali *passage* (Harper, 2024).

Kultur sel primer merupakan teknik *in vitro* dengan tujuan studi tertentu termasuk studi mengenai proliferasi, viabilitas, efek hormon, pengujian biomaterial, sitotoksitas obat, serta mekanisme molekuler remodeling tulang. Teknik kultur sel pada jaringan tulang memungkinkan peneliti mempelajari sel dalam lingkungan yang terkontrol, memisahkan dampak stimulasi tertentu serta memahami proses biologis dasar yang terjadi pada osteoblas, osteoklas, dan osteosit tanpa kompleksitas sistemik organisme secara utuh. Kultur sel mencakup isolasi, propagasi dan manipulasi atau pemberian perlakuan (Riss *et al.*, 2004)

2.4.2 Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari Sumsum Tulang

Kajian-kajian terkait potensi *mesenchymal stem cell* ini umumnya dilakukan dalam skala sel (*invitro*). Hal ini dilakukan untuk mengetahui potensi dari sel tersebut secara langsung dan spesifik terhadap sel tersebut sebagai bentuk kajian awal yang nantinya juga bertujuan sebagai kandidat terapi untuk penyembuhan penyakit. Berdasarkan berbagai potensi yang dimilikinya, *mesenchymal stem cell* saat ini masih terus menjadi salah satu fokus penelitian terutama dalam bidang biologi sel, rekayasa jaringan serta pengobatan regeneratif (Koh *et al.*, 2020).



Gambar 2.4.2 Kultur *Mesenchymal stem cell* yang diisolasi dari sumsum tulang mencit (Rinendyaputri & Noviantari, 2015).

Isolasi *mesenchymal stem cell* (MSC) dari sumsum tulang merupakan tahap penting dalam penelitian kultur sel dan terapi regeneratif karena kualitas proses isolasi sangat memengaruhi terhadap kemampuan tingkat viabilitas, proliferasi serta potensi diferensiasi MSC. *Mesenchymal stem cell* yang diisolasi dari sumsum tulang umumnya diisolasi dari sumsum tulang femur atau tibia. Hal ini dapat dilakukan menggunakan teknik aspirasi atau flushing menggunakan media kultur steril atau *phosphate-buffered saline* (PBS) (Pittenger *et al.*, 1999). Selanjutnya suspensi sumsum tulang difiltrasi untuk menghilangkan fragmen jaringan dan debris sebelum dilakukan pemisahan sel mononuklear menggunakan metode

sentrifugasi gradien densitas seperti *Ficoll-Hypaque* atau *Lymphoprep*. Teknik ini memanfaatkan perbedaan densitas sel sehingga populasi mononuklear yang mengandung MSC dapat dipisahkan dari eritrosit dan granulosit (Soleimani & Nadri, 2009). Setelah sentrifugasi, lapisan sel mononuklear yang terbentuk pada antarmuka medium diambil secara hati-hati menggunakan pipet steril lalu dicuci kembali dengan PBS atau media kultur untuk menghilangkan sisa medium gradien densitas. Sel kemudian ditanam pada flask kultur dengan media lengkap yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. MSC akan melekat pada permukaan plastik kultur dalam waktu 24–72 jam, sedangkan sel hematopoietik non-adheren akan tetap tersuspensi dan dibuang saat penggantian media (Dominici *et al.*, 2006).

Teknik *handling* selama isolasi dan kultur MSC harus dilakukan secara aseptik di dalam laminar air flow untuk mencegah kontaminasi mikroba yang dapat memengaruhi pertumbuhan sel. Selain itu, proses *pipetting* harus dilakukan secara perlahan untuk menghindari stress yang dapat merusak membran sel dan dapat menurunkan viabilitas kultur. Penggunaan alat steril, media segar, suhu stabil, serta waktu pemrosesan yang cepat juga menjadi faktor penting dalam mempertahankan kualitas MSC hasil isolasi. Selama kultur berlangsung, media biasanya diganti setiap 2–3 hari dan subkultur dilakukan ketika konfluensi mencapai sekitar 70–80% untuk mempertahankan kemampuan proliferasi dan diferensiasi MSC (Freshney, 2010). Oleh karena itu, keberhasilan isolasi MSC dari sumsum tulang sangat dipengaruhi oleh teknik pemisahan sel, kondisi sentrifugasi, serta ketepatan *handling* selama proses kultur sehingga diperlukan prosedur kerja yang steril, hati-

hati, dan terstandarisasi guna memperoleh kultur MSC dengan viabilitas dan karakteristik biologis yang optimal.

2.4.3 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Mesenchymal Stem Cell*

Keberhasilan saat proses isolasi ini merupakan tahapan yang sangat penting dalam suatu penelitian agar data yang dihasilkan akurat. Faktor keberhasilan kultur sel pada *mesenchymal stem cell* tentu saja dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti metode isolasi, media serta kondisi lingkungan dalam laboratorium (Rinendyaputri & Noviantari, 2015). Untuk mengetahui sel yang ditanam dapat tumbuh dengan baik, kultur *mesenchymal stem cell* dapat diamati secara mikroskopis. Sel yang tumbuh dengan baik ditandai dengan persebaran sel yang merata serta tingkat viabilitas sel yang tinggi. Sel yang memiliki tingkat konfluenitas antara 70-80% dinilai mampu beradaptasi dengan lingkungan kultur dan siap untuk diberikan perlakuan pada penelitian (Liu & Quan, 2015).

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil isolasi diantaranya adalah kontaminasi mikroorganisme. Kontaminasi mikroorganisme merupakan penyebab utama kegagalan kultur sel dan termasuk dalam faktor yang sering terjadi. Kontaminasi dapat berasal dari peneliti, udara, meja kerja, media ataupun alat yang tidak steril. Oleh karena itu, seluruh proses isolasi dan kultur harus dilakukan secara aseptik, menggunakan alat dan bahan steril, serta meminimalisir paparan kultur terhadap lingkungan luar. Selain itu lama waktu isolasi dan usia donor juga dapat mempengaruhi kemampuan sel bertahan hidup selama kultur. Sampel harus diproses secepat mungkin sesaat setelah diambil dari tubuh hewan coba untuk mencegah kematian sel dan degradasi jaringan. Sel primer umumnya memiliki keterbatasan kemampuan proliferasi. MSC dari donor usia tua atau MSC yang memiliki passage

tinggi umunya menunjukkan penurunan kemampuan proliferasi dan diferensiasi akibat proses penuaan sel (Freshney, 2010).

Faktor lain yang tak kalah penting dalam mempengaruhi tingkat kemampuan sel bertahan hidup dalam kultur adalah lingkungan kultur itu sendiri. Diantaranya komposisi media, suhu inkubasi, permukaan kultur serta kepadatan sel dan frekuensi penggantian media kultur. Freshney (2010) menyatakan bahwa kandungan nutrisi media, pH, osmolaritas, konsentrasi glukosa, serum, faktor pertumbuhan, dan antibiotic sangatlah penting, begitu juga dengan suhu dan kadar CO₂. Umumnya sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C, hal ini penting untuk menjaga metabolisme sel. Jumlah sel awal yang terlalu rendah dapat menghambat pembentukan koloni MSC, sedangkan kepadatan terlalu tinggi menyebabkan kompetisi nutrisi dan penurunan proliferasi. Media sebaiknya diganti dalam kurun waktu 2-3 hari untuk membuang komponen-komponen yang tidak diinginkan dan menyediakan nutrisi baru bagi sel. Selain itu, subkultur harus dilakukan sebelum kultur mencapai overconfluence karena kondisi terlalu padat dapat memicu *cellular senescence* dan perubahan fenotip pada *mesenchymal stem cell*.

2.4.4 Media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) merupakan salah satu media kultur sel yang paling banyak digunakan di laboratorium biologi sel dan bioteknologi di seluruh. DMEM merupakan modifikasi dari *Eagle's Minimal Essential Medium* (MEM) yang awalnya dikembangkan oleh Harry Eagle pada akhir tahun 1950an untuk mendukung pertumbuhan sel mamalia in vitro. Dalam modifikasi yang dilakukan oleh Renato Dulbecco dan koleganya, media ini

dirancang untuk memiliki konsentrasi asam amino dan vitamin yang lebih tinggi sekitar hingga empat kali lipat dibandingkan dengan *Minimal Essential Medium* serta variasi glukosa yang dapat diatur sesuai kebutuhan metabolik sel, sehingga DMEM dinilai sebagai media yang lebih kaya nutrisi, ideal untuk mendukung proliferasi dan viabilitas berbagai sel mamalia seperti fibroblas, sel epitel, neuron, sel kanker, serta sel punca dan jaringan lain selama kultur in vitro (Syahidah & Hadisaputri, 2016).

DMEM merupakan media basal yang menyediakan komponen nutrisi dasar yang diperlukan sel untuk bertahan hidup dan berkembang. Komposisi dasar DMEM mencakup asam amino esensial dan non-esensial, vitamin, garam anorganik, glukosa, serta buffer natrium bikarbonat yang berfungsi mempertahankan pH fisiologis dalam kondisi inkubasi CO₂ 5%. Karena media ini tidak mengandung protein atau faktor pertumbuhan yang dilepaskan dari organisme, DMEM biasanya dilengkapi dengan serum *Fetal Bovine Serum* (FBS) atau *Newborn Calf Serum* (NBCS) dengan konsentrasi yang bervariasi antara 5-15% untuk menyediakan berbagai faktor pertumbuhan, lipoprotein, dan protein yang mendukung proliferasi sel (Syahidah & Hadisaputri, 2016)

2.5 Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

2.5.1 Tinjauan Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dalam Perspektif Al-Qur'an

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan tanaman obat ciptaan Allah SWT yang telah lama dikenal dalam pengobatan tradisional di berbagai negara tropis, termasuk Indonesia. Binahong merupakan bagian dari penciptaan aneka ragam tumbuhan dan tanaman obat yang disebutkan dalam Al-Qur'an, antara lain dalam Al-Qur'an Surat Al-An'am ayat 99 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ
فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ
طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا
وَّغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ^{قُلْ} أَنْظِرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ
يُؤْمِنُونَ

Artinya: “Dialah yang menurunkan air dari langit lalu dengannya Kami menumbuhkan segala macam tumbuhan. Maka, darinya Kami mengeluarkan tanaman yang menghijau. Darinya Kami mengeluarkan butir yang bertumpuk (banyak). Dari mayang kurma (mengurai) tangkai-tangkai yang menjuntai. (Kami menumbuhkan) kebun-kebun anggur. (Kami menumbuhkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah dan menjadi masak. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang beriman”. (Q.S. Al-An’am [6]: 99).

Tafsir Jalalain Imam Jalaluddin Al-Mahalli dan Imam Jalaluddin As-Suyuti menafsirkan bahwa ayat tersebut mengandung makna Allah SWT telah menghidupkan kembali yang telah mati dengan menurunkan hujan sebagai perantara, dari air hujan tersebut tumbuhlah tanaman yang menghijau, dan dari tumbuhan tersebut terbentuklah bulir-bulir gandum dan sejenisnya. Hal ini merupakan satu diantara cara Allah SWT menunjukkan kekuasaanNya dan memerintahkan kaum yang beriman kepadaNya untuk memanfaatkan sesuatu dari yang telah Allah tumbuhkan di muka bumi ini.

Satu diantara banyaknya tumbuhan yang Allah tumbuhkan adalah binahong atau yang dikenal dengan nama ilmiah *Anredera cordifolia*. Tanaman binahong merupakan tanaman merambat dari famili Basellaceae yang diketahui berasal dari Amerika Selatan, Brasil bagian selatan dan Argentina. Kemudian menyebar ke

beberapa negara tropis dan subtropis termasuk negara-negara di Asia sebagai tanaman obat dan tanaman hias (Astuti *et al.*, 2011). Binahong mulai dikenal luas di Tiongkok, Korea, dan Vietnam sebagai tanaman tradisional yang banyak dimanfaatkan untuk pengobatan, sehingga tanaman ini sering disebut sebagai “*Madeira vine*” atau “*Dheng San Chi*” dalam pengobatan herbal Tiongkok (Alba *et al.*, 2020). Di Indonesia, binahong mulai banyak dibudidayakan karena diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologis yang bermanfaat bagi kesehatan. Secara tradisional, hampir seluruh bagian tanaman binahong seperti daun, batang, akar, dan umbi digunakan sebagai obat herbal untuk mempercepat penyembuhan luka, mengatasi peradangan, meningkatkan daya tahan tubuh, mengobati gangguan saluran pencernaan, serta membantu terapi penyakit degeneratif (Latuhihin *et al.*, 2020). Manoi (2009) dalam Latuhihin *et al.* (2020) juga menyatakan bahwa dalam daun binahong terdapat senyawa aktif alkaloid, saponin dan flavonoid.

Di samping penciptaan tumbuhan berkhasiat obat seperti Binahong, Allah SWT juga menciptakan senyawa aktif atau berkhasiat atau yang dikenal dengan metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan, dan memiliki potensi menyembuhkan suatu kondisi tubuh yang dikenal dengan sakit. Potensi menyembuhkan atau berkhasiat dari kandungan metabolit sekunder tersebut, dalam tinjauan Al-Qur'an adalah terjadi karena adanya kuasa Allah SWT yang diberikan kepada senyawa aktif tersebut. Isyarat potensi menyembuhkan dari senyawa yang terkandung pada tumbuhan, terdapat dalam firman Allah SWT pada Al-Qur'an Surat An-Nahl ayat 69 sebagai berikut:

ثُمَّ كُلِّي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًّا يَخْرِجُ مِنْ بُطُونِهَا
 شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ
 يَتَفَكَّرُونَ

Artinya: “Kemudian, makanlah (wahai lebah) dari segala (macam) buah-buahan lalu tempuhlah jalan-jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu).” Dari perutnya itu keluar minuman (madu) yang beraneka warnanya. Di dalamnya terdapat obat bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir”. (Q.S. An-Nahl [16]: 69)

Menurut Tafsir Tahlili Kemenag ayat tersebut Allah memerintahkan hamba Nya untuk memikirkan Allah telah memberikan kemahiran kepada para lebah untuk mengumpulkan makanan dari berbagai macam bunga-bunga dan mengubahnya menjadi madu yang tahan lama dan bergizi, diantara manfaat madu ialah untuk ketahanan tubuh dan mungkin pula sebagai obat. Dalam Tafsir Thabari dinyatakan bahwa ayat tersebut menjelaskan bahwa di dalam minuman yang dikeluarkan Allah dari perut tebah ini, yaitu minuman yang beranekaragam dan merupakan obat yang menyembuhkan bagi manusia, benar-benar terdapat petunjuk dan argumen yang jelas tentang Dzat yang menundukkan lebah ini dan memberinya petunjuk untuk memakan buah-buahan tertentu, membuat sarang pada gunung, pohon, dan atau rumah. Kemudian Allah mengeluarkan dari perutnya obat bagi manusia. Jika dilihat dari alur terbentuknya madu dalam secara alami dalam tafsir tersebut, hal ini secara umum serupa dengan proses pembentukan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan termasuk flavonoid.

Biosintesis senyawa flavonoid terjadi pada titik pertemuan antara jalur shikimat dan jalur asetat. Dalam proses ini, jalur shikimat menyediakan bahan yang diperlukan untuk membentuk kumarin-CoA, sedangkan jalur asetat menyediakan

gugus malonil-CoA untuk reaksi perpanjangan C2 yang dikatalisis oleh *chalcone synthase* (Shen *et al.*, 2022; Tohge *et al.*, 2017). Pada jalur ini asetil CoA akan menghasilkan malonil CoA melalui enzim asetil CoA karboksilase yang mengkatalisis reaksi karboksilasi asetil CoA. Malonil CoA inilah yang berperan dalam pembentukan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid (Kim *et al.*, 2021).

Abdullah bin Muhammad dalam tafsir Ibnu Katsir menafsirkan bahwa dalam ayat tersebut terdapat penjelasan bahwa madu yang dihasilkan ada yang berwarna putih, kuning, merah, dan warna-warna lainnya yang indah sesuai dengan lingkungan dan makanannya, di dalam madu itu terdapat obat penyembuh bagi manusia. Hal ini selaras dengan pernyataan Yang *et al.* (2018) bahwa biosintesis metabolit sekunder pada tanaman dipengaruhi oleh aktivitas enzimatis di dalam jaringan tumbuhan dan lingkungan tumbuhan tersebut. Jika suatu tumbuhan terkena paparan sinar UV berlebihan, infeksi mikroorganisme, kekurangan nutrisi, luka mekanik, suhu ekstrem, atau serangan herbivora, maka tumbuhan akan mengekspresikan gen tertentu yang mengatur sintesis metabolit sekunder. Saat tumbuhan mengalami stres oksidatif, tumbuhan akan mengaktifkan jalur fenilpropanoid dan akan menghasilkan senyawa flavonoid dan senyawa fenolik lain yang berperan sebagai antioksidan alami untuk melindungi sel dari kerusakan radikal bebas. Oleh karena itu, kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan dapat mengalami peningkatan ataupun penurunan sebagai bentuk adaptasi tumbuhan terhadap kondisi lingkungan tertentu (Francini *et al.*, 2019).

2.5.2 Klasifikasi

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan tanaman obat yang telah lama dikenal dalam pengobatan tradisional di berbagai negara tropis, termasuk Indonesia. Daun binahong secara empiris digunakan untuk mengobati luka, meningkatkan daya tahan tubuh, serta membantu penyembuhan berbagai penyakit degenerative. Pusat keanekaragaman *A. cordifolia* terdapat di Amerika Selatan, namun kini telah dibudidayakan secara luas di Indonesia sebagai tanaman obat serbaguna yang bernilai ekonomi tinggi (Perkasa, 2023). Selain itu, binahong mengandung berbagai senyawa bioaktif yang mendukung aktivitas farmakologinya, sehingga banyak dimanfaatkan dalam penelitian biomedis modern (Purwaningsih dkk., 2025).



Gambar 2.5.2 Tanaman binahong (*Anredera cordifolia*) a) habitus tanama *Anredera cordifolia* (Hanifah & Anjani, 2022), b) morfologi daun *Anredera cordifolia*, c) batang *Anredera cordifolia*, d) umbi tanaman *Anredera cordifolia* (Purwaningsih et al., 2025).

Binahong merupakan tanaman merambat yang bersifat perennial dan dapat tumbuh hingga panjang lebih dari 5 meter. Batangnya bersifat lunak, silindris, serta berwarna hijau atau kemerahan pada bagian muda (Purwaningsih et al., 2025). Daun binahong berbentuk tunggal, bertangkai pendek, dan tersusun berseling pada

batang. Bentuk helaian daunnya menyerupai jantung (*cordata*) dengan permukaan halus dan warna hijau mengilap (Perkasa, 2023). Bunga binahong berwarna putih kekuningan, tersusun dalam bentuk malai (tandan) di ketiak daun, serta memiliki aroma khas. Tanaman ini menghasilkan umbi udara di ruas batang yang berfungsi sebagai alat perbanyakan vegetatif dan dapat tumbuh baik pada kondisi lingkungan tropis dengan intensitas cahaya sedang (Putri dkk., 2020). Selain itu, akar binahong bersifat tunggang dengan rimpang berdaging lunak yang mampu menyimpan cadangan air dan nutrisi, menjadikannya tahan terhadap kondisi kering (Purwaningsih dkk., 2025).

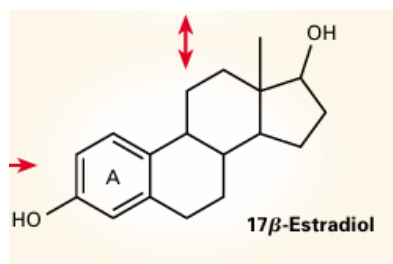
Secara taksonomi, tanaman binahong (*Anredera cordifolia*) dikategorikan sebagai berikut (Perkasa, 2023):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Caryophyllales
Family	: Basellaceae
Genus	: Anredera
Spesies	: <i>Anredera cordifolia</i> (Tenore) Steenis

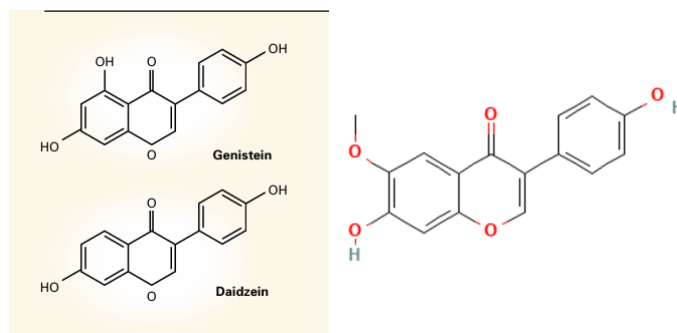
2.5.3 Kandungan Fitokimia

Daun binahong (*Anredera cordifolia*) diketahui mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa bioaktif yang dihasilkan tumbuhan sebagai mekanisme pertahanan terhadap stres lingkungan, patogen, maupun kerusakan oksidatif, namun senyawa tersebut juga memiliki berbagai aktivitas biologis yang bermanfaat dalam bidang kesehatan dan regenerasi

jaringan. Beberapa kelompok senyawa yang telah teridentifikasi pada *Anredera cordifolis* antara lain flavonoid, alkaloid dan saponin. Kandungan senyawa-senyawa tersebut memberikan dasar ilmiah terhadap berbagai aktivitas farmakologis binahong, seperti antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, serta aktivitas penyembuhan luka dan regenerasi jaringan (Panicker & Hamdule, 2021; Perkasa, 2023). Flavonoid merupakan senyawa fenolik utama yang ditemukan dalam daun binahong. Senyawa flavonoid khususnya senyawa turunannya berupa isoflavon diketahui memiliki potensi dapat mempercepat proses pembelahan sel karena sifat fitoestrogennya.



Gambar 2.5.3.1 Struktur kimia 17β-estradiol (Gruber *et al.*, 2002)



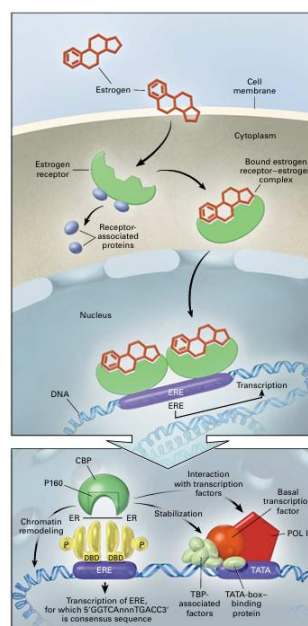
Gambar 2.5.3.2 Struktur kimia senyawa isoflavon pada ekstrak daun binahong Genistein, Daidzein (Gruber *et al.*, 2002) Glycitein (Domínguez-López *et al.*, 2020).

Fitoestrogen merupakan senyawa yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki kemampuan dapat berikatan dengan reseptor hormon estrogen dalam sel sehingga dapat mengaktifkan efek estrogen dalam menekan aktivitas osteoklastik (Sihombing *et al.*, 2013). Senyawa isoflavon pada tumbuhan sebagai senyawa

turunan dari flavonoid secara khusus yang diketahui memiliki sifat fitoestrogen diantaranya adalah genistein, daidzein, glycitein dan biochanin (Dominguez-Lopes *et al.*, 2020). Menurut Safitri *et al.* (2025) ekstrak daun binahong memiliki kandungan senyawa glycitein yang merupakan jenis senyawa isoflavon. Senyawa fitoestrogen diketahui memiliki jumlah dan posisi gugus hidroksil yang mirip dengan 17β -estradiol sehingga memiliki afinitas yang cukup kuat terhadap reseptor estrogen dalam sel (Gruber *et al.*, 2002).

2.5.4 Potensi Binahong terhadap Proliferasi dan Viabilitas Sel

Senyawa metabolit sekunder isofalvon pada tanaman diketahui memiliki sifat fitoestrogen yang juga ditemukan pada tanaman binahong. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun binahong memiliki potensi dalam meningkatkan proliferasi dan viabilitas sel berdasarkan mekanisme fitoestrogen yang dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen pada sel.



Gambar 2.5.4 Mekanisme hormon estrogen dalam sel (Sihombing *et al.*, 2013)

Mekanisme hormon estrogen diawali ketika molekul hormon estrogen masuk kedalam sitoplasma sel kemudian akan berikatan dengan reseptor estrogen

(ER) membentuk kompleks estrogen-ER, kemudian kompleks estrogen-ER akan bertranslokasi masuk ke dalam nukleus dan berikatan dengan segmen DNA pada sel yang disebut dengan Estrogen Response Element (5' GGTCAnnnTGACC-3') membentuk kompleks ER-ERE kemudian memulai proses transkripsi. Transkripsi dikatalisis oleh RNA polimerase II (Pol II) dan memerlukan perakitan berbagai protein, termasuk protein pengikat TATA-box (TBP) serta faktor-faktor terkait yang membentuk faktor transkripsi umum TATA-box binding protein-associated factors (TAFs). Aktivitas transkripsi yang dimediasi oleh estrogen juga memerlukan berbagai protein lain, seperti koaktivator reseptor steroid dan protein pengikat elemen respons AMP siklik. Kompleks ini berikatan dengan elemen respons estrogen (ERE) melalui domain pengikat DNA (DBD) pada reseptor dan menstimulasi transkripsi. Mekanisme yang diusulkan meliputi stimulasi dan stabilisasi kompleks pra-inisiasi, pemodelan ulang kromatin (*chromatin remodeling*), serta interaksi dengan faktor-faktor transkripsi lainnya seperti TBP, TATA-binding protein serta RNA polimerase II untuk membuka struktur kromatin sehingga proses transkripsi menjadi lebih mudah. Transkripsi akan menghasilkan mRNA yang kemudian diterjemahkan menjadi protein-protein serta menurunkan ekspresi RANKL sehingga pembentukan osteoklas menurun dan homeostasis tulang dapat tetap terjaga (Gruber *et al.*, 2002).

2.6 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

H₀: Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) tidak berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro

H₁: Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan secara in vitro dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut, dimodifikasi dari (Djuwita *et al.*, 2012):

1. KP₀ (kontrol normal)

Kelompok kontrol negatif berisi kultur sel tulang dan DMEM. Kelompok ini mempresentasikan kondisi normal *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*).

2. P₁ (Perlakuan 1)

Kelompok perlakuan 1 adalah kultur *mesenchymal stem cell* dan DMEM dengan penambahan ekstrak daun *Anredera cordifolia* sebanyak 0,4mg/mL.

3. P₂ (Perlakuan 2)

Kelompok perlakuan 2 adalah kultur *mesenchymal stem cell* dan DMEM dengan penambahan ekstrak daun *Anredera cordifolia* sebanyak 0,6mg/mL.

4. P₃ (Perlakuan 3)

Kelompok perlakuan 3 adalah kultur *mesenchymal stem cell* dan DMEM dengan penambahan ekstrak daun *Anredera cordifolia* sebanyak 0,8mg/mL.

5. P₄ (Perlakuan 4)

Kelompok perlakuan 4 adalah kultur *mesenchymal stem cell* dan DMEM dengan penambahan ekstrak daun *Anredera cordifolia* sebanyak 1mg/mL.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian pengaruh ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap proliferasi dan viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) secara in vitro meliputi:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah konfluenitas dan viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*).
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kultur *mesenchymal stem cell* menggunakan media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dengan 10% FBS serta 1% antibiotik (*penicilin-streptomisin*) dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2025 sampai bulan Mei 2026 di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan sebagai Laboratorium utama, dan Laboratorium Genetika Molekuler, Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi neraca analitik, *rotary evaporator*, LAF (*laminar air flow*), inkubator CO₂ 5%, oven, autoklaf, mikroskop inverted, *tissue culture dish* 35 mm-SPL, mortal, pistil, sentrifuge, botol schott, erlenmeyer, beaker glass 50 mL, alat bedah, mikropipet 20-200 µl, mikropipet 100-1000 µl.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*), ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*), DMEM, aquades, NaCl fisiologis (0,9%), etil asetat proanalisis, trypsin, spirtus, penicillin, streptomycin, tissue, spiritus, NaHCO₃, Hepes, *deionized water* (DI), (*Fetal bovine serum*) FBS, (*Prhospat buffer saline*) PBS, tipol, wipol, petri dish, etil asetat, alumunium foil, TC dish, blue tip, yellow tip, millipore 0,20 µm, bunsen, korek api, masker, hand glove, kantong plastik tahan panas, kertas label dan tissue dan alkohol teknis 70%.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Ruang

Preparasi ruangan dilakukan dengan tujuan untuk menciptakan ruangan yang steril dalam laboratorium kultur jaringan hewan sebagai laboratorium utama penelitian. Preparasi ruangan diawali dengan proses sterilisasi ruangan. Proses sterilisasi dilakukan dengan cara sterilisasi kimia menggunakan alkohol teknis 70%. Kemudian lantai dibersihkan menggunakan wipol sampai benar-benar bersih, lalu dilakukan proses sterilisasi menggunakan sinar UV selama 24 jam. Setelah dilakukan sterilisasi, maka selanjutnya dilakukan uji sterilitas ruang menggunakan media *Natrium Agar* (NA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada setiap sudut ruangan dan meja kerja, kemudian diinkubasi selama 24 jam (Festing & Altman, 2002).

3.5.2 Preparasi Alat dan Bahan

3.5.2.1 Sterilisasi alat

Proses preparasi alat dan bahan dilakukan dengan beberapa tahapan. Setiap alat-alat yang akan digunakan antara lain alat dissecting seperti pisau, pinset dan alat-alat gelas dan logam direndam pada tipol selama 1x24 jam. Setelah 1x24 jam alat tersebut digosok dan dibilas sebanyak 21 kali pada air mengalir, dan terakhir disarankan menggunakan aquades supaya hasilnya maksimal. Kemudian alat-alat dikeringkan pada oven suhu 40°C dan dibungkus menggunakan aluminium foil. Selanjutnya dilanjutkan dengan sterilisasi kering dengan oven pada suhu 125°C selama 3 jam untuk kategori peralatan gelas dan logam. Sterilisasi basah pada autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit untuk kategori peralatan yang sifatnya plastik.

3.5.2.2 Pembuatan Ekstrak

Simplisia yang digunakan adalah serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) yang didapat dari laboratorium Materia Medica Batu. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat proanalisis selama 48 jam dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:10 kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring (Fitriyani *et al.*, 2024). Residu dari hasil maserasi pertama kemudian dimaserasi kembali selama 24 jam dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:5 kemudian dilakukan proses penyaringan menggunakan kertas saring, tujuan dilakukannya maserasi kembali adalah untuk mengoptimalkan ekstraksi senyawa. Hasil ekstrak dengan metode maserasi kemudian di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan dipekatkan menggunakan oven hingga dihasilkan ekstrak kental.

3.5.2.3 Pembuatan Ekstrak Stock Menggunakan Dimethylsulfoxide (DMSO)

Pembuatan ekstrak stock daun binahong (*Anredera cordifolia*) menggunakan dimethylsulfoxide (DMSO) 0,1% dibuat dalam beberapa konsentrasi berbeda, yaitu 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL dan 1 mg/mL masing-masing sebanyak 5 mL. Ekstrak daun binahong yang sudah dilarutkan menggunakan DMSO kemudian disterilkan menggunakan *millipore* dan disimpan dalam botol *schoot*.

3.5.3 Pembuatan Media Stock DMEM

Ditimbang 1.35g DMEM, 0,37g NaHCO₃, 0,006g penicillin, 0,01 gr streptomycin, dan 0,238g Hepes. Dilarutkan bahan-bahan tersebut dalam 100 ml deionized water (DI) steril kemudian di homogenkan, Media yang sudah homogen difilter dengan menggunakan millipore ukuran 0,22µm dan disimpan pada suhu 4°C dan siap untuk digunakan.

3.5.6 Pembuatan Stok Media Kerja

Stok media kerja dibuat dengan menyiapkan 2700µl DMEM kemudian ditambah 300µl FBS lalu dihomogenkan. Media kerja tersebut memiliki volume total 3ml dengan konsentrasi FBS 10%.

3.5.7 Isolasi Kultur *mesenchymal stem cell*

Prosedur isolasi *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*) dilakukan berdasarkan protokol isolasi dari pabrik (Thermo Fisher) dengan menggunakan mencit (*Mus musculus*) berumur 4-6 minggu. Kemudian dilakukan euthanasia dengan metode dislokasi tulang leher dan tubuh mencit disterilisasi dengan cara menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh tubuhnya. Pembedahan dilakukan pada bagian anggota gerak pasif bawah (femur dan tibia) dengan melepaskan bagian kulit, otot dan jaringan-jaringan lainnya sehingga didapatkan femur dan tibia secara

utuh. kedua tulang tersebut dipastikan sudah terpisah dari kulit, otot dan lemak kemudian dilakukan pencucian again luar tulang menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Kedua epifisis setiap tulang dipotong menggunakan gunting steril dan dipisahkan bagian sumsum tulang dengan metode *flushing*. Bagian dalam tulang dicuci menggunakan medium lengkap DMEM. Larutan yang dihasilkan kemudian disaring menggunakan *cell strainer* 70 μ m kedalam tube sentrifuge kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 4 menit. Pellet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi kemudian disuspensikan ulang menggunakan DMEM kemudian ditanam dalam TC dish dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C hingga mencapai konfluensi 70% hingga 80%, konfluensi 85% didapat setelah dilakukan kultur selama 72 jam.

3.5.8 Pengamatan Konfluenitas Hasil Kultur

Sel dengan perlakuan ekstrak dan kontrol perlakuan yang sudah diinkubasi selama 48 jam diamati dibawah mikroskop inverted. Pengamatan dilakukan dengan fokus utama lensa pada nukleus. Jika pada pengamatan sel tumbuh merata, maka foto pengamatan dapat diambil di area manapun. Namun jika sel tumbuh berkelompok atau tidak merata, maka foto pengamatan diambil adalah pada koloni terbesar yang ada pada area tersebut. Analisis hasil pengamatan dilakukan menggunakan software *ImageJ*. Foto hasil pengamatan menggunakan mikroskop inverted dikonversi menjadi 16-bit dan background dihapus, kemudian foto diolah menggunakan fitur threshold. Dilakukan pemeriksaan akurasi hasil data dari fitur threshold. Jika konfluenitas sel sudah mencapai 70%-80% maka sel siap untuk diberi perlakuan ekstrak *Anredera cordifolia*.

3.5.9 Perlakuan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Kultur *mesenchymal stem cell* Mencit (*Mus musculus*)

Dilakukan pencucian pada sel yang sudah mencapai konfluensi yang diinginkan menggunakan PBS kemudian dilakukan penambahan media baru dan ekstrak *Anredera cordifolia* sesuai konsentrasi masing-masing, yaitu 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL 0,8 mg/mL dan 1mg/mL. Kultur sel dengan perlakuan dan kontrol diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Pengamatan proliferasi dan viabilitas dilakukan setelah 48 jam inkubasi.

3.6 Pengamatan

3.6.1 Konfluenitas sel

Pengamatan konfluenitas dilakukan dengan menggunakan mikroskop inverted dan fokus utama lensa pada nucleus sel. Jika pada pengamatan sel tampak tumbuh merata, maka foto pengamatan dapat diambil di area manapun. Namun jika sel tumbuh berkelompok atau tidak merata, maka foto pengamatan diambil adalah pada koloni terbesar yang ada pada area tersebut. Pengamatan ini dilakukan pada setiap kelompok perlakuan, kemudian dilakukan analisis menggunakan *software ImageJ*.

3.6.2 Viabilitas sel

Pengamatan proliferasi dan viabilitas sel dilakukan saat usia sel memasuki hari ke 2 setelah pemberian perlakuan pada kultur sel. Setelah 2×24 jam inkubasi dilakukan penghitungan sel menggunakan *cell counter*. Diambil 10µl suspensi sel dari TC dish ditambah 10µl pewarna *trypan blue* 0,4% dan dibaca menggunakan *cell counter* (Kozak *et al.*, 2018).

3.6.3 Pengamatan Sitotoksitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap *Mesenchymal Stem Cell* Mencit (*Mus musculus*)

Uji sitotoksitas dilakukan berdasarkan metode pada *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM (2009). Sel diambil dari inkubator CO² kemudian diamati kondisi sel, sel yang mencapai tingkat konfluenitas minimal 80% dipanen. Kemudian dihitung jumlah sel dan dibuat pengenceran sel dengan media kultur sesuai kebutuhan. Sel dimasukkan dalam *well plate* 96 masing-masing berisi 100 µl suspensi sel. Kemudian sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama semalam untuk mengembalikan keadaan sel setelah dipanen.

Larutan stok MTT dibuat dengan cara menimbang 50 mg serbuk MTT dan dilarutkan dalam PBS sampai 10 mL (0,5mg/mL). Reagen MTT disiapkan dengan kadar 0,5mg/mL. Diambil 1 mL stok MTT dalam PBS 5 mg/mL, lalu diencerkan dengan media kultur sampai 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). Pemberian reagen MTT dilakukan dengan cara media sel dibuang dan dicuci dengan PBS, lalu ditambahkan reagen MTT 100 µL ke dalam setiap sumuran termasuk dalam kontrol media. Kemudian sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator CO². Inkubasi dilakukan hingga terbentuk formazan pada sel. Kondisi sel diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Jika formazan sudah terlihat jelas, maka ditambahkan larutan *stopper* 100µL SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,01 N HCl. Selanjutnya *plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat yang gelap pada temperatur kamar selama semalam. Setelah di inkubasi dilakukan pembacaan nilai absorbansi menggunakan *ELISA reader*. *ELISA reader* dihidupkan dan ditunggu sampai proses *prossesing* selesai. Selanjutnya dibuka pembungkus *plate* lalu dimasukkan ke dalam *ELISA reader*. Dibaca absorbansi

dari masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan $\lambda = 490\text{nm}$. Kemudian dilakukan penghitungan nilai IC50.

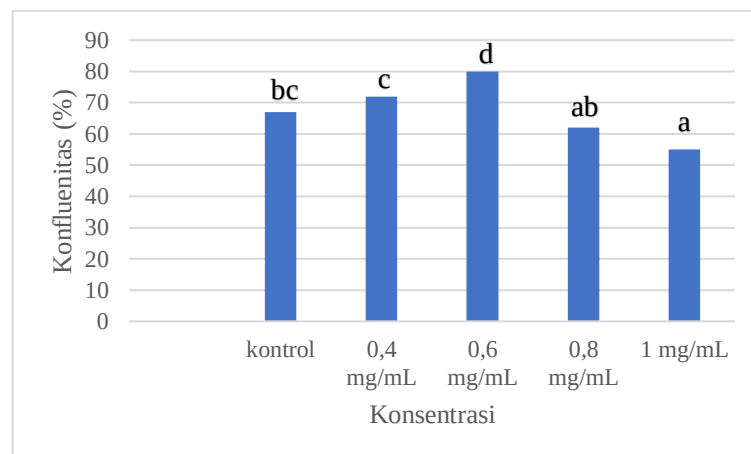
3.7 Analisis Data

Data konfluenitas *mesenchymal stem cell* (MSC) diperoleh dari penghitungan persentase konfluenitas menggunakan *software ImageJ*, viabilitas diperoleh dari penghitungan menggunakan pewarna *trypan blue* dan alat *cell counter*. Dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene*. Apabila data berdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan analisis menggunakan uji One-Way ANOVA untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap proliferasi dan viabilitas *mesenchymal stem cell* mencit (*Mus musculus*). Apabila hasil One-Way ANOVA menunjukkan nilai signifikansi ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Seluruh analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ standar deviasi (mean $\pm$ SD) dan ditampilkan dalam bentuk tabel maupun grafik.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong *Anredera cordifolia* terhadap Konfluenitas Kultur *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) mencit (*Mus musculus*)

Pengamatan pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap kultur *mesenchymal stem cell* dilakukan dengan pengamatan kuantitatif berupa konfluenitas dan pengamatan kualitatif secara mikroskopis. Hasil pengamatan secara kuantitatif maupun kualitatif menunjukkan bahwa sel pada kelompok perlakuan ekstrak 0,6 mg/mL menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Hasil pengamatan kuantitatif menunjukkan bahwa tingkat konfluenitas tertinggi ditemukan pada kelompok perlakuan ekstrak 0,6 mg/mL dengan nilai 80% tingkat konfluensi. Sedangkan nilai konfluenitas terendah ditemukan pada kelompok perlakuan ekstrak 1 mg/mL dengan nilai 55%.



Gambar 4.1.1 Tingkat Konfluenitas *Mesenchymal Stem Cell*

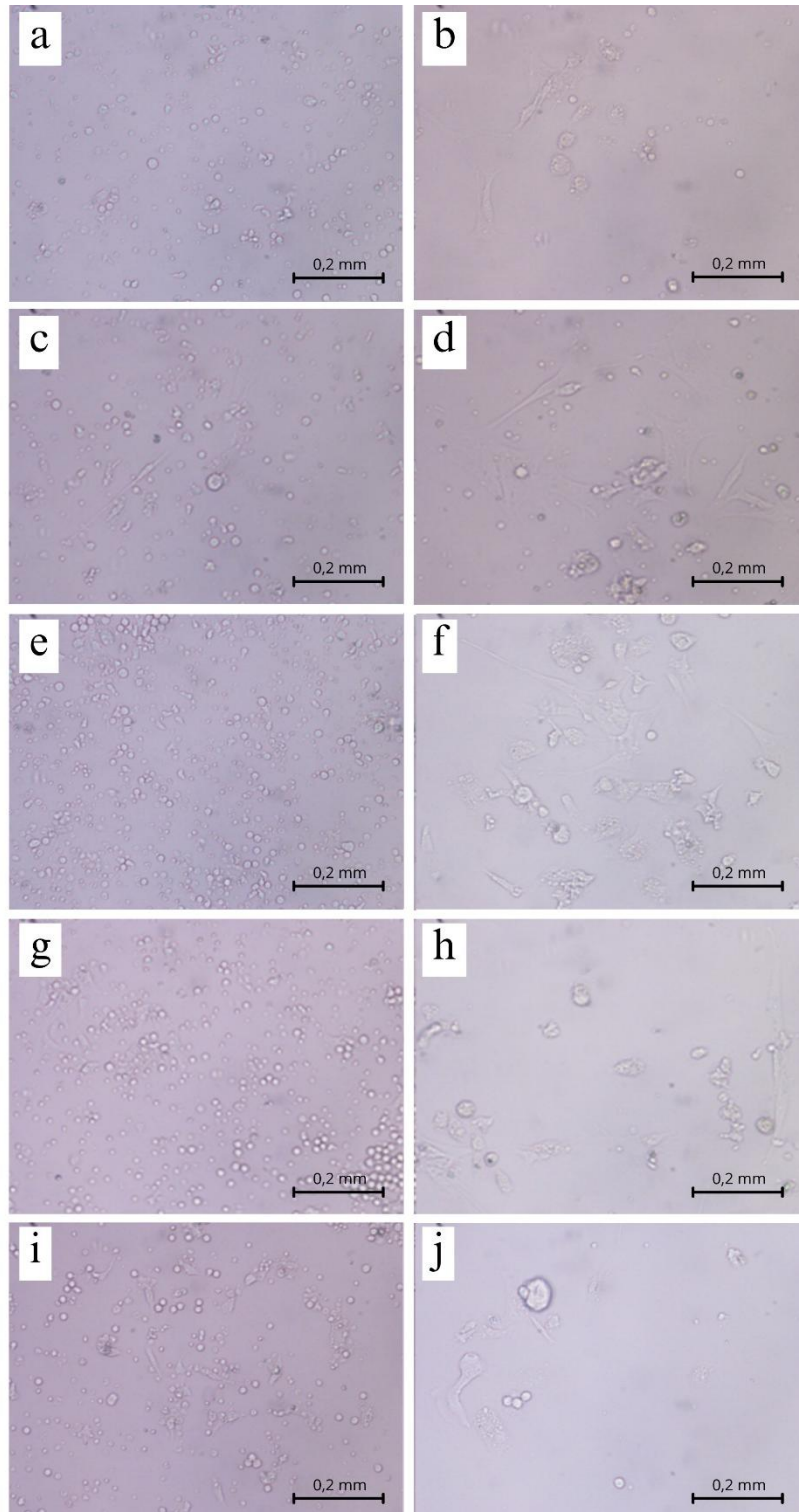
Berdasarkan analisis ANOVA menunjukkan bahwa nilai signifikansi antar perlakuan $<0,001$ yang menunjukkan bahwa tingkat konfluenitas setiap perlakuan berbeda nyata. Uji lanjut menggunakan Duncan menunjukkan konotasi seperti pada

diagram diatas (Gambar 4.1.1). Pada kelompok kontrol menunjukkan konfluensi yang tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 0,4 mg/mL, demikian juga dengan kelompok kontrol terhadap kelompok perlakuan 0,8 mg/mL. Kelompok perlakuan 0,8 mg/mL tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 1 mg/mL. Sedangkan kelompok perlakuan 0,6 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kultur *mesenchymal stem cell* dengan perlakuan ekstrak daun binahong 0,6 mg/mL memiliki tingkat konfluenitas paling tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak lainnya. Tingkat konfluenitas yang tinggi menunjukkan bahwa sel berproliferasi dengan baik, namun pada kondisi in vitro, sel yang mencapai konfluensi 80% harus dilakukan *passage* agar sel dapat tumbuh dan terus berproliferasi secara optimal (Busschots et al., 2015b). Pengaruh perbedaan ini diduga berkaitan dengan senyawa isoflavon yang ada dalam ekstrak daun binahong berupa vitexin, glycitein dan kaempferol (Safitri et al., 2025). Senyawa isoflavon yang merupakan senyawa turunan dari flavonoid diketahui memiliki struktur menyerupai 17 β -estradiol dan memiliki sifat fisiologis yang mirip hormon estrogen dalam tubuh dan dapat menjalankan fungsi seperti hormon estrogen. Hormon estrogen berperan dalam regulasi fisiologi dan pematangan sel (Ko, 2014).

Tingkat konfluenitas pada kultur MSC pada perlakuan 0,4mg/mL diduga juga dipengaruhi oleh senyawa isoflavon pada ekstrak daun binahong namun tidak memengaruhi secara signifikan pada konsentrasi tersebut. Sedangkan pada konsentrasi 0,8mg/mL dan 1mg/mL cenderung memiliki tingkat konfluensi yang lebih rendah dibandingkan kontrol, hal ini diduga kadar isoflavon dengan konsentrasi tinggi juga dapat mempengaruhi interaksi antara fitoestrogen dengan

reseptor hormon estrogen dalam sel sehingga cenderung memberikan efek antagonis terhadap sel. Menurut Setchell & Cassidy (1999) kemungkinan terjadi efek bifasik dari senyawa fitoestrogen dalam ekstrak. Pada konsentrasi rendah hingga sedang, fitoestrogen dapat menginisiasi aktivasi reseptor estrogen dan merangsang proliferasi MSC. Namun pada konsentrasi yang lebih tinggi, fitoestrogen dapat menimbulkan efek antiproliferatif melalui penghambatan siklus sel dan penurunan sensitivitas reseptor estrogen. Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2012) menyatakan bahwa pengaruh senyawa isoflavon genistein dosis tinggi juga dapat menurunkan ekspresi RANKL, rasio RANKL/OPG, ALP, OC, dan OPG sehingga senyawa genistein dosis tinggi pada sel juga dapat menghambat pembentukan tulang subkondral mandibula tikus.

Hasil pengamatan konfluenitas tersebut juga didukung dengan hasil pengamatan secara mikroskopis pada kultur *mesenchymal stem cell* yang mewakili pengamatan sel secara morfologis. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan MSC antar kelompok perlakuan. Hasil pengamatan dapat dilihat pada (Gambar 4.1.2), Pada kelompok kontrol menunjukkan adanya peningkatan ekspansi sel setelah 48 jam inkubasi dibandingkan dengan sebelum inkubasi, demikian pada kelompok perlakuan lainnya. Sesuai dengan hasil analisis konfluensi menggunakan *imageJ* pengamatan mikroskopis juga menunjukkan pada kelompok perlakuan ekstrak 0,6mg/mL sel tampak tumbuh lebih banyak dan tersebar pada permukaan TC dish. Demikian pula kultur *mesenchymal stem cell* dengan perlakuan ekstrak 1 mg/mL tampak memiliki persebaran dan jumlah sel yang paling sedikit dibandingkan dengan perlakuan lainnya.



Gambar 4.1.2 Pengamatan Mikroskopis Kultur *Mesenchymal Stem Cell*.

a) kelompok kontrol 0 jam inkubasi, b) kelompok kontrol 48 jam inkubasi, c) kelompok perlakuan ekstrak 0,4mg/mL 0 jam inkubasi, d) kelompok perlakuan ekstrak 0,4mg/mL 48 jam inkubasi, e) kelompok perlakuan ekstrak 0,6mg/mL 0 jam inkubasi, f) kelompok perlakuan ekstrak 0,6mg/mL 48 jam inkubasi, g) kelompok perlakuan ekstrak 0,8mg/mL 0 jam inkubasi, h) kelompok perlakuan

ekstrak 0,8mg/mL 48 jam inkubasi, i) kelompok perlakuan ekstrak 1mg/mL 0 jam inkubasi, j) kelompok perlakuan ekstrak 1mg/mL 48 jam inkubasi.

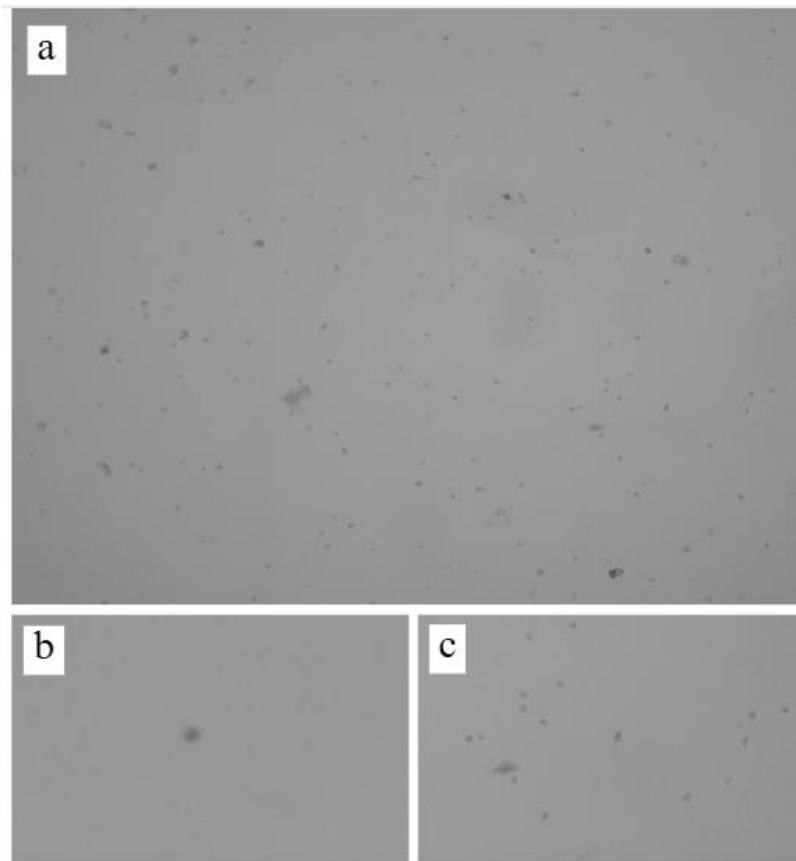
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun binahong pada konsentrasi 0,6mg/mL diduga mampu meningkatkan aktivitas proliferasi *mesenchymal stem cell* dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan peningkatan konsentrasi ekstrak 0,8mg/mL hingga 1mg/mL cenderung menurunkan jumlah sel yang tumbuh. Hal ini menunjukkan adanya pola respon yang *dose dependent*, yaitu efek peningkatan proliferasi pada konsentrasi rendah dan efek penurunan tingkat proliferasi pada konsentrasi yang lebih tinggi. Peningkatan proliferasi pada konsentrasi rendah diduga berkaitan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam ekstrak daun binahong khususnya senyawa turunan flavonoid dari kelompok isoflavon yang diketahui memiliki sifat fitoestrogen dan diduga dapat mempercepat proses pertumbuhan sel (Safitri *et al.*, 2025; Dominguez-Lopez *et al.*, 2020). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ko (2014) menyatakan bahwa senyawa isoflavon yang merupakan senyawa turunan dari flavonoid diketahui memiliki struktur menyerupai 17β -estradiol dan memiliki sifat fisiologis yang mirip hormon estrogen dalam tubuh dan dapat menjalankan fungsi seperti hormon estrogen. Hormon estrogen berperan dalam regulasi fisiologi dan pematangan sel.

Mesenchymal stem cell merupakan prekursor osteoblas yang berperan penting dalam pembentukan tulang baru, sehingga jumlah *mesenchymal stem cell* juga dapat mempengaruhi jumlah osteoblas yang akan terbentuk (Sancricca, 2010). Proliferasi MSC yang diamati pada penelitian ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun binahong berpotensi mendukung proses regenerasi tulang melalui

peningkatan ketersediaan populasi sel progenitor osteogenik. Namun demikian, penelitian lanjutan diperlukan untuk mengevaluasi kemampuan diferensiasi osteogenik MSC setelah pemberian ekstrak daun binahong.

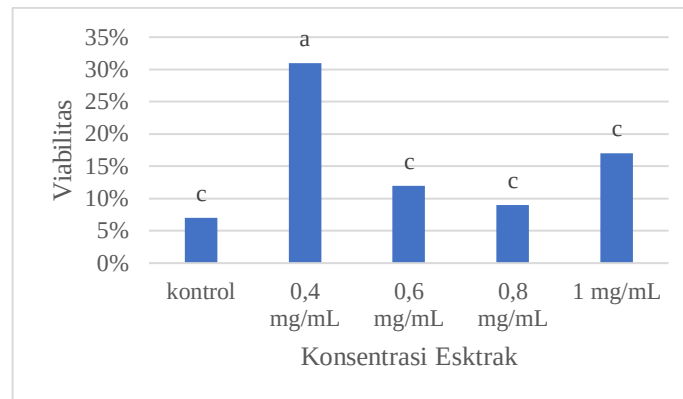
4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong *Anredera cordifolia* terhadap Viabilitas Kultur *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) mencit (*Mus musculus*)

Pengamatan viabilitas sel dilakukan menggunakan *cell counter* dengan pewarnaan *trypan blue*. Interpretasi hasil disajikan dalam bentuk gambar dan persentase sel hidup dan sel mati pada monitor *cell counter* dengan hasil viabilitas tertinggi 30,75% dan tingkat viabilitas terendah adalah 7%, hal ini dihasilkan berdasarkan penghitungan sel dengan penambahan pewarna, dimana sel mati akan terwarnai oleh *trypan blue* sedangkan sel yang hidup tidak akan terwarnai. Penggunaan pewarna berupa trypan blue pada pengamatan viabilitas sel ini digunakan berdasarkan konsep bahwa sel hidup memiliki membran sel yang utuh sehingga pewarna seperti trypan blue tidak dapat masuk kedalam membran sel, sedangkan sel mati memiliki membran sel yang sudah rusak sehingga pewarna dapat masuk kedalam sel dan mewarnai bagian dalam membran sel sehingga menghasilkan visualisasi yang lebih gelap dan tidak ada bagian bening pada intraseluler seperti pada sel hidup (Strober, 2015).



Gambar 4.2.1 Uji viabilitas menggunakan *cell counter*, a) tampilan pembacaan viabilitas sel, b) sel mati terwarnai pada *cell counter*, c) sel hidup tidak terwarnai pada *cell counter*

Hasil pengamatan viabilitas sel yang diberi perlakuan ekstrak daun *Anredera cordifolia* pada penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas tertinggi terdapat pada konsentrasi perlakuan 0,4mg/mL. Pada konsentrasi ini memiliki perbedaan nilai viabilitas yang cukup signifikan dibandingkan dengan kontrol perlakuan yang memiliki persentase viabilitas sebesar 7%. Sedangkan sel dengan perlakuan 0,8mg/mL memiliki tingkat viabilitas terendah diantara sel dengan pemberian ekstrak yaitu 9%, viabilitas sel pada perlakuan tersebut masih lebih tinggi dibandingkan kontrol namun tidak ada perbedaan yang signifikan. Perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 0,6mg/mL dan 1mg/mL memiliki tingkat viabilitas masing-masing 12% dan 17% yang menandakan adanya sedikit peningkatan dibandingkan kontrol.



Gambar 4.2.2 Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) setelah pemberian ekstrak *Anredera cordifolia* selama 48 jam.

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa perbedaan tingkat viabilitas tersebut memiliki nilai signifikansi $<0,001$ yang menandakan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Pada hasil uji lanjut menggunakan LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan ekstrak 0,4mg/mL dengan perlakuan lainnya, sedangkan kontrol perlakuan tidak berbeda nyata dengan perlakuan ekstrak 0,6 dan 0,8 mg/mL namun berbeda nyata dengan perlakuan 1mg/mL (Gambar 4.2.1). Perbedaan tingkat viabilitas pada setiap perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang signifikan, namun angka tersebut masih tergolong rendah karena pada umumnya viabilitas sel dikatakan baik jika tingkat viabilitasnya mencapai 85% (Al-Mutheffer *et al.*, 2023). Hal tersebut mungkin saja terjadi pada sel dikarenakan beberapa faktor seperti kondisi lingkungan sel termasuk dari kadar ekstrak yang diberikan. Salah satu faktor penting dalam mendukung keberlangsungan hidup suatu sel *in vitro* adalah kondisi lingkungan kultur, hal ini dapat mempengaruhi pertumbuhan serta perilaku sel, sehingga penting untuk mengontrol variabel seperti suhu, pH, dan komposisi gas selama proses kultur (Bertoncello, 2019). Selain itu faktor nutrisi pada sel juga berperan penting dalam pertumbuhan sel, nutrisi pada kultur sel umumnya berasal dari medium kultur yang digunakan serta beberapa faktor lain yang ditambahkan

kedalam medium sebagai pelengkap untuk menjaga pH serta serum sebagai faktor nutrisi tambahan bagi sel. Faktor lain yang tak kalah penting yang juga dapat mempengaruhi pertumbuhan sel adalah saat proses isolasi sel, seperti lama waktu isolasi, proses sentrifugasi saat penanaman sel, keadaan inkubator serta proses trypsinasi saat pemanenan sel sesaat sebelum pemberian ekstrak. Menurut Lordon *et al*, (2024) pemberian trypsin pada sel dapat memicu perubahan sitoplasma pada sel akibat penyesuaian volume sel yang terjadi seketika sehingga dapat menurunkan tingkat viabilitas sel.

Data pengamatan proliferasi dan viabilitas pada penelitian ini menunjukkan adanya inkonsistensi antar kedua parameter pada setiap perlakuan. Pada sel dengan perlakuan ekstrak konsentrasi 0.4mg/mL menunjukkan peningkatan pada proliferasi dan viabilitas yang dapat diartikan bahwa keduanya berbanding lurus. Namun pada perlakuan ekstrak konsentrasi 0,6mg/mL hasil pengamatan proliferasi menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel yang signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, tetapi pada pengamatan viabilitas menunjukkan bahwa tingkat viabilitas sel cukup rendah. Hal ini menunjukkan bahwa proliferasi sel tidak selalu berbanding lurus dengan tingkat viabilitas sel, sebaliknya kedua hal tersebut dapat juga berbanding terbalik sesuai dengan kemampuan beradaptasi sel terhadap lingkungan (Guo & Hay, 1999). Jika diamati lebih detail berdasarkan morfologinya, sel dengan perlakuan konsentrasi 0,6mg/mL (Gambar 4.1.2 f) tampak jumlah sel banyak namun ditemukan beberapa sel yang memiliki morfologi membulat dan tidak mengalami ekspansi. Menurut (Siddiqui *et al.*, 2015) sel dengan morfologi *mesenchymal stem cell* yang masih hidup umumnya tampak memiliki sitoplasma yang memanjang yang mengindikasikan bahwa sel tersebut

mengalami pelekatan pada permukaan TC dish. Sedangkan *mesenchymal stem cell* dengan bentuk cenderung membulat pada perlakuan konsentrasi tersebut memiliki ciri morfologi yang sama dengan *mesenchymal stem cell* yang mengalami kematian.

4.3 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur'an

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) berpengaruh terhadap proliferasi dan viabilitas kultur *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*. Berdasarkan pengamatan morfologi sel, perlakuan ekstrak daun binahong pada konsentrasi 0,4 mg/mL dan 0,6 mg/mL menunjukkan kecenderungan meningkatkan proliferasi sel dibandingkan kelompok kontrol. Selain itu, hasil pengujian viabilitas menunjukkan bahwa konsentrasi 0,4 mg/mL menghasilkan tingkat viabilitas tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa daun binahong memiliki kandungan senyawa bioaktif yang mampu mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel pada konsentrasi tertentu.

Kemampuan ekstrak daun binahong dalam memengaruhi proliferasi dan viabilitas sel menunjukkan adanya mekanisme biologis yang sangat kompleks dan teratur dalam makhluk hidup. Sel sebagai unit struktural dan fungsional terkecil kehidupan memiliki kemampuan untuk tumbuh, membelah, memperbaiki kerusakan, serta mempertahankan kelangsungan hidupnya melalui berbagai proses biokimia yang berlangsung secara terkoordinasi. Keteraturan tersebut merupakan salah satu bukti kebesaran dan kekuasaan Allah SWT dalam menciptakan kehidupan. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surah Adz-Dzariyat sebagai berikut:

وَفِي الْأَرْضِ آيَاتٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ ۖ وَفِي أَنفُسِكُمْ ۚ أَفَلَا تُبْصِرُونَ

Artinya: *"Dan di bumi terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang yakin, dan (juga) pada dirimu sendiri. Maka apakah kamu tidak memperhatikan?"* (Q.S. Adz-Dzariyat [51]: 20-21).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa berbagai fenomena yang terdapat pada makhluk hidup, termasuk proses pertumbuhan, proliferasi, dan regenerasi sel, merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT yang dapat dipelajari melalui ilmu pengetahuan. Menurut Imam At-Ṭabari dalam kitabnya Tafsir At-Ṭabari (923 M) yang di-*tahqiq* oleh Bakri dkk. (2007) menjelaskan bahwa maksud dari ayat diatas adalah bahwa di dalam tubuh manusia terdapat banyak sekali tanda-tanda kekuasaan Allah yang dapat diamati hingga unit terkecilnya yaitu sel yang kemudian membentuk organ-organ yang dikehendaki oleh-Nya sebagai indera (perasa) maupun fungsi yang lain. Shihab (2002) menyatakan bahwa banyak sekali tanda-tanda keesaan, kebesaran dan kekuasaan Allah yang terbentang di langit dan di bumi bagi orang-orang yakin, dan di samping itu ada juga banyak tanda-tanda serupa yang terdapat pada diri manusia sendiri. Bukti-bukti keesaan dan kekuasaan Allah pada diri manusia dapat dilihat antara lain pada kejadian manusia yang sangat unik, dan organ-organ tubuhnya yang demikian serasi tapi kompleks, demikian juga pada tingkah lakunya yang demikian rumit hingga ke tingkat seluler.

Selain menunjukkan kebesaran Allah SWT, hasil penelitian ini juga memiliki manfaat bagi manusia. Pemanfaatan daun binahong sebagai bahan alami yang berpotensi mendukung proliferasi dan viabilitas MSC dapat menjadi dasar pengembangan terapi regeneratif, penyembuhan luka, maupun rekayasa jaringan di masa mendatang. Potensi tersebut menunjukkan bahwa tumbuhan yang diciptakan Allah SWT memiliki manfaat yang dapat digunakan untuk menunjang kehidupan

dan kesehatan manusia. Allah SWT berfirman dalam surah Al-baqarah yang berbunyi:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَوَاتٍ ۚ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

Artinya: "Dialah (Allah) yang menciptakan segala apa yang ada di bumi untukmu, kemudian Dia menuju ke langit, lalu Dia menyempurnakannya menjadi tujuh langit. 12) Dia Maha Mengetahui segala sesuatu." (Q.S. Al-Baqarah [2]: 29).

Shihab (2002) dalam Tafsir Al-Misbah menjelaskan bahwa menurut para ulama' penciptaan langit dan bumi beserta dengan isinya diperuntukkan kepada manusia sepanjang tidak ada perintah yang melarangnya. Ayat tersebut menjelaskan bahwa berbagai sumber daya yang ada di bumi diciptakan untuk dimanfaatkan manusia secara bijaksana. Oleh karena itu, penelitian terhadap tanaman obat seperti binahong merupakan salah satu bentuk ikhtiar manusia dalam menggali manfaat ciptaan Allah SWT untuk meningkatkan kualitas hidup dan kesehatan masyarakat. Melalui penelitian ilmiah, potensi tumbuhan yang sebelumnya belum diketahui dapat diungkap sehingga memberikan manfaat yang lebih luas bagi umat manusia.

Pemanfaatan tanaman binahong sebagai sumber senyawa bioaktif dapat meningkatkan nilai penting dalam menjaga kelestarian makhluk hidup, salah satunya untuk mencegah resiko penyakit metabolik pada tulang, sehingga manusia dapat menjalani kehidupan dengan lebih sehat dan tentunya lebih produktif secara berkelanjutan. Hal ini sejalan dengan perintah Allah SWT untuk menjaga dan tidak merusak lingkungan pada surah Al-A'raf yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya: "*Dan janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi setelah (Allah) memperbaikinya...*" (Q.S. Al-A'raf [7]: 56).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa alam raya telah diciptakan Allah dalam keadaan yang sangat harmonis dan serasi untuk memenuhi kebutuhan makhluk. Allah telah menjadikannya baik, bahkan memerintahkan hamba-hamba-Nya untuk memperbaikinya dan memanfaatkannya dengan baik. Penelitian mengenai potensi daun binahong terhadap *mesenchymal stem cell* merupakan salah satu bentuk usaha pemanfaatan sumber daya hayati yang dilakukan melalui pendekatan ilmiah untuk menghasilkan manfaat bagi manusia untuk menjaga kesehatan.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian perlakuan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap *mesenchymal stem cell* secara invitro dengan kombinasi konsentrasi 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL dan 1mg/mL menunjukkan bahwa sel dengan perlakuan konsentrasi rendah (0,4mg/mL dan 0,6mg/mL) dapat meningkatkan konfluenitas *mesenchymal stem cell* dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan sel dengan pemberian ekstrak konsentrasi 0,8mg/mL dan 1mg/mL cenderung memiliki tingkat konfluenitas yang lebih rendah dibandingkan kontrol.
2. Pemberian perlakuan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap *mesenchymal stem cell* secara invitro dengan kombinasi konsentrasi 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL dan 1mg/mL menunjukkan bahwa sel dengan perlakuan konsentrasi rendah 0,4mg/mL dapat meningkatkan tingkat viabilitas *mesenchymal stem cell* secara signifikan dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan sel dengan pemberian ekstrak konsentrasi 0,6mg/mL, 0,8mg/mL dan 1mg/mL jugad memiliki tingkat viabilitas yang lebih tinggi dari kontrol, namun tidak ada perbedaan yang signifikan satu sama lain.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini adalah:

1. Dilakukan penelitian lanjut mengenai karakterisasi sel secara molekuler sebagai validasi jenis sel yang tumbuh dari hasil isolasi *mesenchymal stem cell* pada sumsum tulang.

2. Dilakukan penelitian lanjut yang melakukan pengamatan diferensiasi dari *mesenchymal stem cell* dengan penambahan ekstrak daun binahong *Anredera cordifolia* untuk mengetahui arah diferensiasi *mesenchymal stem cell* khususnya menjadi osteoblas untuk memvalidasi agar tujuan penerapannya untuk menyeimbangkan proses *remodelling* tulang menjadi lebih tepat sasaran.
3. Dilakukan uji kandungan senyawa metabolit sekunder senyawa isoflavon apa saja yang ada dalam ekstrak daun binahong untuk mengkonfirmasi senyawa spesifik yang memberikan efek peningkatan konfluenitas dan viabilitas terhadap *mesenchymal stem cell*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, A. P. R., Muslikh, F. A., Shirvi, I. N., Islamiyah, F. R., Putra, K. H. P., Inayatilah, F. R., Bhagawan, W. S., Ma'arif, B., Mukti, A. W., & Rahayu, A. (2021). Efek Induksi Proliferasi Sel Osteoblas Tulang Trabekular Mencit Jantan oleh Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.): Induction Effect of Proliferation of Osteoblas Cells Trabecular Bone Male Mice by 96% Ethanol Extract of Semanggi Leaves (*Marsilea crenata* Presl.). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(4), 429–435. <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i4.634>
- Alba, T. M., Pelegrin, C. M. G. D., & Sobottka, A. M. (2020). Ethnobotany, ecology, pharmacology, and chemistry of *Anredera cordifolia* (Basellaceae): A review. *Rodriguésia*, 71, 01042019. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071060>
- Al-Mutheffer, E. A., Reinwald, Y., & El Haj, A. J. (2023). Donor variability of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cell—Implications for cell therapy. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 11(1), 23–37. <https://doi.org/10.1080/23144599.2023.2197393>
- Anwar, A. F., & Hadi, R. S. (2024). *Pengaruh Fermentasi Madu Terhadap Viabilitas dan Proliferasi Sel Fibroblast Pasca Diinduksi Cisplatin In Vitro Serta Tinjauan Menurut Islam*. 3(1).
- Astuti, S. M., Sakinah A.M, M., Andayani B.M, R., & Risch, A. (2011). Determination of Saponin Compound from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis Plant (Binahong) to Potential Treatment for Several Diseases. *Journal of Agricultural Science*, 3(4), p224. <https://doi.org/10.5539/jas.v3n4p224>
- Bertoncello, I. (2019). Optimizing the Cell Culture Microenvironment. In I. Bertoncello (Ed.), *Mouse Cell Culture* (Vol. 1940, pp. 23–30). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9086-3_2
- Bolamperti, S., Villa, I., & Rubinacci, A. (2022). Bone remodeling: An operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Research*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>
- Busschots, S., O'Toole, S., O'Leary, J. J., & Stordal, B. (2015a). Non-invasive and non-destructive measurements of confluence in cultured adherent cell lines. *MethodsX*, 2, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.11.002>
- Busschots, S., O'Toole, S., O'Leary, J. J., & Stordal, B. (2015b). Non-invasive and non-destructive measurements of confluence in cultured adherent cell lines. *MethodsX*, 2, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.11.002>
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>

- Chang, B., & Liu, X. (2022). Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(2), 261–278. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0322>
- Djuwita, I., Pratiwi, I. A., Winarto, A., & Sabri, M. (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*, 6(2). <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v6i2.295>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dyasti, P. W., Kurniawati, A., & Pujiastuti, P. (2021). Potentially Of Purple Leaves to Increase Osteoblastat Alveolar Bone Rat Induced Porphyromonas Gingivalis. *Journal of Vocational Health Studies*, 4(3), 114. <https://doi.org/10.20473/jvhs.V4.I3.2021.114-118>
- Festing, M. F. W., & Altman, D. G. (2002). Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal*, 43(4), 244–258. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.244>
- Fitriyani, N., Haresmita, P. P., Wardani, A. K., & Rawar, E. A. (2024). Pengaruh Ekstraksi Bertingkat Terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Binahong (Anredera cordifolia (Ten) Steenis). *Fullerene Journal of Chemistry*, 9(2), 39. <https://doi.org/10.37033/fjc.v9i2.652>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015a). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015b). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Francini, A., Giro, A., & Ferrante, A. (2019). Biochemical and Molecular Regulation of Phenylpropanoids Pathway Under Abiotic Stresses. In *Plant Signaling Molecules* (pp. 183–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00011-3>
- Freshney, R. I. (2010a). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (6th ed). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>

- Freshney, R. I. (2010b). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (6th ed). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000471>
- Guo, M., & Hay, B. A. (n.d.). *Cell proliferation and apoptosis*.
- Halimatus Saidah, Dewi Kartika Sari, Cristina Sri Healthyni, & Mira Zoraya. (2022). The Effectiveness of Infusa Leaf of Binahong (*Anredera Codifolia*) in Healing Perineal Wound. *Journal for Quality in Public Health*, 5(2), 537–544. <https://doi.org/10.30994/jqph.v5i2.353>
- Hanafiah, O. A., Hanafiah, D. S., Dohude, G. A., Satria, D., Livita, L., Moudy, N. S., & Rahma, R. (2022). *Effects of 3% binahong (Anredera cordifolia) leaf extract gel on alveolar bone healing in post-extraction tooth socket wound in Wistar rats (Rattus norvegicus)*. 10(923).
- Harper, J. M. (2024). Primary Cell Culture as a Model System for Evolutionary Molecular Physiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7905. <https://doi.org/10.3390/ijms25147905>
- Hass, R., & Otte, A. (2012). Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Communication and Signaling*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-26>
- Johannes De Villiers, T. (2009). Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 23(1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2008.10.009>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(11), 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.008>
- Kim, J. I., Hidalgo-Shrestha, C., Bonawitz, N. D., Franke, R. B., & Chapple, C. (2021). Spatio-temporal control of phenylpropanoid biosynthesis by inducible complementation of a cinnamate 4-hydroxylase mutant. *Journal of Experimental Botany*, 72(8), 3061–3073. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab055>
- Ko, K.-P. (2014). Isoflavones: Chemistry, Analysis, Functions and Effects on Health and Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(17), 7001–7010. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.17.7001>

- Kodama, J., & Kaito, T. (2020). Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5685. <https://doi.org/10.3390/ijms21165685>
- Koh, B., Sulaiman, N., Fauzi, M. B., Law, J. X., Ng, M. H., Idrus, R. B. H., & Yazid, M. D. (2020). Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: A systematic review. *Cell & Bioscience*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00438-8>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>
- Komori, T. (2019). Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1694. <https://doi.org/10.3390/ijms20071694>
- Kozak, J., Wdowiak, P., Maciejewski, R., & Torres, A. (2018). A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology*, 70(1), 339–350. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0149-5>
- Latuhihin, Y. G., Watuguly, T., Kakisina, P., & Kustarini Samsuria, I. (2020). Potential of Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Tenore] Steen) in Reducing TNF- α Expression on Regeneration of Pancreas β Cells on White Rats (<i>Rattus norvegicus</i>) Diabetes Mellitus Models. *Journal of Biosciences and Medicines*, 08(06), 37–49. <https://doi.org/10.4236/jbm.2020.86004>
- Lee, S., Kim, G. J., Kwon, H., Nam, J.-W., Baek, J. Y., Shim, S. H., Choi, H., & Kang, K. S. (2021). Estrogenic Effects of Extracts and Isolated Compounds from Belowground and Aerial Parts of *Spartina anglica*. *Marine Drugs*, 19(4), 210. <https://doi.org/10.3390/md19040210>
- Li, Y., Xing, X., Wang, H., Weng, X., Yu, S., & Dong, G. (2012). Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(1), 66–74. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.136>
- Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 429. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>
- Liu, X., & Quan, N. (2015). Immune Cell Isolation from Mouse Femur Bone Marrow. *BIO-PROTOCOL*, 5(20). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1631>
- Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>

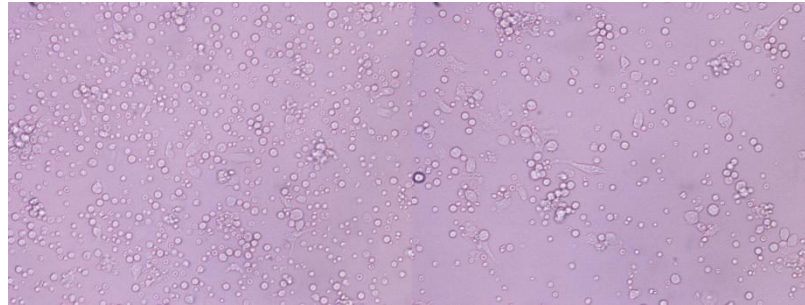
- Lordon, B., Campion, T., Gibot, L., & Gallot, G. (2024). Impact of trypsin on cell cytoplasm during detachment of cells studied by terahertz sensing. *Biophysical Journal*, 123(16), 2476–2483. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2024.06.011>
- Nguyen, H. N., & Kampa, N. (2013). Bone Cell Function: A Review. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 43(3), 329–336. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2488>
- Panicker, S., & Hamdule, A. (2021). Analysis of Medicinal Properties of Vigna Aconitifolia (MATKI). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14(5), 78–81. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2021.v14i5.41186>
- Perkasa, A. Y. (2023). AN INTRODUCTION TO BINAHONG (*Anredera cordifolia* (TEN.) STEENIS) AS A SOURCE OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 6(2), 16–20. <https://doi.org/10.55257/ethabd.1254516>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Purwaningsih, H., Nababan, R. C., & Firmansyah, Y. W. (2025). *Eksplorasi Binahong (Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis) Batang Hijau dan Merah: Studi Organoleptik, Mikroskopis dan Skrining Fitokimia*.
- Rinendyaputri, R., & Noviantari, A. (2015). Produksi Mesenchymal Stem Cell (MSC) dari Sumsum Tulang Belakang Mencit. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 4(1), 33–41. <https://doi.org/10.22435/jbmi.v4i1.4211.33-41>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays*.
- Salim, A., Kristanto, D. F., Subianto, F., Sundah, J. E., Jamaica, P. A., Angelika, T., & Maulida, N. F. (2021). Phytochemical Screening and Therapeutic Effects of Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Leaves. *Indonesian Journal of Life Sciences*, 43–55. <https://doi.org/10.54250/ijls.v3i2.125>
- Sancricca, C. (2010). Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, 2(4), 67. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i4.67>
- Schaffler, M. B., Cheung, W.-Y., Majeska, R., & Kennedy, O. (2014). Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcified Tissue International*, 94(1), 5–24. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>
- Segeritz, C.-P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 151–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>

- Setchell, K. D. R., & Cassidy, A. (1999). Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal of Nutrition*, 129(3), 758S-767S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.3.758S>
- Shao, J., Zhang, W., & Yang, T. (2015). Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biological Research*, 48(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0053-4>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Siddiqui, S., Ahmad, E., Gupta, M., Rawat, V., Shivnath, N., Banerjee, M., Khan, M. S., & Arshad, M. (2015). *Cissus quadrangularis* Linn exerts dose-dependent biphasic effects: Osteogenic and anti-proliferative, through modulating ROS, cell cycle and *Runx2* gene expression in primary rat osteoblasts. *Cell Proliferation*, 48(4), 443–454. <https://doi.org/10.1111/cpr.12195>
- Sihombing, I., Wangko, S., & Kalangi, S. J. R. (2013). PERAN ESTROGEN PADA REMODELING TULANG. *JURNAL BIOMEDIK (JBM)*, 4(3). <https://doi.org/10.35790/jbm.4.3.2012.1210>
- Soleimani, M., & Nadri, S. (2009). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature Protocols*, 4(1), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.221>
- Šromová, V., Sobola, D., & Kaspar, P. (2023). A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*, 12(21), 2576. <https://doi.org/10.3390/cells12212576>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Susanti, H., & Ciptono, C. (2018). PENGARUH EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*) TERHADAP PERUBAHAN JUMLAH FOLIKEL OVARIUM TIKUS PUTIH BETINA (*Rattus norvegicus*, L.). *Kingdom (The Journal of Biological Studies)*, 7(4), 269–280. <https://doi.org/10.21831/kingdom.v7i4.13238>
- Syahidah, H. N., & Hadisaputri, Y. E. (2016). Review Artikel: Media Yang Digunakan Pada Kultur Sel. 14(3), 27–36.
- Tohge, T., De Souza, L. P., & Fernie, A. R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4013–4028. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx177>
- Trajkovic, K., Valdez, C., Ysselstein, D., & Krainc, D. (2019). Fluctuations in cell density alter protein markers of multiple cellular compartments, confounding

- experimental outcomes. *PLOS ONE*, 14(2), e0211727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211727>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
- Veni, M. A. C., & Rajathi, P. (2017). Interaction between Bone Cells in Bone Remodelling. *Journal of Academy of Dental Education*, 1. <https://doi.org/10.18311/jade/0/15952>
- Wang, H.-F., Jin, W.-A., Gao, J.-J., & Sheng, H. (2007). Changes of Biological Function of Bone Cells and Effect of Anti-osteoporosis Agents on Bone Cells. In L. Qin, H. K. Genant, J. F. Griffith, & K. S. Leung (Eds.), *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffold Materials* (pp. 205–222). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-45456-4_12
- Wawrzyniak, A., & Balawender, K. (2022). Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals*, 12(15), 1946. <https://doi.org/10.3390/ani12151946>
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(4), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zhang, J., Liu, Z., Luo, Y., Li, X., Huang, G., Chen, H., Li, A., & Qin, S. (2022). The Role of Flavonoids in the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 849513. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.849513>

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengamatan konfluenitas sel sebelum pemberian ekstrak



Lampiran 2. Olah data konfluenitas menggunakan SPSS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konfluensi	konsentrasi
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	55.0945	2.00
	Std. Deviation	6.22457	1.451
Most Extreme Differences	Absolute	.141	.155
	Positive	.098	.155
	Negative	-.141	-.155
Test Statistic		.141	.155
Asymp. Sig. (2-tailed) ^c		.200 ^d	.200 ^d
Monte Carlo Sig. (2-tailed) ^e	Sig.	.362	.234
	99% Confidence Interval	Lower Bound	.349
		Upper Bound	.374

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

e. Lilliefors' method based on 10000 Monte Carlo samples with starting seed 2000000.

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
konfluensi	Based on Mean	2.827	4	15	.062
	Based on Median	1.329	4	15	.304
	Based on Median and with adjusted df	1.329	4	5.899	.360
	Based on trimmed mean	2.541	4	15	.083

ANOVA

konfluensi		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		576.752	4	144.188	13.568	<.001
Within Groups		159.408	15	10.627		
Total		736.160	19			

konfluensi

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	4	47.6200			
3	4	51.7025	51.7025		
0	4		54.6575	54.6575	
1	4			58.2225	
2	4				63.2700
Sig.		.097	.219	.143	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Lampiran 3. Dokumentasi penghitungan viabilitas menggunakan *cell counter*



Lampiran 4. Olah data viabilitas menggunakan SPSS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		viabilitas	perlakuan
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21.8900	2.0000
	Std. Deviation	7.62295	1.45095
Most Extreme Differences	Absolute	.169	.155
	Positive	.169	.155
	Negative	-.092	-.155
Test Statistic		.169	.155
Asymp. Sig. (2-tailed) ^c		.135	.200 ^e
Monte Carlo Sig. (2-tailed) ^d	Sig.	.130	.232
	99% Confidence Interval	Lower Bound	.122
		Upper Bound	.243

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. Lilliefors' method based on 10000 Monte Carlo samples with starting seed 299883525.

e. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
viabilitas	Based on Mean	2.948	4	15	.055
	Based on Median	2.219	4	15	.116
	Based on Median and with adjusted df	2.219	4	13.674	.121
	Based on trimmed mean	2.868	4	15	.060

ANOVA

viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	888.328	4	222.082	15.440	<.001
Within Groups	215.750	15	14.383		
Total	1104.078	19			

Multiple Comparisons

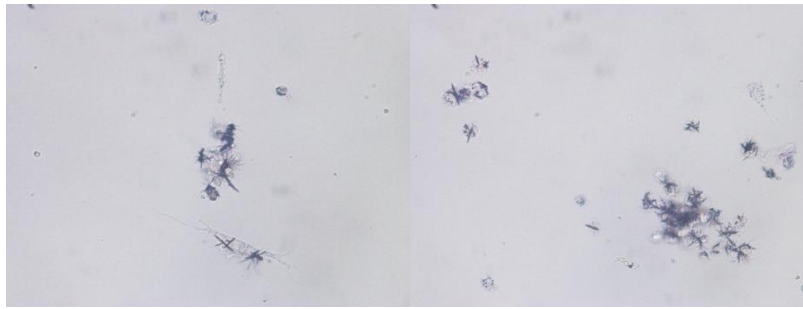
Dependent Variable: viabilitas

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	1.00	-18.44500 [*]	2.68173	<.001	-24.1610	-12.7290
	2.00	-4.18250	2.68173	.140	-9.8985	1.5335
	3.00	-1.57750	2.68173	.565	-7.2935	4.1385
	4.00	-9.28250 [*]	2.68173	.003	-14.9985	-3.5665
1.00	.00	18.44500 [*]	2.68173	<.001	12.7290	24.1610
	2.00	14.26250 [*]	2.68173	<.001	8.5465	19.9785
	3.00	16.86750 [*]	2.68173	<.001	11.1515	22.5835
	4.00	9.16250 [*]	2.68173	.004	3.4465	14.8785
2.00	.00	4.18250	2.68173	.140	-1.5335	9.8985
	1.00	-14.26250 [*]	2.68173	<.001	-19.9785	-8.5465
	3.00	2.60500	2.68173	.347	-3.1110	8.3210
	4.00	-5.10000	2.68173	.077	-10.8160	.6160
3.00	.00	1.57750	2.68173	.565	-4.1385	7.2935
	1.00	-16.86750 [*]	2.68173	<.001	-22.5835	-11.1515
	2.00	-2.60500	2.68173	.347	-8.3210	3.1110
	4.00	-7.70500 [*]	2.68173	.012	-13.4210	-1.9890
4.00	.00	9.28250 [*]	2.68173	.003	3.5665	14.9985
	1.00	-9.16250 [*]	2.68173	.004	-14.8785	-3.4465
	2.00	5.10000	2.68173	.077	-.6160	10.8160
	3.00	7.70500 [*]	2.68173	.012	1.9890	13.4210

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

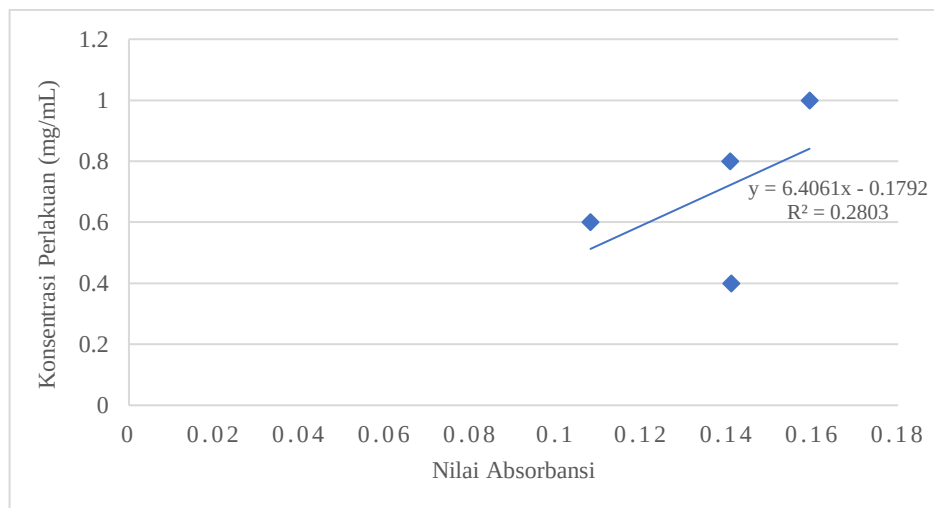
Lampiran 5. Kristal formazan pada uji MTT Assay



Lampiran 6. Nilai absorbansi MTT Assay

Konsentrasi (mg/mL)	Pengulangan				Rata-rata Absorbansi
	1	2	3	4	
0.4	0.271	0.108	0.094	0.091	0.141
0.6	0.131	0.106	0.101	0.094	0.108
0.8	0.251	0.104	0.107	0.101	0.141
1	0.313	0.104	0.12	0.1	0.159

Lampiran 7. Kurva standar uji sitotoksitas menggunakan MTT Assay





JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 220602110034
Nama : 'IFFATUSY SYARIFA
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Jurusan : BIOLOGI
Dosen Pembimbing 1 : MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD
Dosen Pembimbing 2 : Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : PENGARUH EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera codifolia*) TERHADAP PROLIFERASI DAN VIABILITAS SEL TULANG MENCIT (*Mus musculus*)

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	12 Juni 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Penentuan judul dan bimbingan BAB 1	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
2	29 Agustus 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Pengarahan kepenulisan	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
3	10 September 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Bimbingan BAB 1 revisi dan konsultasi metode	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
4	18 September 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Bimbingan BAB 1 dan metode	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
5	02 Oktober 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	konsultasi BAB 2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
6	08 Oktober 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	bimbingan BAB 2 dan BAB 3	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
7	08 Oktober 2025	Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd	Konsultasi integrasi BAB 1	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
8	16 Oktober 2025	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Bimbingan BAB 2 dan BAB 3 ACC	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
9	16 Oktober 2025	Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd	Bimbingan Integrasi BAB 2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
10	11 November 2025	Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd	Bimbingan Integrasi Revisi	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
11	18 Mei 2026	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	bimbingan hasil	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
12	20 Mei 2026	Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd	bimbingan integrasi BAB 4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
13	22 Mei 2026	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	bimbingan BAB 4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
14	25 Mei 2026	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Bimbingan BAB1-4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
15	03 Juni 2026	MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD	Revisi BAB1-5	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2

Dr. EKO BUDI MINARNO, M.Pd

Malang, _____

Dosen Pembimbing 1

MAHARANI RETNA DUHITA, M.Sc., PhD



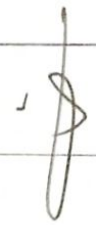


KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : 'Iffatusy syarifa
NIM : 220602110034
Judul : Pengaruh Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*) Terhadap Proliferasi Dan Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) Mencit (*Mus Musculus*) Secara Invitro

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc	24%	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001