



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK ANTIOSTEOKLASTOGENESIS EKSTRAK ETANOL
96% LEUNCA (*SOLANUM NIGRUM*) TERHADAP SEL RAW
264 SECARA *IN VITRO***

TESIS

IPAK RIDMAH RIKENAWATY

1006733026

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK ANTIOSTEOKLASTOGENESIS EKSTRAK ETANOL
96% LEUNCA (*SOLANUM NIGRUM*) TERHADAP SEL RAW
264 SECARA *IN VITRO***

TESIS

**Ditujukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Herbal**

IPAK RIDMAH RIKENAWATY

1006733026

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN

ALAM

PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL

DEPOK

JULI 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Karya Akhir ini diajukan oleh :

Nama : Ipak.Ridmah Rikenawaty
NPM : 1006733026
Program studi : Magister Herbal
Judul Tesis : Efek Antiosteoklastogenesis Ekstrak etanol 96% Leunca
Terhadap Sel RAW 264 secara *in-vitro*.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Herbal pada Program Studi Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : DR. Anton Bahtiar, M Biomed, Apt (.....)
Pembimbing II : DR. Churiyah, Msi (.....)
Penguji : drg. Erik Idrus, PhD (.....)
Penguji : DR. Abdul Mun'im, Msi, Apt (.....)
Ketua Sidang : Dr. Iskandarsyah M.S., Apt (.....)
Sekertaris : Dr. Mahdi Jufri M.Si (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 18 -Juli- 2012

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ipak Ridmah Rikenawaty

NPM : 1006733026

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya bahwa :

- 1) Tesis saya yang berjudul Efek Antiosteoklastogenesis Ekstrak Etanol 96% Leunca (*Solanum Nigrum*) terhadap Sel RAW 264 secara *in vitro* adalah benar karya saya sendiri dan bukan plagiat dari karya yang lain.
- 2) Apabila dikemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam karya ilmiah tersebut maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan penuh tanggung jawab.

Yang membuat pernyataan



(Ipak Ridmah Rikenawaty)

HALAMAN PERNYATAAN ORSINALITAS

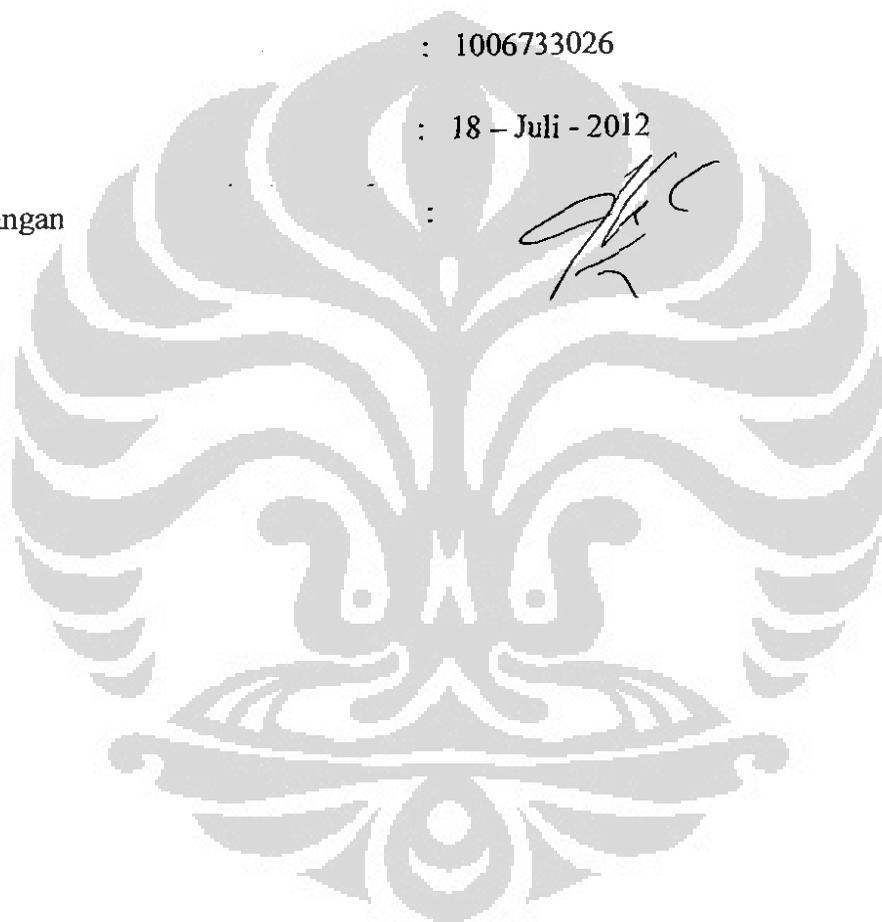
Tesis ini adalah hasil karya sendiri, dan semua sumber yang dikutip maupun di rujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Yang menyatakan Nama : Ipak Ridmah Rikenawaty

NPM : 1006733026

Tanggal : 18 – Juli - 2012

Tanda Tangan :



HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA AKHIR UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ipak Ridmah Rikenawaty

NPM : 1006733026

Program Studi : Magister Herbal

Departemen : Farmasi

Fakultas : Farmasi

Jenis karya : Tesis

Demi kepentingan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-free Right*) atas Tesis saya yang berjudul :

Efek Antiosteoklastogenesis ekstrak etanol 96% Leunca (*Solanum Nigrum*) terhadap sel RAW 264 secara invitro.

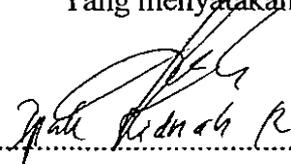
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/ formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan Tesis tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Di buat di : Depok

Pada tanggal : 18 – Juli- 2012

Yang menyatakan

(..........)

ABSTRAK

Nama : Ipak Ridmah Rikenawaty
Program Studi : Magister Herbal
Judul : Efek Antiosteoklastogenesis ekstrak etanol 96% Leunca
(*Solanum nigrum*) terhadap sel RAW 264 secara *invitro*.

Osteoporosis secara seluler terjadi karena jumlah sel osteoklas melebihi jumlah sel osteoblas. Osteoklastogenesis dapat terjadi akibat defisiensi estrogen yang menyebabkan meningkatnya umur osteoklas dan memperpendek umur osteoblas. Leunca memiliki kandungan Isoflavon, yang merupakan fitoestrogen mayor yang memiliki struktur kimia yang sama dengan 17β -estradiol, sehingga dapat dipakai sebagai bahan estrogen alami. Penelitian ini menilai apakah ekstrak etanol 96% leunca memiliki kemampuan dalam menghambat osteoklastogenesis secara *invitro* pada sel RAW 264.

Pengujian MTT dilakukan untuk menilai hambatan proliferasi sel RAW 264 dan uji antiosteoklastogenesis dilakukan dengan pewarnaan TRAP pada sel RAW 264 yang diinduksi dengan RANK-L. Pada pengujian MTT dengan inkubasi 48 jam viabilitas sel terlihat baik pada konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$ dan 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Hasil pengujian antiosteoklastogenesis terlihat penekanan osteoklas pada sel RAW 264 terbaik pada konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : Osteoklastogenesis, Leunca, sel RAW 264.

ABSTRACT

Name : Ipak Ridmah Rikenawaty
Program Study : Magister Herbal
Title : Anti osteoclastogenesis effect of 96 % ethanol extract of Leunca (*Solanum nigrum*) in RAW 264 cell *in vitro*

Cellularly, osteoporosis occurs because the scale of osteoclasts is higher than osteoblasts. Osteoclastogenesis may occur as a result of estrogen deficiency therefore it may lead to the increased age of osteoclasts as well as shortening the lifespan of osteoblast. It resulting a negative balance of a bone. Leunca (*Solanum nigrum*) is a plant-*terungan* which has a high content of isoflavones. Isoflavones Phytoestrogens itself is a mayor Fitoestrogen that has a similar chemical structure to 17β -estradiol, so it can be used as the most potent natural estrogen. The study was conducted to assess whether the 96% ethanol extract of Leunca (*Solanum nigrum*) has the ability to inhibit osteoclastogenesis *in vitro* in RAW 264 cells.

The MTT assay was performed to assess the proliferation resistance of RAW 264 cells meanwhile the antiosteoklastogenesis assay was conducted by staining TRAP in RAW 264 cells induced by RANK-L. The results of MTT assay at 48 hours incubation showed distinct cell viability at 3,125 $\mu\text{g/ml}$ dan 6,25 $\mu\text{g/ml}$ concentration. The result of antiosteoclastogenesis assay showed distinct osteoclast inhibition on RAW 264 cells at 3,125 $\mu\text{g/ml}$ concentration.

Key words : Osteoclastogenesis, Leunca, Cell RAW 264.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORSINLITAS.....	iii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIATOR.....	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	v
LEMBAR PER SETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	x
SINGKATAN.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Jenis Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Tujuan Penelitian	4
1.6 Kontribusi penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Osteoporosis	6
2.2 Osteoklastogenesis	7
2.3 Efek Estrogen	11
2.4 Fitoestrogen	12
2.4.1 Dosis dan efek samping Fitoestrogen	15
2.4.2 Mekanisme kerja Fitoestrogen	15
2.5 Leunca	16
2.5.1 Nama Tanaman	16
2.5.2 Klasifikasi Tumbuhan	16
2.5.3 Deskripsi Tumbuhan	17
2.5.4 Kandungan Kimia dan Manfaat	17
2.5.5 Nilai Gizi Leunca	20
2.6 Ekstraksi	21
2.7 Skrining Fitokimia	23
2.7.1 Alkaloid.....	24
2.7.2 Triterpen.....	24
2.7.3 Saponin.....	25
2.7.4 Tanin.....	25
2.8 Kromatografi cair kinerja tinggi(KCKT)	25
2.9 Microculture Tetrazolium (MTT)/ MTTAssay.....	27
2.10 Pemeriksaan Western Blot.....	28
2.10.1 Antibodi β -actin	28

4.1 Ekstraksi	48
4.2 Pengujian sisa pelarut.....	48
4.3 Pemeriksaan kelarutan ekstrak kental buah leunca dalam air dan etanol 96%.....	49
4.4 Kadar abu	50
4.5 Kadar air.....	50
4.6 Penapisan Fitokimia.....	51
4.6.1 Identifikasi senyawa Isoflavon pada ekstrak etanol 96% Leunca...	51
4.6.2 Identifikasi senyawa Alkaloid pada ekstrak etanol 96% Leunca....	53
4.6.3 Identifikasi senyawa Saponin pada ekstrak etanol 96% Leunca.....	53
4.6.4 Identifikasi senyawa Terpen pada ekstrak etanol 96% Leunca.....	54
4.6.5 Identifikasi senyawa Flavonoid pada ekstrak etanol 96% Leunca.	55
4.6.6 Identifikasi senyawa Tanin pada ekstrak etanol 96% Leunca.....	55
47 Thawing dan penyiapan kultur sel.....	56
4.8 Pengujian proliferasi sel metode MTT.....	57
4.9 Pemeriksaan osteoklastogenesis.....	60
4.10 Pengujian Western Blot.....	64
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
5.1 Kesimpulan.....	69
5.2 Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Mekanisme aktifitas ekspresi RANKL oleh berbagai tipe sel dalam menginduksi osteoklastogenesis yang diikuti dengan mengikat RANK pada prekursor osteoklas.....	10
2.2	Pathway Central RANK.....	11
2.3	Struktur Kimia desgalactotigonin (R=H) dan tigonin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[β-D-glucopyranosyl-(1->3)]-β D glucopyranosyl-(1->4)-galactopyranoside (R=CH ₂ OH).....	19
2.4	Struktur Kimia Nigrumnin I (R ₁ =H ₂ ; R ₂ =H) dan Nigrumnin II (R ₁ =O ; R ₂ =OH).....	19
4.1	Grafik gambaran sisa etanol 96% leunca.....	48
4.2	Morfologi sel RAW 264.....	57
4.3	Absorbansi MTT assay RAW 264 pada 24 dan 48 jam.....	59
4.4	Viabilitas sel Raw 264 24 jam dan 48 jam.....	60
4.5	Grafik perhitungan osteoklas pada masing masing perlakuan	62
4.6	Gambaran sel osteoklas.....	62
4.7	Viabilitas sel dan jumlah sel osteoklas.....	63
4.8	Hasil SDS-PAGE dan hasil transfer SDS -PAGE ke membran	65
4.9	Hasil Western Blot setelah dideteksi dengan DAB kit.....	67

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Kandungan Nutrisi Buah leunca (<i>Solanum Nigrum. L</i>)	21
3.1	Berat molekul protein marker dan prosentase gel	43
4.1	Sisa pelarut etanol dalam ekstrak etanol 96% leunca	48
4.2	Data kelarutan ekstrak kental leunca pada air dan etanol	49
4.3	Data hasil pengujian kadar abu ekstrak kental buah leunca	50
4.4	Data hasil pengujian kadar air ekstrak etanol 96% buah leunca	50
4.5	Hasil Pengujian kandungan senyawa isoflavon pada ekstrak kental buah Leunca secara KCKT	51
4.6	Identifikasi senyawa alkaloid	53
4.7	Identifikasi saponin	54
4.8	Identifikasi senyawa Terpen pada Ekstrak etanol 96% Leunca	54
4.9	Identifikasi senyawa flavonoid pada Ekstrak etanol 96% Leunca	55
4.10	Identifikasi Senyawa Tanin	56
4.11	Data absorbansi MTT assay RAW 264 pada 24 jam dan 48 jam	58
4.12	Viabilitas sel RAW 264 pada 24 jam dan 48 jam	59
4.13	Jumlah sel osteoklas osteoklas pada masing masing perlakuan	61

SINGKATAN



α MEM	=	minimum essential medium alpha
CNTF	=	<i>Ciliary Neurotropic Factor</i>
DMSO	=	<i>dimethyl sulfoxide</i>
Er α	=	reseptor estrogen alpha
Er β	=	reseptor estrogen beta
ERR α	=	<i>estrogen reseptor- related reseptor α</i>
FBS	=	Fetal bovine serum
GC	=	Gas chromatografi
GM-CSF	=	<i>Granulocyte macrophage- colony stimulating factor</i>
IL-1	=	<i>Interleukin-1</i>
IL-6	=	<i>Interleukin-6</i>
KCKT	=	Kromatografi cair kinerja tinggi
LIF	=	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
M-CSF	=	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MTT	=	<i>Microculture tetrazolium</i>
NFAT 2	=	<i>nuclear factor activated T cell cl</i>
OPG	=	<i>osteoprotegrin</i>
OSM	=	<i>Oncostatin M</i>
RANK-L	= =	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand .</i>
SE	=	standar Error
SERM	=	<i>selective estrogen reseptor modulator</i>
TNF- α	=	<i>Tumor Necrosis Factor- Alpha</i>
TGF β	=	<i>transforming growth faktor β</i>
TGF β	=	<i>Transforming growth faktor β</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan penyakit penyakit metabolik tulang yang ditandai oleh menurunnya masa tulang, oleh karena berkurangnya matriks dan mineral tulang disertai dengan kerusakan mikroarsitektur dari jaringan tulang, dengan akibat menurunnya kekuatan tulang, sehingga terjadi kecenderungan tulang mudah patah (Kawiyana, 2009). Penyakit ini seringkali dikaitkan dengan faktor penuaan atau usia lanjut, padahal berdasarkan pemeriksaan kepadatan tulang dengan densitometer wanita usia muda (sekitar 25 tahun) juga memiliki resiko osteoporosis. Kasus osteoporosis pada wanita lebih cepat dan lebih berat dibandingkan kaum pria, karena menurunnya hormon estrogen di dalam tubuh ketika masa menopause (Kawiyana, 2009).

Terdapat dua tipe osteoporosis yaitu osteoporosis primer dan osteoporosis sekunder. Osteoporosis primer dibedakan lagi menjadi tipe 1 atau *Postmenopause* dan tipe 2 yang disebut *Senile* . Penyebab terjadinya osteoporosis primer tipe 1 erat kaitannya dengan defisiensi estrogen pada masa menopause, biasanya terjadi antara 15 – 20 tahun setelah masa menopause atau pada usia sekitar 51 – 75 tahun (Putri, 2009). Sedangkan osteoporosis sekunder, terjadi karena adanya gangguan kelainan hormon, penggunaan obat obatan dan gaya hidup yang kurang baik seperti konsumsi alkohol yang berlebihan dan kebiasaan merokok (Hartono, 2004).

Pada proses *remodeling*, tulang secara terus menerus mengalami penyerapan dan pembentukan. Sel yang bertanggung jawab untuk pembentukan tulang disebut osteoblas sedangkan sel osteoklas bertanggung jawab untuk penyerapan tulang. Pembentukan tulang terutama terjadi pada masa pertumbuhan sedangkan keseimbangan pembentukan dan penyerapan tulang terjadi pada usia

Universitas Indonesia

sekitar 30-40 tahun. Keseimbangan ini mulai bergeser dan lebih condong ke arah penyerapan tulang, ketika wanita mencapai menopause dan pria mencapai usia 60 tahun. Pada osteoporosis terjadi abnormalitas *bone turnover*, dimana proses penyerapan tulang lebih banyak dari pada proses pembentukan tulang (Kawiyana, 2009).

Proses remodeling dikendalikan oleh hormon endokrin yaitu hormon paratiroid yang meningkatkan resorpsi tulang, dan hormon estrogen yang menyebabkan resorpsi tulang menjadi lambat (Ganong, 2008). Defisiensi estrogen endogen, sehingga dapat memberikan efek estrogenik maupun estrogen pada wanita pascamenopause menginduksi produksi mediator yang mempengaruhi aktifitas sel osteoklas sehingga terjadi peningkatan proses penyerapan tulang dibanding pembentukan tulang (Manolagas, 1995; Kawiyana, 2009). Estrogen dilaporkan dapat meningkatkan *apoptosis* osteoklas dan menurunkan sitokin yang berfungsi meningkatkan aktivitas osteoklas. Sebaliknya defisiensi estrogen menyebabkan meningkatnya umur osteoklas dan memperpendek umur osteoblas sehingga terjadi keseimbangan negatif pada tulang (Chiechi, 2005).

Salah satu alternatif pencegahan dan pengobatan ketidak-seimbangan resorpsi dan formasi tulang adalah terapi sulih hormon (TSH) estrogen. Namun penggunaan TSH estrogen sintetik dapat menimbulkan efek samping, serta resiko kanker payudara dan endometrium (Speroff dan Fritz 2005, Bjarnason dan Christiansen, 2005). Selain diperlukan pemantauan yang cermat saat terapi maupun pasca terapi, sediaan hormon estrogen relatif mahal untuk pemakaian jangka panjang (Wiyasa et al, 2008).

Kondisi ini dapat diatasi dengan penggunaan sediaan yang berkhasiat serupa dengan estrogen alami, cukup aman pemakaiannya, terjangkau oleh masyarakat banyak dan relatif dapat dikonsumsi dalam jangka waktu lama. Sediaan tersebut dapat berasal dari tumbuh tumbuhan yang termasuk kelompok

fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan komponen tumbuhan yang memiliki aktivitas biologi dan struktur molekul menyerupai 17- β *estradiol*. Senyawa tersebut dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan antiestrogenik. Tiga unsur utama fitoestrogen adalah isoflavon, *coumestan* dan lignan (Mazur, 1998; Wiyasa et al, 2008).

Sumber isoflavon antara lain tanaman polong polongan (*Leguminuceae*) terutama kedelai, dengan unsur utama *genistein* dan *daidzein*. Studi terbaru membuktikan isoflavon merupakan *selective estrogen reseptor modulator* (SERM) karena dapat bersifat sebagai estrogen pada jaringan tertentu seperti pada tulang dan bersifat sebagai anti estrogen pada jaringan lainnya yaitu payudara dan uterus (Hidayat et al, 2003; Wiyasa et al, 2008).

Leunca merupakan sejenis tanaman terung terungan. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid / triterpenoid. Berdasarkan kandungan senyawa kimia yang terdapat pada leunca, maka buah leunca dijadikan sebagai bahan penelitian untuk mengetahui apakah didalam buah leunca terdapat senyawa fitoestrogen yang berguna sebagai antiosteoklastogenesis terhadap sel RAW 264.

Sel RAW 264 merupakan *cell line* yang berasal dari *leukemic* monosit tikus BALB/c yang diinduksi dengan virus *Abelson Leukemia virus*. Morfologi sel RAW 264 adalah *macrophage-like* (Riken, n.d). Sejak ditemukannya RANKL sebagai faktor diferensiasi osteoklas, maka dimulai penelitian osteoklastogenesis *in vitro* menggunakan sel RAW 264 dengan induksi RANKL sehingga terbentuk osteoklas dalam waktu 4 hari (Ishihada et al., 2002).

1.2 Perumusan Masalah

Dalam penelitian ini akan dikaji kemungkinan pemanfaatan buah Leunca sebagai antiosteoklastogenesis, untuk itu beberapa permasalahan berikut akan dievaluasi , yaitu :

- a) Kandungan senyawa kimia apa yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% buah Leunca yang termasuk dalam kelompok fitoestrogen.
- b) Apakah ekstrak etanol 96% buah leunca mempengaruhi proliferasi sel RAW 264.
- c) Apakah ekstrak etanol 96% buah leunca dapat berperan sebagai fitoestrogen dan digunakan sebagai antiosteoklastogenesis.
- d) Apakah ekstrak etanol 96% buah leunca dapat mempengaruhi ekspresi protein NFAT2.

1.3 Jenis penelitian

Penelitian dilakukan eksperimental secara *in vitro* dengan metode pengujian MTT, pengujian osteoklastogenesis dan Western blot.

1.4 Hipotesis

- a) Ekstrak etanol 96% buah Leunca mengandung senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok fitoestrogen
- b) Ekstrak etanol 96% buah Leunca dapat mempengaruhi proliferasi sel RAW 264
- c) Ekstrak etanol 96% buah Leunca dapat menghambat diferensiasi osteoklas dari sel RAW 264
- d) Pemberian ekstrak etanol 96% buah Leunca pada sel RAW 264 dapat menurunkan ekspresi protein NFAT2

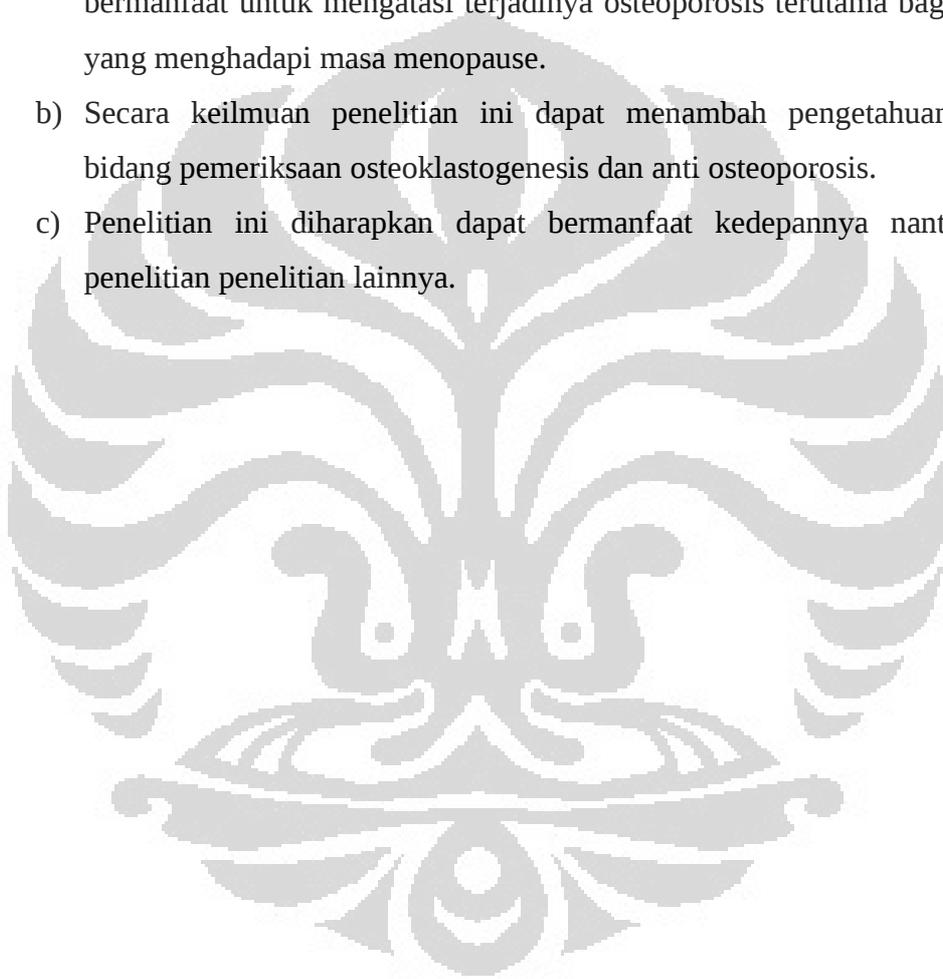
1.5 Tujuan penelitian

- a. Mengetahui kandungan senyawa kimia dalam buah Leunca yang termasuk dalam golongan fitoestrogen.
- b. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% buah leunca (*Solanum Nigrum.L*) terhadap proliferasi sel RAW 264 *in vitro*.
- c. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% buah leunca (*Solanum Nigrum.L*) terhadap efek penghambatan osteoklastogenesis secara *in vitro*.
- d. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% buah Leunca terhadap ekspresi

protein NFAT2 pada sel RAW 264.

1.6 Kontribusi Penelitian

- a) Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menemukan tanaman yang dapat berkhasiat sebagai antiosteoklastogenesis, dan diharapkan bermanfaat untuk mengatasi terjadinya osteoporosis terutama bagi wanita yang menghadapi masa menopause.
- b) Secara keilmuan penelitian ini dapat menambah pengetahuan dalam bidang pemeriksaan osteoklastogenesis dan anti osteoporosis.
- c) Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat kedepannya nanti untuk penelitian penelitian lainnya.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Osteoporosis

Osteoporosis adalah suatu keadaan dimana masa tulang atau kepadatan tulang per unit volume tulang berkurang (*decrease bone density and mass*), mikro arsitektur jaringan tulang menjadi jelek dan terjadi peningkatan fragilitas tulang dengan resiko terjadinya patah tulang (Kawiyana, 2009). Tulang merupakan jaringan yang tersusun oleh sel dan didominasi oleh matrix kolagen ekstraselular (type I collagen) yang disebut sebagai osteoid. Osteoid ini di mineralisasi oleh deposit kalsium hydroxyapatite, sehingga tulang menjadi kaku dan kuat. Osteoblast, merupakan sel yang bertanggung jawab atas pembentukan matriks tulang, oleh karena itu banyak ditemukan pada tulang yang sedang tumbuh. Osteosit merupakan komponen sel utama dalam jaringan tulang yang berperan penting dalam pembentukan matriks tulang dengan cara membantu pemberian nutrisi pada tulang. Osteoklas berasal dari sel monosit makrofag dan merupakan sel multinukleat raksasa dengan ukuran berkisar antara 20 μ m-100 μ m dengan inti sampai mencapai 50 buah. Osteoklas mempunyai kemampuan mengikis tulang dan mampu memperbaiki tulang bersama osteoblast. Sel osteoprogenitor merupakan sel mesenchimal primitive yang menghasilkan osteoblast dan osteosit selama pertumbuhan tulang pada permukaan dalam jaringan tulang (Derek,S.,Kalangi,S.J.R., dan Wangko,S., 2007).

Pembentukan tulang terutama terjadi pada masa pertumbuhan sedangkan keseimbangan pembentukan dan penyerapan tulang terjadi pada usia sekitar 30-40 tahun. Keseimbangan ini mulai terganggu dan condong lebih berat ke arah penyerapan tulang ketika wanita mencapai menopause dan pria mencapai usia 60 tahun. Pada osteoporosis akan terjadi abnormalitas *bone turnover*, yaitu terjadinya proses penyerapan tulang (*bone resorption*) lebih banyak dari pada proses pembentukan tulang (*bone formation*) (Kawiyana, 2009).

Universitas Indonesia

2.2 Osteoklastogenesis

Osteoklastogenesis dapat terjadi akibat defisiensi estrogen. Estrogen mempunyai efek terhadap sel osteoklas, dan memberikan pengaruh secara langsung maupun tidak langsung terhadap proses diferensiasi, aktivasi, maupun apoptosis dari osteoklas. Osteoklastogenesis dapat di stimulasi oleh sitokin IL-1, IL-3, IL-6, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin M* (OSM), *Ciliary Neurotropic Factor* (CNTF), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), dan *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF), dan dihambat oleh sitokin IL-4, IL-10, IL-18, dan interferon-g. Interleukin-6 merupakan salah satu yang perlu mendapatkan perhatian, oleh karena meningkatnya IL-6 terbukti memegang peranan pada terjadinya beberapa penyakit, diantaranya pada remodeling tulang dan penyerapan tulang yang berlebihan baik lokal maupun sistemik (Manolagas SC, 2000).

Defisiensi estrogen akan meningkatkan produksi IL-1, IL-6, dan TNF- α dan lebih lanjut akan diproduksi M-CSF dan RANK-L. RANK-L menginduksi aktivitas JNK1 dan *osteoclastogenic activator protein-1*, faktor transkripsi c-Fos dan c-Jun. Dalam diferensiasi dan aktivasinya estrogen menekan ekspresi RANK-L, M-CSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK, dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK. Secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti IL-6, IL-1, TNF- α , IL-11 dan IL-7. Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- β yang akan menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis. Efek langsung dari estrogen terhadap osteoklas adalah melalui reseptor estrogen pada sel osteoklas, dengan menekan aktivasi c-Jun, sehingga mencegah terjadinya diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menekan aktivasi sel osteoklas dewasa (Yatim dan Faisal, 2003).

Peningkatan kadar dan aktivitas sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- α) secara spontan terjadi apabila fungsi ovarium menurun, misalnya pada masa menopause. Mekanisme secara pasti hubungan penurunan estrogen dengan peningkatan sitokin belum diketahui secara jelas, namun diduga erat hubungannya dengan interaksi dari reseptor estrogen (ER = Estrogen Receptor) dengan faktor transkripsi, modulasi dari aktivitas nitrik-oksida (NO), efek antioksidan, aksi plasma membran, dan perubahan dalam fungsi sel imun (Yatim dan Faisal, 2003).

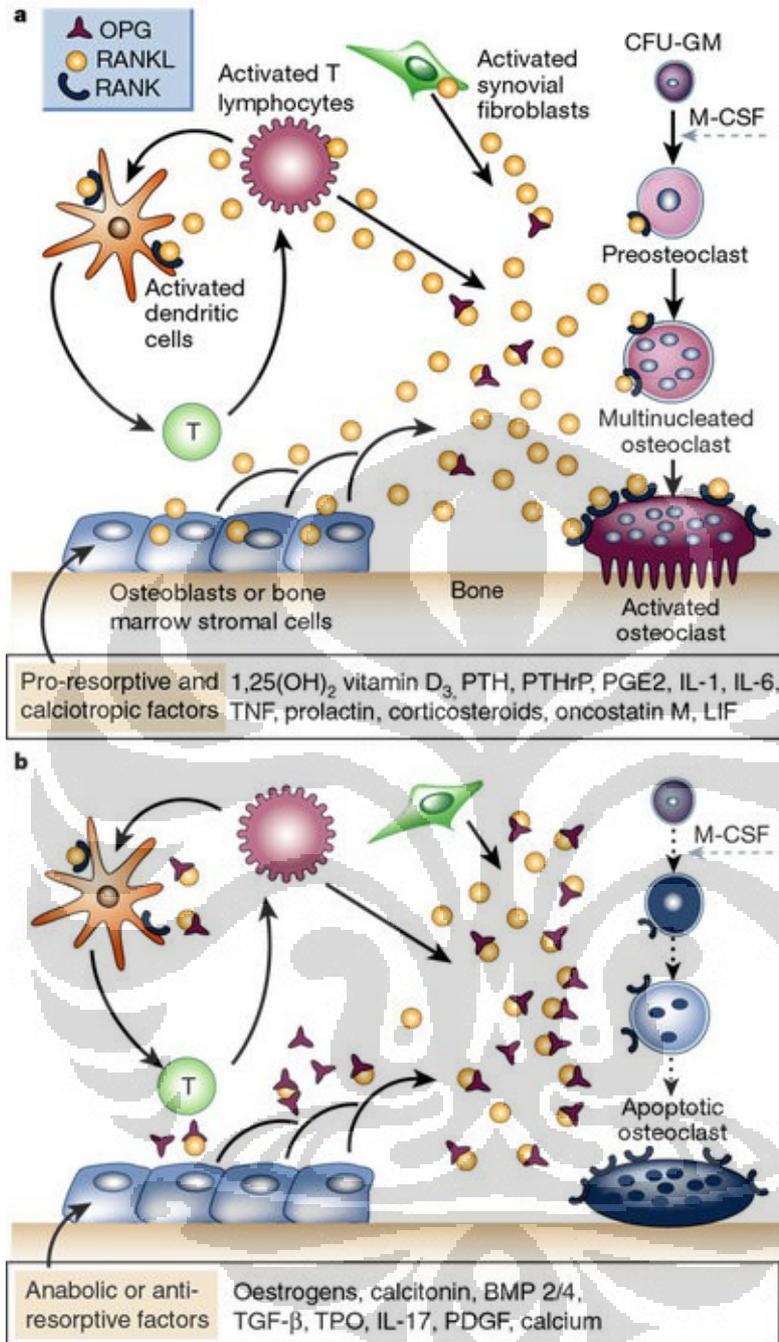
Pada studi klinis dan eksperimental ditemukan adanya hubungannya antara penurunan massa tulang dengan peningkatan sitokin proinflamasi dan ditemukan pula terjadinya diferensiasi turunan sel monosit menjadi sel osteoklas dewasa/matang yang dirangsang oleh *tumor necrosis factor related factor* yang disebut, RANK-L atau dengan nama lain, OPGL atau ODF (*Osteoclast Differentiation Factors*). Dikatakan pula bahwa RANK-L memegang peran yang sangat esensial dalam pembentukan sel osteoklas dan lebih lanjut akan menyebabkan penyerapan tulang. Melalui studi genetik dan biokemis RANK-L mengatur diferensiasi osteoklas, dengan mengaktifkan reseptor RANK, melalui peran dari faktor transkripsi c-Jun. Sebuah studi dengan menggunakan tikus mendapatkan bahwa estrogen (E2) menyebabkan menurunnya osteoklastogenesis, akibat menurunnya respons prekursor osteoklas terhadap RANK-L yang lebih lanjut akan menurunkan aktivasi dari enzim Jun N-kinase 1 (JNK1), yang selanjutnya akan mengakibatkan menurunnya produksi faktor transkripsi osteoklastogenik c-Fos dan c-Jun (Yatim dan Faisal, 2003).

Molekul yang dapat diblokade aktivitasnya oleh OPG disebut OPG ligand atau ODF yang lebih dikenal dengan RANK-Ligand, yang berperan penting sebagai kunci mediator dalam osteoklastogenesis. RANK-L dan osteoprotegerin merupakan suatu parakrin yang mengatur metabolisme tulang dan fungsi vaskuler. RANK-L merupakan suatu mediator yang meningkatkan penyerapan tulang pada wanita *pascamenopause*. Terakhir dibuktikan bahwa RANK-L merupakan salah

satu faktor resiko secara biomolekuler terhadap terjadinya osteoporosis pada wanita *pascamenopause* defisiensi estrogen.

Terjadinya diferensiasi sel osteoklas dari hemopoitik progenitor bergantung pada reseptor yang terdapat pada membran sel osteoklas yang disebut RANK yang terbukti pengaturan transkripsinya oleh NF κ B. Sel stroma osteoblastik mengekspresikan pada permukaan RANK-L. Selanjutnya RANK-L berikatan dengan RANK pada permukaan sel osteoklas progenitor untuk merangsang diferensiasi sel tersebut. Selain itu sel stroma osteoblas juga mensekresi suatu substansi yang larut dan mengambang, yang berfungsi sebagai reseptor dan dapat juga mengikat RANK-L yang disebut OPG. OPG dapat beraksi sangat poten sebagai penghambat pembentukan osteoklas dengan cara berikatan dengan RANK-L, sehingga mencegah interaksi antara RANK-L dengan RANK pada progenitor osteoklas.

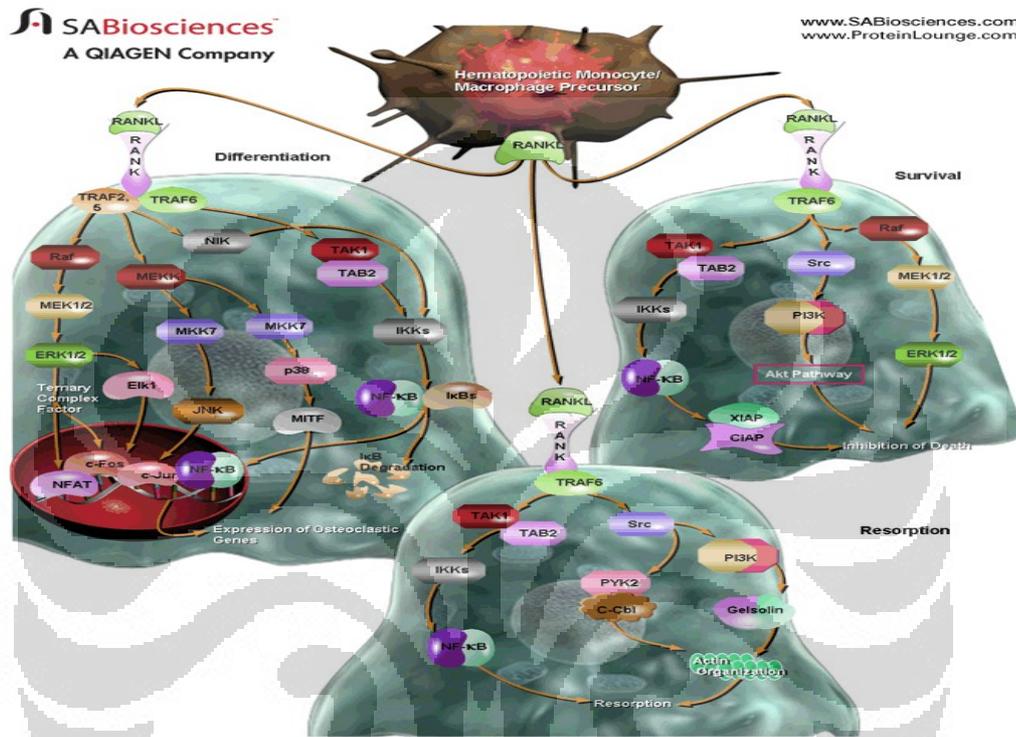
RANK-L, RANK, dan OPG merupakan molekul esensial yang merupakan protein superfamili dari TNF-TNFR. RANK dan RANK-L merupakan protein yang menyerupai molekul sitokin yang berikatan pada membran (*membrane-bound cytokine-like molecules*). Sedangkan OPG yang sangat poten sebagai penghambat proses osteoklastogenesis dan penyerapan tulang baik *in vitro* maupun *in vivo*, melalui kemampuannya sebagai reseptor umpan (*decoy receptor*) yang dapat berikatan dengan RANK-L, sehingga menghambat terjadinya interaksi antara RANK-L dan RANK. Dalam implikasinya RANK-L merangsang terjadinya fusi dari sel prekursor yang mononukler menjadi sel multinuklear, kemudian memacu untuk berdiferensiasi menjadi sel osteoklas dewasa, perlengketannya pada permukaan tulang, dan aktivitasnya menyerap tulang, dan bahkan lebih lanjut mempertahankan kehidupan osteoklas dengan cara memperlambat terjadinya apoptosis. RANK-L diekspresi paling banyak oleh osteoblas dan sel lapisan mesenchim. Selain itu diekspresi juga oleh sel periosteal, kondrosit, sel endotelial, dan juga oleh sel T aktif (Yatim dan Faisal, 2003).



(Boyle, Simonet and Lacey, 2003)

Gambar 2.1 : Mekanisme aktifitas ekspresi RANKL oleh berbagai tipe sel dalam menginduksi osteoklastogenesis yang diikuti dengan mengikat RANK pada prekursor osteoklas (a). Sebaliknya OPG terhadap RANKL relatif menghambat

pengikatan RANKL dengan RANK yang menyebabkan berkurangnya osteoklastogenesis dan osteoklas yang telah ada sebelumnya (b).



(<http://www.sabiosciences.com>).

Gambar 2.2 Pathway Central RANK

2.3 Efek estrogen

Pengobatan wanita *postmenopause* dengan estrogen akan menghentikan kehilangan tulang (perlindungan terhadap terjadinya osteoporosis) pada wanita usia 50, 60 atau 70 tahun. Pengobatan dengan estrogen memberikan gambaran efek terapi pada kasus osteoporosis. Estrogen dianggap dapat menghambat resorpsi tulang. Terapi pemberian estrogen sebagai pencegahan terhadap osteoporosis didapat berdasarkan observasi sebagai berikut :

1. Kejadian osteoporosis meningkat *postmenopause*.
- 2.. Wanita yang mengalami ooforektomi bilateral memperlihatkan gejala osteoporosis lebih dini dan hebat.
3. Penderita yang mengalami osteoporosis umumnya berkurang dengan pemberian estrogen.

Pemberian estrogen merupakan dasar pencegahan dan pengobatan kehilangan tulang *postmenopause*. Pada penelitian terdahulu, Telah dibuktikan bahwa terdapat korelasi bermakna antara kadar estradiol dengan persentasi kenaikan densitas tulang belakang 1 tahun setelah pemberian implan 75 mg estradiol dan 100 mg testosteron. Pemberian estrogen oral, transdermal atau implan kesemuanya dapat meningkatkan densitas tulang secara bermakna dan secara epidemiologik dibuktikan bahwa terapi ini menurunkan angka kejadian patah tulang oleh karena osteoporosis pada panggul dan tulang punggung. Bagaimana estrogen dapat mencegah kehilangan tulang masih belum ada kesepakatan, dan masih merupakan teori.

Kemungkinan estrogen mencegah osteoporosis terjadi dengan cara sebagai berikut:

1. Estrogen menempati reseptor osteoklas yang akan mempengaruhi fungsi osteoklas dalam menurunkan kehilangan tulang.
2. Estrogen menurunkan kecepatan perubahan tulang normal yang menyebabkan efek positif terhadap keseimbangan kalsium.
3. Estrogen akan memperbaiki absorpsi kalsium.
4. Estrogen mengatur produksi interleukin 1 dan 6 yang merupakan "*bone resorbing*". Estrogen juga mengatur bahan-bahan yang merangsang pembentukan tulang seperti *Insulin like growth factor* I dan II, serta *Growth factor β* .
- 5 Estrogen merangsang sintesa kalsitonin yang dapat menghambat resorpsi tulang.

6. Estrogen meningkatkan reseptor vitamin D di osteoblas.
(Kawiyana, 2009).

2.4 Fitoestrogen

Fitoestrogen adalah zat yang terdapat pada tumbuhan dan memiliki struktur kimia serta fungsi yang menyerupai estrogen. Ada beberapa jenis fitoestrogen, antara lain :

1. Isoflavon yang terdiri atas genistein dan daidzein.

Genistein dibentuk dari *biochanin A* dan di metabolisme menjadi p-etilfenol estrogen inaktif, sedangkan daidzein dibentuk dari formononetin oleh enzim hidrolitik bakteri lumen usus dan di metabolisme menjadi equol dan o-desmetilangolesin (O-DMA).

Isoflavon terutama ditemukan pada kacang kedelai, buncis, dan kacang panjang.

2. Lignan yang di metabolisme oleh mikroflora usus menjadi enterodiol dan enterolakton. Banyak terdapat pada padi, sereal, bawang putih, brokoli, wortel, jeruk, dan apel.
3. Coumestan yang banyak ditemukan pada kecambah, kacang kacangan, dan biji bunga matahari (Bustamam, 2008).

Fitoestrogen mempunyai afinitas yang tinggi terhadap reseptor β , tetapi mempunyai efek estrogenik yang lemah yaitu 1/100 lebih kecil dari pada estrogen endogen. Sifat fitoestrogen adalah paradoksal, artinya mempunyai efek estrogenik dan antiestrogenik (antagonis dengan estrogen). Pada keadaan kadar estrogen tinggi, fitoestrogen akan tetap berikatan dengan reseptor dan menghalangi estrogen untuk berikatan dengan reseptor. Sebaliknya pada keadaan defisiensi estrogen pada menopause, fitoestrogen dominan dan akan berikatan dengan reseptor estrogen yang kosong dan menimbulkan efek estrogenik sehingga dapat di manfaatkan untuk mengatasi keluhan menopause (Bustamam, 2008).

Sejumlah penelitian membuktikan bahwa fitoestrogen berpotensi mencegah hilangnya massa tulang, diantaranya :

1. Penelitian *invitro* tentang pengaruh fitoestrogen terhadap kultur tulang, menunjukkan :
 - a. Genistein menghambat resorpsi tulang.
Genistein bekerja menghambat tirosin kinase C sehingga menghambat transpor HCl osteoklas.
 - b. Daidzein menurunkan jumlah sel progenitor osteoklas.
 - c. Genistein, daidzein, dan ekstrak kedelai meningkatkan proliferasi sel osteoblast.
 - d. *Genistein* dan daidzein menstimulasi osteogenesis, hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah alkaline fosfatase dan osteokalsin.
2. Penelitian *invivo* pada pengujian osteoporosis *pascamenopause* menunjukkan :
 - a. Pemberian genistein dapat mencegah hilangnya massa tulang. Genistein berhubungan dengan tingginya pembentukan tulang yang diukur melalui kadar osteokalsin dan jumlah sel osteoblas.
 - b. *Ovariectomy* menurunkan densitas tulang. Perubahan tersebut dapat dicegah dengan pemberian genistein dan daidzein.
 - c. Tikus yang mengalami *ovariectomy* dapat meningkatkan densitas tulangnya jika diberi genistein dan latihan fisik.
3. Penelitian observasional tentang asupan fitoestrogen/ kedelai , tulang dan metabolisme tulang menunjukkan :
 - a. Pada wanita *pascamenopause* dengan asupan kedelai tinggi mempunyai densitas tulang yang lebih tinggi dari pada wanita dengan asupan kedelai rendah.
 - b. Pada wanita *premenopause* tidak ditemukan perbedaan signifikan antara densitas tulang dengan asupan kedelai.
4. Penelitian intervensi menggunakan fitoestrogen menunjukkan :
 - a. Peningkatan densitas tulang pada pemberian isoflavon/ kedelai, tetapi ada penelitian lain yang tidak menunjukkan adanya perubahan densitas tulang.

- b. Pada pemberian isoflavon/kedelai, penanda pembentukan tulang meningkat, sebaliknya penanda resorpsi tulang menurun, tetapi ada hasil penelitian lain yang tidak menunjukkan perubahan kadar penanda (Setchell, Lydeking, and Oslen, 2003).
- c. Pada 62 wanita menopause yang mengkonsumsi kedelai selama setahun menunjukkan penanda pembentuk tulang meningkat (Arjmandi, Lucas, Khalil et al 2005).
- d. Hasil pengukuran antropometri dan pemeriksaan beberapa indikator metabolisme tulang menunjukkan bahwa konsumsi protein kedelai pada 15 wanita 45 – 65 tahun yang diberi protein kedelai 35 gram per hari selama 12 minggu menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dapat mencegah degradasi kolagen sebagai protein utama matriks tulang (Roudsari et al, 2005).
- e. Pada 66 wanita yang mengkonsumsi 88 mg isoflavon per hari menunjukkan bahwa isoflavon dapat meningkatkan densitas tulang lumbal (Potter et al, 1998). Namun penelitian terhadap 202 wanita *pascamenopause* yang mengkonsumsi suplemen 99 mg isoflavon selama 12 bulan, tidak memperlihatkan bahwa suplemen tersebut meningkatkan densitas tulang jika dimulai pada usia lebih dari 60 tahun (Kreijkamp et al, 2004).

2.4.1 Dosis dan efek samping Fitoestrogen

Oleh karena fitoestrogen direkomendasikan sebagai suplemen makanan, penting untuk memperhatikan standar yang berkaitan dengan manufaktur dan kandungan isoflavon. Namun belum ada rekomendasi yang spesifik tentang dosis tersebut. Disarankan kandungan fitoestrogen untuk wanita dengan sindrom klimakterik adalah 40 – 100 mg yang terdiri dari genistein, daidzein, glycitein, formononetin, biochacin A. Pada kebanyakan peneliti klinis digunakan 20 – 80 g protein kedelai perhari, sementara penelitian populasi menunjukkan kebanyakan orang Jepang rata-rata mengkonsumsi 39,2 g protein kedelai per hari. Rekomendasi dosis tersebut berdasarkan diet orang Asia dan secara toksikologi

aman (Tempfer et al, 2007).

Sampai saat ini tidak ada laporan efek samping yang serius tentang konsumsi fitoestrogen jangka pendek dan jangka panjang. Beberapa efek yang tidak menyenangkan antara lain: konstipasi, diare, atau masalah gastrointestinal lainnya karena peningkatan konsumsi serat (Bustamam, 2008).

2.4.2 Mekanisme kerja fitoestrogen

Fitoestrogen mempunyai struktur yang menyerupai estrogen, maka mekanisme kerjanya sama dengan estrogen. Di dalam tubuh terdapat estrogen yaitu estradiol, estrone dan estriol. Estradiol disintesis oleh sel theca dan granulosa ovarium, sedangkan estrone dan estriol disintesis di hati. Pada wanita menopause kadar estradiol menurun, estrone adalah estrogen utama pada wanita menopause (Bustamam, 2008).

Fitoestrogen mayor seperti isoflavon dan coumestan struktur kimianya sama dengan 17β -estradiol, sehingga dapat dipakai sebagai bahan estrogen alami yang paling potensial. Molekul-molekul fitoestrogen dapat menempati reseptor estrogen, tetapi lama penempatan atau afinitasnya terhadap reseptor lebih kecil bila dibandingkan dengan 17β -estradiol (Anderson and Garner, 1998).

2.5. Leunca (*Solanum nigrum* L.)

2.5.1 Nama Tanaman

Nama daerah : Leunca (Sunda), Ranti (Jawa), anti, Bobosa (Maluku)

Nama asing : *long kui* (Tiong Hoa), *enab el-deeb* (Arab)

Nama latin : *Solanum nigrum* L.

Sinonim : *S. fistulosum* Rich, *S. nodiflorum* Jacq. *Solanum guineense* (L)

Lam.

2.5.2. Klasifikasi tumbuhan

Kingdom : *Plantae* (Tumbuhan)
Subkingdom : *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : *Spermatophyta* (Menghasilkan biji)
Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)
Kelas : *Magnoliopsida* (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas : *Asteridae*
Ordo : *Solanales* (suku terung-terungan)
Famili : *Solanaceae*
Genus : *Solanum*
Spesies : *Solanum nigrum* L (Kartesz, 2004).

2.5.3. Deskripsi Tumbuhan

Tanaman ini termasuk ke dalam golongan semak, dengan tinggi lebih kurang 1,5 m. Memiliki akar tunggang dengan warna putih kecoklatan. Batang tegak, berbentuk bulat, lunak, dan berwarna hijau. Berdaun tunggal, lonjong, dan tersebar dengan panjang 5-7,5 cm ; lebar 2,5-3,5 cm. Pangkal dan ujung daun meruncing dengan tepi rata. Pertulangan daun menyirip. Daun mempunyai tangkai dengan panjang ± 1 cm dan berwarna hijau. Bunga berupa bunga majemuk dengan mahkota kecil, bangun bintang, berwarna putih, benang sari berwarna kehijaunan dengan jumlah 5 buah. Tangkai bunga berwarna hijau pucat dan berbulu. Buah berbentuk bulat, jika masih muda berwarna hijau, dan berwarna hitam mengkilat jika sudah tua ukurannya kira-kira sebesar kacang kapri Biji berbentuk bulat pipih, kecil-kecil, dan berwarna putih.

2.5.4. Kandungan Kimia dan Manfaat

Leunca telah banyak digunakan diberbagai negara sebagai terapi herbal. Beberapa manfaat leunca secara empiris dilaporkan dari beberapa negara. Di Eropa leunca digunakan untuk mengatasi konvulsi di Jerman Leunca digunakan sebagai obat tidur khususnya untuk anak anak (Edmonds and Chweya, 1997).

Untuk penggunaan luar, daun segarnya bisa digunakan untuk menghilangkan nyeri dan peradangan. Jus daun leunca juga digunakan sebagai obat kurap, gout, sakit telinga. Jus daun leunca ini juga dapat digunakan sebagai obat kumur dan pembersih mulut jika dicampurkan dengan cuka. Di Amerika Utara, masyarakat Indian menggunakan rebusan akar tanaman leunca sebagai obat cacangan pada anak, dan daun yang luruh di campur dengan minyak di gunakan sebagai tapel untuk menutupi luka. Di Amerika Selatan leunca digunakan sebagai obat untuk mengatasi gangguan karena kecanduan narkotika dan alkohol (Edmonds and Chweya, 1997).

Di India seluruh tanaman leunca digunakan sebagai antiseptik dan antidisentri. Rebusan tanaman ini digunakan sebagai enema pada anak anak dengan gangguan pencernaan. Tanaman ini juga digunakan untuk mengobati pustula pada anthrax, diuretik, laksatif dan antispasmodik dan narkotik. Ekstrak segar tanaman ini juga digunakan sebagai obat sirosis hepatitis, dan sebagai antidot pada penggunaan opium (Edmonds and Chweya, 1997).

Di Cina daun leunca digunakan sebagai obat detoks, diuretik, antihipertensi, antikanker dan infeksi saluran kemih. Di Jepang Saijo et al, meneliti buah yang masih muda yang mengandung glikosida steroid sebagai antikanker, di mana glikosida ini mungkin adalah solasonin, solamargine, diosgenin dan solasodin (Edmonds and Chweya, 1997).

Di Hawaii tumbuhan dari spesies *Solanum americanum* digunakan sebagai obat gangguan saluran pernafasan, erupsi kulit, luka, dan trakhoma. Selain itu di Mauritius daun leunca digunakan sebagai tapal untuk nyeri abdomen dan peradangan pada kandung kemih. Di Afrika Timur buah yang jelek di kunyah dan ditelan untuk pengobatan ulkus lambung. Beberapa variasi tanaman juga

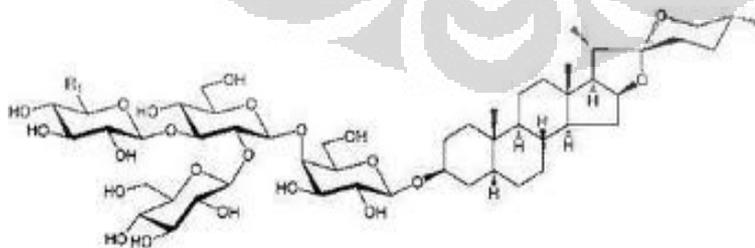
dipercaya untuk mengobati malaria, black fever, disentri, dan infeksi saluran kemih (Edmonds and Chweya, 1997).

Everist, 1974; Wetter dan Phipps, 1979; Cooper dan Johnson, 1984 menyatakan leunca mengandung solanine, solasonine, solamargine dan chaconine (Edmonds and Chweya, 1997). Serta diketahui pada buah leunca yang belum matang mengandung steroidal alkaloid solasodine serta steroidal saponin diosgenin dan tigogenin. Pada buah leunca (*Solanum nigrum* L) yang masih hijau (belum matang) terdapat kandungan yang signifikan dari diosgenin (1,2%) dan solasodine (0,65%) (Istiaji, n.d).

Dalimarta dalam bukunya Atlas tanaman Obat Indonesia menyatakan kandungan leunca antara lain, glucoalkaloids solanine, solasonine, solamargine, juga terdapat solanigrine, solanigridine, diosgenine, tigogenine, sedikit atropine, saponin, resin, zat samak, minyak lemak, mineral (kalsium, fosfor, besi), serta vitamin (A dan C). Buah muda mengandung glycoalkaloid yang beracun.

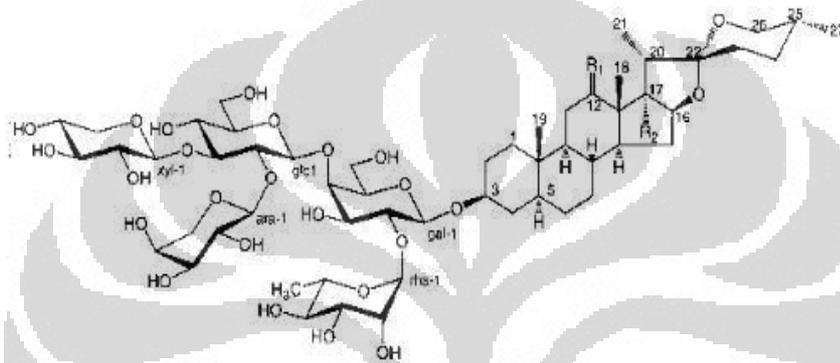
Solasodine adalah aglycone dari solasonine dan solamargine. Solanidine adalah aglycone dari solanine. Solasodine mempunyai efek menghilangkan sakit, menurunkan panas, anti radang, anti syok. Sedangkan solamargine dan solasonine merupakan antibakteri dan solanine sebagai antimitosis (Dalimarta, 2008).

Saijo *et al.* (1982) meneliti pada buah Leunca (*Solanum nigrum* L) yang belum matang mengandung steroidal glikosida yaitu proto-desgalactotigonin desgalactotigonin dan tigogenin3-O- β -D-gluco-pyranosyl-(1->2)-[β -D-gluco-pyranosyl-(1->3)]- β -Dgluco-pyranosyl-(1->4)- β -D-galactopyranoside.



Gambar 2.3 Struktur Kimia desgalactotigonin (R=H) dan tigogenin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[β-D-glucopyranosyl-(1->3)]-β-Dglucopyranosyl-(1->4) galactopyranoside (R=CH₂OH) (Ikeda, 2000)

Kemudian pada tahun 2000, Ikeda mengisolasi dari seluruh tanaman leunca (*Solanum nigrum* L) dan diperoleh 2 senyawa steroidal oligoglikosida yang beraktivitas sitotoksik dan antiherpes yaitu nigrumnin I dan nigrumnin II .



Gambar 2.4 : Struktur Kimia Nigrumnin I ($R_1 = H ; R_2 = H$) dan Nigrumnin II ($R_1 = O ; R_2 = OH$) (Ikeda, 2000).

Selanjutnya dilaporkan bahwa β-2-solamargine yang diisolasi dari *Solanum nigrum* L, terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel tumor HT-29 (kolon), HCT-15 (kolon), LNCaP (prostat), PC-3 (prostat), T47D (payudara), dan MDA-MB-231 (payudara) dalam uji *in vitro*. Sementara itu dari uji sitotoksik mengindikasikan bahwa kandungan utama senyawa antikanker pada *Solanum nigrum* L adalah solamargine. Solamargin diketahui dapat memodulasi protein TNFRs dan bcl-2, dan potensial sebagai agen antikanker untuk sel kanker yang resisten TNFs and Bcl-2 . Selain itu solamargine menurunkan regulasi HER2 dan meningkatkan regulasi Fas dan ekspresi tumor necrosis factor receptor (TNFR)

sehingga memacu jalur apoptosis sel yang termediasi mitokondria dan mensensitisasi *nonsmall cell lung cancer* (NSCLC) H441 dan A549. Solanin yang diisolasi dari leunca mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker hepar HepG2 melalui penurunan ekspresi Bcl-2 yang ditunjukkan melalui *western blot* (Jain,N; Sharma,A; Gupta,S; Sarethy,I.P; Gabrani,R, 2011).

Hasil analisa determinasi buah leunca menunjukkan kadar abu total 6,36%; kadar abu tidak larut asam 5,95%, kadar abu larut air 6,56%, kadar sari larut air 3,12%; kadar sari larut etanol 3,97%; kadar air 6,94% (v/b), susut pengeringan 9,50%. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid (Edmonds and Chweya, 1997).

2.5.5 Nilai gizi Leunca

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menilai nilai gizi tanaman leunca. Spesies ini merupakan sayur sayuran bergizi. Daunnya mengandung cukup banyak protein, asam amino, mineral termasuk kalsium, zat besi, fosfor, Vitamin A dan C, lemak, serat dan metionin.

Tabel 2.1 Kandungan Nutrisi Buah leunca (*Solanum nigrum. L*)

Nutrient per 100-g <i>edible portio</i>	<i>Range of values</i>
---	------------------------

Air (%)	83-91
Protein (g)	2.8-5.8
Serat (g)	0.6-1.4
Lemak (g)	0.8
Karbohidrat (g)	3.3-5.0
Kalori (kcal)	38
Ekstrak etanol 96% eter (g)	38-44
Total abu (g)	3.3-8.8
Zat besi (mg)	1.0-4.2
Kalsium (mg)	99-442
Phospor (mg)	75
Beta-carotene (mg)	1.7-11.6
Asam ascorbat (mg)	20-158
Oxalat (mg)	58.8-98.5
Nitrate-N (mg)	29-400
Total phenolik (mg)	68.3-73.4

(Edmonds and Chweya, 1997).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat yang semula berada di dalam ditarik oleh cairan penyari sehingga zat-zat aktif larut dalam cairan penyari. Sedangkan ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati (Departemen kesehatan RI, 2008).

Metode dasar penyarian adalah maserasi, perkolasi dan soxhletasi. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi serta kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ditjen POM, 1986).

Maserasi merupakan proses penyarian yang paling sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia halus (Voight, 1994). Teknik penyarian dengan metode maserasi dilakukan dengan merendam

simplisia dengan cairan penyari tertentu. Karena perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang pekat didesak ke luar. Peristiwa ini terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Ansel, 1989).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang larut dalam cairan penyari dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. Cairan penyari yang biasa digunakan untuk maserasi adalah pelarut yang bersifat non polar, semipolar dan polar. Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan bentuk dan faktor cairan penyari yang baik. Penyari harus memenuhi kriteria, yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif (hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki) dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Ansel, 1989).

Pada maserasi, sejauh mungkin dihindari penggunaan logam berat tanpa lapis karena dapat membentuk senyawa kompleks dengan kandungan kimia tanaman yang mempunyai gugus ortohidroksi atau hidroksikarbonil dalam molekulnya, misalnya flavonoid, antosianin, tanin dan senyawa fenol lain (Ansel, 1989). Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaan yang lama dan penyariannya kurang sempurna. Serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan dalam wadah atau bejana bermulut besar, ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan serbuk simplisia (Ansel, 1989).

Proses maserasi selesai bila keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voight, 1994). Pada penyarian dengan maserasi perlu dilakukan pengadukan untuk meratakan

konsentrasi larutan di luar butir serbuk simplisia sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan di luar sel (Bustamam, 2008).

Voight, 1994, menyatakan Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk pemekatan relatif lebih sedikit. Selain itu, etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lainnya adalah sifatnya yang mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim (Bustamam, 2008).

2.7 Skrining Fitokimia

Untuk menelusuri tumbuhan dan senyawa kandungan dari bahan alami yang memiliki aktifitas biologi dapat digunakan dengan skrining fitokimia. Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga, buah, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif, yaitu alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), iridoid, dan sebagainya (Rahmansyah, Sriana, dan Agustin, 2011).

Adapun tujuan utama dari pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan dan mendapatkan kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan. Metode yang digunakan untuk melakukan skrining fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain :

- a. Sederhana
- b. Cepat
- c. Dirancang untuk peralatan minimal
- d. Bersifat selektif untuk golongan senyawa yang dipelajari
- e. Bersifat semi kuantitatif seberapa jauh dapat diketahui batas terendah dari

golongan senyawa yang dipelajari

- f. Dapat memberikan keterangan tambahan ada atau tidaknya senyawa tertentu dari golongan senyawa yang dipelajari

Senyawa fitokimia yang diuji antara lain :

2.7.1 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa organik siklik yang mengandung nitrogen dengan bilangan oksidasi negatif, yang penyebarannya terbatas pada makhluk hidup. Alkaloid juga merupakan golongan zat metabolit sekunder yang terbesar, yang pada saat ini telah diketahui sekitar 5500 buah. Alkaloid pada umumnya mempunyai keaktifan fisiologi yang menonjol, sehingga oleh manusia alkaloid sering dimanfaatkan untuk pengobatan (Rustaman, Abdurahman dan Al Anshori, 2006).

2.7.2 Triterpen

adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik, yaitu skualen. Senyawa ini berstruktur siklik yang nisbi rumit, kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat. Mereka berupa senyawa tak berwarna, berbentuk kristal, seringkali bertitik leleh tinggi dan optis aktif, yang umurnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya.

Triterpen sekurang-kurangnya dapat dibagi menjadi empat golongan senyawa yaitu triterpena sebenarnya, steroid, saponin, dan glikosida jantung. Kedua golongan yang terakhir sebenarnya triterpen atau steroid yang terutama terdapat pada glikosida (Rustaman, Abdurahman dan Al Anshori, 2006).

2.7.3 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Pencarian saponin dalam tumbuhan telah dirangsang oleh kebutuhan akan sumber saponin yang mudah diperoleh dan dapat diubah di laboratorium menjadi sterol hewan yang berkhasiat penting (misalnya kortison, estrogen, kontraseptik dan lain-lain).

Pola glikosida saponin yang mempunyai satuan gula sampai lima dan komponen yang umum ialah asam glukuronat (Rustaman, Abdurahman dan Al Anshori, 2006).

2.7.4 Tanin

Tanin tersebar luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Dalam industri, tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein.

Di dalam tumbuhan, letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak, misalnya bila hewan memakannya, maka reaksi penyamakan dapat terjadi. Reaksi ini menyebabkan protein lebih sukar dicapai oleh cairan pencernaan hewan. Sebagian besar tumbuhan yang banyak bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat (Rustaman, Abdurahman dan Al Anshori, 2006).

2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan tehnik pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi. Hal ini di dukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistim pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Ditjen POM, 1995).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*) dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (*nonvolatil*). KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat dan protein-protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain.

Kelebihan KCKT antara lain:

- a. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- b. Resolusinya baik
- c. Mudah melaksanakannya
- d. Kecepatan analisis dan kepekaannya tinggi
- e. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis.
- f. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
- g. Kolom dapat digunakan kembali
- h. Mudah melakukan rekovery cuplikan. Tekniknya tidak begitu tergantung pada keahlian operator dan reproduibilitasnya lebih baik.
- i. Instrumennya memungkinkan untuk bekerja secara otomatis dan kuantitatif
- j. Waktu analisis umumnya singkat
- k. Kromatografi cair preparatif memungkinkan dalam skala besar .
- l. Ideal untuk molekul besar dan ion (Putra, 2007).

Keterbatasan metode KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrometer massa (MS). Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Munson, 1991).

2.9 Microculture tetrazolium (MTT) / MTT Assay

MTT assay merupakan metode yang penggunaannya sudah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur proliferasi sel secara kolorimetri. Metode MTT relatif cepat, sensitif, akurat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sitotoksik suatu bahan (Doyle and Griffiths, 2000). Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium kuning (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2.5-difeniltetrazolium bromida) (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim *succinic dehydrogenase* dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam SDS 10% berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim dehydrogenase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Semakin besar absorpsi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup (Lindya, 2007).

Pemeriksaan MTT ini mengukur kecepatan proliferasi sel , sehingga bila terjadi reaksi metabolik yang menyebabkan apoptosis/nekrosis maka viabilitas selnya akan berkurang. Kelemahan metode MTT adalah metode ini tidak dapat diaplikasikan untuk sampel yang berwarna karena warna sampel juga akan menyerap sinar UV sehingga absorpsi yang diperoleh menjadi lebih besar dari yang seharusnya dan hasil pengamatan uji menjadi tidak valid (Elly, 2002). Akan tetapi, metode *direct counting* juga memiliki kelemahan antara lain memerlukan waktu relatif lama dan menghitung jumlah sel hidup bersifat subyektif, hasil antara individu akan berbeda sama sekali (Lindya, 2007). Untuk mengatasi kelemahan metode MTT perlu digunakan kontrol ekstrak. Selain itu juga diperlukan kontrol media dan kontrol terhadap jumlah sel yang hidup atau tanpa perlakuan dalam perhitungan. Dengan cara ini absorpsi warna kristal formazan yang larut akan sebanding dengan jumlah sel hidup (Anggriati, 2008).

2.10 Pemeriksaan Western Blot

Western Blotting yang juga dikenal dengan immunoblotting merupakan teknik pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis protein. Prinsip dari tehnik ini adalah pembentukan kompleks antibodi dengan protein melalui ikatan khusus yang diimobilisasi pada membran dan antibodi yang terikat kemudian dideteksi dengan beberapa metode. Ada beberapa tahapan dasar pemeriksaan western blot ini yaitu

Pemeriksaan sampel , gel elektroforesis, trasfer antibodi, deteksi pelacak, dan imaging analisis.

2.10.1 Antibodi β -Actin

β -Actin adalah satu dari enam bentuk isoforms aktin yang berbeda yang telah diidentifikasi. Molekul-molekul aktin ditemukan dalam sel-sel dari berbagai spesies dan jaringan yang cenderung sangat mirip dalam sifat-sifat imunologi dan kandungan fisik. Sebagai konsekwensinya sulit untuk menghasilkan antiserum yang ampuh terhadap protein ini. Oleh karena itu ketersediaan antibodi monoklonal pada β -actin menjadi sesuatu yang bermakna dalam studi distribusi intraseluler dari β -actin dan aspek-aspek *cytoskeleton* ([Genscript-The Biology CRO](#))

2.10.2 Antibodi NFAT-2

NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) bagian dari protein yang mengandung NFAT1 (NFATc2 atau NFATp), NFAT2 (NFATc1 atau NFATc), NFAT3 (NFATc4), dan NFAT4 (NFATc3 atau NFATx). Semua protein tersebut adalah faktor-faktor transkripsi dengan jalur domain homologi dan mengatur transkripsi gen bersama-sama dengan AP 1 (Jun / Fos) untuk mengatur respons imun yang efektif. Protein NFAT diuji dalam sel-sel sistem imun secara dominan. Pada sel yang beristirahat protein NFAT terfosforilasi dan terlokalisasi dalam sitoplasma. Peningkatan konsentrasi kalsium intrasel bertambah mengaktifkan kalsium / calmodulin calcineurin fosfatase serina, yang mana protein NFAT terfosforilasi, mengakibatkan translokasi berikutnya ke nucleus. Pemutusan signal NFAT terjadi

selama penurunan konsentrasi kalsium dan fosforilasi NFAT oleh kinase seperti GSK-3 atau CK1. Siklosporin A and FK506 adalah suatu immunosupresan yang menghambat calcineurin dengan demikian mempertahankan protein NFAT dalam sitoplasma (Product pathway-lymphocyte signaling).



Universitas Indonesia

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol 96% hingga analisa ekspresi protein dilakukan di Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB) - Puspitek Serpong. Pengujian Fitokimia dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Indonesia Depok. Determinasi tanaman dilakukan di Pusat Penelitian Biologi, Bidang Botani, LIPI Cibinong.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara *in vitro* yang terdiri dari tiga tahap penelitian, yaitu :

3.2.1 Pengujian sitotoksitas ekstrak etanol 96% buah leunca terhadap sel RAW 264 dengan metode MTT, untuk mendapatkan dosis ekstrak yang tidak toksik terhadap sel.

3.2.2 Pengujian aktivitas ekstrak etanol 96% buah leunca terhadap deferensiasi sel preosteoklas RAW 264 menjadi sel osteoklas yang diinduksi dengan pemberian RANK-L 1 μ l/ml, dengan pewarnaan TRAP.

3.2.3 Pengujian ekspresi protein NFAT2 secara Western Blot pada sel RAW 264 yang diberi perlakuan ekstrak dan diinduksi dengan RANK-L 1 μ l/ml.

3.3. Parameter Yang Diamati

3.3.1. Dosis ekstrak yang tidak menghambat proliferasi sel preosteoklas (RAW 264) dibandingkan dengan kontrol negatif sel tanpa perlakuan ekstrak.

3.3.2 Jumlah sel osteoklas hasil dari deferensiasi sel RAW 264 yang mendapat perlakuan ekstrak etanol 96% buah leunca dan induksi RANK-L di bandingkan dengan kontrol negatif tanpa perlakuan ekstrak.

3.3.3 Ekspresi protein NFAT2 pada sel preosteoklas (RAW 264) yang mendapat perlakuan ekstrak etanol 96% buah leunca dan induksi RANK-L dibandingkan dengan kontrol β -actin.

3.4 Bahan Dan Alat Penelitian

3.4.1. Tumbuhan

Tumbuhan yang diteliti adalah Leunca (*Solanum nigrum.L*) yang didapatkan dari kebun di daerah Srengseng Sawah Jakarta Selatan. Tanaman ini dideterminasi di Herbarium LIPI Cibinong.

3.4.2. Reagen, Cell line

Reagen yang digunakan meliputi Medium α MEM (minimum essential medium alpha - Sigma Aldrich), 0,1 mM L- Glutamin , Fetal bovine serum 10% (FBS), Trypsin EDTA, PBS, Penicillin/ streptomycin, TRAP-staining kit, Eter, Analog L-serin, Etanol 96%, RIPA buffer, Anti β -actin monoclonal antibodi, Anti-NFAT2 monoklonal antibodi, HRP conjugated sheep, ECL detection kit, ABS, Sampel buffer, TBST, Cell line (sel RAW 264) / preosteoklas.

3.5 Tahapan Penelitian

3.5.1 Pembuatan ekstrak etanol 96% buah leunca (*Solanum nigrum.L*)

Buah leunca segar sebanyak 2 kg dicuci bersih, kemudian ditiriskan, setelah kering diblender kasar, untuk memudahkan penghancuran ditambahkan etanol 96% sebanyak 900 ml. Seluruh leunca yang telah diblender kasar kemudian dimaserasi dengan etanol 96% hingga 2,5 liter agar seluruh leunca terendam pelarut. Maserat diaduk dengan menggunakan maserator selama 2 jam dengan kecepatan 230 rpm, kemudian diamkan selama 24 jam. Dilakukan penyaringan maserat dengan bantuan pompa vakum, hingga seluruh ekstrak tersaring. Proses diulangi dengan jumlah pelarut yang sama hingga 3 kali pengulangan. Semua maserat dikumpulkan dan dilakukan evaporasi dengan menggunakan rotavapor pada suhu 40°C, dan tekanan 175 mbar. Proses evaporasi ini dilakukan selama 3

hari, sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kemudian di simpan dalam lemari pendingin (*freezer*) agar tidak mudah rusak.

3.5.2 Pengujian kadar sisa pelarut

Pengujian kadar sisa pelarut dilakukan dengan gas kromatografi (GC). Sampel uji ekstrak sebanyak 10 mg dimasukkan kedalam eppendorf kemudian ditambahkan air 1 mL, selanjutnya disonifikasi 10 menit dan disentrifus 10 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Supernatan dipindahkan kedalam labu takar 5 ml dan ditambahkan l-propanol 25 μ L, kemudian ditambah air sampai tanda batas. Dihomogenkan dan dispuir 1 μ L, kemudian diinjeksikan ke GC (merk : Dani 1000 DPC no. 031203LHL3), dengan fase diam C10 dan fase gerak N2.

3.5.3. Penetapan kadar abu dan kadar air.

a. Kadar Abu

Pengukuran kadar abu dilakukan dengan cara menimbang 200 mg ekstrak etanol 96% leunca (A) lalu dimasukkan secara merata kedalam cawan porselen yang telah dipijarkan kedalam tanur pada suhu 700°C selama 30 menit (B). Kemudian dipijarkan dalam tanur pada suhu 700°C hingga arang habis lalu didinginkan. Abu ditimbang dan dicatat hasilnya, kemudian dimasukkan dalam tanur pada suhu 700°C selama 2 jam kemudian ditimbang kembali. Jika bobot dari penimbangan pertama dan kedua menunjukkan hasil yang sama maka telah tercapai bobot tetap (C). Jika belum mencapai bobot tetap maka diulangi kembali langkah sebelumnya hingga diperoleh bobot tetap. Terakhir dihitung kadar abu dengan rumus :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{(C - B)}{A} \times 100\%$$

b. Kadar air

Sampel yang telah homogen ditimbang sebanyak 200 mg dan diletakkan didalam cawan kosong yang sudah ditimbang beratnya. Cawan yang berisi sampel kemudian dikeringkan kedalam oven dengan suhu 100-102° C selama 6 jam. Cawan dikeringkan didalam desikator, setelah dingin cawan ditimbang sampai berat bahan konstan. Kehilangan berat yang terjadi menunjukkan jumlah air yang dikandungnya. Kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{kadar air} = w_1 - w_2 \times 100\%$$

keterangan : w_1 : berat sampel

w_2 : berat sampel setelah dikeringkan

3.5.4 Penapisan Fitokimia

3.5.4.1 Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 200mg ekstrak kental dilarutkan dengan 50 ml campuran air suling dan HCL 2N (5ml) kemudian dipanaskan selama 30 menit, setelah dingin disaring dan 1 ml filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang selanjutnya dilakukan sebagai berikut :

- a. Sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes larutan Bouchardat. Hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat sampai hitam
- b. Sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes larutan Mayer. Hasil positif dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol.
- c. Sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes larutan Dragendorf. Hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat (Hanani dan Mun'im, 2005).

3.5.4.2 Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 50 mL air suling dan dipanaskan selama 10 menit, kemudian didinginkan, setelah dingin dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih setinggi 1 cm – 10 cm yang dengan penambahan 1 tetes

asam klorida 2 N buih tidak hilang maka ekstrak positif mengandung saponin. (Hanani dan Mun'im, 2005).

3.5.4.3 Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak kental diencerkan dengan 15 ml air hingga homogen dan dimasukkan kedalam corong pisah, kemudian ditambahkan petroleum eter (10ml), dikocok dengan hati hati dan didiamkan. Lapisan etanol diuapkan pada suhu di bawah 40°C, sampai kental dan sisanya dilarutkan dalam 10 ml etil asetat, dan disaring.

Percobaan :

- a) Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dalam 1-2 mL etanol (95%) kemudian ditambahkan 0,5 g serbuk seng dan 2 mL HCl 2 N dan didiamkan selama 1 menit, kemudian ditambahkan 5 ml HCl pekat. Jika terbentuk warna merah intensif menunjukkan adanya flavanoid (glikosida-3-flavonol).
- b) Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dalam 1 mL etanol (95%) kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 5 ml HCl pekat. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavanoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.
- c) Sebanyak 2 ml larutan diuapkan hingga kering, kemudian dibasahi dengan aseton dan ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan serbuk asam oksalat, kemudian dipanaskan. Campuran Sisa yang diperoleh dilarutkan dalam 5 ml eter dan diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavanoid (Hanani dan Mun'im, 2005).

3.5.4.4 Analisa isoflavon

A. Bahan

Bahan yang digunakan adalah aquades; asetonitril (KCKT grade); asam fosfat 85 %; (KCKT grade); DMSO 99,9%; asetonitril 40%; dan standar daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein dan genistein).

B. Alat

Alat yang digunakan adalah KCKT, Kolom kromatografi, LiChrospher 60 RP-Select B, 250-4 μm ; pelindung kolom; timbangan analitik; mikropipet; botol berwarna gelap; alat-alat gelas; sentrifuge; tabung ependorf; *syringe filters*; dan *syringe*

C. Prosedur pengujian

a. Preparasi sampel

1. Ekstrak etanol 96% buah leunca ditimbang sebanyak 0,05 g, berat sampel dicatat S(w).
2. Ditambah dengan 0,025 ml larutan standar internal dan digoyang untuk membasahi sampel.
3. Ditambah dengan 0,4 ml asetonitril dan digoyang untuk menyempurnakan pembentukan padatan tersuspensi.
4. Ditambah dengan 0,25 ml air terdeionisasi kemurnian tinggi dan dicampur. Dipastikan sampel yang dimasukkan tidak tertinggal di dalam tabung uji dengan cara penggojogan kuat.
5. Dicampur selama 60 menit dalam pengaduk leher atau *inversion mixer* atau dicampur secara manual dengan menginversi tabung uji beberapa kali paling sedikit setiap 5 menit selama 60 menit ekstrak etanol 96%si. (proses ini tidak perlu dilakukan untuk produk yang larut sempurna pada awal pencampuran).
6. Ditambah dengan 0,325 ml air terdeionisasi dan dikocok.
7. Disentrifuge selama 10 menit pada 200 x g untuk menjadi residu pelet tidak larut. (tahap ini tidak diperlukan untuk produk yang larut dengan sempurna).
8. Diambil sebagian supernatan dan difilter melalui *syringe filter* 0,45 μm .

9. Sampel siap untuk dianalisis menggunakan KCKT.

b. Pengaturan kondisi alat

1. Modul KCKT diatur dengan kondisi sebagai berikut :
 - a. Kolom : LiChocart 60 RP-Select B, 250-4 μ m
 - b. Temperatur kolom : 40 $^{\circ}$ C
 - c. Detektor : UV dengan panjang gelombang 260 nm
 - d. Integrator : Program Isoflavon
 - e. Volume injeksi : 10 μ l
 - f. Laju alir : 0,8 ml/menit
 - g. Sistem Gradien

Eluen A : Air yang mengandung 0,05% asam fosfat

Eluen B : Acetonitril

- h. Gradien elusi, sebagai berikut :

Waktu (menit)	Eluen A (%)	Eluen B (%)	Laju alir (ml/menit)
0,0	90	10	0,80
10,0	90	10	0,80
10,1	70	30	0,80
30,0	70	30	0,80
30,1	10	90	0,80
33,0	10	90	0,80
33,1	90	10	0,80
34,0	90	10	0,80

Setelah injeksi, gradien linier sampai 30% B selama 30 menit, 3 menit pencucian pada 90 %, 10 menit kesetimbangan pada 10% B. Kemudian ditunggu 6 menit untuk injeksi standar/sampel selanjutnya.

3.5.4.5 Identifikasi Tanin

Sebanyak 100 mg ekstrak kental etanol 96% dilarutkan dalam 15 mL air panas dididihkan selama 5 menit. Setelah dingin disentrifuge dan dipisahkan cairan yang ada di atasnya dengan cara dekantasi. Kemudian ditambahkan 5 ml larutan NaCl 10%, dan disaring. Terhadap filtrat dilakukan percobaan sebagai berikut :

- a. 10 tetes FeCl_3 1% ditambahkan kedalam filtrat dan diamati pembentukan warna yang terjadi. Warna biru hitam atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.
- b. 10 tetes larutan gelatin 10% ditambahkan kedalam filtrat dan diperhatikan adanya endapan. Adanya endapan menunjukkan adanya tanin.
- c. 10 tetes larutan gelatin 1% yang mengandung 10% NaCl ditambahkan pada filtrat. Adanya endapan menunjukkan adanya tanin (Hanani dan Mun'im, 2005).

3.5.4.6 Identifikasi Terpen

Sebanyak 100 mg ekstrak ditambah dengan 5 mL larutan eter. Residu yang didapat ditambah KMnO_4 , H_2SO_4 , 2,4-dinitrofenilhidrazin, Asam asetat anhidrid. Warna merah hijau atau violet biru menunjukkan positif terpen (Hanani dan Mun'im, 2005).

3.5.5 Kultur Cell Line

Untuk penyiapan kultur cell line, prosedur kerja disesuaikan dengan protocol dari abcam (2009) dengan sedikit modifikasi.

3.5.5.1 Persiapan cell line

a. Pembuatan Medium Kultur

Medium yang digunakan adalah α -MEM (medium essensial medium alpha - Sigma aldrich) M-0894. Bubuk medium α -MEM 10,1 gr ditambah dengan 2,2 gr Natrium bikarbonat kemudian dilarutkan dalam aquabides 900 ml, diaduk hingga homogen, ditepatkan volumenya dengan aquabides hingga 1000 ml. Selanjutnya pH medium ditera hingga mencapai pH 7, kemudian difilter

dengan menggunakan membran filter 0,2 μ m. Medium kultur dibuat dengan mencampur 445 ml medium α -MEM dengan 50ml Fetal Bovin Serum (FBS) dan 5 ml antibiotik Penicillin – Streptomycin, difilter kembali dan disimpan pada suhu 4°C.

b. Thawing sel

Tahap awal dalam thawing sel adalah mengeluarkan cryo vial yang berisi suspensi sel beku RAW 264 dari tempat penyimpanan (tangi nitrogen), kemudian vial dihangatkan hingga sel mencair. Kemudian suspensi sel yang mulai mencair dengan segera dipindahkan kedalam t-flask 25 cm² yang telah diisi medium kultur sebanyak 5ml. Kultur diinkubasi didalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37°C. Setelah 4 jam kondisi sel diamati dibawah mikroskop. Apabila sel telah menempel pada dasar t-flask, medium dibuang dan diganti dengan 5 ml medium kultur baru. Kalau sel belum menempel diinkubasi kembali didalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

c. Pengamatan dan Pemeriksaan sel

Sel diperiksa dibawah mikroskop setiap hari untuk memastikan sel tumbuh dengan baik dan tidak terkontaminasi mikroba. Pada pengamatan setelah inkubasi 24 jam dilihat jumlah sel yang menempel pada dasar plate, kemudian dilakukan penggantian medium, dengan cara membuang medium yang ada dan menggantinya dengan medium yang baru sebanyak 5 ml. Selanjutnya kultur disimpan kembali di dalam inkubator dengan suhu 37°C - 38°C dengan CO₂ 5% kelembaban 80 – 90 %. Pengamatan tetap dilanjutkan setiap hari hingga pertumbuhan sel mencapai sekitar 70% dari dasar cawan.

d. Panen sel dan Subkultur

Sel dipanen setelah sel tumbuh dan menutupi sekitar 70% - 80% dari dasar cawan, kemudian medium kultur dibuang, dan dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Selanjutnya dilakukan tripsinasi dengan menambahkan 900 μ l PBS dan 100 μ l tripsin, diinkubasi selama 3 menit didalam inkubator, kemudian sel di scrapper

dan ditambah dengan 5ml medium kultur. Suspensi sel dipindah kedalam tabung sentrifuge, dan disentrifuge pada 1500 rpm selama 5 menit dengan suhu 23°C. Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan medium kultur baru dan dipindah ke cawan kultur besar (75cm²), kemudian diinkubasi kembali dalam incubator CO₂. Kultur diamati setiap hari dan dilakukan panen sel dan subkultur setelah pertumbuhan kultur mencapai 70% - 80% dari permukaan dasar cawan.

3.5.6 Pengujian MTT

Setelah kepadatan sel mencapai sekitar 80% dari dasar permukaan cawan kultur, sel siap untuk dipanen dan digunakan untuk percobaan. Panen sel dilakukan seperti prosedur panen sel tersebut diatas, yaitu dilakukan tripsinasi dan discrapper, kemudian disentrifuse. Pelet sel yang diperoleh ditambah dengan 1 ml medium kultur dan dilakukan penghitungan sel. Agar memudahkan didalam penghitungan sel dilakukan pengenceran suspensi sel menggunakan medium kultur dengan perbandingan 1:10.

Penghitungan sel menggunakan hemositometer dan pewarnaan sel dengan triphan blue. Sebanyak 50 µl suspensi sel dimasukkan kedalam tabung effendrof dan ditambah dengan 50µl tripan blue, lalu dihomogenkan. Suspensi sel yang telah diwarnai dipipetkan ke dinding bilik hemositometer dan dihitung jumlah sel dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 pada 2 kamar. Jumlah sel yang didapat diencerkan secara serial sampai didapatkan jumlah sel 1 x 10⁴sel/well. Sel ditanam didalam 96 well plate dengan volume 100 µl sel/ well, sebanyak 2 plate. Kultur diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37°C. selama 24 jam. Selanjutnya kultur diberi perlakuan ekstrak dengan berbagai konsentrasi, sebagai berikut :

1. Blanko (medium tanpa sel)
2. Kontrol negatif (sel tanpa perlakuan)
3. Sel + ekstrak etanol 96% 100 µg/ml
4. Sel + ekstrak etanol 96% 50 µg/ml
5. Sel + ekstrak etanol 96% 25 µg/ml
6. Sel + ekstrak etanol 96% 12,5 µg/ml

7. Sel + ekstrak etanol 96% 6,25µg/ml
8. Sel + ekstrak etanol 96% 3,125µg/ml

masing masing perlakuan dibuat triplikasi. Kultur yang telah diberi perlakuan diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam. Setelah 24 jam untuk plate kedua, medium dalam masing masing well termasuk kontrol dan blanko dibuang, kemudian dicuci dengan PBS dan ditambah dengan 100 ml medium kultur yang mengandung 0.5mg MTT/ml PBS. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37°C selama 4 jam. Setelah itu ditambah dengan deterjen (larutan SDS 10%) sebanyak 100 µl untuk setiap well, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu kamar pada ruang gelap semalam. Selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan *elisa plate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Dilakukan yang sama untuk perlakuan pengamatan 48 jam.

3.5.7. Pengujian osteoklastogenesis

Dalam pengujian osteoklastogenesis digunakan plate 48 well dengan kapasitas volume 250 µL /well. Jumlah sel RAW 264 yang diperlukan adalah 50.000 sel/ml. Perlakuan sampel menggunakan 6 konsentrasi ekstrak seperti yang dilakukan pada pengujian sitotoksitas yaitu 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125µg/ml. Semua perlakuan dilakukan dengan triplikasi termasuk kontrol negatif yaitu sel tanpa perlakuan.

Penyiapan perlakuan sel dilakukan didalam tabung mikro 1,5 ml sebanyak 7 tabung. Masing-masing tabung diisi dengan 1ml medium yang mengandung suspensi sel 5×10^4 sel/ml dan ekstrak dosis terpilih, dan kontrol negatif. Selanjutnya suspensi sel yang telah diberi perlakuan tersebut ditanam didalam plate 48 well masing-masing 250ul/well dengan triplikasi dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam medium diganti dengan medium kultur baru yang ditambah dengan RANK-L 1ul/ml dan masing-masing dosis ekstrak. Setelah inkubasi 72 jam dilakukan penggantian medium dengan komposisi medium yang sama, kemudian diinkubasi hingga 96 jam.

Setelah itu dilakukan staining (pewarnaan) dengan trap staining. Komposisi Trap staining terdiri dari : a) reagen 1, yaitu larutan fiksatif (metanol murni), b) reagen 2, berisi buffer yang mengandung asam tartrat 0,025 molar dalam 0,1 molar asam asetat pH 5,2, dibuat sebanyak 12 ml, dan c) reagen 3. yang terdiri dari alfa naftol 12,5 mg/ml DMF. Proses pewarnaan diawali dengan membuang medium kultur, kemudian dicuci dengan 100 µL PBS sebanyak dua kali. Setelah itu difiksasi dengan metanol murni sebanyak 200µl/well, dan dikeringkan. Kemudian diwarnai dengan larutan trap staining 200µl/well, dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya masing-masing well dicuci dengan 250 µL aquades, dan dikeringkan semalaman pada suhu kamar. Setelah plate kering dilakukan perhitungan sel osteoklas pada setiap well.

3.5.8. Pengujian Western Blot

3.5.8.1. Persiapan sampel

A. Penanaman sel.

Sebanyak 5×10^4 sel/ml ditambah dengan 4 ml medium ditanam dalam 6 buah cawan petri yang terdiri dari kontrol negatif (sel tanpa perlakuan), kontrol positif (sel yang ditambahkan medium + RANKL), dan sel yang ditambah medium + RANKL dan sampel, diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam medium diganti, untuk kontrol positif dan perlakuan ekstrak, medium diganti dengan dengan medium kultur baru 4 ml yang mengandung RANKL 4 µl dan diinkubasi untuk perlakuan 24 dan 48 jam dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37°C. Selanjutnya keesokan harinya untuk sel dengan perlakuan 24 jam medium dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, dan ditambahkan 100 µl sampel buffer dan 100 µl RIPA, kemudian sel disrapper dan dipindahkan kedalam tabung *effendorf* dan didiamkan 10 – 15 menit dalam es selanjutnya disentrifuge pada 15.000 rpm dengan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diambil 100µl ditambahkan 20µl sampel buffer 6 kali kuat dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, selanjutnya disimpan pada suhu - 80°C . Keesokan harinya dilakukan perlakuan yang sama untuk sel dengan masa inkubasi 48 jam. Sel siap untuk pengujian western blot.

B. Buffer lisis

a. Penyiapan bufer lisis

Bufer lisis digunakan untuk melarutkan protein didalam sel, sehingga bisa bermigrasi melewati separating gel. Dalam penelitian ini buffer lisis yang digunakan adalah RIPA buffer (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*) yang bisa bekerja di seluruh sel.

RIPA buffer tersebut terdiri dari :

- 150 mM sodium chloride
- 1,0% NP-40 atau triton X-100
- 0,5% sodium deoxycholate
- 0,1% SDS (sodium dodecyl sulphate)
- 50mM Tris , ph 8,0

b. Persiapan lisat dari sel kultur

Sel yang sudah dikulturkan dan diberi perlakuan ekstrak dan RANKL selama 96 jam diletakkan diatas es, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Setelah itu dimasukkan 100 μ L RIPA buffer dan dilakukan scrapping menggunakan scrapper. Setelah di *scrapper*, didiamkan 30 menit diatas es (supaya proteinnnya larut semua), kemudian disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 15.000 rpm, pada suhu 4°C. Supernatan diambil, lalu dicampur dengan sample buffer 6 kali, kemudian dengan hati-hati supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan ditempatkan diatas es.

3.5.8.2. Elektroforesis

Untuk memberikan warna pada lisat ditambahkan sampel buffer, karena sel dengan RIPA tidak berwarna. Sampel buffer yang digunakan adalah sampel buffer 6 kali (6 x laemmli buffer), dengan perbandingan 1/6 : 5/6. Sampel buffer

sebanyak 5 μ L dicampur dengan 25 μ L sampel sehingga didapatkan 30 μ L campuran yang siap untuk diload ke dalam gel elektroforesis.

a. Persiapan PAGE gel

Untuk pemeriksaan ini digunakan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel electrophoresis). Konsentrasi gel poliakrilamid disesuaikan dengan berat molekul protein yang ingin dipisahkan. Aturannya adalah semakin kecil berat molekul protein semakin besar konsentrasi gel, sebaliknya semakin besar berat molekul, konsentrasi gel semakin kecil.

Tabel 3.1 Berat molekul protein marker dan prosentase gel

Berat molekul protein (kDa)	Prosentase gel (%)
4 – 40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Dalam penelitian ini protein yang akan diperiksa berat molekulnya adalah NFAT2 dengan berat molekul 125 kDa, sehingga konsentrasi gel yang digunakan adalah 8%.

b. Persiapan larutan dapar

Larutan dapar yang akan dibuat adalah 1,5 Tris-HCl, pH 8,8 dengan cara melarutkan 27,23 g Tris base dengan 100 ml aquadest (RO), kemudian pH larutan ditara dengan HCl 6N hingga pH menjadi 8,8, lalu ditambahkan aquadest hingga volume menjadi 150 ml. Larutan dapar disimpan pada suhu 4°C.

Dapar lainnya adalah 0,5 Tris- HCl dengan pH 6,8. Dapar tersebut dibuat dengan melarutkan 6 g Tris base ke dalam 60 ml aquadest (RO), pH ditara dengan HCl 6 N hingga pH menjadi 6,8. Selanjutnya ditambah dengan aquadest hingga volume menjadi 100 ml, dan disimpan pada suhu 4°C

c. Pembuatan gel :

Pembuatan gel terdiri dari dua tahap, yaitu pembuatan *resolving* gel dan *stacking* gel.

Pembuatan *Resolving* gel (untuk 3 gel), dengan komposisi sebagai berikut :

- H₂O : 6,9µl
- Acrylamid : 3,9 µl
- Buffer (pH 8,8) : 3,9 µl
- SDS : 0,15 µl
- APS : 0,15 µl
- TEMED : 0,009 µl

Semua bahan tersebut diatas dilarutkan , dan dimasukkan kedalam gelas elektroforesis sampai batas tertentu, dan ditunggu hingga gel *resolving* mengeras.

Selanjutnya dilakukan penyiapan *stacking* gel, dengan komposisi sebagai berikut :

Stacking gel (3 x resep)

- H₂O : 4,2 µl
- Acrylamic : 0,99 µl
- Buffer (pH 6,8) : 0,75 µl
- SDS : 0,06 µl
- APS : 0,06 µl

Seluruh bahan dilarutkan dan ditambahkan diatas gel *resolving* yang telah mengeras, kemudian dimasukkan sisir kedalam cetakan gel. Setelah gel mengeras sisir dilepas perlahan dan gel siap digunakan untuk elektroforesis.

d. Loading sampel

Dari campuran yang di dapat tadi di masukkan sebanyak 6 µL/ kolom, masing-masing yaitu kontrol (-) , kontrol (+), dan ekstrak dengan konsentrasi 3,125 µg/ml.

24 jam

48 jam

	K -	K+	sampel	Protein marker	K-	K+	sampel
	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl

Running gel.

Untuk running gel diperlukan running buffer dengan komposisi sebagai berikut :

- 12,12 gr Tris base
- 57,6 gr glycine
- 4 gr SDS

(digunakan untuk empat kali running). Ketiga bahan diatas masing masing ditimbang, dilarutkan dalam air RO \pm 200 ml, diaduk hingga homogen (larutan menjadi jernih), kemudian ditambah air RO hingga volume 400 ml. Larutan disimpan pada suhu 4°C, jika terjadi endapan selama penyimpanan larutan dihangatkan pada temperatur kamar sebelum digunakan.

Dalam penggunaannya 50 ml larutan stok running buffer 10x dilarutkan dalam 450 ml RO untuk setiap kali running. Larutan running buffer dimasukan kedalam elektroda *distance* pada perangkat elektroforesis. Running gel dilakukan pada 200 V, selama 1 jam.

Penyiapan keperluan transfer membran

Untuk transfer membrane diperlukan buffer transfer. (1500 ml buffer transfer), dengan komposisi sebagai berikut :

- 25 mM Tris, pH 8,3
- 129 mM glycine dengan atau tanpa 20% metanol
- 0,025% SDS.

Selain buffer transfer juga diperlukan wadah transfer, untuk menempatkan serabut, kertas saring, gel yang akan ditransfer, membran nitroselulosa dan larutan buffer transfer.

Didalam proses transfer membran juga diperlukan loading kontrol untuk memastikan bahwa gel sudah diload dengan sampel dan untuk melihat bahwa keseluruhan gel dapat ditransfer ke membran. Pita (band) pada loading kontrol juga dapat digunakan untuk mengamati kuantitas protein yang melewati masing-masing baris. Loading kontrol yang digunakan adalah β -aktin.

3.5.8.3. Western Blotting

a. Transfer gel ke membrane nitroselulosa

Tahapan berikutnya adalah transfer gel ke membran nitroselulose. Gel dikeluarkan dari perangkat elektroforesis, kemudian diletakkan diatas kertas membrane pada transfer buffer. Urutannya yaitu kertas serap, membran nitroselulosa, gel, kertas serap. Kemudian transfer buffer ditempatkan di antara elektroda positif dan negative, dimana membran berada di dekat elektroda positif dan gel di dekat elektroda negatif. Transfer membran dilakukan selama 1 jam dengan arus listrik 100 V 350 mA.

Gel yang telah ditransfer kemudian direndam dalam larutan Commasie blue semalam, selanjutnya dicuci dengan larutan destaine commasie hingga bersih. Jika gel terlihat bersih maka semua protein sudah tertransfer kedalam membran.

b. Pewarnaan membran.

Dibuat larutan asam asetat 5% dengan cara mencampur 25 ml asam asetat kedalam air RO 500 ml. Selanjutnya 0,4 mg poceaue dilarutkan dalam 40 ml asam asetat 5%, *dishaker* hingga homogen. Membran yang telah direndam dalam commasie blue semalam dan telah dicuci bersih, kemudian diberi pewarnaan poceaue dengan *dishaker* selama menit. Selanjutnya membran dicuci dengan asam asetat 5% dan diamati keberhasilan proses transfer protein.

Membran kemudian dicuci dengan PBST 2 kali untuk membuang poceaue, direndam dengan PBSA (5% BSA + PBST) disimpam semalam. Setelah itu larutan PBSA dibuang dan dibilas dengan PBST 1 kali.

c. Blocking membran

Membran diletakkan dengan posisi terbalik dan kemudian dimasukkan antibodi NFAT2 dan β Actin sebanyak 8 ml, diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu dicuci tiga kali dengan PBST dengan waktu berturut-turut, 5 menit, 15 menit, dan 5 menit. Selanjutnya ditambah dengan AB kedua (PBS 20 ml + 1 gr skim), 10 ml untuk NFAT 2 dan 10 ml untuk β Actin. Masing masing protein direndam dengan PBS + Skim 10 ml selama 45 menit. Dicuci kembali sebanyak 3 kali dengan PBST berturut-turut 5 menit, 5 menit dan 5 menit..

d. Kit Deteksi

Membran ditransfer kedalam larutan DAB, kemudian diinkubasi di ruang gelap selama 10 menit. Setelah itu membran di keluarkan dan dicuci 2 kali dengan PBST.

BAB 4
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Ekstraksi

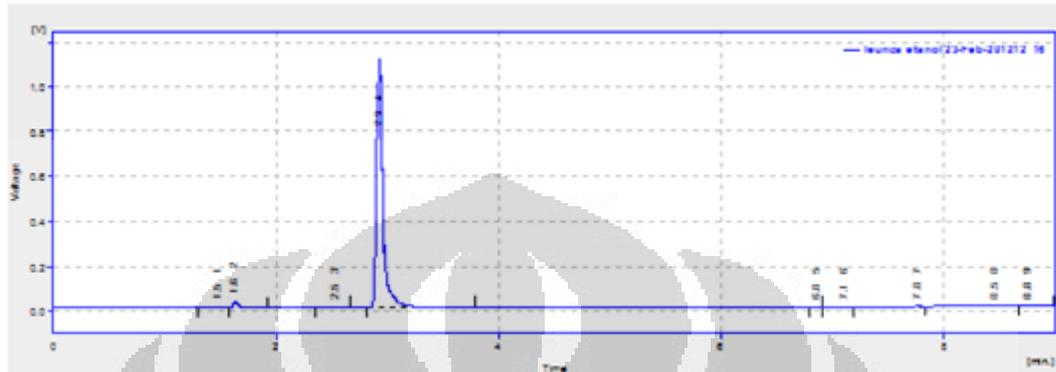
Hasil ekstraksi dari buah leunca segar sebanyak 2 kg dengan pelarut etanol 96% adalah ekstrak kental etanol 96% sebanyak 87,48 gram. Ekstrak tersebut bersifat kental, berwarna hijau tua dan rasanya pahit.

4.2 Pengujian sisa pelarut

Pengujian sisa pelarut etanol 96% yang terkandung didalam ekstrak kental buah leunca dilakukan dengan metode GC (*Gas Chromatography*)

Tabel 4.1 Sisa pelarut etanol dalam ekstrak etanol 96% leunca

ulangan	RT	A	Ratio	Rata rata	Konsentrasi (%)
1	1,623	73,296	0,017	0,0169	0,00896075
	2,923	4416,981			
2	1,587	71,342	0,017		
	2,860	4138,565			



Gambar 4.1 Grafik gambaran sisa etanol 96% leunca

Dari hasil pengujian yang tercantum pada Tabel 4.1. dan gambar 4,1, menunjukkan bahwa sisa pelarut etanol yang terkandung didalam ekstrak kental adalah 0,0089%. Kandungan sisa pelarut tersebut masih aman untuk pengujian terhadap sel RAW 264.

4.3 Pengujian kelarutan ekstrak kental buah Leunca dalam air dan etanol 96 %

Tabel 4.2 Data kelarutan ekstrak kental leunca pada air dan etanol

Sampel	Kelarutan dalam air	Kelarutan dalam etanol
I	Sukar larut	Mudah larut
II	Sukar larut	Mudah larut
III	Sukar larut	Mudah larut

Keterangan : Mudah larut = larutan berwarna hijau homogen tanpa endapan

Sukar larut = larutan berwarna hijau jernih dengan endapan.

Dari hasil pengujian kelarutan ekstrak etanol 96% dalam air dan etanol 96% dari tabel 4.2. menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% buah leunca sukar larut dalam air, dan mudah larut dalam etanol 96%. Hal ini diduga karena pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah etanol 96% sehingga didalam ekstrak tersebut terdapat senyawa non polar yang sukar larut dalam air.

Dari pemeriksaan kelarutan ekstrak dalam air dan etanol 96%, didapatkan ekstrak etanol 96% leunca sukar larut dalam air, sedangkan medium pertumbuhan *cell line* menggunakan bahan dasar air. Untuk membantu kelarutan ekstrak etanol 96% di dalam medium maka digunakan DMSO (dimetil sulfoksida) dalam kisaran yang masih aman untuk *cell line*. DMSO merupakan reagen organik yang sangat polar dan sering digunakan sebagai pelarut pada zat-zat yang sukar larut untuk digunakan pada material biologi atau sebagai agen cryoprotektif (Kahler, 2000). Juga dilaporkan bahwa konsentrasi DMSO dibawah 1% tidak mempengaruhi hasil penelitian karena tidak menghambat proliferasi sel (Santos et al., 2003).

4.4 Kadar abu

Prinsip dasar penentuan kadar abu adalah bahwa mineral tidak hancur dengan pemanasan, dan mineral memiliki volatilitas yang rendah dibandingkan senyawa lain. Dari hasil pengujian kadar abu dari ekstrak kental buah leunca menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mempunyai kadar abu 11,193% (Tabel 4.3). Hasil pengujian yang dilakukan oleh Edmonds and Chweya (1997) melaporkan bahwa buah leunca mempunyai kandungan zat besi, kalsium, dan phospor yang cukup tinggi.

Tabel 4.3 Data hasil pengujian kadar abu ekstrak kental buah leunca

Bobot Simplisia (gr)	Bobot Abu (gr)	Kadar abu (gr)	Kadar abu rata rata (%)
2,0124	0,1643	11.86	11,53
2,0132	0,1742	8,89	
2,0080	0,1647	13,83	

4.5 Kadar air

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi air didalam simplisia untuk menghindari pertumbuhan mikroba.

Dari hasil pengujian kadar air menunjukkan bahwa ekstrak kental 96% buah leunca mengandung air sangat sedikit hanya 1,295%, meskipun demikian untuk menghindari tumbuhnya mikroba dalam ekstrak kental tersebut ekstrak harus di simpan dalam lemari pendingin. Pada proses penguapan ekstrak menggunakan rotavapor sangat sulit untuk bisa membuat sediaan dalam bentuk ekstrak kering

Tabel 4.4 Hasil pengujian kadar air dari ekstrak etanol 96% buah leunca

Berat Sampel	Berat setelah dikeringkan	Kadar air	Rata-rata (%)
2.0076	1.229	1.395	1.295
2.0091	1.244	1.389	
2.0218	1.248	1.404	

Dengan demikian kadar air yang masih tersisa tersebut relatif sangat sedikit mengingat kandungan air dari buah leunca cukup tinggi. Dari hasil pengujian yang dilakukan oleh Edmonds and Chweya (1997) dilaporkan bahwa kandungan air pada buah leunca cukup tinggi yaitu antara 83 – 91%.

4.6 Penapisan Fitokimia

4.6.1. Identifikasi Senyawa Isoflavon pada ekstrak etanol 96% buah Leunca.

Untuk mengetahui senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol 96% buah leunca ini, dilakukan analisa secara KCKT (kromatografi cair kinerja tinggi).

Hasil pengujian isoflavon dalam ekstrak tercantum dalam Tabel 4.5, terlihat bahwa ekstrak tersebut mengandung isoflavon dalam bentuk aglikon yaitu genistein, daidzein dan glisitein, serta dalam bentuk glikosida yaitu genistin,

daidzin dan glisitin. Kandungan senyawa isoflavon dari 100 g ekstrak yang diuji paling tinggi adalah glisitin (352,4265 g), kemudian genistin (117,2901 g) dan Daidzein (15,5505 g).

Menurut penelitian dari Murphy tahun (1981) genistein dan daidzein merupakan komponen yang paling aktif dari golongan isoflavon, karena mempunyai sejumlah aktivitas estrogen. Estrogen dapat digunakan untuk pengobatan gejala pascamenopause dan penghambat ovulasi untuk kontrasepsi.

Tabel 4.5 Hasil Pengujian kandungan senyawa isoflavon pada ekstrak kental buah Leunca secara KCKT.

	Jenis Isoflavon	Berat(g) /100gr ekstrak
1	daidzin	1,9884
2	glisitin	352,4265
3	genistin	117,2901
4	daidzein	15,5505
	glisitein	0,4814
6	genistein	0, 9967

Hasil penapisan fitokimia dari ekstrak etanol 96% leunca terlihat bahwa ekstrak etanol 96% leunca mengandung Isoflavon bentuk aglikon, yaitu genistein 0, 9967 mg/100 g, daidzein 15,5505 mg/100 g dan glisitein : 0,4814 mg/100 g, serta bentuk glikosida yaitu genistin 117,2901 mg/100 g, daidzin 1,9884 mg/100 g dan glisitin 352,4265 mg/100 g.

Dari hasil yang didapat ternyata ekstrak etanol 96% leunca ini mengandung lebih banyak Isoflavon dalam bentuk glikosida. Namun bentuk aglikon dari Isoflavon juga memiliki nilai yang cukup tinggi terutama kandungan daidzein.

Aktivitas estrogenik isoflavon ternyata terkait dengan struktur kimianya yang mirip dengan stilbestrol, yang biasa digunakan sebagai obat estrogenik. Bahkan, senyawa isoflavon mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dari stilbestrol. Daidzein merupakan senyawa isoflavon yang aktivitas estrogennya lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isoflavon lainnya (Pawiroharsono, S).

Menurut penelitian dari Murphy tahun 1981 genistein dan daidzein merupakan komponen yang paling aktif dari golongan isoflavon, karena mempunyai sejumlah aktivitas estrogen. Estrogen dapat digunakan untuk pengobatan gejala *pascamenopause* dan penghambat ovulasi untuk kontrasepsi.

Peranan isoflavon dalam membantu menurunkan osteoporosis juga telah diteliti. Konsumsi protein kedelai dengan isoflavon telah terbukti dapat mencegah kerapuhan tulang pada tikus yang digunakan sebagai model untuk penelitian osteoporosis. Studi yang lain menunjukkan hasil yang sama pada saat menggunakan genistein saja. Ipriflavone, obat yang dimetabolisme menjadi daidzein telah terbukti dapat menghambat kehilangan kalsium melalui urine pada wanita *postmenopause* (Koswara, 2006).

4.6.2 Identifikasi senyawa Alkaloid pada ekstrak etanol 96% buah leunca

Tabel 4.6 Identifikasi senyawa alkaloid

Metode	Uji	Perubahan warna	Hasil
Bouchardat	I	Terdapat endapan coklat	Positif
	II	Terdapat endapan coklat	Positif
	III	Terdapat endapan coklat	Positif
Mayer	I	Terdapat endapan putih	Positif
	II	Terdapat endapan putih	Positif
	II	Terdapat endapan putih	Positif
Dragendroff	I	Terdapat endapan jingga	Positif
	II	Terdapat endapan jingga	Positif
	III	Terdapat endapan jingga	Positif

Keterangan : Pereaksi Dragendroff mengandung bismut subnitrit dan Kalium Iodida, Pereaksi Bouchardat mengandung Iodium dan kalium iodida, Pereaksi Mayer mengandung larutan raksa (II) Klorida dan kalium Iodida.

Hasil identifikasi senyawa alkaloid pada ekstrak buah leunca secara kualitatif menggunakan tiga macam prereaksi, yaitu pereaksi Dragendorff, Bouchardat dan Mayer semuanya menunjukkan hasil yang positif. Dengan demikian ekstrak buah leunca mengandung senyawa alkaloid.

Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa pada buah leunca yang belum matang mengandung steroidal alkaloid solasodine serta steroidal saponin diosgenin dan tigogenin. Dan dilaporkan pula bahwa terdapat kandungan signifikan dari diosgenin (1,2%) dan solasodine (0,65%) pada buah leunca (*Solanum nigrum* L.) yang belum masak dan masih berwarna hijau.

4.6.3. Identifikasi senyawa saponin pada ekstrak etanol 96% buah leunca

Hasil identifikasi ekstrak etanol 96% buah leunca ini positif mengandung saponin (Tabel 4.6). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa terdapat senyawa saponin pada buah leunca (Hartati et al, 2005)

Tabel 4.7 Identifikasi saponin

Uji	Buih	Hasil
I	Buih \geq 1 cm, tidak hilang dengan penambahan HCl 2N	Positif
II	Buih \geq 1 cm, tidak hilang dengan penambahan HCl 2N	Positif
III	Buih \geq 1 cm, tidak hilang dengan penambahan HCl 2N	Positif

Hasil pengujian ekstrak etanol 96% leunca ini positif mengandung saponin, hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu terhadap leunca yang dilakukan oleh Hartati Kris, Ruslan Komar, Fidrianny Irda dari sekolah farmasi ITB tahun 2005. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid. Dari fraksi etil asetat diperoleh 8 pita. Dari pita B dan C dihasilkan isolat I dan isolat II. Isolat I dan isolat II memberikan bercak berwarna biru kehijauan dengan penampak bercak Liebermann-Burchard yang menunjukkan senyawa steroid dan berwarna jingga dengan penampak bercak Dragendorf yang menunjukkan senyawa alkaloid. Isolat I mempunyai jarak lebur 196-1970C, sedangkan isolat II 271-2720C. Kedua isolat tersebut mempunyai gugus OH, NH₂, CH₂, dan tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi, serta memiliki BM yang sama yaitu 446. (Sekolah Farmasi ITB, <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>)

4.6.4. Identifikasi senyawa Terpen pada Ekstrak etanol 96% Leunca

Hasil identifikasi senyawa terpen secara kualitatif pada ekstrak etanol 96% buah leunca dengan tiga kali ulangan yang tercantum pada Tabel 4.8, menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa terpen.

Tabel 4.8 Identifikasi senyawa Terpen

Uji	Perubahan Warna	Hasil
I	Hijau keunguan	Positif
II	Hijau keunguan	Positif
III	Hijau keunguan	Positif

4.6.5. Identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 96% buah leunca

Hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanol 96% buah leunca secara kualitatif menggunakan tiga metode uji yaitu dengan penambahan serbuk Zn, penambahan serbuk Mg dan penambahan serbuk asam borat dan asam oksalat tercantum pada Tabel 4.8. Dari hasil pengujian menggunakan tiga metode dengan tiga ulangan tersebut menunjukkan bahwa ekstrak buah leunca mengandung senyawa flavonoid.

Tabel 4.9 Hasil Identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol 96% buah leunca.

Metode	sampel	Perubahan warna	Hasil
Uji dengan penambahan serbuk Zn	I	Merah	Positif
	II	Merah	Positif
	III	Merah	Positif
Uji dengan penambahan serbuk Mg	I	Merah muda	Positif
	II	Merah muda	Positif
	III	Merah muda	Positif
Uji dengan penambahan serbuk as Borat dan As oksalat	I	Fluoresensi kuning	Positif
	II	Fluorosensi kuning	Positif
	III	Fluorosensi kuning	positif

4.6.6. Identifikasi senyawa Tanin pada ekstrak etanol 96% leunca

Hasil identifikasi senyawa tanin secara kualitatif menggunakan tiga metode uji yaitu penambahan FeCl_3 , larutan gelatin 10% dan larutan gelatin 1% yang mengandung 10% NaCl tercantum pada Tabel 4.9. Dari hasil pengujian dengan tiga kali pengulangan pada masing-masing metode tersebut membuktikan bahwa ekstrak buah leunca mengandung senyawa tannin.

Tabel 4.10 Identifikasi Senyawa Tanin

	uji	Hasil
Penambahan FeCl ₃ 1 %	I	Positif, warna kehitaman
	II	Positif, warna kehitaman
	III	Positif, warna kehitaman
Penambahan larutan gelatin 10 %	I	Positif, terdapat endapan
	II	Positif, terdapat endapan
	III	Positif, terdapat endapan
Penambahan larutan gelatin 1 % yg mengandung 10% NaCl	I	Positif, terdapat endapan
	II	Positif, terdapat endapan
	III	Positif, terdapat endapan

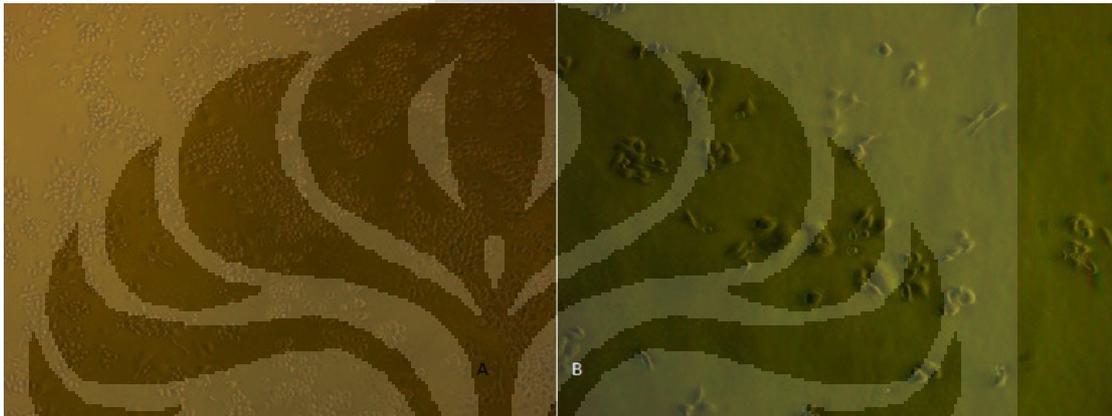
Hasil penapisan fitokimia sebelumnya menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid. Dari fraksi etil asetat diperoleh 8 pita. Dari pita B dan C dihasilkan isolat I dan isolat II. Isolat I dan isolat II memberikan bercak berwarna biru kehijauan dengan penampak bercak Liebermann-Buncharad yang menunjukkan senyawa steroid dan berwarna jingga dengan penampak bercak Dragendorf yang menunjukkan senyawa alkaloid. Isolat I mempunyai jarak lebur 196-1970C, sedangkan isolat II 271-2720C. Kedua isolat tersebut mempunyai gugus OH, NH₂, CH₂, dan tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi, serta memiliki BM yang sama yaitu 446 (Sekolah Farmasi ITB, <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>)

4.7 Thawing dan penyiapan kultur sel

Pengamatan pada 24 jam setelah thawing terlihat masih banyak sel yang belum menempel pada dasar plate. Kemudian dilakukan penggantian medium, dengan membuang medium yang lama dan menggantinya dengan medium kultur baru sebanyak 5 ml. Kultur tidak dicuci dengan PBS dikhawatirkan sel yang belum menempel akan ikut terbuang. Selanjutnya kultur disimpan didalam inkubator dengan suhu 37°C dengan CO₂ 5% kelembaban 80 – 90 %.

Pengamatan dilanjutkan setiap hari, pada hari ke 3 setelah thawing sel mulai tumbuh lebih pesat (gambar 4.2). Pengamatan pada hari ke 4 terlihat

pertumbuhan sel sudah 50% menutupi dasar cawan kultur, kemudian dilakukan subkultur pada cawan kultur 75cm². Pertumbuhan sel pada hari ke-2 setelah subkultur sel tumbuh dan berkembang lebih pesat, dan tersebar merata keseluruhan cawan kultur. Pengamatan hari ke 5 pertumbuhan sel sudah mencapai 70 – 80% luas permukaan cawan kultur, dan sel sudah dapat di panen. Sel hasil panen sebagian disubkultur dalam cawan petri berdiameter 10 cm dengan konsentrasi, sisanya disimpan sebagai stok sel dengan cara dibekukan dalam nitrogen cair.



Gambar 4.2 Morfologi sel RAW 264

Keterangan : A = dilihat pada mikroskop dengan pembesaran 10 x.

B = dilihat pada mikroskop dengan pembesaran 40 x.

4.8 Pengujian proliferasi sel metode MTT

Pengujian proliferasi sel metode MTT dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol 96% buah leunca mempengaruhi viabilitas sel RAW 264. Sebelum pengujian dilakukan penyiapan larutan sampel uji ekstrak etanol 96% buah leunca sesuai dengan konsentrasi yang akan diujikan. Ekstrak ditimbang sebanyak 21,4 mg dan dilarutkan dengan 428 µl DMSO untuk membuat larutan stok 50.000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran beberapa kali sampai didapat konsentrasi ekstrak 100 µl/ml, 50 µl/ml, 25 µl/ml, 12,5 µl/ml, 6,25 µl/ml dan 3,125µl/ml. Konsentrasi DMSO yang terdapat dalam larutan ekstrak etanol

96% juga dihitung untuk memperkirakan pengaruh DMSO terhadap hasil pemeriksaan.

Hasil pengamatan pengaruh ekstrak terhadap proliferasi sel RAW 264 setelah 24 jam dan 48 jam, yang dibaca dengan Elisa reader tercantum pada Tabel 4.10. dan Gambar 4.3.

Tabel 4.11 Data absorbansi pengujian MTT pengaruh perlakuan ekstrak terhadap sel RAW 264 pada 24 jam dan 48 jam dibaca pada λ 570 nm (setelah dikurangi absorbansi media 0,22)

	Absorbansi 24 jam (rata rata \pm SE)	Absorbansi 48 jam (rata rata \pm SE)
Kontrol	0.1233 \pm 0.01472	0.3607 \pm 0.01596
Konsentrasi 3.125	0.099 \pm 0.00881	0.3833 \pm 0.0201
Konsentrasi 6.25	0.116 \pm 0.05622	0.438 \pm 0.06022
Konsentrasi 12.5	0.0473 \pm 0.00841	0.290 \pm 0.02401
Konsentrasi 25	0.0257 \pm 0.01235	0.1837 \pm 0.01713
Konsentrasi 50	0.015 \pm 0,00153	0.0217 \pm 0.00145
Konsentrasi 100	0.00097 \pm 0,00186	0.004 \pm 0.00058

Keterangan : Kontrol adalah sel tanpa pemberian ekstrak etanol 96% leunca. SE = Standar error, dihitung dengan menggunakan SPSS statistic 16.0

Pengujian MTT ini mengukur kecepatan proliferasi sel karena akan bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase dalam mitokondria sel hidup, sehingga bila terjadi reaksi metabolik yang menyebabkan apoptosis atau nekrosis maka viabilitas selnya akan berkurang.

Dari data absorbansi tersebut diperoleh data viabilitas sel melalui rumus sebagai berikut :

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

Data yang dipindahkan dalam bentuk grafik terlihat pada pola grafik dibawah ini.

Gambar 4.3. Absorbansi MTT assay RAW 264 pada 24 dan 48 jam setelah pemberian ekstrak etanol 96% leunca, dibaca dengan Elisa reader pada $\lambda 570$ nm (setelah dikurangi dengan rata rata absorbansi media 0,22)

Tabel 4.12 Viabilitas sel RAW 264 pada 24 jam dan 48 jam (Kontrol dan ekstrak leunca konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$.

Perlakuan	Viabilitas RAW 264 pada	Viabilitas RAW 264 pada
	24 jam (%)	48 jam (%)
Kontrol	100	100
Konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$	80,29197	106,2656
Konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$	94,07948	114,2708
Konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$	38,36172	66,21005
Konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$	20,84347	11,81274
Konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$	7,866991	18,43318
Konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$	8	2

Tabel diatas apabila dipindahkan dalam bentuk grafik histogram, maka akan terlihat sebagai berikut :

Gambar 4.4 Data pengaruh ekstrak etanol 96% buah leunca terhadap viabilitas sel RAW 264 pada pengamatan 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan

Perlakuan ekstrak konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan viabilitas sel dibawah viabilitas sel kontrol baik pada

Universitas Indonesia

pengamatan 24 jam maupun 48 jam. Karena pada konsentrasi tersebut ekstrak menghambat proliferasi sel, dengan demikian tidak dapat digunakan pada pengujian osteoklastogenesis. Sebaliknya pada konsentrasi ekstrak 3,125 µg/ml dan 6,25 µg/ml tidak mempengaruhi proliferasi sel, dimana viabilitas sel hampir sama dengan viabilitas sel kontrol, Sehingga konsentrasi ekstrak tersebut akan digunakan dalam pengujian osteoklastogenesis. Hal ini diduga berkaitan dengan sifat ekstrak sebagai fitoestrogen adalah paradox, artinya mempunyai efek estrogenik pada konsentrasi rendah dan antiestrogenik pada konsentrasi tinggi.

4.9 Pengujian osteoklastogenesis

Untuk pengujian osteoklastogenesis sel RAW 264 ditanam pada plat 48 well dengan jumlah sel awal 5×10^4 / ml yang diberi perlakuan ekstrak konsentrasi 3,125µg/ml dan 6,25 µg/ml. Setiap perlakuan dilakukan ulangan triplikasi. Pada hari ke2 diberi perlakuan RANKL dengan konsentrasi 1µl/ml medium kultur. Penggantian medium dengan komposisi yang sama dilakukan setelah 72 jam perlakuan dan pengamatan dilakukan setelah 96 jam perlakuan dengan pewarnaan TRAP..

Sel osteoklas diamati sebagai sel yang positif menyerap pewarnaan TRAP dengan jumlah inti sama atau lebih dari 3. Perhitungan jumlah sel osteoklas dilakukan dengan mikroskop perbesaran 10x pada 5 lapang pandang yang berbeda disetiap well. Jumlah osteoklas yang didapat kemudian dianalisa secara statistik dengan menggunakan SPSS 16.0, untuk mencari apakah ada perbedaan bermakna pada osteoklas yang terbentuk dari masing masing perlakuan dibandingkan kontrol.

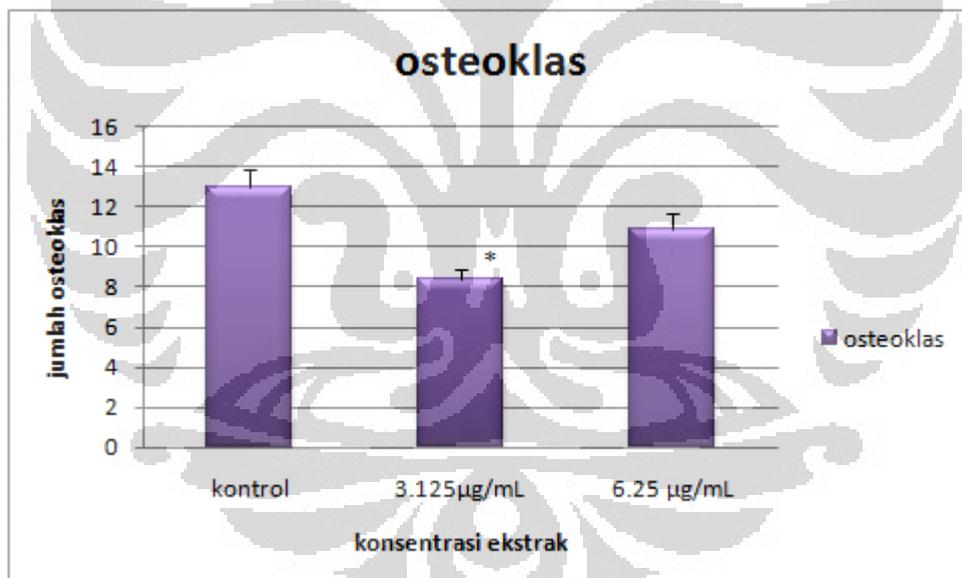
Tabel 4.13 Jumlah sel osteoklas pada masing masing perlakuan. Data ditampilkan dalam bentuk mean ± standar Error (SE)

	Jumlah osteoklas perlapang pandang (mean ± SE)
Kontrol	13.000 ± 0.879

Konsentrasi 3.125 µg/ml	8,417 ± 0.514
Konsentrasi 6.25 µg/ml	10.917 ± 0.802

Keterangan : Kontrol adalah sel dengan penambahan RANKL saja, sedangkan perlakuan lain adalah sel dengan penambahan RANKL dan ekstrak.

Dari data diatas menunjukkan bahwa pada perlakuan ekstrak konsentrasi 3,125 differensiasi sel RAW 264 menjadi sel osteoklas lebih sedikit dari pada perlakuan ekstrak 6,25 µg/ml. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa perlakuan ekstrak dosis 3.125 µg/ml menekan proses osteoklastogenesis dari sel preosteoklas RAW 264 lebih baik dibanding perlakuan ekstrak 6,25 µg/ml. Hasil terbaik pada penelitian ini dimana jumlah sel osteoklas lebih sedikit tetapi viabilitas sel lebih tinggi terlihat pada perlakuan ekstrak dosis 3,125. µg/ml.



Gambar 4.5 Grafik perhitungan osteoklas pada masing masing perlakuan (Kontrol dan sel yang mendapat RANKL dan ekstrak etanol 96% dengan berbagai konsentrasi).

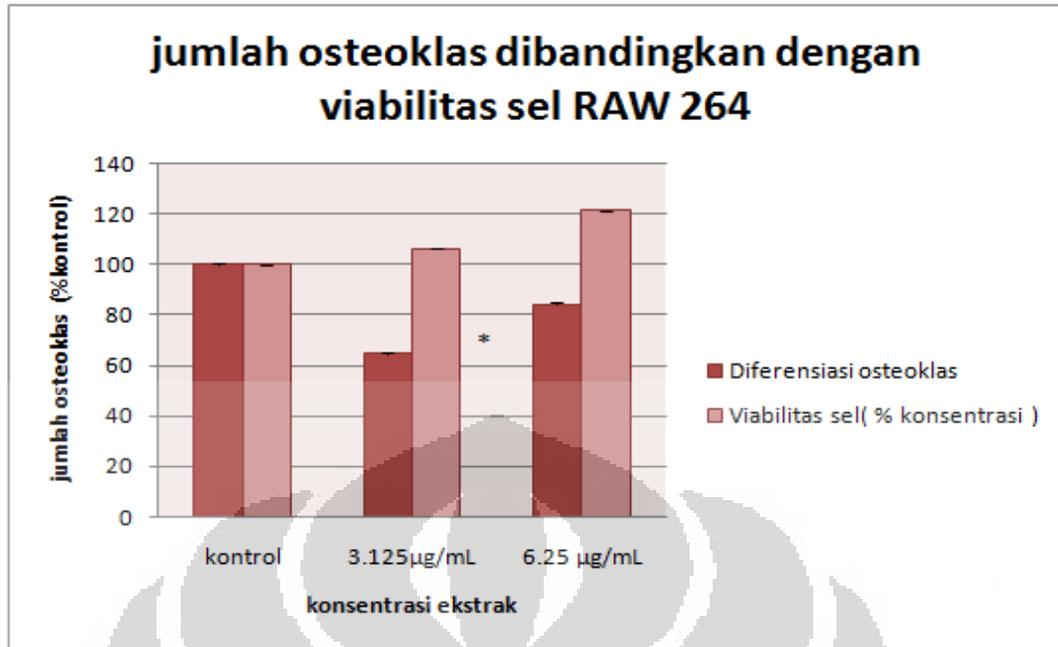
Keterangan : Jumlah osteoklas yang dihitung adalah positif TRAP dengan inti sama atau lebih dari 3.

Hal ini diduga berkaitan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa buah leunca muda mengandung glykoalkaloid yang beracun (Dalimarta, 2008). Kemungkinan hal ini pula yang menyebabkan pada data hasil penelitian bahwa semakin besar dosis ekstrak yang diberikan, proliferasi sel menjadi terganggu. Untuk memperkuat hasil pengujian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pengujian secara *in vivo* menggunakan hewan coba.



Gambar 4.6. Gambaran sel osteoklas pada konsentrasi 3,125 µg/ml

Dari data diatas didapatkan bahwa pada konsentrasi 3,125 µg/ml terlihat differensiasi sel RAW 264 menjadi osteoklas lebih sedikit dari pada dosis 6,25 µg/ml. Untuk melihat apakah jumlah osteoklas yang terbentuk sebanding dengan viabilitas sel RAW 264 , maka dibuat grafik yang memperlihatkan viabilitas sel dan jumlah osteoklas secara berdampingan.



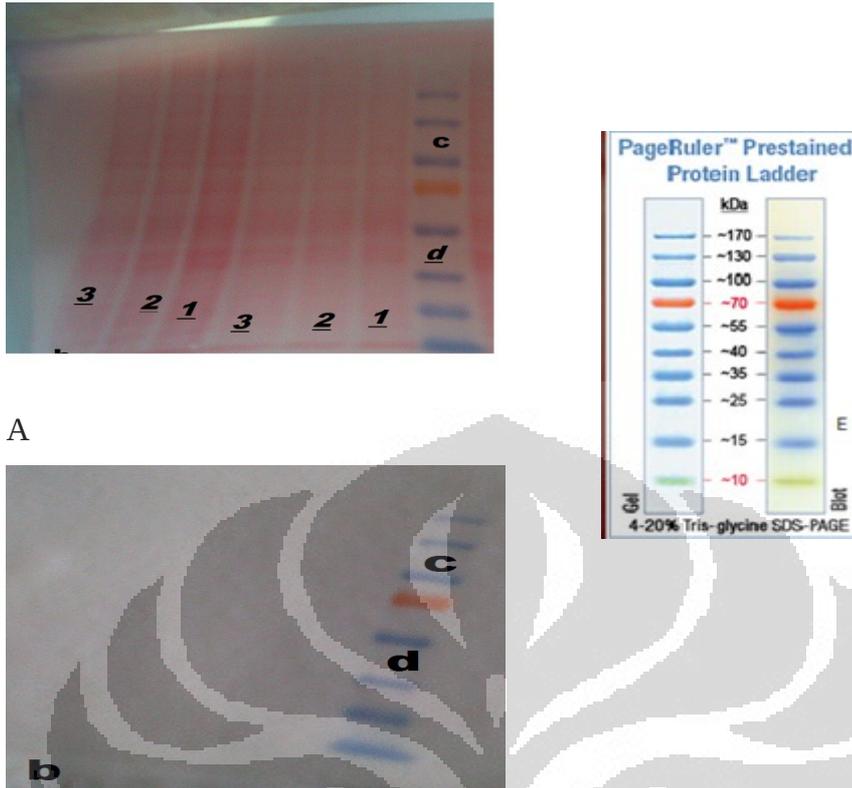
Gambar 4.7 Viabilitas sel dan jumlah osteoklas kontrol, konsentrasi 3,125 µg/ml dan konsentrasi 6,25 µg/ml. Pada konsentrasi 3,125 µg/ml viabilitas sel RAW 264 juga lebih kecil dari konsentrasi 6,25µg/ml.

Dari hasil yang didapat terlihat bahwa penekanan osteoklas pada sel RAW 264 dengan ekstrak etanol 96% leunca terlihat baik pada dosis kecil, dalam hal ini konsentrasi 3,125 µg/ml. Jika dilihat dari kandungan buah muda leunca mengandung glycoalkaloid yang beracun, kemungkinan hal ini yang menyebabkan pada data hasil penelitian terlihat semakin tinggi konsentrasi, proliferasi sel juga terganggu. Patel,S., Ghweewala,N., Suthar,A and Shah, A(2009) dalam penelitiannya menyatakan ekstrak metnol leunca pada konsntrasi 10 mg/ml sampai 0,0196 mg/ml berefek cytotoksik terhadap sel HeLa. Pada penelitian didapatkan hasil terbaik dimana pertumbuhan osteoklas lebih sedikit dan viabilitas sel lebih baik terlihat pada konsentrasi 3,125 µg/ml. Untuk menguatkan pengujian ini perlu penelitian lebih lanjut pada pengujian secara in vivo.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Wiyasa, Norahmawati dan Soehartono (2008), pemberian isoflavon, genistein dan daidzein oral dari ekstrak *Pueraria Lobata* setiap hari selama 21 hari meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan jumlah osteoklas *Rattus novergicus hipoestrogen* dengan dosis isoflavon, genistein dan daidzein 30mg/kg/BB/hari, serta menghasilkan jumlah osteoblas terbesar, dan osteoklas terkecil.

4.10 Pengujian western Blot

Pengujian Western Blot untuk mengetahui pengaruh ekstrak terhadap ekspresi protein NFAT2 oleh sel preosteoklas RAW 264 yang diinduksi dengan RANKL telah dilakukan mengikuti prosedur yang telah disebutkan pada Bab sebelumnya, namun hasil yang diperoleh belum dapat dianalisa. Pada pengujian Western blot ini meliputi beberapa tahap yang perlu dioptimasi. Beberapa tahap dalam pengujian Western Blot yaitu hasil SDS-PAGE dan hasil transfer ke membrane nitroselulose tercantum pada gambar 4.8.



A



B

Gambar 4.8 Hasil SDS-PAGE dan hasil transfer SDS –PAGE ke membran.

Keterangan :

A = SDS- PAGE yang terwarnai dengan ponceaue, untuk melihat keberhasilan running SDS – PAGE dengan melihat adanya pita protein yang muncul.

B = Membran Nitroselulose yang sudah selesai ditransfer dan diwarnai dengan pewarnaan ponceaue red. Terlihat marker protein, dan beberapa pita protein tertransfer sempurna namun pita protein tidak terlampau tegas terlihat.

c = daerah yang seharusnya muncul pada pita NFAT2 (antara 100 – 130 kDa).

d = Daerah yang seharusnya muncul pita β –actin (43 kDa)

E = Marker protein yang digunakan (Fermentas)

1 = Kontrol (-), sel tanpa perlakuan

2 = Kontrol (+), sel + medium + RANKL

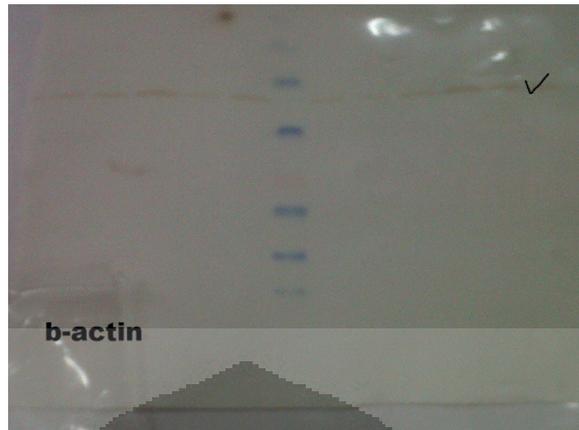
3 = Sel + medium + RANKL + konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$

Pewarnaan dengan Coumassie Brilliant Blue pada gel SDS-PAGE untuk mengetahui keberhasilan running SDS – PAGE dengan terlihatnya pita protein. Loading dan running berhasil dilakukan dengan baik, demikian pula pewarnaan dengan Coumassie Brilliant Blue yang merata pada gel, tetapi pita protein yang terbentuk sangat tipis (Gambar A)

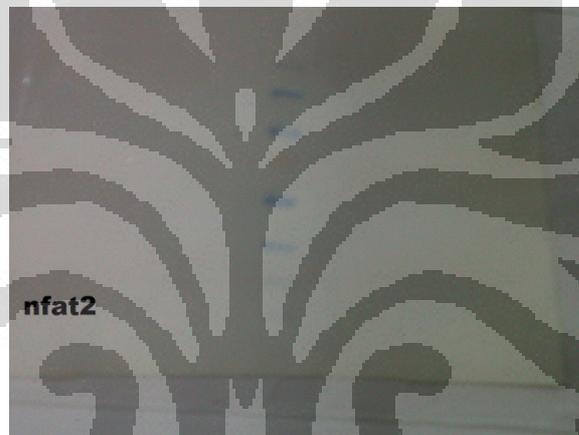
Pada membran nitroselulose yang sudah selesai ditransfer dan diwarnai dengan pewarnaan ponceau red, tampak marker protein, dan beberapa pita protein yang telah tertransfer meskipun sangat tipis (Gambar C). Pita NFAT2 dengan BM antara 100 – 130 kDa seharusnya tampak pada daerah c. sedangkan pita β -actin dengan BM 43 kDa seharusnya terlihat pada daerah d. ,

Dari hasil Western Blot dapat dilihat beberapa pita protein yang muncul baik pada gel maupun membran, meskipun sangat tipis. Pada daerah c yaitu tempat seharusnya ada pita NFAT2 tidak terlihat pita, sedangkan pada pita β -actin terlihat pita berwarna coklat tetapi sangat tipis.

Tahap selanjutnya adalah blocking membran yang dibersihkan dari pewarna ponceau red dengan blocking agen yaitu BSA dalam PBST, dan diikuti dengan inkubasi antibodi pertama selama 1 jam. Setelah dilakukan pencucian dengan PBST sebanyak 3 kali, maka dilakukan inkubasi dengan antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan HRP. Tahap terakhir adalah tahap deteksi dengan menggunakan DAB kit.



A



B

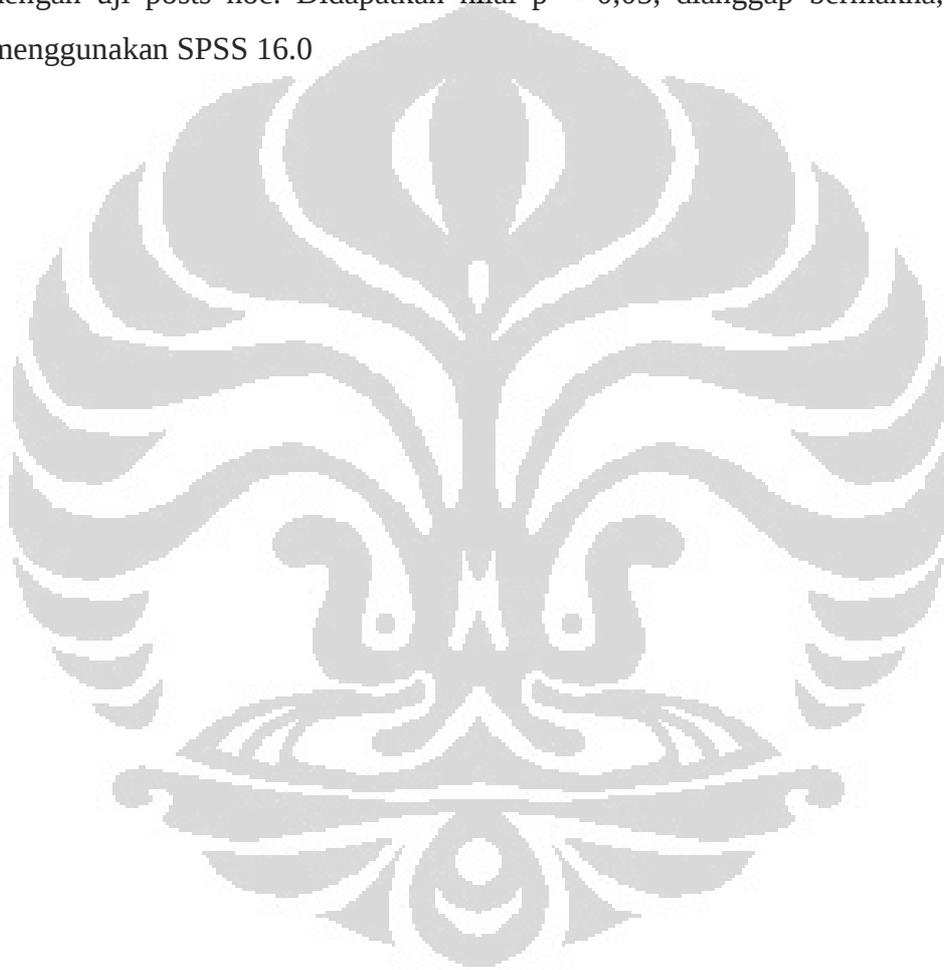
Gambar 4.9 Hasil Western Blot setelah dideteksi dengan DAB kit

Keterangan : Pada gambar β actin tampak terlihat ekspresi protein dengan gambaran garis berwarna coklat namun tidak terlalu nyata. Pada gambaran nfat2 tidak tampak terlihat ekspresi dari preotein.

Pada gambar 4.9. A pita β actin terlihat berwarna coklat meskipun sangat tipis tetapi pita NFAT2 tidak terlihat (Gambar B). Dari hasil Western Blot ini belum bias dianalisa, karena banyak faktor yang perlu dilakukan optimasi. Sehingga dari hasil pengujian Western Blot belum dapat diketahui pengaruh ekstrak etanol 96% buah leunca terhadap ekspresi protein NFAT2.

Beberapa faktor yang perlu dilakukan optimasi antara lain jumlah sel yang ditanam ditingkatkan sehingga konsentrasi protein yang diperoleh lebih tinggi. Faktor lainnya adalah konsentrasi protein yang di loading ditinggikan. Selain itu waktu inkubasi dengan antibodi pertama ditambah sehingga memungkinkan antibodi untuk berikatan dengan protein secara sempurna..

Analisa statistik menggunakan analisis varians (ANOVA), dilanjutkan dengan uji posts hoc. Didapatkan nilai $p < 0,05$, dianggap bermakna, dengan menggunakan SPSS 16.0



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Ekstrak etanol 96% buah leunca mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan terpen.
- b. Kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 96% leunca merupakan isoflavon dalam bentuk aglikon yaitu daidzin, glisitin, genistin serta dalam bentuk glikosida, yakni daidzein, glisitein, genistein
- c. Perlakuan ekstrak etanol 96% buah leunca pada konsentrasi 3,125 μ g/ml dan 6,25 μ g/ml tidak mempengaruhi proliferasi sel, selanjutnya konsentrasi 12,5 dan 25 μ g/ml mulai menghambat proliferasi sel, dan pada konsentrasi selanjutnya 50 μ g/ml, 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml toksik terhadap sel.
- d. Ekstrak etanol 96% buah leunca dapat berperan sebagai fitoestrogen dan aktif menghambat osteoklastogenesis sel preosteoklas RAW 264 dimana konsentrasi 3,125 μ g/ml merupakan konsentrasi optimum dalam menekan osteoklastogenesis.
- e. Ekspresi protein NFAT2 pada pengujian western blot belum dapat diamati, perlu dilakukan optimasi pada beberapa tahap pengujian.

5.2 Saran

- a. Pengujian ini perlu dilanjutkan dengan pengujian secara in vivo menggunakan hewan coba untuk membuktikan bahwa khasiat antiosteoklastogenesis dari buah leunca secara in vitro berkorelasi positif dengan hasil pengujian secara in vivo.
- b. Dalam pengujian ekspresi protein NFAT2 secara Western Blot masih perlu

dilakukan optimasi pada beberapa kondisi pengujian, antara lain jumlah sel yang akan dianalisa proteinnya, jumlah protein yang diloading didalam gel, konsentrasi antibodi β -actin untuk mengikat protein, dan waktu transfer protein dari gel ke membran nitroselulosa sehingga ekspresi protein NFAT2 dapat diamati dengan jelas

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel, H.C. (1989). Pengantar bentuk sediaan Farmasi (edisi 4). Jakarta: UI-Press.
- Anggriati, P. (2008). Skripsi: *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah kemukus (Piper cubeba L) Terhadap sel Hela*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah surakarta.
- Bustamam, N. (2006). *Fitoestrogen dan Kesehatan Tulang*. Bina Widya (vol.19-3, 146-150). Jakarta.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). *Osteoclast differentiation and activation*. Nature vol.423. California, USA.
- Bahtiar, A., et al. (2009). Identification of a novel L-Serine Analog that Suppresses Osteoclastogenesis in vitro and Bone Turn Over in vivo. *Journal of Biological Chemistry*,16, 207-213.
- Bahram, H., Arjmandi. (2001). The Role of Phytoestrogens in the Prevention and Treatment of Osteoporosis in Ovarian Hormone Deficiency. *Journal Am Coll Nutr vol. 20 no. suppl 5 398S-402S*

Chiechi, L.M and Micheli, L. (2004). *Utility of dietary Phytoestrgens in Preventing Postmenopausal osteoporosis*. Current Topics in Nutraceutical Research.(Vol. 3, No. 1, pp. 15-28). Bari, Italy.

Dalimarta, S. (2008). *Atlas tanaman Obat Indonesia Jilid 5*. Pustaka Bunda.

Derek, S., Kalangi, S.J.R., and Wangko, S. (2007). *Kerja Osteoklas pada perombakan tulang*. BIK Biomed.(Vol.3.3). Manado, Indonesia.

Ditjen POM.(1986). *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Edmonds, J.M.,and Chweya, J.A. (1997). *Black nightshades, Solanum nigrum L and related spesies*. International Plant genetic Resources Institute. Ed.1, vol.1;8.(1777). Australia.

Handbooks from GE Healthcare. *Western Blotting principles and Methods*.

Hartono, M.(2000). *Mencegah dan Mengatasi Osteoporosis* 1st ed. Jakarta Puspa Swara.

Hanani, E.,dan Mun'im, A. (2005). *Penuntun Praktikum Fitokimia I*. Departemen farmasi Universitas Indonesia.

Ishida, N. et al. (2002). Large Scale Gene Expression Analysis of Osteoclastogenesis in vitro and Elucidation of NFAT2 as a Key regulator. *Jurnal of Biological Chemistry*, 277(43), 41147-41156.

Istiaji, R.P.' Leunca (*Solanum Nigrum*)' n.d. Fakultas Farmasi Universitas

Gajah Mada. Berbagi dan Aplikasi kemoprevensi.

Universitas Indonesia

Jimi, E., et al. (1999). Osteoclast Differentiation Factor Acts as a Multifunctional Regulator in Murine Osteoclast Differentiation and Function. *Jurnal of Immunology*. 163;434-442..

Jilka, L.(2001). *Cell biology of osteoblast and the hormones and cytokines that control their development and activity*. The 1st joint Meeting of the International Bone and Mineral society and the European calcified Tissue Society; june 1-5; Madrid spain.

Jain, N.,Sharma, A.,Gupta, S.,Sarethy, I.P., and Gabrani, R. (2011). *Solanum nigrum: Current Perspectives on Therapeutic Properties*. *Alternative medicine Review*. Vol.16.1. India.

Kawiyana, S. (2009). Interleukin-6 yang tinggi sebagai faktor resiko terhadap kejadian osteoporosis pada wanita pascamenopause defisiensi estrogen. *Jurnal Penyakit Dalam* Vol.10

Kris, H., Komar, R dan Irda, F. *Telaah Kandungan kimia buah Leunca (Solanum nigrum L)*. Sekolah Farmasi ITB. April 9, 2012. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>.

Kreijkamp, S. et al. (2004). Effect of Soy Protein Containing Isoflavones on Cognitive function, Bone Mineral Density, and Plasma Lipids in Postmenopausal Women. *JAMA*.;292(1):65-74. doi:10.1001/jama.292.1.65

Koswara, S. (2006) Isoflavon, senyawa multi manfaat dalam kedelai. *Ebookpangan IPB, Bogor*.

- Liswati, H. (2007). Disertasi Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran. *Kombinasi latihan fisik dan pemberian daun semanggi menghambat peningkatan ketidakseimbangan proses remodeling tulang perempuan pascamenopause melalui peran reseptor estrogen α sel*. Universitas Airlangga.
- Manolagas, S.C.(2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 21(2):115-37. USA.
- Manolagas, S.C., Jilka, R.L.(1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl Journal Med.* 2;332(5), 305-11.
- Nurrochmad, A., Leviana, F., Wulancarsari, C.G., Lukitaningsih, E. (2010). Phytoestrogen of *Pachyrhizus erosus* prevent Bone Loss in an Ovariectomized Rat model of Osteoporosis. *Jurnal of phytomedicine*, 2, 363-372..
- Pawiroharsono, S.n.d. Prospek dan manfaat isoflavon untuk kesehatan. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
- Product Pathway- Lymphocyte Signaling, Cell Signaling Technology. 9 April 2012. [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn:RANK_Signaling_in_Osteoklast](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=RANK_Signaling_in_Osteoklast).
- Patel, S.,Ghweewala, N.,Suthar, A and Shah A.(2009). In-Vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela Cell line and Vero Cell line. *Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals science* Vol.1.1.
- Roudsari, A.H. et al. (2005).Assessment of soy phytoestrogens' effects on bone turnover indicators in menopausal women with osteopenia in Iran: a before

and after clinical trial. *Nutrition Journal*, (vol.4:30 doi:10.1186/1475-2891-4-30). Tehran, Iran.

Rahmansyah, A., Sriana, D.W., Agustin, G.A.(2011). Skripsi. *Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh melalui Skrining Fitokimia dengan Menggunakan Metode KLT*. AKAFARMA, Malang.

Rustaman., Abdurahman, M., Al-Anshori ,J. (2006). Skrining fitokimia tumbuhan di kawasan gunung kuda kabupaten Bandung sebagai penelaah keanekaragaman hayati. *Laporan penelitian*, Lembaga penelitian Universitas Padjajaran..

Tempfer, C.B. et al. (2007). Phytoestrogens in clinical practice. *a review of the literature*. **Fertility and Sterility** Volume 87, Issue 6 , Pages 1243-1249. Netherlands.

Tempfer, C.B., Simoni, M., Destenaves, B., and Fauser, B.C. (2009). Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II- endometriosis. *Human Reproduction Update*, Vol.15, No.1 pp. 97–118. Netherlands.

Tulang.(Tutorial IPB,n.d) Juni 12. 2012. <http://blogs.unpad.ac.id/histologi>.

Wiyasa, I.W.A., Norahmawati, E., dan Soehartono. (2008). Pengaruh isoflavone genistein dan daidzein ekstrak tokbi (*Pueraria lobata*) strain Kangean terhadap jumlah osteoblas *Rattus Novergicus Wistar* hipoestrogenik. *Jurnal Obstet Gynecol* vol.32-3 : 148-52.

Wasjudi., dan Nugroho. (2000). *Keperawatan Gerontik*. (Ed.2). Jakarta, EGC.

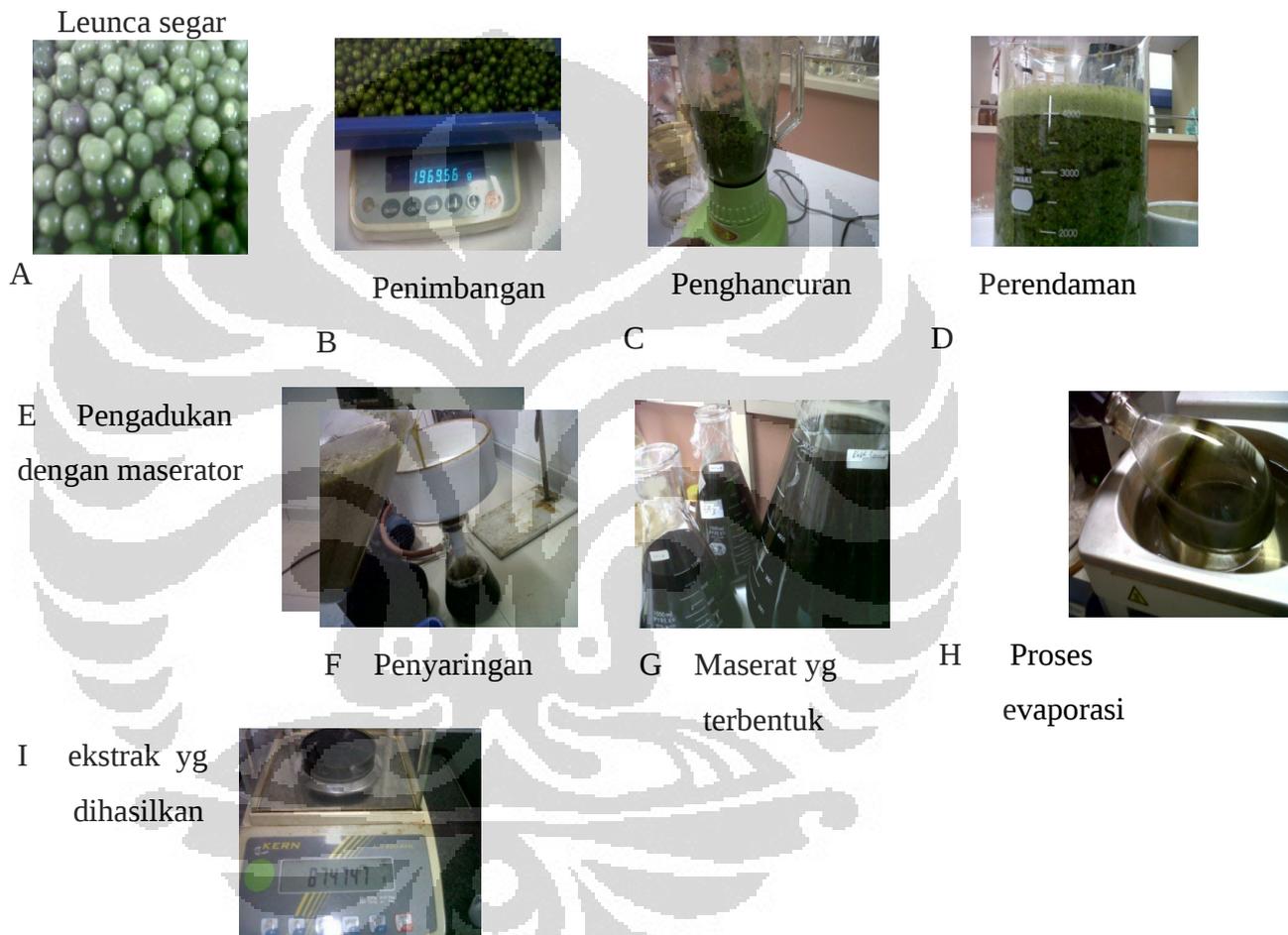
Writing Group for The Women's Health initiative Investigators. "Risk and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women".

Universitas Indonesia

Prinsipal Results From the women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *Journal of American medical Association*. Vol.288.3

Yatim., dan Faisal. (2003). *Osteoporosis (Penyakit Kerapuhan Tulang) pada Manula*. Jakarta: Pustaka Populer Obor.

Lampiran 1. Pembuatan ekstrak etanol 96% Leunca

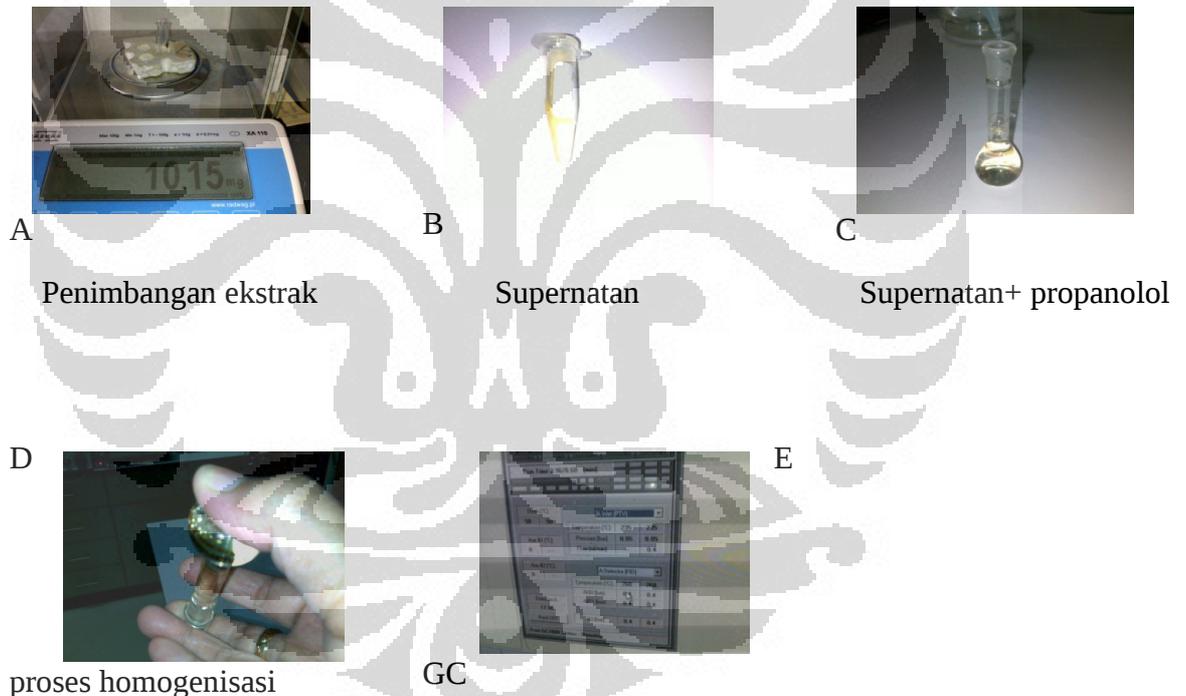


Keterangan : Proses pembuatan simplisia dimulai dengan pengumpulan leunca dicuci bersih dan dikeringkan dari air (A), kemudian Leunca ditimbang (B),

Universitas Indonesia

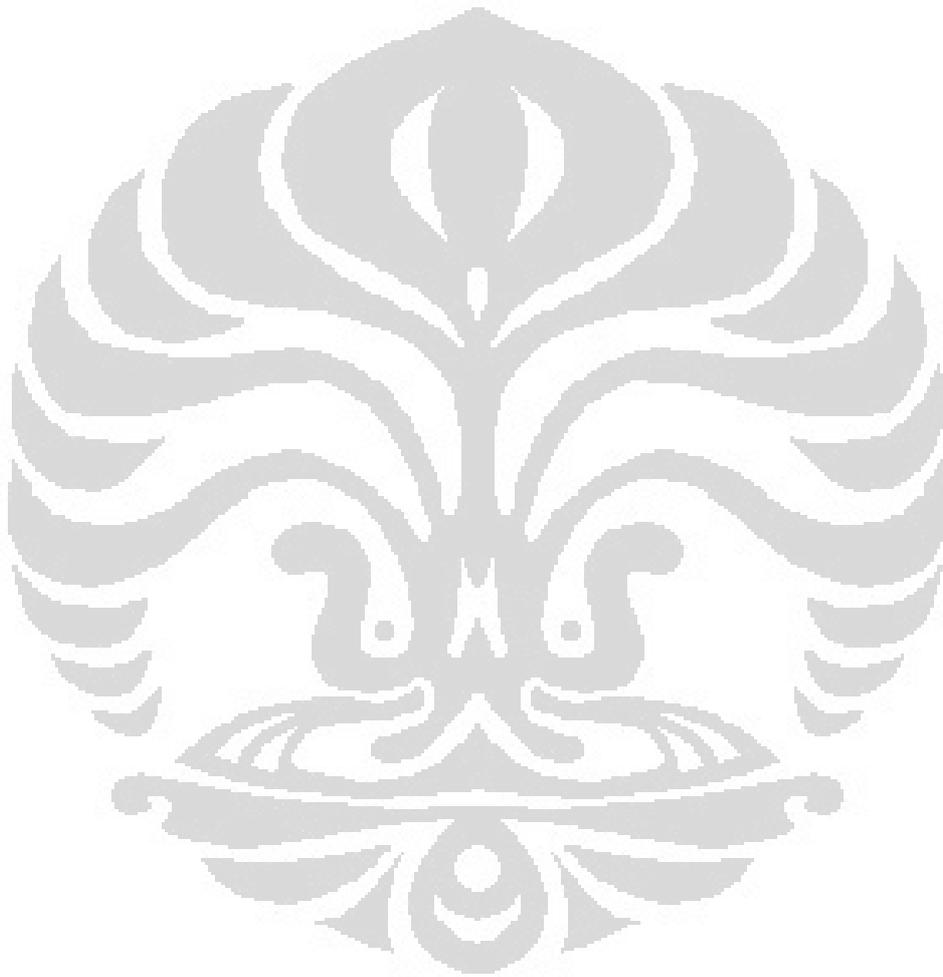
Leunca segar di hancurkan kasar dengan menggunakan blender dan diberi etanol 96% untuk memudahkan penghancuran (C), hasilnya dikumpulkan dalam 1 wadah (D), Selanjutnya dilakukan maserasi selama 2 jam dengan maserator dengan perbandingan 10: 1 untuk maserasi awal (E) dan selanjutnya dilakukan maserasi berikutnya hingga 3 kali maserasi dengan perbandingan pelarut 7:1. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan dengan bantuan vacuum pump .(F), Hasil maserasi didapatkan maserat sebanyak 7000 ml (G), kemudian dilakukan evaporasi terhadap maserat yang didapat dengan menggunakan rotavapor pada suhu 40°C. Vacuum kontrol bertekanan 175 mbar (H), didapatkan ekstrak etanol 96% kental leunca sebanyak 87,475 gram (I)

Lampiran 2 . Pemeriksaan sisa pelarut



Keterangan : 10,15 mg sampel ditimbang dan dimasukkan dalam tabung effendrof (A) kemudian ditambahkan ditambahkan air 1 ml, disonifikasi 10 menit, selanjutnya disentrifus 10 menit 5.000 rpm (B). Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam labu takar 5 dan ditambahkan propanol 25µl serta

tambahkan air hingga batas tanda (C), dihomogenkan dan di spuit 1 μ l (D),
kemudian diinjeksikan ke GC merk : Dani 1000 DPV no 031203 LHL3. Fase
diam : C10, Fase gerak : N2 (E)



Universitas Indonesia

Lampiran 3 . Pemeriksaan Fitokimia

Pengujian Isoflavon dengan metode KCKT

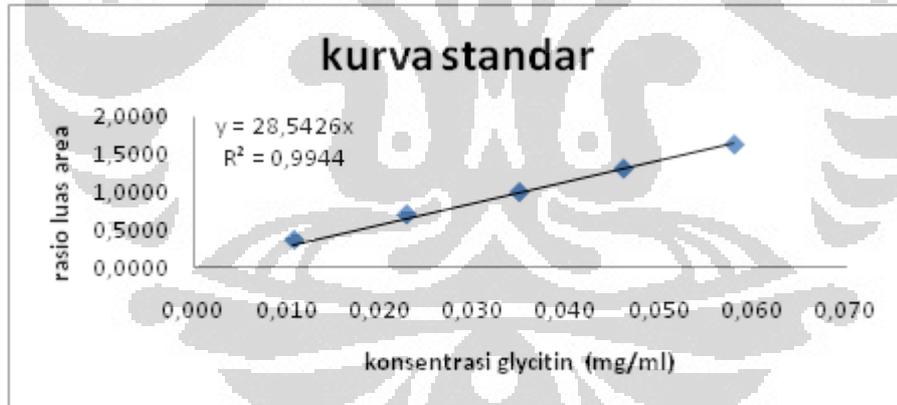
- sampel leunca

	Area sampel	Area apigenin	Rasio luas area
daidzin	2686	114464	0.02346589
glycitin	594129	114464	5.19053152
genistin	248014	114464	2.16674238
daidzein	38564	114464	0.33690942
glycitein	1163	114464	0.0101604
genistein	2997	114464	0.0261829

1. Kurva standar

Kurva standar daidzin

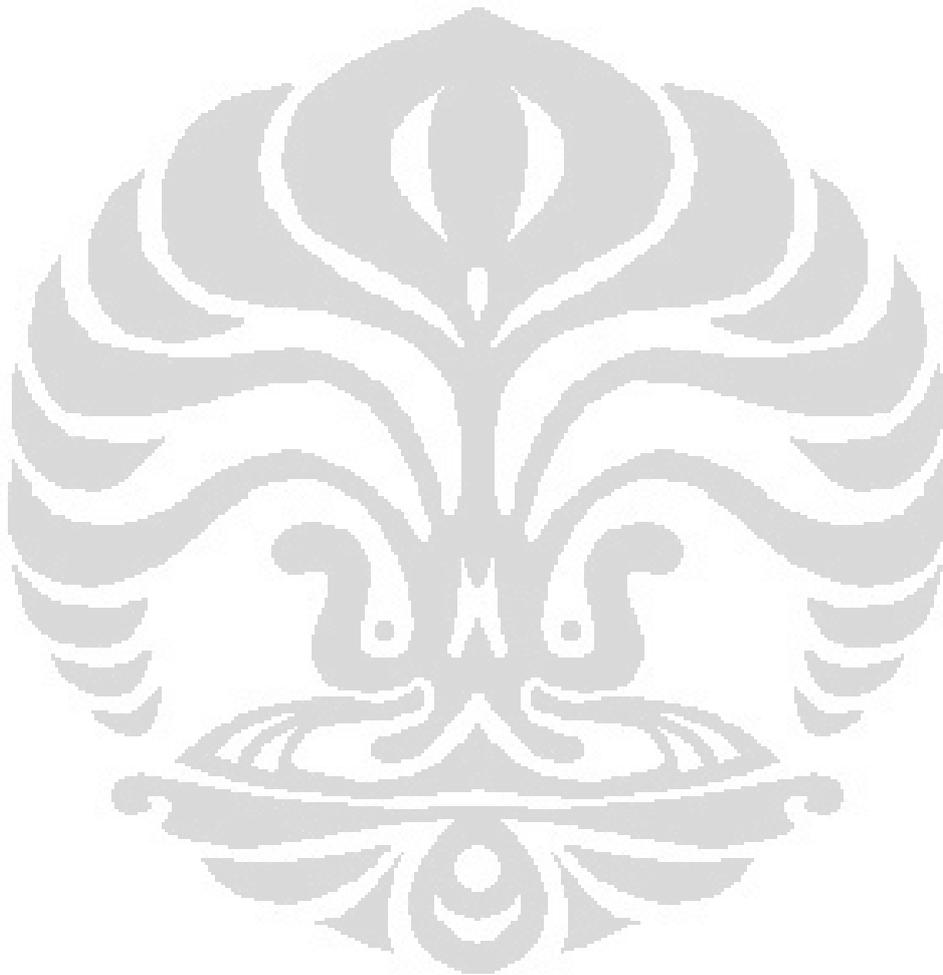
Kurva standar glycitin



(Lanjutan)

Kurva standar genistin

Kurva standar daidzein



Universitas Indonesia

(Lanjutan)

Kurva standar glycitein

Kurva standar genistein

2. Perhitungan

$$\text{Kons. } (X)_{\text{sebenarnya}} \text{ mg/g} = \text{kons. } (X)_{\text{analisis}} \text{ mg/ml} \times 1 \text{ ml/berat sampel}$$

(Lanjutan)

Leunca

	C analisa (mg/ml)	C sebenarnya (mg/g)
daidzin	0.00103	0.0199
glycitin	0.18185	3.5243
genistin	0.06052	1.1729
daidzein	0.00802	0.1555
glycitein	0.00025	0.0048
genistein	0.00051	0.0100

Leunca	Daidzin	1.9884	mg/100g
	Glycitin	352.4265	
	Genistin	117.2901	
	Daidzein	15.5505	
	Glycitein	0.4814	
	Daidzin	0.9967	

Lampiran 4 . Thawing sel



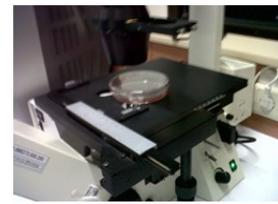
A

Sel dikeluarkan dari cryo



B

Penanaman sel pada
T flash



C

Sel hasil cryo dilihat
dibawah mikroskop

Keterangan : mengeluarkan cryo vial dari tempat penyimpanan (tangi nitrogen) (A), Medium 500 ml + 50 ml FBS + 5 ml Penisillin dan Streptomisin, di masukan sel RAW 264 P 26. Sel RAW 264 dimasukan dari cryo tube kedalam petri disc sebanyak 5 ml. (B),Sel hasil cryo tube dilihat di bawah mikroskop, kemudian diinkubasi didalam inkubator dengan 5% CO2 dan suhu 37°C selama 24 jam.

Lampiran 5 . Sub kultur sel RAW 264



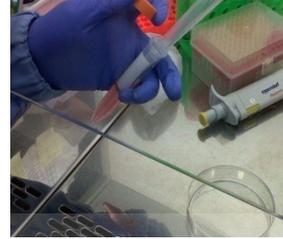
Pencucian sel dengan PBS.

A



scrapper sel pada dinding petri.

B



sel hasil scrapper siap untuk di sentrifuge

C



Pelet pada dasar tabung

D

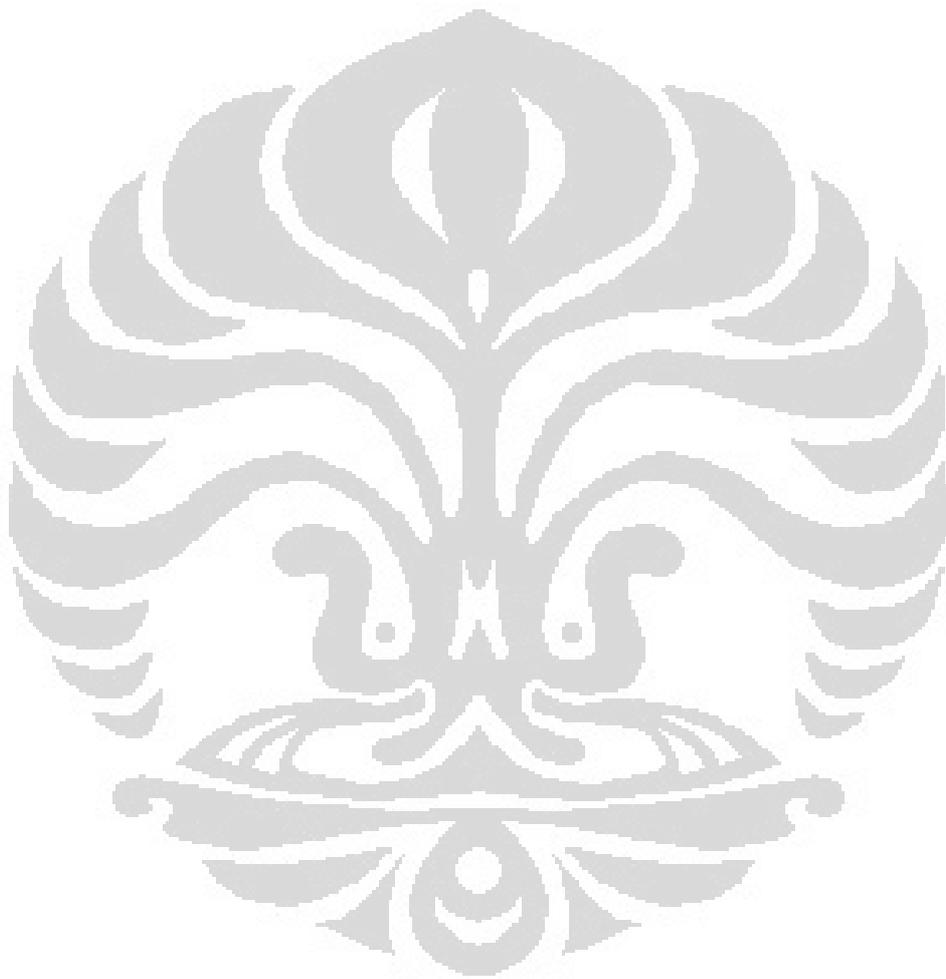


E. Pelet + medium

Siap untuk di inkubasi.

Keterangan : Sel dikeluarkan dari inkubator, medium dibuang, dan dicuci dengan PBS 1 kali (5 ml). (A), tambahkan tripsin 100 μ l, inkubasi selama 3 menit, kemudian sel di scrapper, masukan dalam tabung sentrifuge, dan disentrifuge pada 1500 rpm selama 5 menit (B & C), Pelet dimasukkan dalam medium baru, dilihat di bawah mikroskop, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan kelembaban 80 – 90%. (D)

Universitas Indonesia

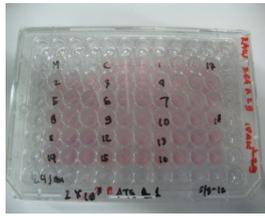


Universitas Indonesia

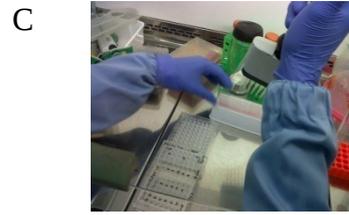
Lampiran 6. MTT assay



A Plate 96 well 24 jam dan 48 jam.



B Plate berisi sel siap diinkubasi



C Medium dibuang dan ditambahkan medium baru + MTT



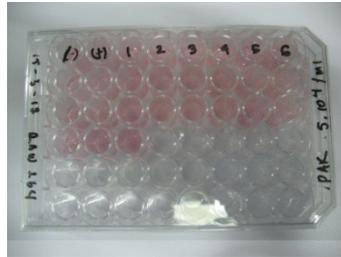
D. Setelah penambahan SDS ditutup dg alumunium foil dan disimpan dalam ruang gelap



E. Pembacaan absorbansi dengan ELISA reader

Keterangan : Sel ditanam pada 96 plate well dengan konsentrasi 5×10^4 sel/ml dan disimpan diinkubator (A), setelah 24 jam ditambahkan dengan beberapa konsentrasi, lalu disimpan di inkubator (B), 24 jam kemudian medium dikuras dan dimasukkan 100 μ l larutan MTT 10% dalam medium ke masing masing well (C),Setelah 4jam tambahkan SDS 100 μ l, tutup plate dengan alumunium foil dan simpan pada suhu ruang (D). Setelah semalam, baca absorbansi pada ELISA reader dengan panjang gelombang 570 nm. (E)

Lampiran 7. Pemeriksaan Osteoklastogenesis



Sel ditanam pada Plate 48 well

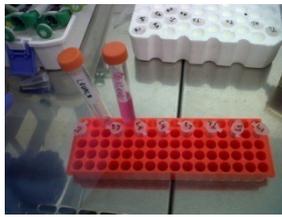
Keterangan : Untuk osteoklastogenesis digunakan plate 48 well yang diisi 250 μ l campuran sel, medium, RANKL, dan ekstrak.

Gambaran sel Osteoklas pada konsentrasi 3.125 μ g/ml.



Universitas Indonesia

Lampiran 9. Pemeriksaan running SDS- PAGE dan transfer membran



A Lisat protein dengan laemli 6x kuat.



B Pemanasan sampel + sampel buffer pada 100°C.



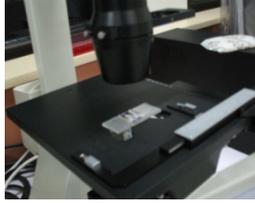
C Proses running



D Persiapan transfer membran

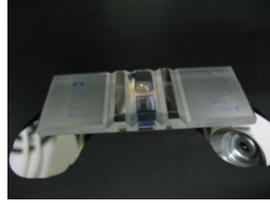
Keterangan : Lisat protein dicampur dengan Laemmli 6x loading buffer dengan perbandingan 5:1 (A), didenaturasi dengan menggunakan air yang dipanaskan di hot plate dengan suhu 100°C (B), Running SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis (C) Persiapan transfer gel ke membran. (D).

Lampiran 8. Perhitungan jumlah sel



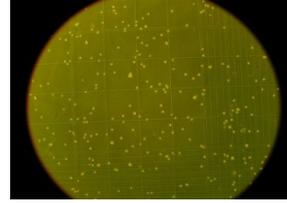
A

Perhitungan sel dengan hemocytometer.



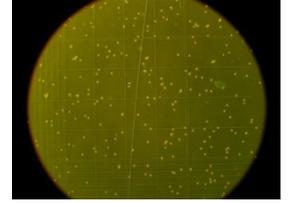
B

sel dengan



C

Gambaran sel pada kamar hitung.



D

Keterangan : Untuk menghitung jumlah sel / ml digunakan sel yang sudah di campur dengan larutan *trypan blue* (50 µl sel + 50 µl trypan blue) yang diteteskan pada hemocytometer, selanjutnya dihitung di mikroskop (A dan B). Sel yang dihitung adalah sel hidup (sel yang berwarna gelap adalah sel mati) yang terdapat pada empat bilik besar yang masing masing terdiri dari 16 kotak kecil (C dan D).

Jumlah sel yang didapat kemudian dimasukkan ke rumus :

$$\Sigma \text{ sel / ml} = \frac{\text{Jumlah total sel yang dihitung}}{4} \times 10^4 \times 10 \times 2$$

Dimana : 10^4 = jumlah sel dalam 1 ml

10 = pengenceran pertama 10 x (50 µl sel + 450 µl medium)

2 = pengenceran kedua 2 x (50 µl sel dari pengenceran pertama diencerkan lagi dengan 50 µl *trypan blue*)

Perhitungan jumlah sel pada plating untuk MTT assay

(lanjutan)

Jumlah total sel yang dihitung pada 4 bilik = 354 sel

$$\Sigma \text{ sel / ml} = 354 \times 10^4 \times 10 \times 2$$

$$\begin{aligned} & \frac{\quad}{4} \\ & = 177 \times 10^5 \text{ sel / ml} \\ & = 17,7 \times 10^6 \text{ sel/ ml} \end{aligned}$$

Konsentrasi sel $17,7 \times 10^6$ sel /ml disebut konsentrasi awal (n1)

Untuk mendapatkan konsentrasi sel yang diinginkan maka di masukkan ke dalam rumus :

$$v1 \times n1 = v2 \times n2$$

dimana :

v1 = Volume awal

n1 = Konsentrasi awal

v2 = volume akhir

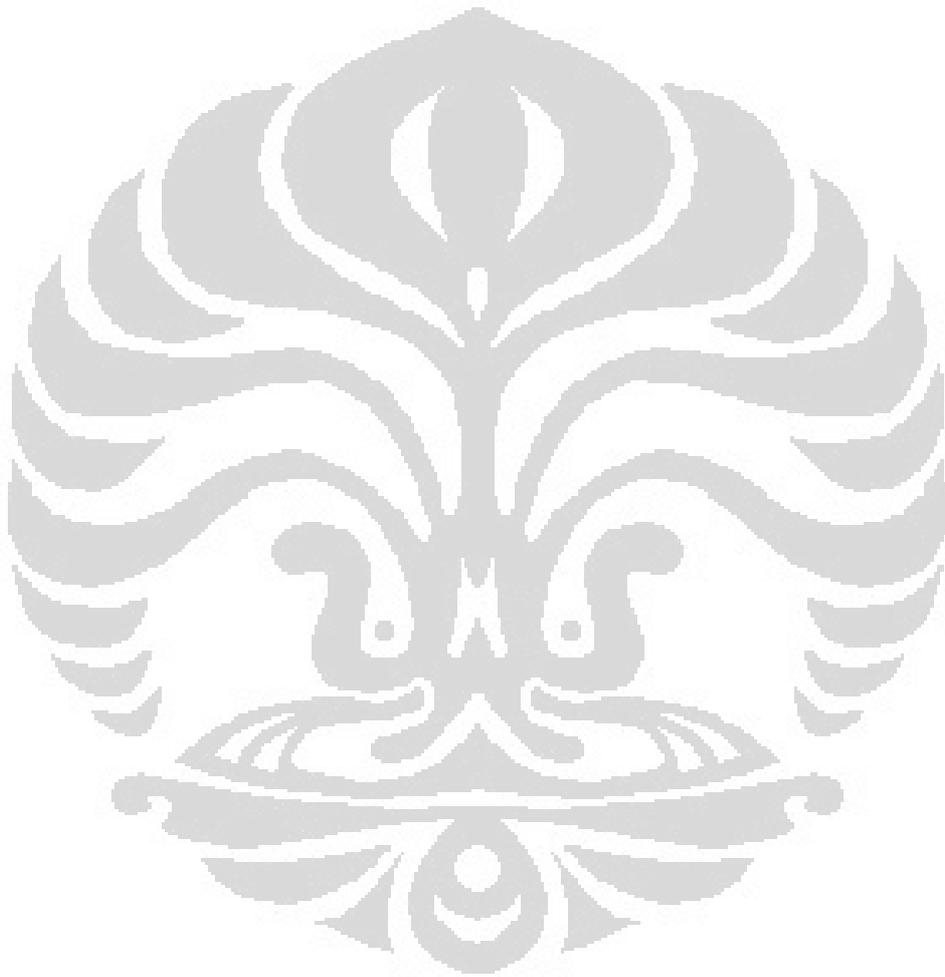
n2 = Konsentrasi akhir

Pada pemeriksaan MTT, masing masing *well* diisi 100 μ l campuran sel dan medium 5×10^4 / *well* (n2) maka volume sel awal diambil adalah :

$$\begin{aligned} v1 & = v2 \times n2 / n1 \\ & = 100 \mu\text{l} \times 5 \times 10^4 / 17,7 \times 10^6 \end{aligned}$$

Universitas Indonesia

= 0,028 μ l / well



Universitas Indonesia

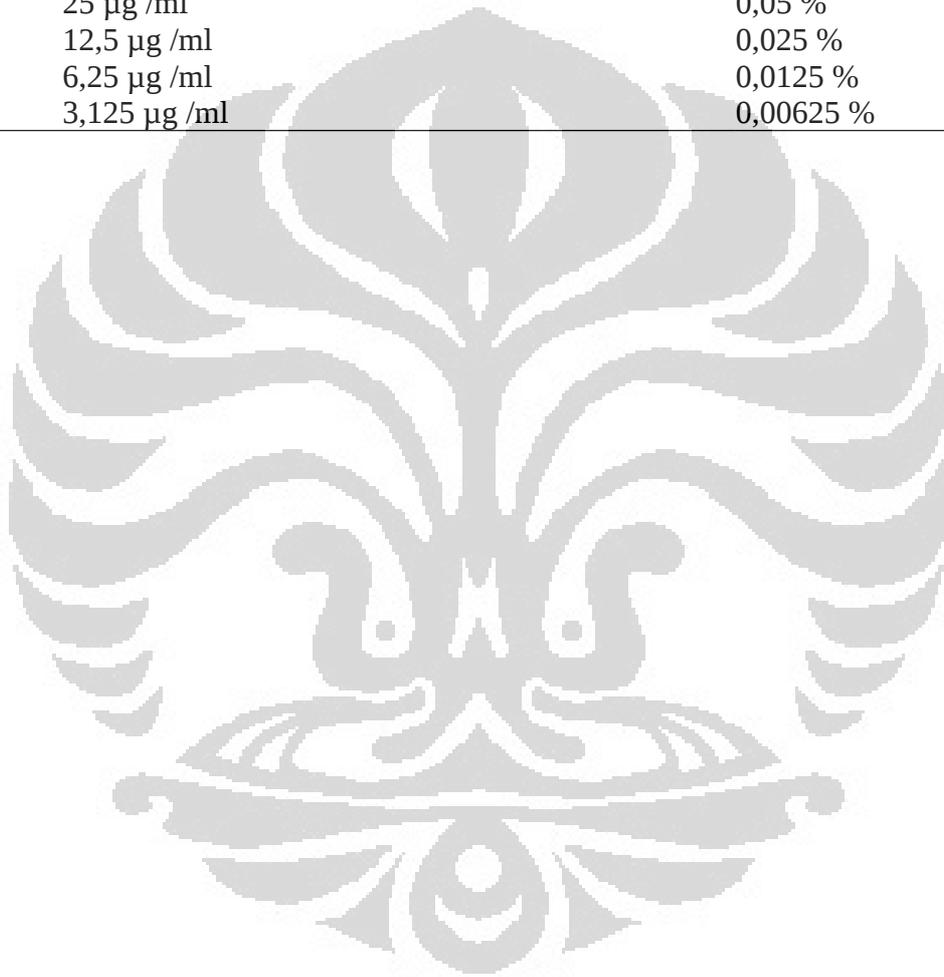
Lampiran 10. Pengenceran ekstrak dan konsentrasi DMSO .
konsentrasi Leunca yang ditimbang 16,8 mg

- 1) Untuk membuat larutan stok 50.000 ppm jumlah DMSO yang dibutuhkan
= $16,8 / 10 \times 200 = 336 \mu\text{l}$ (stok 1)
- 2) Untuk membuat larutan stok 5000 ppm diambil 50 μl stok 1 ditambah 450
 μl medium kultur (stok 2)
- 3) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 100 ppm
(konsentrasi 1) diambil 56 μl larutan stok 2 ditambah dengan 1344 μl
medium kultur.
- 4) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 50 ppm
(konsentrasi 2) diambil 56 μl larutan stok 1 ditambah 1372 μl medium
kultur.
- 5) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 25 ppm
(konsentrasi 3) diambil 56 μl larutan stok 2 ditambah 1372 μl medium
kultur.
- 6) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 12,5 ppm
(konsentrasi 4) diambil 56 μl larutan stok 3 ditambah 1372 μl medium
kultur.
- 7) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 6,25 ppm
(konsentrasi 5) diambil 56 μl larutan stok 4 ditambah 1372 μl medium
kontrol.
- 8) Untuk membuat larutan 1400 μl dengan konsentrasi ekstrak 3,125 ppm
(konsentrasi 6) diambil 56 μl larutan stok 5 ditambah 1372 μl medium
kontrol

(Lanjutan)

Tabel konsentrasi akhir DMSO pada masing-masing konsentrasi ekstrak.

No	Konsentrasi ekstrak	Konsentrasi DMSO
1	100 µg /ml	0,2 %
2	50 µg /ml	0,1%
3	25 µg /ml	0,05 %
4	12,5 µg /ml	0,025 %
5	6,25 µg /ml	0,0125 %
6	3,125 µg /ml	0,00625 %



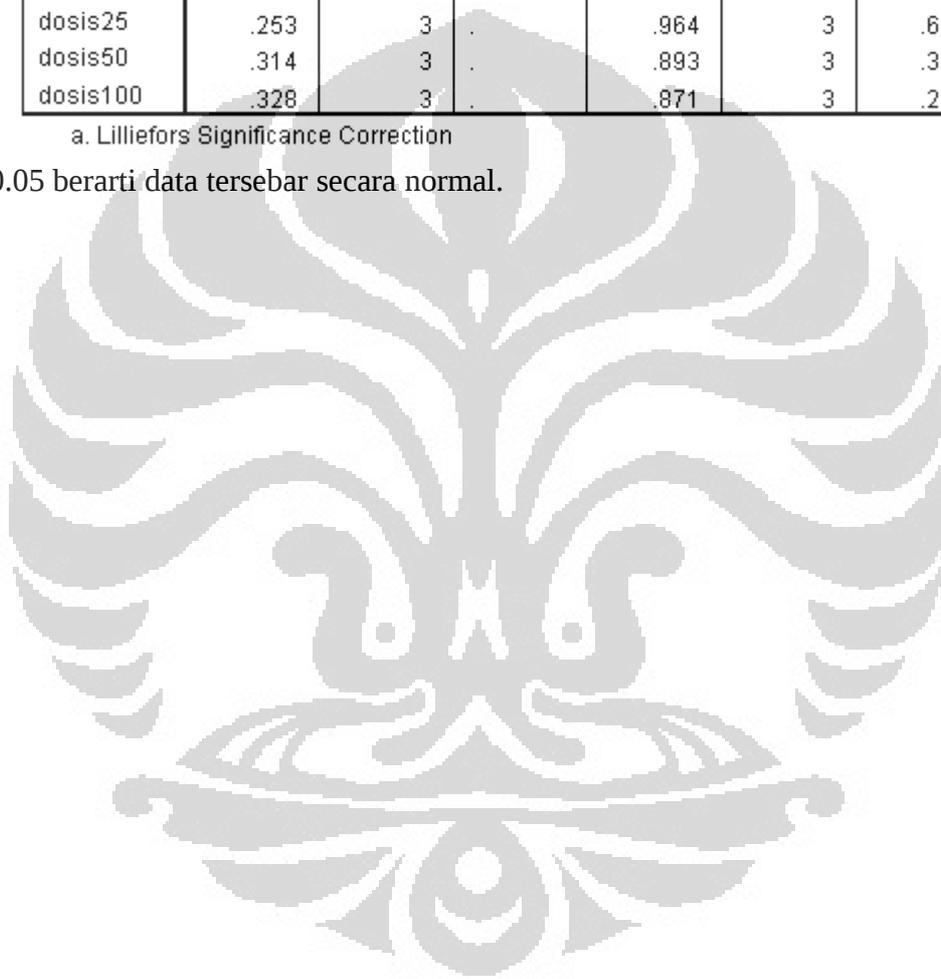
Lampiran 11. Analisa statistik MTT assay 24 jam (dengan SPSS 16.0)

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol	.176	3	.	1.000	3	.978
dosis3.125	.175	3	.	1.000	3	1.000
dosis6.25	.228	3	.	.982	3	.744
dosis12.5	.212	3	.	.990	3	.811
dosis25	.253	3	.	.964	3	.637
dosis50	.314	3	.	.893	3	.363
dosis100	.328	3	.	.871	3	.298

a. Lilliefors Significance Correction

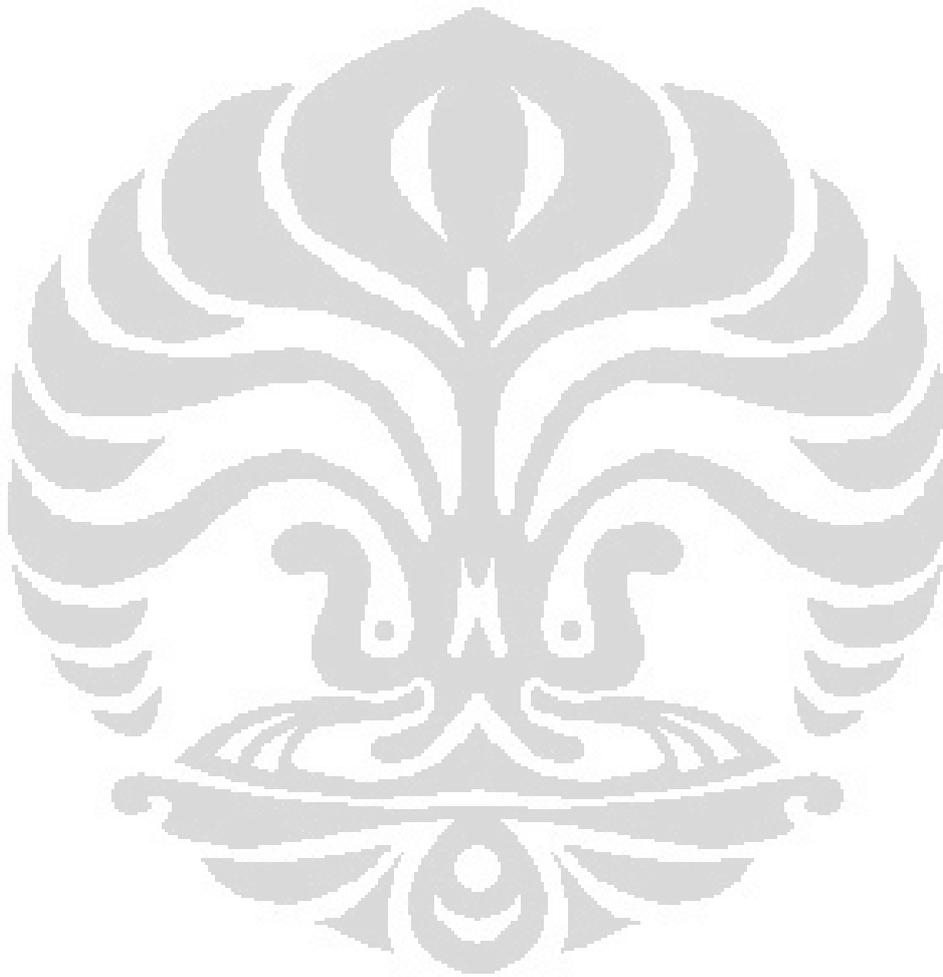
0.05 berarti data tersebar secara normal.



Test of Homogeneity of Variances

MTT24

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.159	6	14	.013



$P > 0.05$ berarti distribusi beberapa set data yang dibandingkan memiliki varian yang sama (homogen)

ANOVA

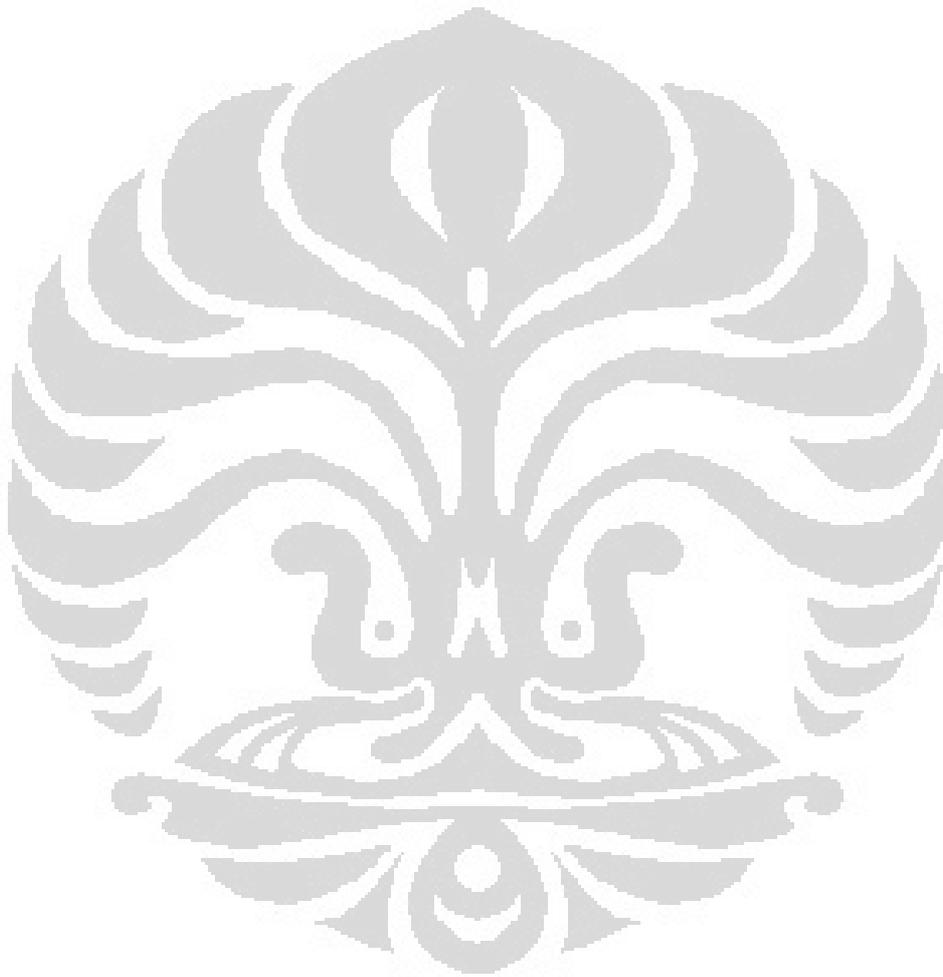
MTT24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.044	6	.007	4.578	.009
Within Groups	.022	14	.002		
Total	.066	20			

sia

$p < 0.05$ berarti paling tidak terdapat dua data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna.

Karena nilai $p < 0.05$ maka dilakukan analisis Post Hoc



Universitas Indonesia

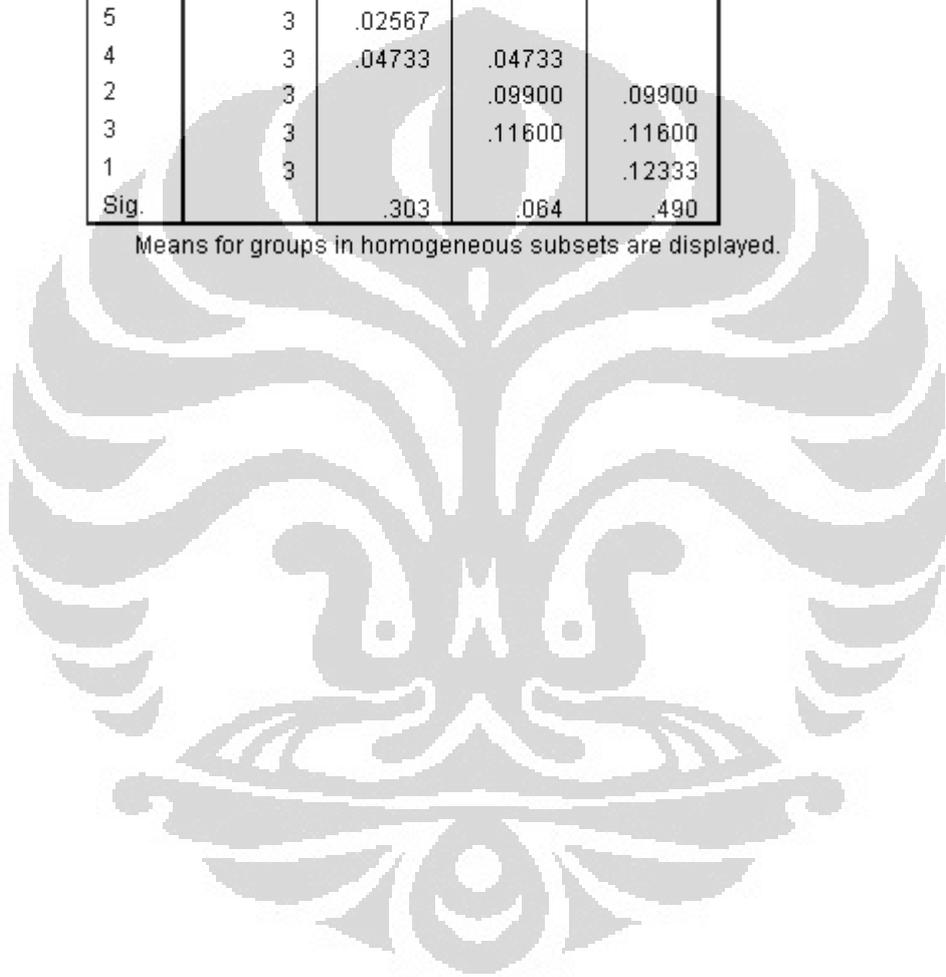
(lanjutan)

MTT24

Duncan

kategor ori	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
7	3	.00967		
6	3	.01500		
5	3	.02567		
4	3	.04733	.04733	
2	3		.09900	.09900
3	3		.11600	.11600
1	3			.12333
Sig.		.303	.064	.490

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 12. Analisis statistik MTT assay 48 jam

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol	.339	3	.	.851	3	.242
dosis3.125	.265	3	.	.954	3	.585
dosis6.25	.224	3	.	.984	3	.762
dosis12.5	.308	3	.	.902	3	.393
dosis25	.315	3	.	.891	3	.356
dosis50	.219	3	.	.987	3	.780
dosis100	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0.05$ berarti distribusi data normal.

Test of Homogeneity of Variances

MTT48jam

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.243	6	13	.036

$P > 0.05$ berarti distribusi beberapa set data yang dibandingkan mempunyai varians yang sama.

ANOVA

MTT48iam

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.491	6	.082	34.407	.000
Within Groups	.031	13	.002		
Total	.522	19			

$p < 0.05$ berarti paling tidak terdapat dua data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna.

Karena nilai $p < 0.05$ maka dilakukan analisis Post Hoc

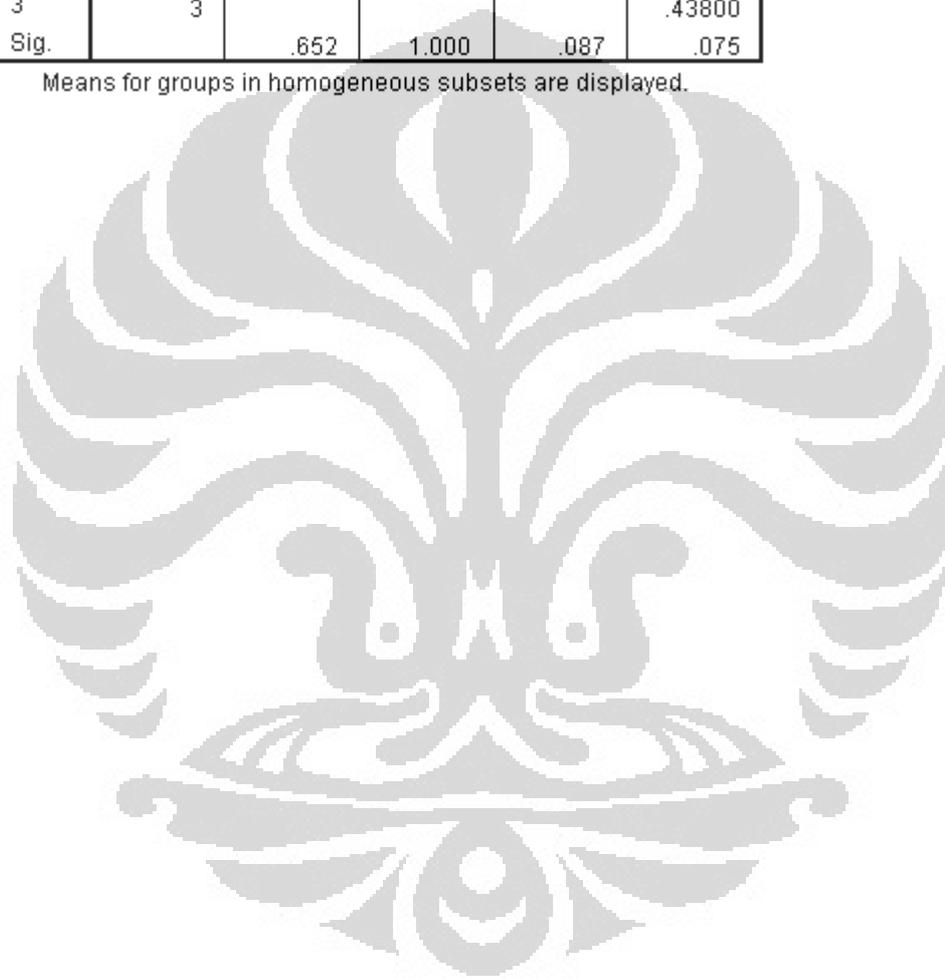
(lanjutan)

MTT48

Duncan

varian	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
7	3	.00400			
6	3	.02167			
5	3		.18367		
4	3			.29000	
1	3			.36067	.36067
2	3				.38333
3	3				.43800
Sig.		.652	1.000	.087	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 13. Analisa statistik pemeriksaan osteoklastogenesis

No	Control	Konsentrasi 3.125 µg /ml	Konsentrasi 6.25 µg /ml
1	8	12	10
2	13	6	10
3	15	8	11
4	16	7	7
5	10	9	15
6	16	10	8
7	12	8	13
8	17	11	13
9	15	7	6
10	13	8	13
11	8	7	12
12	13	8	13

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kk	.167	12	.200 [*]	.914	12	.241
k_3.125	.259	12	.025	.910	12	.212
k_6.25	.190	12	.200 [*]	.928	12	.364

a. Lilliefors Significance Correction

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

(Lanjutan)

$P > 0.05$ Berarti distribusi data normal

Test of Homogeneity of Variances

osteoklas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.527	2	33	.232

$p > 0.05$ berarti distribusi beberapa set data yang dibandingkan mempunyai varians yang sama.

ANOVA

osteo

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	126.389	2	63.194	9.401	.001
Within Groups	221.833	33	6.722		
Total	348.222	35			

$p < 0.05$ berarti paling tidak terdapat dua kelompok data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna .

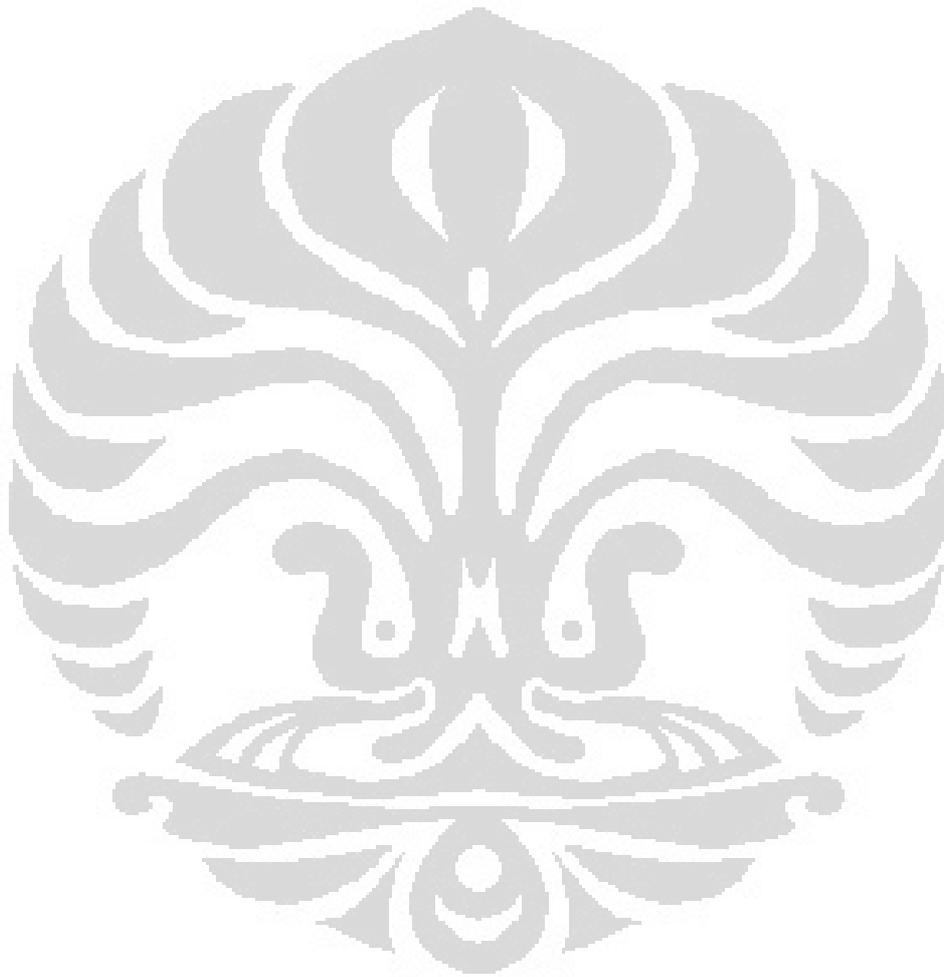
Karena nilai $p < 0.05$ maka dilakukan analisis Post Hoc

osteo

Duncan

varian	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	12	8.41667	
3	12		10.91667
1	12		13.00000
Sig.		1.000	.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 14. Hasil Identifikasi / Determinasi Leunca (*Solanum Nigrum*)

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)
Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 26 Oktober 2011

Nomor : 1410/IPH.1.02/If.8/X/2011
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Ipak Ridmah R.
Mhs. Univ. Indonesia
DEPOK

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Leunca	<i>Solanum nigrum</i> L.	Solanaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Dr. Jochi Setijo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Ipak Ridmah R..doc\JJA-DG

Page 1 of 1