

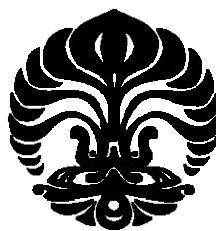
UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI ANTIOSTEOKLASTOGENESIS EKSTRAK ETANOL
KACANG PANJANG (*Vigna unguiculata* (L) Walp) PADA
SEL RAW 264 *IN VITRO***

TESIS

**RATNA ASIH SR
1006787256**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI ANTIOSTEOKLASTOGENESIS EKSTRAK ETANOL
KACANG PANJANG (*Vigna unguiculata* (L) Walp) PADA
SEL RAW 264 *IN VITRO***

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
magister sains**

**RATNA ASIH SR
1006787256**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JUNI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan tindakan Plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

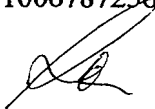
Depok, 20 Juni 2012.



Ratna Asih SR

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : RATNA ASIH SR
NPM : 1006787256
Tanda Tangan : 
Tanggal : 20 Juni 20

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : RATNA ASIH SR
NPM : 1006787256
Program Studi : MAGISTER HERBAL
Judul Tesis : STUDI ANTIOSTEOKLASTOGENESIS
EKSTRAK ETANOL KACANG PANJANG
(*Vigna unguiculata* (L) Walp) TERHADAP SEL
RAW 264 *In Vitro*.

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

DEWAN PENGUJI

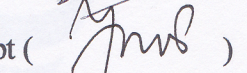
Pembimbing I : Dr. ANTON BAHTIAR, M. Biomed, Apt

()

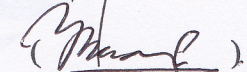
Pembimbing II : Dr. AGUNG ERU WIBOWO, MSc, Apt

()

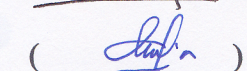
Ketua : Prof. Dr. YAHDIANA HARAHAHAP, MS, Apt

()

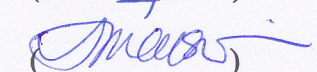
Sekretaris : Dr. HERMAN SURYADI, MS, Apt

()

Penguji I : Dr. BERNA ELYA, MS, Apt

()

Penguji II : Dr. AMARILA MALIK, MS, Apt

()

Ditetapkan : Rpole

Tanggal : 18 Juli 2012

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan puji syukur yang tak terhingga kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Penulisan tesis ini dalam rangka menyelesaikan tugas akhir dalam menempuh Program Studi Magister Herbal di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karenanya pada kesempatan ini, saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tak terhingga kepada:

- (1) Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed, Apt (Pembimbing I) yang telah membimbing dan mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
- (2) Dr. Agung Eru Wibowo, Msc, Apt (Pembimbing II) yang telah membimbing dan mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
- (3) Dr. Churiyah, Msi selaku Kepala Laboratorium Biologi Seluler Lab. TIAP Puspitek Serpong atas waktu, tenaga dan pikiran telah membimbing dan mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
- (4) Dr. Fifit selaku Kepala Laboratorium Biologi Molekuler Lab. TIAP Puspitek Serpong atas segala bantuan dan dukungannya selama ini.
- (5) Dr. Abdul Mun'im, Msi,Apt Kepala Program Studi Magister Herbal Fakultas Farmasi UI atas segala bantuan, dukungan dan perhatiannya selama menempuh studi dan penelitian.
- (6) Prof. Dr. Endang Hanani, MSi, Apt yang telah berupaya keras sehingga Program Studi Magister Herbal dapat terselenggara dan berjalan sampai saat ini.
- (7) Prof. Dr. Yahdiana Harahap Dekan Fakultas Farmasi atas kepedulian dan perhatiannya.

- (8) Semua staf Fakultas Farmasi UI yang telah turut membimbing dan membantu saya selama ini.
- (9) Semua staf LTFM-Lab TIAP Puspitek Serpong yang telah turut membimbing dan membantu saya selama penelitian ini.
- (10) Suamiku terkasih, Ir.Nurhadi Budi atas pengertian, kesabaran dan dukungan doa, moril dan materiil, juga anak-anakku tersayang Faizah, Aziza dan Kemal yang menjadi penghibur dan pemacu semangat.
- (11) Kedua ibuku, kakak-kakak dan adik-adikku atas dukungan doanya.
- (12) Semua teman peserta Program Studi Magister Herbal Fakultas Farmasi UI, teristimewa Rahmi Fitria dan Ipak Ridmah atas kebersamaan, semangat, dukungan dan kerjasamanya selama ini.
- (13) Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, semoga kebaikannya menjadi amal sholeh di hadapan Allah.

Tak ada gading yang tak retak, kami mohon maaf jika masih terdapat berbagai kekurangan pada penelitian ini. Masukan dan saran dari semua pihak sangat saya hargai

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis,
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Ratna Asih SR
NPM : 1006787256
Program Studi : Magister Herbal
Fakultas : Farmasi.
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan; menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

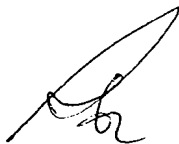
Studi Antiosteoklastogenesis Ekstrak Etanol Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L) Walp) pada Sel RAW 264 *In Vitro*, beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Tangerang

Pada tanggal : 20 Juni 2012

Yang menyatakan



(Ratna Asih SR)

ABSTRAK

Nama : RatnaAsih SR
Program Studi : Magister Herbal
Judul : Studi Antiosteoklastogenesis Ekstrak Etanol Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L) Walp) pada Sel RAW 264 *In Vitro*.

Osteoporosis adalah kerapuhan tulang akibat menurunnya massa dan kemunduran mikroarsitek jaringan tulang. Secara seluler terjadi karena jumlah sel osteoklas melebihi jumlah sel osteoblas. Fungsi dari sel osteoklas dan osteoblas sangat dipengaruhi oleh hormon estrogen. Kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L) Walp) adalah salah satu jenis tanaman yang diketahui mengandung senyawa fitoestrogen, yaitu senyawa dalam tanaman yang bersifat estrogenik (menyerupai estrogen). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol 96 % kacang panjang dalam menghambat osteoklastogenesis tetapi tidak menghambat proliferasi sel RAW 264 *in vitro*. Uji hambatan proliferasi dilakukan dengan teknik MTT *assay* dan uji antiosteoklastogenesis dilakukan dengan pewarnaan TRAP (*Tartrat Resistance Acid Phosphatase*). Hasil MTT *assay* pada inkubasi 48 jam menunjukkan proliferasi sel yang berbeda bermakna secara statistik ($p < 0.05$). Pemberian ekstrak etanol kacang panjang dengan konsentrasi 25, 50 dan 200 $\mu\text{g/mL}$ proliferasi lebih tinggi dibanding kontrol dan konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ proliferasi lebih rendah dibanding kontrol. Hasil uji antiosteoklastogenesis menunjukkan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ maksimal menghambat osteoklastogenesis sel RAW 264 secara signifikan ($p < 0.05$) tetapi tidak mengganggu proliferasinya dan justru meningkatkan proliferasi sel RAW 264 setelah 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96 % kacang panjang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen anti osteoporosis.

Kata kunci : kacang panjang, sel RAW 264, proliferasi, osteoklastogenesis
xvi+114 halamam : 19 gambar; 20 tabel
Daftar Pustaka : 61 (1984-2011)

ABSTRACT

Name : RatnaAsih SR
Study Programme : Magister Herbal
Theme : *In Vitro* Study of Antiosteoclastogenesis of Long Bean
(*Vigna unguiculata* (L) Walp) Ethanol Extract to RAW
264 Cells

Osteoporosis is bone fragility which is caused by reduction of the bone mineral density and microarchitecture deteriorates. At the cellular level, this occurred due to the higher level of osteoclast cells compared to osteoblast cells. The role of osteoclast and osteoblast cells is greatly influenced by estrogen hormone. Long bean (*Vigna unguiculata* (L) walp) is one type of plants that contains fitoestrogen compound, the plant compound that is estrogenic (imitation of estrogen). The study aims to find the ability of long bean in antiosteoclastogenesis retardation, but not in *in vitro* proliferation of RAW 264 cells. Proliferation resistance test was done by using MTT assay technique and antiosteoclastogenesis test was done by TRAP staining (*Tartrat Resistance Acid Phospatase*). The result of MTT assay after 48 hours incubation shown statistically significant difference ($p < 0,05$) in cell proliferation. Addition of long bean ethanol extract with a concentration of 25, 50 and 200 $\mu\text{g/mL}$ showed higher proliferation than control and proliferation at 800 $\mu\text{g/mL}$ concentration is lesser than control. The result of antiosteoclastogenesis test shown that at a maximum concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ significantly hampers ($p < 0,05$) osteoclastogenesis of RAW 264 cells but does not interfere with the proliferation but increases proliferation of RAW 264 cells after 48 hours. Therefore, it can be concluded that ethanol extract of long beans has the potential to be developed as anti-osteoporosis agent.

Key words : Long bean, RAW 264 cells, proliferation,
osteoclastogenesis.
xvi+114 pages : 19 pictures; 20 tables
Bibliography : 61 (1984-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	5
1.2 Perumusan Masalah	5
1.3 Hipotesis	5
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Osteoporosis.....	7
2.1.1. Definisi	7
2.1.2. Epidemiologi.....	8
2.1.3. Faktor Resiko.....	9
2.1.3.1. Faktor Resiko yang Tidak Dapat Dimodifikasi... ..	9
2.1.3.2. Faktor Resiko yang Dapat Dimodifikasi	9
2.1.4. Klasifikasi Osteoporosis.....	11
2.1.4.1. Osteoporosis Primer.....	11
2.1.4.2. Osteoporosis Sekunder.....	11
2.1.5. Patofisiologi.....	12
2.1.6. Diagnosis.....	17
2.1.7. Terapi.....	19
2.1.7.1. Pengobatan Hormonal.....	19
2.1.7.2. Pengobatan Non Hormonal.....	20
2.2. Fitoestrogen.....	21
2.2.1. Isoflavon.....	22
2.2.2. Mekanisme Kerja Fitoestrogen.....	23
2.3. Kacang Panjang.....	26
2.3.1. Klasifikasi.....	26

2.3.2. Deskripsi.....	26
2.3.3. Kandungan Kimia.....	27
2.3.4. Manfaat Kacang Panjang.....	28
2.4. Ekstraksi.....	29
2.4.1. Prinsip Ekstraksi secara Maserasi.....	29
2.4.2. Etanol sebagai Pernyari.....	31
2.5. Uji Hambatan Proliferasi dengan MTT.....	31
2.6. Pemeriksaan <i>Western Blotting</i>	32
2.7. Sel RAW 264.....	32
2.8. <i>Minimum Essensial Medium</i> (MEM).....	33
3. METODE PENELITIAN.....	34
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
3.2. Bahan dan Alat.....	34
3.2.1. Tanaman.....	34
3.2.2. Bahan dan Reagen.....	34
3.2.3. Alat.....	35
3.2.4. <i>Cell Line</i>	35
3.3. Rancangan Penelitian.....	35
3.4. Parameter yang Diamati.....	36
3.5. Alur Kerja Penelitian.....	36
3.5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Kacang Panjang.....	36
3.5.2. Karakteristik Ekstrak Spesifik.....	37
3.5.2.1. Identitas Ekstrak.....	37
3.5.2.2. Deskripsi Organoleptik.....	37
3.5.3. Karakteristik Ekstrak Non- Spesifik.....	37
3.5.3.1. Kelarutan dalam Air dan Etanol.....	37
3.5.3.2. Susut Pengeringan.....	37
3.5.3.3. Kadar Abu Total.....	38
3.5.3.4. Kadar Abu yang Tidak Larut Asam.....	38
3.5.3.5. Kadar Sisa Pelarut.....	39
3.5.4. Uji Kandungan Kimia Ekstrak.....	39
3.5.4.1. Identifikasi Flavonoid.....	39
3.5.4.2. Identifikasi Steroid/ Triterpenoid.....	40
3.5.4.3. Identifikasi Saponin.....	40
3.5.4.4. Identifikasi Alkaloid.....	40
3.5.4.5. Analisa Isoflavon.....	41
3.5.5. Kultur <i>Cell Line</i>	43
3.5.5.1. Persiapan Medium Pertumbuhan <i>Cell Line</i>	43
3.5.5.2. <i>Thawing Cell Line</i>	43
3.5.5.3. Pemeriksaan Sel.....	43
3.5.5.4. Sub Kultur <i>Cell Line</i>	44
3.5.6. Uji MTT.....	44
3.5.7. Pemeriksaan Osteoklastogenesis.....	45
3.5.8. Pemeriksaan <i>Western Blotting</i>	46
3.5.8.1. Persiapan Sampel.....	46
3.5.8.2. Determinasi Konsentrasi Protein.....	49

3.5.8.3. Persiapan SDS-PAGE.....	49
3.5.8.4. Elektroforesis.....	51
3.5.8.5. <i>Western Blotting</i>	53
3.6. Analisa Data.....	54
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	55
4.1. Pembuatan Ekstrak.....	55
4.2. Karakteristik Ekstrak Spesifik.....	55
4.2.1. Identitas Ekstrak.....	55
4.2.2. Deskripsi Organoleptik.....	56
4.3. Karakteristik Ekstrak Non Spesifik.....	56
4.3.1. Kelarutan dalam Air dan Etanol.....	56
4.3.2. Susut Pengeringan.....	57
4.3.3. Penentuan Kadar Abu.....	57
4.3.4. Kadar Abu yang Tidak Larut Asam.....	58
4.3.5. Kadar Sisa Pelarut.....	59
4.4. Identifikasi Kandungan.....	60
4.4.1. Identifikasi Flavonoid.....	60
4.4.2. Identifikasi Steroid/ Triterpenoid.....	61
4.4.3. Identifikasi Saponin.....	63
4.4.4. Identifikasi Alkaloid.....	63
4.4.5. Analisa Isoflavon.....	64
4.5. <i>Thawing</i> dan Pengkulturan Sel.....	66
4.6. Uji MTT.....	68
4.7. Pemeriksaan Osteoklastogenesis.....	72
4.8. Hasil <i>Western Blotting</i>	77
4.8.1. SDS-PAGE dengan <i>staining Coumassie Brillian Blue</i>	77
4.8.2. Membran dengan <i>staining Ponceau red</i>	78
4.8.3. Hasil <i>Western Blotting</i> untuk Nfat2 dan β actin.....	79
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	80
5.1. Kesimpulan.....	80
5.2. Saran.....	80
DAFTAR PUSTAKA	81

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Penampakan tulang normal dan osteoporosis.....	7
Gambar 2.2.	Proses pembentukan dan aktivasi osteoklas.....	13
Gambar 2.3.	Peran RANK, RANKL dan OPG	15
Gambar 2.4.	Jalur RANK, RANKL, c-Fos dan NFAT2	17
Gambar 2.5.	Struktur Fitoestrogen.....	21
Gambar 2.6.	Kacang panjang.....	26
Gambar 3.1.	Marker berat protein	51
Gambar 3.2.	Posisi <i>loading</i> sampel penelitian.....	52
Gambar 4.1.	Kurva standar.....	59
Gambar 4.2.	Hasil KLT.....	62
Gambar 4.3.	Morfologi sel RAW 264.....	67
Gambar 4.4.	Grafik absorbansi uji MTT pada 24 dan 48 jam.....	69
Gambar 4.5.	Viabilitas sel RAW 264 pada 24 dan 48 jam.....	71
Gambar 4.6.	Foto sel osteoklas.....	73
Gambar 4.7.	Grafik jumlah osteoklas.....	74
Gambar 4.8.	Viabilitas sel RAW 264 dibanding dengan diferensiasinya.....	75
Gambar 4.9.	SDS-PAGE dengan <i>staining Comassie blue</i>	77
Gambar 4.10.	Membran yang <i>distaining dengan Ponceau red</i>	78
Gambar 4.11.	Hasil <i>Western blotting</i> setelah dideteksi dengan DAB Kit.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Faktor resiko osteoporosis yang dapat dimodifikasi	11
Tabel 2.2.	Penilaian osteoporosis secara laboratorium.....	18
Tabel 2.3.	Tiga kelas senyawa fitoestrogen	22
Tabel 2.4.	Nilai gizi kacang panjang.....	27
Tabel 3.1.	Definisi kelarutan.....	37
Tabel 3.2.	Gradien elusi.....	42
Tabel 3.3.	Berat molekul protein dan prosentase gel.....	50
Tabel 4.1.	Data identifikasi organoleptik ekstrak.....	56
Tabel 4.2.	Data kelarutan ekstrak dalam air dan etanol	56
Tabel 4.3.	Data susut pengeringan.....	57
Tabel 4.4.	Data kadar abu.....	58
Tabel 4.5.	Data kadar abu tidak larut asam.....	58
Tabel 4.6.	Kadar sisa pelarut.....	59
Tabel 4.7.	Data identifikasi flavonoid.....	61
Tabel 4.8.	Data identifikasi saponin.....	64
Tabel 4.9.	Data identifikasi alkaloid.....	64
Tabel 4.10.	Data identifikasi isoflavon.....	66
Tabel 4.11.	Absorbansi uji MTT pada 24 dan 48 jam.....	68
Tabel 4.12.	Viabilitas sel RAW 264 pada 24 dan 48 jam.....	70
Tabel 4.13.	Jumlah sel osteoklas inti lebih atau sama dengan 3.....	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Vigna unguiculata (L)Walp.....	86
Lampiran 2. Alur Penelitian.....	87
Lampiran 3. Pembuatan ekstrak etanol kacang panjang.....	88
Lampiran 4. Pemeriksaan sisa pelarut.....	89
Lampiran 5 Pemeriksaan Fitokimia.....	93
Lampiran 6. Hasil analisa isoflavon dengan KCKT.....	94
Lampiran 7. Subkultur sel RAW 264.....	101
Lampiran 8. Pemeriksaan uji MTT.....	102
Lampiran 9. Pemeriksaan osteoklastogenesis.....	103
Lampiran 10. Pemeriksaan SDS-PAGE dan Western Blot.....	104
Lampiran 11. Perhitungan jumlah sel.....	105
Lampiran 12. Konsentrasi DMSO dalam ekstrak.....	117
Lampiran 13. Analisis statistik uji MTT 24 jam (SPSS 17.0).....	108
Lampiran 14. Analisis statistik uji MTT 48 jam (SPSS 17.0).....	110
Lampiran 15. Analisis statistik pemeriksaan osteoklastogenesis.....	112

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Osteoporosis merupakan salah satu masalah dalam Kesehatan Masyarakat terutama di negara berkembang. Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai oleh rendahnya massa tulang dan kemunduran mikroarsitek jaringan tulang yang menyebabkan peningkatan kerapuhan (fragilitas) tulang dengan konsekuensi meningkatnya resiko fraktur (Jones, Kong, dan Penninger, 2002). Penyakit osteoporosis sering disebut sebagai *silent disease* karena proses kepadatan tulang berkurang secara perlahan (terutama pada penderita osteoporosis senilis) dan berlangsung secara progresif selama bertahun-tahun tanpa disadari dan tanpa adanya gejala. Banyak orang tidak menyadari bahwa osteoporosis adalah pembunuh tersembunyi (*silent killer*). Berbeda dengan radang pada sendi (*arthritis*), osteoporosis hanya sedikit menunjukkan tanda-tanda dini dan penyakit ini baru diketahui setelah terjadinya komplikasi berupa patah tulang (fraktur) (Tandra, 2009).

Pada tahun 2003 WHO mencatat lebih dari 75 juta orang di Eropa, Amerika dan Jepang menderita osteoporosis. Di Cina tercatat angka kesakitan sebesar 7% dari jumlah populasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Hasil analisa data resiko osteoporosis pada tahun 2005 menunjukkan 2 dari 5 penduduk Indonesia memiliki resiko untuk terkena osteoporosis (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

Tingkat lanjut dari osteoporosis berupa fraktur osteoporotik. Pasien fraktur osteoporosis akan mengalami dampak sosial maupun dampak ekonomi. Dampak ekonomi meliputi biaya pengeluaran langsung maupun tidak langsung. Di Amerika Serikat untuk pengobatan osteoporosis, biaya yang dikeluarkan Pemerintah sebesar Rp. 90 trilyun rupiah sampai Rp. 135 trilyun rupiah per tahun (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Sedangkan biaya pengeluaran tidak langsung adalah hilangnya waktu kerja (produktivitas),

ketakutan/kecemasan atau depresi dan biaya lain seperti transportasi dan akomodasi selama perawatan.

Kasus fraktur yang paling sering adalah fraktur panggul, fraktur vertebra dan fraktur pergelangan tangan. Sedangkan fraktur osteoporosis yang paling serius ialah fraktur panggul. Fraktur pada pasien osteoporosis usia lanjut tidak hanya berpengaruh pada kualitas hidup, namun juga mengancam jiwa (*life threatening*) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Di Amerika Serikat, 1 diantara 2 wanita dan 1 diantara 8 pria usia di atas 50 tahun akan mengalami fraktur karena osteoporosis sepanjang hidup (Tandra, 2009).

Penurunan massa tulang dan memburuknya arsitektur jaringan tulang berhubungan erat dengan proses *remodeling* tulang yaitu terjadi abnormalitas *bone turnover*. Pada proses *remodeling*, tulang secara kontinyu mengalami penyerapan dan pembentukan sel tulang. Hal ini berarti bahwa pembentukan tulang tidak terbatas pada fase pertumbuhan saja, akan tetapi berlangsung seumur hidup. Sel yang bertanggung jawab untuk pembentukan tulang disebut osteoblas sedangkan osteoklas bertanggung jawab untuk penyerapan tulang. Pembentukan tulang terutama terjadi pada masa pertumbuhan. Pembentukan dan penyerapan tulang berada dalam keseimbangan pada individu berusia sekitar 30-40 tahun. Keseimbangan ini mulai terganggu dan lebih berat ke arah penyerapan tulang ketika wanita mencapai menopause dan pria mencapai usia 60 tahun. Abnormalitas *bone turnover*, yaitu terjadinya proses penyerapan tulang (*bone resorption*) lebih banyak dari pada proses pembentukan tulang (*bone formation*) akibatnya terjadi penghancuran berlebihan pada tulang yang bisa menyebabkan osteoporosis, penyakit periodontal, *rheumathoid arthritis* dan *multiple myeloma* (Manolagas, 2000).

Osteoklas berasal dari turunan makrofag yang kemudian berdiferensiasi menjadi osteoklas melalui jalur khusus. Dalam proses diferensiasi dan aktivasi osteoklas, osteoprotegerin (OPG), *Receptor Activator of Nuclear Factor* (NF- κ B), RANK, RANK ligand (RANKL) dan *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) berperan dalam mengatur fungsi osteoklas. Selain itu c-Fos bersama RANKL akan mempengaruhi ekspresi NFAT2 (*Nuclear Factor of*

Activated T Cell 2) yang akan merangsang diferensiasi osteoklas (Boyle, Simonet dan Lacey, 2003; Takayanagi et al., 2002).

Hormon estrogen berperan penting mencegah osteoporosis dengan cara meningkatkan apoptosis osteoklas dan menurunkan sitokin yang meningkatkan aktivitas osteoblas. Defisiensi estrogen menyebabkan meningkatnya umur osteoklas dan memperpendek umur osteoblas sehingga terjadi keseimbangan negatif pada tulang (Chiechi and Micheli, 2005).

Tujuan utama pengobatan osteoporosis adalah mengurangi rasa nyeri, menghambat proses resorpsi tulang dan meningkatkan proses formasi tulang untuk meningkatkan kekuatan tulang sampai di atas ambang fraktur (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Osteoporosis pada wanita menopause pasca- menopause salah satunya disebabkan kekurangan hormon estrogen, maka pengobatannya antara lain dengan pemberian hormon pengganti estrogen, yang dikenal dengan Terapi Pengganti Estrogen/*Estrogen Replacement Therapy* (ERT). Pemberian estrogen ini biasanya dikombinasi dengan pemberian hormon progesteron, sehingga dikenal dengan istilah Terapi Pengganti Hormon (TPH) atau Terapi Sulih Hormon (TSH) (Wratsangka, 1999).

Terapi Sulih Hormon (TSH) merupakan pengobatan terpilih untuk mengatasi berbagai keluhan akibat defisiensi estrogen seperti gejala panas, penyakit jantung koroner dan osteoporosis. Ada beberapa kelemahan TSH selain harganya cukup mahal, timbul keluhan perdarahan dan kekhawatiran kanker rahim dan kanker payudara (Kawiyana, 2009).

Adanya efek samping pada TSH, mendorong upaya lain, salah satu diantaranya dengan penggunaan tanaman obat kelompok fitoestrogen, yaitu tanaman obat yang mengandung senyawa non steroid yang bersifat estrogenik (seperti estrogen). Secara umum, fitoestrogen bekerja sebagai *selektif estrogen reseptor modulators* (SERMs) yaitu mampu memberikan efek estrogenik dan atau efek anti estrogenik. Beberapa golongan senyawa fitoestrogen antara lain isoflavon, lignin dan komestan (Bustamam, 2008).

Data empiris dan penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa insiden beberapa penyakit, seperti sindrom menopause, osteoporosis, kanker payudara dan penyakit jantung koroner lebih rendah terjadi di negara yang tingkat konsumsi fitoestrogen masyarakatnya lebih tinggi. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa fitoestrogen mempunyai efek proteksi terhadap munculnya beberapa penyakit tersebut dan mendorong meningkatnya penelitian klinis dan biomolekuler terkait dengan fitoestrogen (Bustamam, 2008).

Kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L) Walp) banyak dibudidayakan di Indonesia dan dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan obat. Kacang panjang adalah salah satu tanaman kacang - kacang yang mengandung fitoestrogen dari golongan isoflavon yang bersifat estrogenik. Secara tradisional telah digunakan untuk memperbesar payudara. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kacang panjang mampu meningkatkan proliferasi MCF-7 dengan dosis 50 sampai 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Meiyanto, Handayani dan Jenie, 2008) dan meningkatkan proliferasi sel epitel payudara T47D pada dosis 200 sampai 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fitriasari, Wijayanti, Fitriyah, Dewi, Mayasari dan Meiyanto, 2007).

Sel RAW 264 merupakan *cell line* yang didapat dari *leukemic* monosit tikus BALB/c yang diinduksi dengan suntikan *Abelson Leukemia Virus*. Morfologi sel RAW 264 adalah *macrophage-like* (Riken, n.d). Setelah ditemukannya RANKL sebagai faktor diferensiasi osteoklas, dapat dibuat penelitian osteoklastogenesis secara *in vitro* dengan menggunakan sel RAW 264 dengan induksi RANKL sehingga dapat terbentuk osteoklas dalam 4 hari (Kumagai et al., 2004).

Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian *in vitro* untuk mengetahui apakah kacang panjang dapat menghambat diferensiasi sel RAW 264 menjadi osteoklas matur tetapi tidak menghambat proliferasi sel RAW 264.

1.2. Perumusan Masalah

- a. Apakah ekstrak etanol kacang panjang tidak menghambat proliferasi sel RAW 264.
- b. Apakah ekstrak etanol kacang panjang dapat menghambat osteoklastogenesis pada sel RAW 264 *in vitro*.
- c. Apakah ekstrak etanol kacang panjang dapat menghambat ekspresi protein NFAT2.

1.3. Hipotesis

- a. Pemberian ekstrak etanol kacang panjang tidak menghambat proliferasi pada sel RAW 264 *in vitro*.
- b. Pemberian ekstrak etanol kacang panjang dapat menghambat osteoklastogenesis pada sel RAW 264 *in vitro*.
- c. Mekanisme penghambatan osteoklastogenesis pada sel RAW 264 di duga melalui penghambatan ekspresi protein NFAT2.

1.4. Tujuan Penelitian

- a. Memperoleh hasil bahwa ekstrak etanol kacang panjang tidak menghambat proliferasi sel RAW 264 *in vitro*.
- b. Memperoleh hasil bahwa ekstrak etanol kacang panjang menghambat diferensiasi sel RAW 264 menjadi sel osteoklas matur.
- c. Memperoleh hasil bahwa ekstrak etanol kacang panjang menghambat ekspresi protein NFAT2.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Aplikatif

Dapat ditemukan salah satu alternatif terapi untuk pencegahan osteoporosis.

1.5.2. Manfaat Keilmuan

- a. Dapat mempelajari cara pemeriksaan osteoklastogenesis dan anti osteoporosis secara *in vitro* sehingga ilmu yang diperoleh bisa dimanfaatkan untuk penelitian lainnya.
- b. Dapat menilai efektivitas kandungan fitoestrogen pada kacang panjang sebagai antiosteoklastogenesis.
- c. Memperkaya penelitian tentang obat bahan alam dari tumbuhan Indonesia yang bermanfaat sebagai antiosteoporosis.



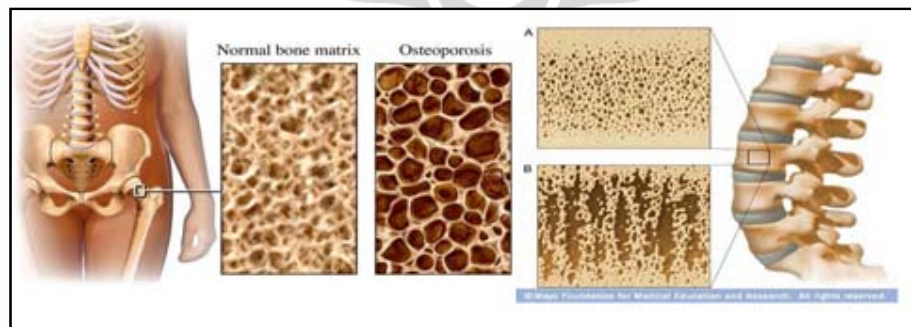
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. OSTEOPOROSIS

2.1.1. Definisi

Osteoporosis adalah suatu penyakit yang ditandai dengan berkurangnya massa tulang dan adanya perubahan mikro-arsitektur jaringan tulang yang berakibat menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang, sehingga tulang mudah patah. Definisi lain, osteoporosis adalah kondisi dimana tulang menjadi tipis, rapuh, keropos dan mudah patah akibat berkurangnya massa tulang yang terjadi dalam waktu yang lama. Secara statistik, osteoporosis didefinisikan sebagai keadaan dimana Densitas Massa Tulang (DMT) berada di bawah rujukan menurut umur atau standar deviasi berada dibawah nilai rata-rata rujukan pada usia dewasa muda. Sebelum terjadi osteoporosis, seseorang terlebih dahulu mengalami proses osteopenia, yaitu suatu kondisi hilangnya sejumlah massa tulang akibat berbagai keadaan. Penyakit ini dijuluki sebagai *silent disease*, karena menyerang secara diam-diam, tanpa adanya tanda-tanda khusus, sampai si pasien mengalami patah tulang (Jones, Kong, Penninger, 2002; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).



[Sumber : www.mayoclinic.com, telah diolah kembali].

Gambar 2.1. Penampakan tulang normal (a) dan osteoporosis (b).

2.1.2. Epidemiologi

Osteoporosis merupakan masalah kesehatan dunia (*global issue*). Prevalensi osteoporosis tertinggi diderita oleh wanita usia lanjut, namun berdasarkan penelitian ditemukan bahwa prevalensi kejadian osteoporosis pada pria meningkat dibandingkan sebelumnya. Selain itu diketahui bahwa osteoporosis kini diderita pada kelompok usia yang lebih muda (Ilyas, 2006).

Pada usia 80 tahun, 1 dari 3 wanita dan 1 dari 5 pria beresiko mengalami patah tulang panggul atau tulang belakang. Pada usia 50 tahun kemungkinan mengalami patah tulang bagi wanita adalah 40 %, sedangkan pada pria 13 % (Tandra, 2009).

Hasil analisa data resiko osteoporosis pada tahun 2005 dengan jumlah sampel 65.727 orang (22.799 laki-laki dan 42.928 perempuan) yang dilakukan oleh Puslitbang Gizi Depkes RI dan sebuah perusahaan nutrisi pada 16 wilayah di Indonesia secara *selected people* (Sumatera Utara & NAD, Sumatera Barat, Riau, Kepulauan Riau, Jambi, Sumatera Selatan & Bangka Belitung & Bengkulu, Lampung, DKI Jakarta, Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, Jawa Timur, Bali & NTB & NTT, Kalimantan, Sulawesi & Maluku & Papua) dengan metode pemeriksaan DMT (Densitas Massa Tulang) menggunakan alat diagnostik *clinical bone sonometer*, menunjukkan angka prevalensi osteopenia (osteoporosis dini) sebesar 41,7 % dan prevalensi osteoporosis sebesar 10 %. Ini berarti 2 dari 5 penduduk Indonesia memiliki resiko untuk terkena osteoporosis, dimana 41,2 % dari keseluruhan sampel yang berusia kurang dari 55 tahun terdeteksi menderita osteopenia. Prevalensi osteopenia dan osteoporosis usia kurang 55 tahun pada pria cenderung lebih tinggi dibanding wanita, sedangkan pada usia lebih 55 tahun peningkatan osteopenia pada wanita 6 kali lebih besar dari pria dan peningkatan osteoporosis pada wanita 2 kali lebih besar dari pria (Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008). Data retrospektif osteoporosis yang dikumpulkan Unit Pelayanan Teknis (UPT) Makmal Terpadu Imunoendokrinologi, FKUI tahun 2006-2008 dari 98 kasus osteoporosis, ternyata 94,90 % terjadi sesudah menopause (Sihombing, 2009).

2.1.3. Faktor Resiko

Faktor resiko osteoporosis pada dasarnya terdiri dari faktor resiko yang dapat dimodifikasi dan faktor resiko yang tidak dapat dimodifikasi.

2.1.3.1. Faktor Resiko yang Tidak Dapat Dimodifikasi

a. Usia

Usia adalah salah satu dari faktor resiko osteoporosis yang tidak dapat direayasa. Pada lansia daya serap kalsium akan menurun seiring dengan bertambahnya usia .

b. Gender

Diperkirakan selama hidup, wanita akan kehilangan masa tulang 30 - 50%, sedangkan pria hanya 20 - 30%, namun tidak berarti semua wanita yang telah mengalami menopause akan mengalami osteoporosis.

c. Genetik

Diperkirakan 80% kepadatan tulang diwariskan secara genetik sehingga dapat diartikan bahwa osteoporosis dapat diturunkan.

d. Gangguan hormonal

Wanita yang memasuki masa menopause mengalami pengurangan hormon esterogen, sehingga pada umumnya wanita diatas usia 40 tahun lebih banyak terkena osteoporosis dibanding dengan pria. Pria yang mengalami defisit testosteron (hormon ini dalam darah diubah menjadi estrogen). Gangguan hormonal lain seperti : tiroid, para retiroid, insulin dan glukokortikoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008) .

2.1.3.2. Faktor Resiko Yang Dapat Dimodifikasi

a. Imobilisasi

Imobilisasi dalam waktu yang lama memiliki resiko yang lebih tinggi untuk terkena osteoporosis dibandingkan menopause. Imobilitas akan berakibat pada pengecilan tulang dan pengeluaran kalsium dari tubuh (hiperkalsiuria). Imobilitas umumnya dialami orang yang berada dalam masa penyembuhan yang perlu mengistirahatkan tubuhnya untuk waktu lama.

b. Postur tubuh kurus

Postur tubuh yang kurus cenderung mengalami osteoporosis dibandingkan dengan postur ideal (dengan berat badan ideal), karena dengan postur tubuh yang kurus sangat mempengaruhi tingkat pencapaian massa tulang.

c. Kebiasaan (mengkonsumsi alkohol, kopi, minuman yang mengandung kafein dan rokok yang berlebihan). Dengan berhenti merokok secara total, membuat estrogen dalam tubuh seseorang tetap beraktifitas dan juga dapat mengeliminasi resiko kehilangan sel pembentuk tulang selama hidup yang mencakup 20 - 30% pada pria dan 40 - 50% pada wanita. Minuman yang mengandung alkohol, kafein dan soda berpotensi mengurangi penyerapan kalsium ke dalam tubuh, sehingga jenis minuman tersebut dikategorikan sebagai faktor resiko osteoporosis.

d. Asupan gizi rendah

Pola makan yang tidak seimbang yang kurang memperhatikan kandungan gizi seperti kalsium, fosfor, seng, vitamin B6, C, D, K serta fitoestrogen merupakan faktor resiko osteoporosis.

e. Kurang terkena sinar matahari

Orang jarang terkena sinar matahari, terutama sinar pada pagi dan sore hari, karena pada saat tersebut sinar dibutuhkan untuk memicu kulit membentuk vitamin D3, dimana vitamin D (D3 + D2/berasal dari makanan) diubah oleh hepar dan ginjal menjadi kalsitriol.

f. Kurang aktifitas fisik dan lingkungan

Kurangnya olah raga dan latihan secara teratur, menimbulkan efek negatif yang menghambat proses pematangan massa tulang dan kekuatan tulang. Lingkungan yang beresiko terkena osteoporosis, adalah lingkungan yang memungkinkan orang tidak terkena sinar matahari dalam jangka waktu yang lama seperti daerah padat hunian, rumah susun, apartemen dan lain-lain.

g. Penggunaan obat untuk waktu lama

Terutama pemakaian obat yang mengganggu metabolisme tulang. Jenis obat tersebut antara lain : kortikosteroid, sitostatika (metrotreksat) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Berikut ini adalah klasifikasi faktor resiko osteoporosis yang dapat dimodifikasi.

Tabel 2.1. Faktor resiko osteoporosis yang dapat dimodifikasi.

Penggolongan	Faktor Resiko
Resiko Tinggi	Imobilitas pada pasien dalam jangka waktu yang lama (anggota gerak yang mengalami kelumpuhan, contoh stroke)
Resiko Sedang	Badan yang kurus (BB kurang dari normal) konsumsi alkohol, penggunaan steroid jangka lama, penggunaan obat kortisol dan obat osteoartritis dalam jangka lama
Resiko Rendah	Konsumsi rokok atau tembakau, kurang aktifitas fisik, kurang konsumsi kalsium

[Sumber : Brownson, Remington, Davis, 2001 (dalam Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008)].

2.1.4. Klasifikasi osteoporosis

2.1.4.1. Osteoporosis primer : berhubungan dengan berkurangnya massa tulang dan atau terhentinya produksi hormon (khusus perempuan) disamping bertambahnya usia. Osteoporosis primer terdiri dari :

a. Tipe I (*post menopause*). Yang terjadi pada wanita pasca menopause. Biasanya wanita berusia 50-65 tahun, fraktur biasanya pada vertebra (ruas tulang belakang), iga atau tulang radius.

b. Tipe II (*senile*). Terjadi pada usia lanjut. Pasien biasanya berusia lebih 70 tahun, pria dan wanita mempunyai kemungkinan yang sama terserang, fraktur biasanya pada tulang paha. Selain fraktur maka gejala yang perlu diwaspadai adalah kifosis dorsalis bertambah, makin pendek dan nyeri tulang berkepanjangan.

2.1.4.2. Osteoporosis sekunder : dapat terjadi pada tiap kelompok umur. Disebabkan oleh berbagai penyakit tulang (rematoid kronik, arthritis, spondilitis tbc, osteomalasia, dll), penggunaan steroid untuk jangka waktu yang lama,

astronot tanpa gaya berat, paralise otot, tidak bergerak untuk periode lama, hipertiroid dan lain-lain (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

2.1.5. Patofisiologi

Osteoporosis adalah abnormalitas pada proses remodeling tulang dimana proses resorpsi tulang lebih besar daripada proses pembentukan tulang yang menyebabkan hilangnya massa tulang. Remodeling tulang digambarkan dengan keseimbangan fungsi osteoblas dan osteoklas dan terjadi pada tiap permukaan tulang dan berlanjut sepanjang hidup meskipun pertumbuhan terhenti. Jika massa tulang tetap pada dewasa, menunjukkan terjadinya keseimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang. Remodeling dibutuhkan untuk menjaga kekuatan tulang dengan membuang tulang yang sudah tua sehingga stabilitas biomekanik dan homeostasis mineral tubuh bisa dipertahankan. Osteoporosis secara seluler terjadi disebabkan oleh karena jumlah dan aktivitas sel osteoklas melebihi dari jumlah dan aktivitas sel osteoblas. Keadaan ini mengakibatkan penurunan massa tulang (Manolagas, 2000).

Sel-sel tulang terdiri dari 3 jenis, yaitu osteoklas, osteoblas dan osteosit.

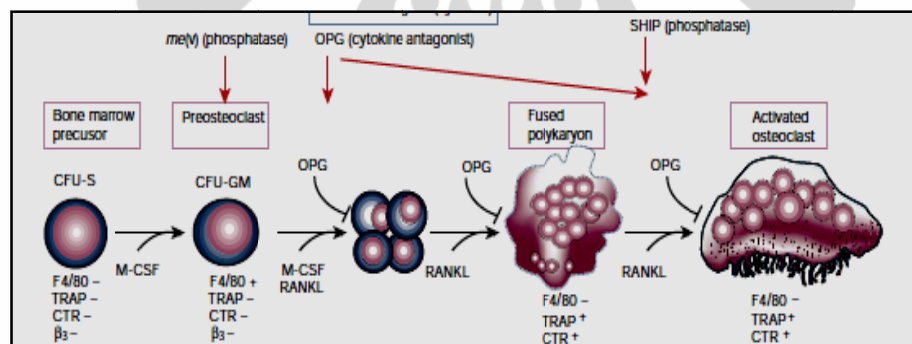
Osteoblas merupakan sel tulang yang masih muda, yang berfungsi membentuk tulang, sehingga sering didapatkan pada sel yang sedang tumbuh. Mereka membentuk dan mensekresikan kolagen dan nonkolagen organik, yaitu komponen pada fase matrik tulang. Mereka mempunyai peranan penting pada mineralisasi matrik organik yang nantinya akan dihilangkan oleh osteoklas bila teraktivasi dengan dilarutkannya mineral tulang dan degradasi matrik tulang. Peranan protein nonkolagen tidak diketahui tapi sintesisnya diatur oleh hormon paratiroid (PTH) dan 1.25 dihidroksivitamin D. Mereka juga berperan pada kemotaksis dan adhesi sel. Pada proses pembentukan matrik tulang organik, osteoblas terperangkap diantara formasi jaringan baru, kehilangan kemampuan sintesis dan menjadi **osteosit**.

Osteoklas merupakan sel raksasa (20-100 mikron) yang berinti banyak/*multinuclear* (6-50 buah). Sel ini ditemukan terutama pada tulang yang mengalami resorpsi. Sel ini bergabung menjadi tulang melalui permukaan reseptor. Penggabungan pada permukaan osteoklas tulang membentuk kompartemen yang

dikenal sebagai *sealing zone*. Reabsorpsi tulang terjadi oleh kerja proteinase asam pada pusat ruang isolasi subosteoklas yang dikenal sebagai *lacuna Howship*. Osteoklas mungkin berasal dari sel induk sumsum tulang (*Bone Marrow-derived monocyte/Macrophage precursor Cells* (BMMs), yang juga menghasilkan makrofag-monosit. Perkembangan dan fungsi mereka dimodulasi melalui signal yang dikeluarkan sel mesenkim termasuk osteoblas (Takayanagi et al., 2002; Lindsay dan Cosman, 2005).

Estrogen merupakan hormon seks steroid memegang peranan yang sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas sel osteoblas maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin-parakrin utamanya oleh sel osteoblas .

Osteoklas terbentuk dari fusi sel prekursor yang *mononuclear* menjadi sel *multinuclear*, kemudian memacu untuk berdiferensiasi menjadi sel osteoklas dewasa. Dalam deferensiasi dan aktivasi osteoklas diinduksi oleh ekspresi RANK-L (*Ligand Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B*) dan M-CSF (*Macrophage- Colony Stimulating Factor*) dari sel stroma osteoblas.



[Sumber : Boyle, Simonet dan Lacey, 2003].

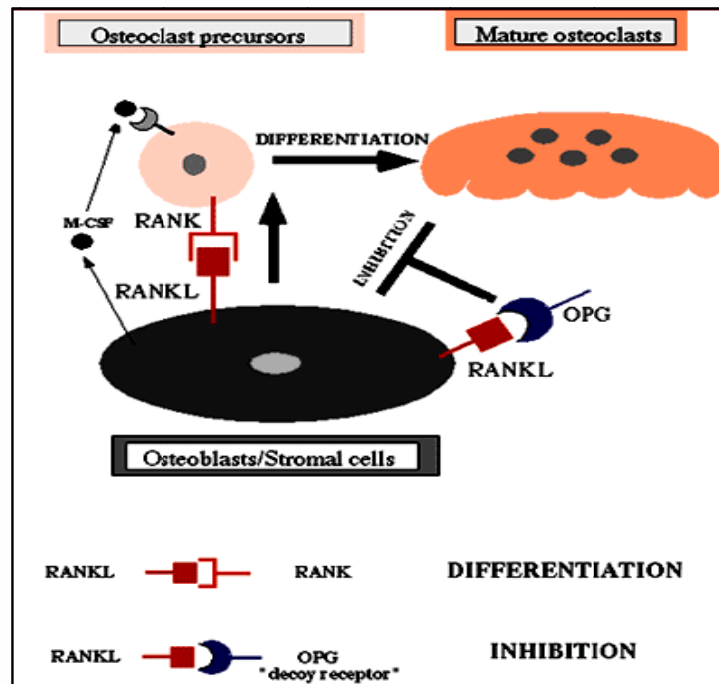
Gambar 2.2. Proses pembentukan dan aktivasi sel osteoklas atas pengaruh M-CSF dan RANKL.

Sel osteoblas memiliki reseptor estrogen α dan β (ER α dan ER β) di dalam sitosol. Dalam diferensiasi sel osteoblas mengekspresikan reseptor β (ER β) 10 kali lipat dari reseptor estrogen α (ER α) (Monroe, Sereto dan Spelsberg, 2003). Sub tipe reseptor inilah yang melakukan pengaturan homeostasis tulang dan berperan akan terjadinya osteoporosis (Quaedackers et al., 2001). Dalam sebuah

studi didapatkan bahwa kemampuan estrogen mengatur produksi sitokin sangat bervariasi dari masing-masing organ maupun masing-masing spesies (Kawiyana, 2009). Didalam percobaan binatang defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen terjadi pembentukan tulang kembali dan didapatkan penurunan produksi dari IL-1, IL-6 dan TNF- α , selanjutnya akan terjadi penurunan produksi M-CSF dan RANK-Ligand (RANK-L). RANK-L yang merupakan salah satu famili dari TNF disebut juga : OPG-L dan memiliki reseptor RANK yang merupakan kunci pengatur *remodeling* tulang dan sangat esensial dalam perkembangan dan aktivitas dari osteoklas (Boyle, Simonet dan Lacey, 2003). RANK dan RANK-L merupakan protein yang menyerupai molekul sitokin yang berikatan pada membran (*membrane-bound cytokine-like molecules*). RANK-L diekspresikan paling banyak oleh osteoblas dan sel lapisan mesenkim. Selain itu diekspresi juga oleh sel periosteal, kondrosit, sel endothelial dan juga oleh sel T aktif (Kears, Khosla dan Kostenuik, 2008).

Diferensiasi sel osteoklas dari hemopoitik progenitor bergantung pada reseptor yang terdapat pada membran sel osteoklas yang disebut RANK. Sedangkan sel stroma osteoblastik mengekspresikan RANK-L pada permukaan sel. Selanjutnya RANK-L berikatan dengan RANK pada permukaan sel osteoklas progenitor untuk merangsang diferensiasi sel tersebut. Selain itu sel stroma osteoblas juga mensekresi substansi yang larut dan mengambang, yang berfungsi sebagai reseptor dan dapat juga mengikat RANK-L yang disebut OPG (*osteoprotegerin*). OPG dapat beraksi sangat poten sebagai penghambat proses osteoklastogenesis dan penyerapan tulang baik *in vitro* maupun *in vivo*, melalui kemampuannya sebagai reseptor umpan (*decoy receptor*) dengan cara berikatan dengan RANK-L, sehingga mencegah interaksi antara RANK-L dengan RANK pada progenitor osteoklas. 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. Malahan terakhir dibuktikan bahwa RANK-L merupakan salah satu faktor resiko secara biomolekuler akan terjadinya osteoporosis pada wanita pascamenopause defisiensi estrogen (Khosla, 2001; Siki Kawiyana, 2009). Studi

pada tikus transgenik menunjukkan bahwa overekspresi OPG osteopetrosis diproduksi, sementara depresi OPG tikus memiliki fenotip osteoporosis parah dengan tingginya insiden fraktur (Aubin dan Bonnelye, 2000; Kawiya, 2008).



[Sumber : Aubin dan Bonnelye, 2000].

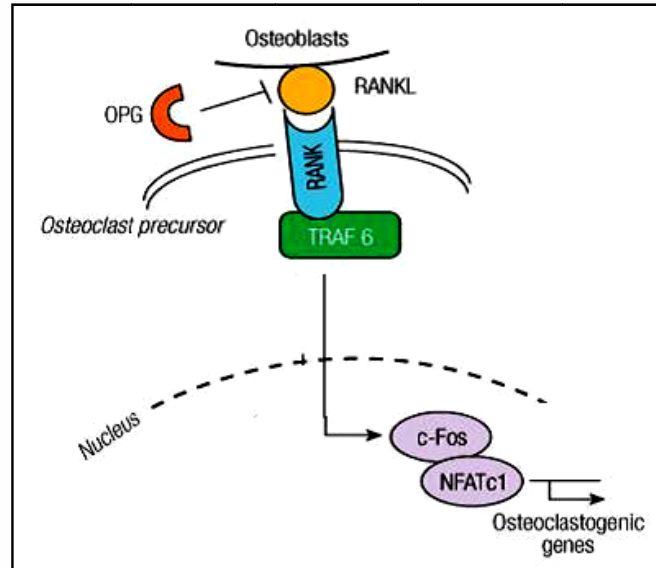
Gambar 2.3. Peranan RANK dan RANKL dalam aktivasi sel osteoklas dan peran OPG menghambat proses tersebut .

Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang sel osteoblas dan sel stroma untuk memproduksi TGF- β , yang selanjutnya TGF- β ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Oursler, 2003). Sedangkan efek langsung dari estrogen terhadap osteoklas adalah melalui reseptor estrogen pada sel osteoklas, yaitu menekan aktivasi c-Jun dan c-Fos, sehingga mencegah terjadinya diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menekan aktivasi sel osteoklas dewasa (Oursler, 2003).

Terjadi peningkatan kadar dan aktivitas sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- α) secara spontan apabila fungsi ovarium menurun, misalnya pada masa menopause. Bagaimana mekanisme secara pasti hubungan penurunan estrogen

dengan peningkatan sitokin ini belum diketahui secara jelas. Tetapi ini diduga erat hubungannya dengan interaksi dari reseptor estrogen (ER= *Estrogen Receptor*) dengan faktor transkripsi, modulasi dari aktivasi NO, efek antioksidan, aksi plasma membran dan perubahan dalam fungsi sel imun. Maka pada studi klinis dan eksperimental ditemukan ada hubungannya antara penurunan massa tulang dengan peningkatan sitokin proinflamasi ini.

Defisiensi estrogen menginduksi kehilangan tulang melalui pengaturan ke hulu osteoklastogenesis lewat berbagai mekanisme yang belum lengkap diketahui. Ini diduga erat hubungannya dengan interaksi dari reseptor estrogen (ER= *Estrogen Receptor*) dengan faktor transkripsi. Dalam kondisi fisiologis, RANKL diproduksi oleh osteoblas berikatan dengan RANK pada permukaan membran prekursor osteoklas dan merekrut protein adaptor TRAF 6, menyebabkan aktivasi NF- κ B dan bertranslokasi ke nukleus. NF- κ B meningkatkan pengekspresian c-Fos dan c-Fos berinteraksi/membangkitkan NFATc1 (NFAT2) untuk memicu transkripsi gen osteoklastogenik dengan mendorong translokasi nuklear dari protein-protein Jun. NFATc1, sebaliknya, difosforilasi oleh kalsineurin, yang juga mendorong translokasi nuklearnya. Yang penting, penginaktifasian c-Fos, c-Jun, atau NFATc1 menghasilkan kegagalan diferensiasi osteoklas dan osteopetrosis yang parah. Jalur RANKL, c-Fos dan NFATc1 (NFAT2) adalah wajib bagi diferensiasi dan fungsi osteoklas, meskipun ia bukanlah satu-satunya pemain bagi suatu osteoklastogenesis yang benar (Huang et al., 2006 ; Takayanagi et al., 2002).



[Sumber : Boyce dan Xing, 2007, telah diolah kembali].

Gambar 2.4. Jalur RANK, RANKL, c-Fos dan NFATc1 (NFAT2) pada osteoklastogenesis.

Pada sel proosteoklas yang dirangsang dengan RANKL, ekspresi NFAT2 dominan pada sitoplasma 24 jam setelah stimulasi RANKL, namun translokasi intinya menjadi jelas pada 48 jam yaitu pada saat fusi osteoklas dimulai. Pada waktu ini, sel-sel positif untuk TRAP, diagnostik untuk osteoklas, sudah dapat diamati. Pada 72 jam setelah stimulasi RANKL, pada dasarnya semua inti sel multinuklear sepenuhnya mengekspresikan penanda TRAP menjadi sangat positif untuk NFAT2. Jadi ada korelasi erat antara kinetika induksi RANKL dengan peningkatan tingkat ekspresi NFAT2 dalam inti dan diferensiasi osteoklas BMMs untuk *in vitro* (Takayanagi et al., 2002).

2.1.6. Diagnosis

Osteoporosis tidak memiliki keluhan spesifik. Keluhan akan dirasakan bila tulang udah mengalami fraktur yang akan menyebabkan rasa nyeri, deformitas, serta gangguan fungsi. Anamnesis terperinci tentang faktor resiko yang mungkin

dimiliki pasien sangat membantu dalam menegakkan diagnosis. Analisis faktor resiko ini penting untuk menentukan perlu tidaknya dilakukan pemeriksaan densitas mineral tulang (BMD) yang merupakan modalitas diagnosis yang utama dalam menegakkan diagnosis (Health Technology Assessment Indonesia, 2005).

Faktor lain yang kurang berpengaruh berdasarkan studi tapi juga memiliki hubungan yang signifikan dengan densitas tulang dan fraktur. Meliputi merokok, penggunaan alkohol, kopi, asupan rendah kalsium dan vitamin D serta pengguna kortikosteroid. Prediksi untuk densitas tulang rendah dan fraktur adalah sama kecuali yang spesifik berkaitan dengan jatuh. Sebagian besar faktor resiko berhubungan signifikan pada populasi dan ras yang berbeda. Faktor resiko sesuai untuk tiap tempat fraktur yang berbeda kecuali fraktur karena jatuh memiliki faktor resiko fungsional tambahan.

Tabel.2.2. Penilaian osteoporosis secara laboratorik dilakukan dengan melihat petanda biokimia untuk osteoblas dan untuk osteoklas.

Pemeriksaan Laboratorium	Petanda Biokimia
Untuk osteoblas	Osteokalsin, prokolagen I peptide dan alkali fosfatase total serum
Untuk osteoklas	Dioksi piridinolin (D-pyr), piridinolin (Pyr) <i>Tartate Resistant Acid Phosphatase</i> (TRAP), kalsium urin, hidroksisiprolin dan hidroksi glikosida.

[Sumber : Rahman I dalam Health Technology Assessment Indonesia, 2005].

Penilaian langsung densitas tulang untuk mengetahui ada/tidaknya osteoporosis dapat dilakukan secara : Radiologik, Radioisotop, QCT (*Quantitative Computerised Tomography*), MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), QUS (*Quantitative Ultrasound*), Densitometer (*X-ray absorpmetry*).

Secara bioseluler, penilaian biopsi tulang dilakukan secara histopometri dengan menilai aktivitas osteoblas dan osteoklas secara langsung. Namun

pemeriksaan ini biayanya masih mahal (Health Technology Assessment Indonesia, 2005).

2.1.7 . Terapi

Osteoporosis bersifat multifaktorial sehingga penanganannya pun sangat kompleks. Terapi untuk osteoporosis difokuskan tidak hanya untuk menghambat resorpsi tulang atau merangsang pembentukan tulang. Tidak kalah penting untuk mengurangi resiko terjatuh. Secara teoritis osteoporosis dapat diobati dengan cara menghambat kerja osteoklas dan atau meningkatkan kerja osteoblas. Akan tetapi saat ini obat-obat yang beredar pada umumnya bersifat anti resorpsi.

Yang termasuk obat anti resorpsi :

2.1.7.1. Pengobatan Hormonal

Estrogen

Pengobatan wanita pasca menopause dengan estrogen akan menghentikan kehilangan tulang (perlindungan terhadap terjadinya osteoporosis) pada wanita usia 50, 60 atau 70 tahun. Terapi estrogen dihentikan bila tidak ada peningkatan massa tulang. Pengobatan dengan estrogen memberikan gambaran efek terapi pada kasus osteoporosis. Estrogen dianggap dapat menghambat resorpsi tulang, terapi pemberian estrogen sebagai pencegahan terhadap osteoporosis berdasarkan observasi sebagai berikut :

- a. Kejadian osteoporosis meningkat postmenopause.
- b. Wanita yang mengalami ooforektomi bilateral memperlihatkan gejala osteoporosis lebih dini dan hebat.
- c. Penderita yang mengalami osteoporosis umumnya berkurang dengan pemberian estrogen.

Kemungkinan estrogen mencegah osteoporosis dengan cara sebagai berikut :

- a. Estrogen menempati reseptor osteoklas yang akan mempengaruhi fungsi osteoklas dalam menurunkan kehilangan tulang.
- b. Estrogen menurunkan kecepatan perubahan tulang normal yang

- menyebabkan efek positif terhadap keseimbangan kalsium.
- c. Estrogen akan memperbaiki absorpsi kalsium.
 - d. 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* 1 dan 2, serta *growth factor beta*.
 - e. Estrogen merangsang sintesa kalsitonin yang dapat menghambat resorpsi tulang.
 - f. Estrogen meningkatkan reseptor vitamin D di osteoblas (Setiyohadi, 2006).

Efek samping estrogen meliputi nyeri payudara (mastalgia), retensi cairan, peningkatan berat badan, tromboembolisme dan pemakaian jangka panjang dapat meningkatkan resiko kanker payudara.

Kontra indikasi absolut penggunaan estrogen adalah : kanker payudara, kanker endometrium, hiperplasia endometrium, perdarahan uterus disfungsi, hipertensi, penyakit tromboembolik, karsinoma ovarium, dan penyakit hati yang berat (Setiyohadi, 2006).

Kombinasi estrogen dengan progesteron akan menurunkan resiko kanker endometrium dan harus diberikan pada setiap wanita yang mendapatkan TSH, kecuali yang telah menjalani histerektomi (Kawiyana, 2009).

Saat ini pemakaian fitoestrogen (isoflavon) mulai digalakkan sebagai TSH. Beberapa penelitian menyatakan memberikan hasil yang baik untuk keluhan defisiensi estrogen atau mencegah osteoporosis (Liswati, 2007).

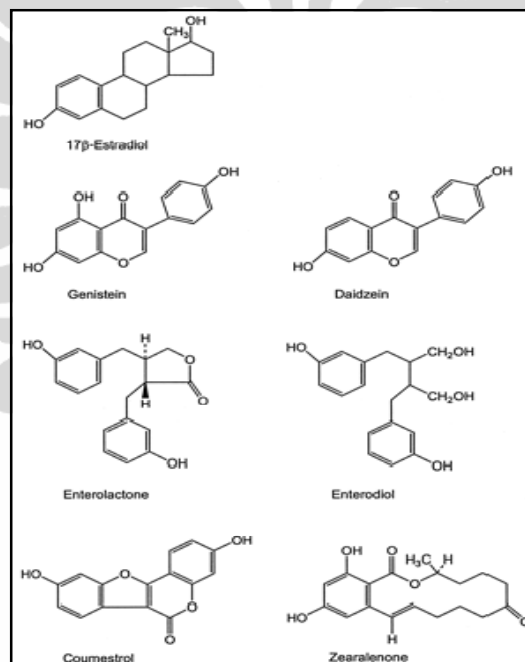
2.1.7.2. Pengobatan non Hormonal

- a. Kalsitonin
- b. Bifosfonat
- c. Kalsium dan vitamin D : tidak mempunyai efek antiresorpsi maupun stimulator tulang, tetapi diperlukan untuk optimalisasi mineralisasi osteoid setelah proses pembentukan tulang oleh sel osteoblas.

d. Stimulasi pembentukan tulang : fluorida, anabolik steroid, hormon parathiroit, bahan lain dan olahraga berat (Setiyohadi, 2006).

2.2. FITOESTROGEN

Fitoestrogen merupakan suatu senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang memiliki struktur mirip estrogen manusia 17- β estradiol, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Molekul-molekul fitoestrogen dapat menempati reseptor estrogen, tetapi lama penempatan atau afinitasnya terhadap reseptor lebih kecil bila dibandingkan dengan 17 β -estradiol. Fitoestrogen memiliki afinitas yang lebih tinggi dengan ER β dibanding dengan ER α . Oleh karena itu fitoestrogen memiliki aktivitas mirip estrogen (Dang and Lowik, 2005; Bustamam, 2008; Setchell, Lydeking-Oslen, 2003).



[Sumber : Belcher and Zsarnovszky, 2001].

Gambar. 2.5. Kemiripan struktur 17- β -estradiol dengan fitoestrogen.

Fitoestrogen dibedakan menjadi 3 kelas yaitu isoflavon, kumestan dan lignin. Selain itu beberapa flavonoid seperti apigenin, quercetin, kaemferol dan naringenin juga termasuk dalam fitoestrogen (Dang and Lowik, 2005).

Tabel 2.3. Tiga kelas senyawa fitoestrogen dan sumbernya.

No	Kelas Senyawa	Jenis Fitoestrogen		Sumber
		Glikosida	Aglisosida	
1.	Isoflavon	Genistin	Genistein	Kacang kedelai, buncis dan kacang panjang
		Biochanin A		
		Daidzin Formononetin	Daidzein (dimetabolisme menjadi equol dan O-desmetilangolesin O-DMA)	
2.	Lignan	Glicetin		Padi, sereal, bawang putih, brokoli, wortel, jeruk dan apel.
		Sekoisolariciresinol	Enterodiol	
3.	Coumestan	Matairesionol	Enterolakton	Kecambah, kacang-kacangan dan biji bunga matahari
			Coumestrol	

[Sumber : Chiechi and Micheli, 2005].

Genistein : dibentuk dari biochanin A dan di metabolisme menjadi p-etilfenol estrogen inaktif. Daidzein : dibentuk dari formononetin oleh enzim hidrolitik bakteri di lumen usus dan dimetabolisme menjadi equol dan O-desmetilangolesin (O-DMA). Enterodiol dan enterolakton adalah hasil metabolisme lignin oleh mikroflora.

2.2.1. Isoflavon

Isoflavon merupakan fitoestrogen yang paling terkenal, terutama ditemukan dalam suku Fabaceae/Leguminoceae yang meliputi kacang kedele, buncis dan kacang panjang. Isoflavon ada di alam dalam bentuk tidak aktif sebagai glikon, yang siap dihidrolisis dalam usus oleh β -glukosidase menjadi aglikon yang mudah diserap melalui sel epitel usus, diangkut ke hati, rekonjugasi dan diekskresikan dalam urin dan empedu seperti sirkulasi enterohepatik estrogen.

Genistein adalah bentuk aglikon dari genistin, adalah isoflavon yang paling banyak dipelajari, dan mempunyai potensi yang lebih rendah dibanding estradiol dan tergantung interaksi dengan ERs, 1/1000 ketika berinteraksi dengan ER α dan 1/3 ketika berinteraksi dengan ER β (Chiechi dan Micheli, 2005).

2.2.2. Mekanisme Kerja Fitoestrogen

Fitoestrogen mempengaruhi kesehatan manusia dengan dua mekanisme yaitu secara genomik dan non genomik, disebabkan karena berat molekulnya yang rendah sehingga dapat menembus membran sel dan berinteraksi dengan reseptor dan enzim. Mekanisme genomik termasuk efek estrogenik dan anti estrogenik terhadap estrogen reseptor (ERs) sedangkan mekanisme non genomik termasuk menghambat tirosin kinase, inhibisi topoisomerase DNA, aktifitas anti oksidan, menghambat angiogenesis dan inhibisi enzim aromatase (Chiechi dan Micheli, 2005).

Fitoestrogen bekerja sebagai *selective estrogen receptor modulator* (SERMs) karena dapat bersifat sebagai estrogen pada jaringan tertentu seperti tulang dan bersifat sebagai antiestrogen (antagonis) pada jaringan lainnya (payudara dan uterus). Singkatnya dapat melakukan fungsi kompleks sebagai agonis atau antagonis tergantung pada jaringan, jenis dan jumlah ERs dan lingkungan hormon endogen (Gruber, Tschugguel, Schneeberger dan Huber, 2002).

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa fitoestrogen bisa menjadi kandidat yang ideal untuk pengobatan osteoporosis karena mampu merangsang aktivitas osteoblastik dan menghambat pembentukan osteoklas, hal ini merupakan fungsi ganda yang diperoleh dengan mengkonsumsi genistein (Branca, 2000). Penemuan reseptor ER α dan ER β dalam tulang dan fitoestrogen (genistein), yang memiliki efek selektif pada tulang telah menjelaskan efek perlindungan dari fitoestrogen yang mungkin dihasilkan melalui pengikatan zat-zat pada reseptor estrogen dan terutama ER β . Ekspresi ER β meningkat selama mineralisasi tulang (Arts et al., 1997). Dan afinitas ER β yang tinggi terhadap genistein kemungkinan menjadikan efeknya yang efisien pada tingkat fisiologis. Metabolisme isoflavon dalam usus

dapat memberikan efikasi klinis yang berbeda dan bervariasi antar individu karena metabolit usus tidak dibuat dengan cara yang sama pada semua orang, bahkan hanya 45% wanita pascamenopause yang mampu menghasilkan equol (Lydeking-Olsen, Jansen, Setchell, Damhus dan Jensen, 2002), yang merupakan metabolit usus dari daidzein (Axelson, Kirk, Farrant, Cooley, Lawson dan Setchell, 1982) dan lebih aktif dari prekursor fitoestrogennya. Ini memiliki relevansi yang besar dari sudut pandang klinis karena hanya equol yang mampu meningkatkan BMD tulang belakang mereka (Setchell, Bron dan Lydeking-Olsen, 2002)

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

- a. Penelitian *in vitro* tentang pengaruh fitoestrogen terhadap kultur tulang menunjukkan ekstrak kedelai, genestein dan daidzein meningkatkan proliferasi sel osteoblas yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah alkaline fosfatase dan osteokalsin. Genestein menghambat resorpsi tulang, daidzein menurunkan jumlah sel progenitor osteoklas. Penelitian lain menemukan bahwa fitoestrogen kumestan dan koumestrol, tidak hanya menghambat resorpsi tulang dari *9-d-old-chick embryo femur eksplan* tetapi juga menegaskan efek resorpsi tulang dari hormon paratiroid, vitamin D dan prostaglandin pada dosis 10⁻⁵ mol/L (Setchell dan Lydeking-Olsen, 2003).
- b. Penelitian *in vivo*, Blair et al, yang pertama menguji genistein murni ditambahkan ke dalam makanan, dibandingkan dengan protein kedelai yang kaya isoflavon, pada Sprague-Dawley diovariectomi dan menemukan bahwa peningkatan BMD (*bone mineral density*) sebesar 12% selama 30 hari periode setelah operasi. Pengamatan ini kemudian dikonfirmasi oleh orang lain dengan isoflavon murni, dan dosis-respon efek yang dicatat untuk daidzin dan genistin, termasuk respon bifasik dilaporkan oleh Anderson et al di mana dosis rendah genistein (0,5 mg/hari) adalah jauh lebih efektif daripada dosis yang lebih tinggi (> 1,6 mg/hari). Yang juga menarik adalah temuan bahwa menunda pemberian genistein sampai lama setelah ovariektomi kurang efektif dalam melindungi tulang dibanding diberikan langsung setelah ovariektomi (Setchell dan Lydeking-Olsen, 2003). Fitoestrogen yang terdapat pada bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

dapat mencegah kehilangan massa tulang pada tikus yang diovariectomi. Sprague-Dawley betina umur 42 hari diberi ekstrak etil asetat bengkuang 200, 400 dan 800 mg/kg BB selama 4 minggu, efektif meningkatkan panjang femur dan tibia, meningkatkan densitas tulang dan mineral tulang yaitu kalsium dan fosfor (Nurrocmad, Leviana, Wulancarsari dan Lukitaningsih, 2010).

c. Penelitian intervensi pada manusia, pada 62 wanita menopause yang mengkonsumsi kedelai selama setahun menunjukkan bahwa penanda pembentukan tulang (*bone alkaline phosphatase*, *insulin-like growth factor-1* dan osteoklasin) meningkat. Namun tidak ada pengaruhnya pada ekskresi DPD (*deoksipiridinolin*), penanda resorpsi tulang. Suplementasi 25 g protein/hari secara positif memodulasi aktivitas penanda pembentukan tulang, tetapi tidak dapat mencegah resorpsi tulang lumbal dan paha pada wanita menopause (Arjmandi et al., 2005).

d. Hasil pengukuran antropometri dan pemeriksaan beberapa indikator metabolisme tulang menunjukkan bahwa konsumsi protein kedelai pada 15 wanita 45-64 tahun yang diberi 35 g protein kedelai perhari selama 12 minggu menurunkan ekskresi DPD yang berfungsi sebagai penghubung antara fibril kolagen. Namun tidak mengubah kadar osteokalsin secara bermakna. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dapat mencegah degradasi kolagen sebagai protein utama matriks tulang (Roudsari, Tahbaz, Hossein-Nezhad, Arjmandi, Larijani dan Kimiagar, 2005).

e. Pada 66 wanita yang mengkonsumsi 88 mg isoflavon per hari menunjukkan bahwa isoflavon dapat meningkatkan densitas tulang lumbal. Namun penelitian pada 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 (Bustamam, 2005).

2.3. KACANG PANJANG



Gambar 2.6. Kacang panjang.

2.3.1. Klasifikasi

Kerajaan	:	Plantae
Sub Kerajaan	:	Viridaplantae
Divisi	:	Tracheophyta
Sub Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Bangsa	:	Fabales
Suku	:	Fabaceae
Marga	:	Vigna
Jenis	:	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp (www.itis.gov/index.html , diunduh 25 Juni 2012, jam 20.15).

Sinonim : *Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk., *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Vigna cylindrical* Endl., *Vigna catjang* (Burm.) Walp (Hutapea, 1994).
Kacang panjang dalam bahasa Inggris long bean, cowpea atau snake bean , dalam bahasa cina Zi Hua di Ding.

2.3.2. Deskripsi

Tanaman kacang panjang merupakan tanaman semak, menjalar, semusim dengan tinggi kurang lebih 2,5 m. Batang tanaman ini tegak, silindris, lunak, berwarna hijau dengan permukaan licin. Daunnya majemuk, lonjong, berseling, panjang 6-8 cm, lebar 3-4,5 cm, tepi rata, pangkal membulat, ujung lancip,

pertulangan menyirip, tangkai silindris, panjang kurang lebih 4 cm, dan berwarna hijau. Bunga tanaman ini terdapat pada ketiak daun, majemuk, tangkai silindris, panjang kurang lebih 12 cm, berwarna hijau keputih-putihan, mahkota berbentuk kupu-kupu, berwarna putih keunguan, benang sari bertangkai, panjang kurang lebih 2 cm, berwarna putih, kepala sari kuning, putik bertangkai, berwarna kuning, panjang kurang lebih 1 cm dan berwarna ungu. Buah tanaman ini berbentuk polong, berwarna hijau dan panjang 15-25 cm. Bijinya lonjong, pipih, berwarna coklat muda. Akarnya tunggang berwarna coklat muda (Pitojo, 2006).

2.3.3. Kandungan Kimia

Kacang panjang mengandung enam antosianin (sianidin 3-O-galaktosida, sianidin 3-O-glukosida, delfinidin 3-O-glukosida, malvidin 3-O-glukosida, peonidin 3-O-glukosida, dan petunidin 3-O-glukosida), flavonol atau glikosida flavonol (kaempferol 3-O-glukosida, quersetin, quersetin 3-O-glukosida, kuersetin 3-O-6'-asetilglukosida) (Wong dan Chang, 2004). Aglikon flavonoid (kuersetin, kaempferol, isorhamnetin) (Lattanzio, Arpaia, Cardinali, Di Venere and Linsalata, 2000). Daun dan akarnya mengandung saponin dan polifenol (Hutapea, 1994). Selain itu juga mengandung protein, karbohidrat, lemak, serat, kalsium, besi, fosfor, potasium, sodium, vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, dan niasin (Handri dan Rafira, 2003). Secara empiris, tanaman kacang panjang dimanfaatkan untuk merawat dan memperbesar payudara (Aryati, 2001).

Tabel. 2.4. Nilai gizi kacang panjang (mentah) per 100 g (3,5 onz).

Parameter	Nilai
Energi	196 Kj (47 kcal)
Karbohidrat	8 gr
Diet serat	3,6 gr
Lemak	0
Protein	3 gr

[Sumber : USDA Nutrient database dalam Handri dan Rafira, 2003].

Dalam ukuran porsi 100 gram kacang terdapat 47 kalori, 0 gram lemak total, kolesterol 0 mg, natrium 4 mg (0% nilai harian), 8 gram karbohidrat total (2% nilai harian), dan 3 gram protein (nilai harian 5%). Ada juga 17% DV vitamin A, 2% DV besi, 31% DV vitamin C, dan 5% DV kalsium. Persen nilai harian berdasarkan diet 2000 kalori nilai harian individu bisa lebih tinggi atau lebih rendah tergantung pada kebutuhan kalori masing-masing (Handri dan Rafira, 2003).

2.3.4. Manfaat Kacang Panjang

Pada umumnya buah kacang-kacangan mengandung senyawa isoflavon yang bersifat estrogenik (Meiyanto, Handayani dan Jenie, 2008), namun demikian efek estrogeniknya masih memerlukan bukti ilmiah melalui penelitian. Kandungan senyawa-senyawa di dalam kacang panjang ini berperan dalam proses proliferasi, diferensiasi, dan sintesis protein di sel target yang berbeda-beda (Meiyanto, Handayani dan Jenie. 2008).

Pemberian ekstrak etanol kacang panjang mampu meningkatkan proliferasi sel MCF-7 yang bergantung pada dosis. MCF-7 merupakan *cell line* yang diturunkan dari sel epitel duktus dan mengekspresikan ER- α . Dengan demikian sel MCF-7 akan responsif terhadap estrogen maupun senyawa fitoestrogen. Pemberian ekstrak kacang panjang pada kultur sel MCF-7 menunjukkan fenomena pertumbuhan yang tidak konsisten terhadap dosis. Pemberian ekstrak kacang panjang dosis 50 - 300 $\mu\text{g/mL}$ menampakkan efek peningkatan proliferasi/pertumbuhan sel MCF-7, sedangkan pada dosis yang lebih tinggi lagi 400 dan 500 $\mu\text{g/mL}$ terjadi efek penurunan proliferasi sel. Pemberian ekstrak kacang panjang juga mampu meningkatkan perkembangan lobulus hingga 2 kali lipat dan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen pada sel epitel duktus dan lobulus payudara (Meiyanto, Handayani dan Jenie, 2008).

2.4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tanaman obat. Adapun tujuan dari ekstraksi yaitu untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut.

Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (Departemen Kesehatan RI, 1995).

2.4.1. Prinsip Ekstraksi secara Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian zat aktif secara sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama beberapa hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. Metode maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks dan lilin.

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya sederhana. Sedang kerugiannya antara lain waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan

untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks dan lilin. Metode maserasi dapat dilakukan dengan modifikasi sebagai berikut :

- a. Modifikasi maserasi melingkar. Maserasi dapat diperbaiki dengan mengusahakan agar cairan penyari selalu bergerak dan menyebar. Dengan cara ini penyari selalu mengalir kembali secara berkesinambungan melalui serbuk simplisia dan melarutkan zat aktifnya.
- b. Modifikasi maserasi digesti. Digesti adalah cara maserasi dengan menggunakan pemanasan lemah, yaitu pada suhu 40 - 50⁰C. Cara maserasi ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan.
- c. Modifikasi Maserasi Melingkar Bertingkat. Pada maserasi melingkar, penyarian tidak dapat dilaksanakan secara sempurna, karena pemindahan massa akan berhenti bila keseimbangan telah terjadi masalah ini dapat diatasi dengan maserasi melingkar bertingkat (M.M.B), yang akan didapatkan : serbuk simplisia mengalami proses penyarian beberapa kali, sesuai dengan bejana penampung, serbuk simplisia sebelum dikeluarkan dari bejana penyari, dilakukan penyarian dengan cairan penyari baru. Dengan ini diharapkan agar memberikan hasil penyarian yang maksimal, hasil penyarian sebelum diuapkan digunakan dulu untuk menyari serbuk simplisia yang baru, hingga memberikan sari dengan kepekatan yang maksimal, penyarian yang dilakukan berulang-ulang akan mendapatkan hasil yang lebih baik daripada yang dilakukan sekali dengan jumlah pelarut yang sama.
- d. Modifikasi remaserasi. Cairan penyari dibagi menjadi 2. Seluruh serbuk simplisia di maserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah diendapkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua.
- e. Modifikasi dengan mesin pengaduk. Penggunaan mesin pengaduk yang berputar terus-menerus, waktu proses maserasi dapat dipersingkat menjadi 6 sampai 24 jam (Departemen Kesehatan RI, 1995).

2.4.2. Etanol sebagai Penyari

Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena keuntungannya antara lain : lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Sedangkan kerugiannya adalah bahwa etanol mahal harganya. Etanol dapat melarutkan alkaloida basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, dammar dan klorofil. Lemak, malam, tannin, dan saponin hanya sedikit larut/terbatas. Untuk meningkatkan penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Perbandingan jumlah etanol dan air tergantung pada bahan yang akan disari. Dari pustaka akan dapat ditelusuri kandungannya baik zat aktif maupun zat lainnya. Dengan diketahuinya kandungan tersebut dapat dilakukan beberapa percobaan untuk mencari perbandingan pelarut yang tepat (Departemen Kesehatan RI, 1995) .

2.5. Uji Hambatan Proliferasi dengan MTT

Uji MTT merupakan metode hambatan yang sudah banyak digunakan dalam mengukur kecepatan proliferasi sel secara kolorimetri. Metode MTT relatif cepat, sensitif dan akurat untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi efek sitotoksik suatu bahan (Doyle and Griffiths, 2000). Metode ini didasarkan 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 menghasilkan ekivalen pereduksi seperti NADH dan NADPH menjadi formazan intraseluler yang berwarna ungu yang dapat larut dengan deterjen dan diukur dengan alat ELISA reader (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 *succinic dehydrogenase* yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Semakin besar nilai absorbansinya

menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Metode MTT ini mengukur kecepatan proliferasi sel, sehingga bila terjadi reaksi metabolik yang menyebabkan apoptosis atau 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 absorbansi yang diperoleh menjadi lebih besar dari yang seharusnya dan hasil pengamatan uji menjadi tidak valid. 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 absorbansi warna kristal formazan yang larut akan sebanding dengan jumlah sel hidup.

2.6. Pemeriksaan *Western Blot*

Western Blotting yang juga dikenal dengan *immunoblotting* merupakan teknik pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis protein. Prinsip dari teknik ini adalah pembentukan kompleks antibodi dengan protein melalui ikatan khusus yang diimobilisasi pada membran dan antibodi yang terikat kemudian dideteksi dengan beberapa metode (www.abcam.com/technical, diunduh 24 Oktober 2011, jam 15.00).

2.7. Sel RAW 264

Sel RAW 264 merupakan *cell line* yang didapat dari *lekemic monocyte* tikus BALB/c yang diinduksi dengan suntikan *Abelson Leukemia Virus*. Sel ini merupakan sel makrofag/monosit yang menempel pada dasar medium pertumbuhan. Medium pertumbuhan yang dianjurkan adalah *Minimum Essential Medium* (MEM) dengan berbagai modifikasi dengan penggantian medium setiap 2-3 hari. Selain itu untuk pertumbuhannya sel ini membutuhkan karbon dioksida (CO₂) 5% dengan suhu 37,0°C, frekuensi kultur 1-2 kali/minggu (www.brc.riken.jp/lab/cell/.../contribution.shtm diunduh 5 Mei 2012 jam 16.22).

2.8. *Minimum Essential Medium (MEM)*

Minimum Essential Medium (MEM) dikembangkan oleh Harry Eagle, merupakan medium kultur sintetik yang umum digunakan. Pada awalnya medium ini digunakan untuk pertumbuhan fibroblas mamalia normal dan subtipe sel HeLa tertentu yang membutuhkan beberapa nutrisi yang tidak dijumpai pada medium *basal Eagle (BME)*. Medium MEM mengandung asam amino konsentrasi tinggi sehingga dapat mendekati kebutuhan kultur sel mamalia. Kemudian medium ini dimodifikasi menjadi beberapa bentuk dengan suplementasi beberapa asam amino non esensial.

Modifikasi alfa-MEM merupakan MEM yang ditambahkan dengan *Earle's Balance salt* berupa asam amino non esensial, sodium piruvat, dan tambahan vitamin. Modifikasi ini pertama kali digunakan oleh Stanner (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/mem-media.html> diunduh 6 Mei 2012-jam 21.03).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi UI Depok dan Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika (LTFM), LAPTIAB – BPPT di PUSPIPTEK Serpong pada Oktober 2011 – Mei 2012.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Tanaman

Tanaman yang diteliti adalah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L) Walp) yang diambil dari hasil budi daya di daerah Serpong Tangerang dan telah dideterminasi di Herbarium LIPI Cibinong.

3.2.2. Bahan dan Reagen :

Etanol, metanol, kloroform, asam klorida 2N, etil asetat, pereaksi (Dragendorf, Mayer, Wagner dan Bouchardat), amonium hidroksida, hexan, asam sulfat 10%, serbuk Zn dan Mg, ekstrak etanol 50% kulit manggis, ekstrak metanol bunga cengkeh dan kulit batang kina, 1-Propanol (Merc), akuades, asetonitril dan asam fosfat 85% (grade KCKT), asetonitril 40%, standar (daidzin, glicitin, genistin, daidzein, glicitein, genistein), apigenin, α MEM/*Eagle's Minimum Essential Medium* modifikasi *alpha* (Sigma-Aldrich, USA) yang mengandung 0,1 mM L-glutamin dan *Fetal Bovine Serum* 10% (FBS), RANK-L (*Receptor Activator of NF-Kb Ligand*), *Trypsin* EDTA (*Ethylene diaminetetraacetic acid*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*), Penicillin 100 U/0.1 mg/mL streptomycin, DMSO (*dimetilsulfoksida*) (Merc), TRAP-staining (*Tartrat Resistance Acid Phosphatase*), asam tartrat, DMF (*Dimetyl forfamida*), alfa-naftol, etanol 70%, RIPA buffer (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*), anti- β actin *monoclonal antibody* (AC-74 Sigma-Aldrich), anti- NFAT2 *monoclonal antibody* (sc-7294),

HRP -conjugated sheep anti-mouse IgG (GE Healthcare), sampel *buffer*, PBST (*Phospat Buffer Saline Tween 20*), MTT (*Microculture tetrazolium*) assay Kit, Ponceau S practical grade (Sigma-Aldrich USA), *Coomassiae Brilliant Blue R-250 Staining solution* (Bio- Rad), *Destaining Solution Coomassiae R-250 1X Solution* (Bio-Rad), Isopropil alkohol (Sigma-Aldrich USA), Glisin (Bio-Rad), *Tris Base* (Promega), SDS (*Sodium dodecyl sulfate*), *non fat milk* (Tropicana), TEMED (*Tetrametiletilediamin*) (Bio-Rad), DAB (*diaminobenzidine*) *detection Kit*.

3.2.3. Alat

Motor pengaduk RZR 2020 (Heidolph), *rotary evaporator* Heidolph laborata 4011- digital, *bekker* 5000 mL, pendingin (*chiller lab companion* RW-05256), desikator, cawan porselen, penangas air, sonikator (Elmasonic-Elma S15), sentrifus mikro 22R, pH meter (Eutech Instruments), *hotplate* (Yellow^{line}), kertas saring, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, corong kaca, pipet, tabung reaksi, *vortex*, gelas ukur, pipet (*Eppendorf research*) berbagai ukuran, tip berbagai ukuran, lempeng aluminium silica gel 6 F₂₅₄, Kromatografi Gas Dani 1000 DPC no.031203LHL3, KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi), kolom kromatografi LiChrospher 60 RP-Select B, 5 µm, 250x4 mm, pelindung kolom, timbangan analitik, botol berwarna gelap, *syringe filters*, *syringe*, *Plat 96 well*, *Plat 48 well*, *T Flask* kecil (5 mL), *T Flask* besar (15 mL), UV λ 254 dan 366 nm, *petri dish* diameter 10 cm, *petri dish* diameter 6 cm, ELISA reader (uQuant), alat sentrifus (Universal 320R), *vortex* (Heidolph REAX), tabung *eppendorf* 1.5 mL, PCR tube, *Power supply* (Bio-Rad), *Laminar air-flow*, Inkubator, SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*) *apparatus* (Bio-Craft, Model BE 240), *Transfer kit* (Bio-Rad), *marker protein* (Fermentas).

3.2.4. Cell Line

Cell Line yang digunakan adalah sel RAW 264 (didapat dari koleksi Dr. Anton Bahtiar, M Biomed, Apt).

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorium, yaitu ekstraksi kacang panjang dengan etanol, uji proliferasi dan antiosteoklastogenesis *in vitro* terhadap sel RAW 264.

3.4. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah proliferasi sel RAW 264 dan diferensiasi sel RAW 264 menjadi sel osteoklas pada kultur sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak etanol kacang panjang dibanding dengan kontrol. Kemudian diamati juga ekspresi NFAT2 pada sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak etanol kacang panjang dibandingkan kontrol.

3.5. Alur Kerja Penelitian

3.5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Kacang Panjang

Kacang panjang segar sebanyak 2 kg dibuat ekstrak dengan cara maserasi dengan etanol. Kacang panjang segar dicuci bersih dan dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih sama 1,5 cm, kemudian diblender. Setelah semua diblender dimasukkan *becker* 5000 mL, ditambahkan etanol, hingga terendam (2500 mL). Sampel yang dimaserasi diaduk menggunakan motor pengaduk dengan kecepatan 500 rpm selama 2 jam, kemudian didiamkan selama 24 jam. Maserat dipisahkan melalui penyaringan dengan *vacuum pump* dan proses diulangi dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama sebanyak 3 kali. Semua maserat dikumpulkan dan diukur volumenya, kemudian dilakukan proses pemekatan ekstrak dengan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 40⁰ C dan kecepatan putar 50 rpm. Tekanan vakum 175 mBar dengan menggunakan pendingin pada suhu 5⁰ C hingga diperoleh ekstrak etanol kental. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dan dicatat, selanjutnya rendemen dihitung, sebagai berikut :

$$\text{Rendemen total (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak total}}{\text{Bobot serbuk total}} \times 100\%$$

Ekstrak etanol disimpan di lemari pendingin -20°C sampai saat digunakan. Hasil ekstrak etanol kental ini pun siap untuk dilakukan pemeriksaan organoleptik, kadar abu, kadar sisa pelarut dan penapisan fitokimia.

3.5.2. Karakteristik Ekstrak Spesifik

3.5.2.1. Identitas Ekstrak

Meliputi nama ekstrak, nama tanaman, bagian tanaman dan nama Indonesia tanaman.

3.5.2.2. Deskripsi Organoleptik.

Deskripsi organoleptik ekstrak etanol kacang panjang diperiksa bentuk, warna, bau dan rasa (Badan POM RI, 2006).

3.5.3. Karakteristik Ekstrak Non-Spesifik

3.5.3.1. Kelarutan dalam Air dan Etanol

Untuk mengetahui kelarutan dalam air, 50 mg ekstrak ditimbang ke dalam *eppendorf* kemudian ditambahkan 1 mL air, disonikasi selama 10 menit. Lalu diamati warna larutan dan ada tidaknya endapan.

Untuk mengetahui kelarutan dalam etanol, 50 mg ekstrak ditimbang ke dalam *eppendorf* kemudian ditambahkan 1 mL etanol, disonikasi selama 10 menit. Lalu diamati warna larutan dan ada tidaknya endapan.

Tabel 3.1. Definisi kelarutan adalah sebagai berikut :

No	Warna Larutan	Spesifikasi
1	Larutan hijau pekat tanpa endapan	Larut
2	Larutan hijau pekat dengan sedikit endapan	Larut sebagian
3	Larutan kuning kecoklatan jernih, banyak endapan	Sukar larut
4	Larutan mendekati warna pelarut dengan banyak endapan	Praktis tidak larut

[Sumber : Departemen Kesehatan RI, 1995].

3.5.3.2. Susut Pengerinan

Pengukuran susut pengerinan dilakukan dengan cara cawan porselen dan tutupnya yang telah dipanaskan dalam oven pada suhu $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit ditimbang dan ditara (A). Sejumlah 2 g ekstrak ditimbang (B), dimasukkan ke dalam cawan porselen ditutup kembali. Ekstrak dalam cawan diratakan dengan cara menggoyangkan cawan tersebut. Lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$, tutup cawan dilepaskan dan dibiarkan dalam oven. Bobot sisa ditimbang dan dicatat hasilnya. Lalu dimasukkan kembali ke dalam oven pada suhu $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam, 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 (Departemen Kesehatan RI, 1989).

Terakhir dihitung kadar susut pengerinan dengan rumus :

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

3.5.3.3. Kadar Abu Total

Kadar abu total diukur dengan cara krus porselen kosong ditara dengan dipijarkan didalam tanur (700°C) selama 30 menit, dikeluarkan dari tanur dan krus porselen dimasukkan ke dalam desikator hingga mencapai suhu ruang, lalu ditimbang (W1). Ekstrak sebanyak 2 g ditimbang (W2). Dimasukkan ke dalam krus porselen yang sudah ditara dan sudah ditimbang bobot kosongnya. Krus porselen yang berisi ekstrak dimasukkan ke dalam tanur selama ± 6 jam atau hingga ekstrak menjadi abu berwarna putih. Krus porselen hasil pemijaran dikeluarkan dari tanur dan selanjutnya dimasukkan ke dalam desikator selama ± 15 menit atau hingga mencapai suhu ruang. Krus porselen yang telah mencapai suhu ruang ditimbang, lalu dicatat bobot akhirnya (W3) (Badan POM RI, 2006).

$$\text{Kadar abu} = \frac{(W3 - W1)}{W2} \times 100\%$$

3.5.3.4. Kadar Abu yang Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, disaring dan ditimbang, ditentukan kadar abu yang tidak larut asam dalam persen terhadap berat sampel awal (Badan POM RI, 2006).

3.5.3.5. Kadar Sisa Pelarut

Pengujian kadar sisa pelarut dilakukan dengan cara 10 mg sampel dimasukkan dalam eppendorf kemudian ditambahkan air 1 mL, kemudian disentrifugasi 10 menit, disentrifugasi 10 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Supernatan diambil, dipindahkan ke dalam labu takar 5 mL. Ditambahkan 1-propanol 25 μ L kemudian ditambah air sampai tanda batas. Dihomogenkan dan dispuilit 1 μ L, kemudian diinjeksikan ke kromatografi gas. Hasil akan tampak di layar monitor .

3.5.4. Uji Kandungan Kimia Ekstrak

Uji kandungan kimia ekstrak merupakan analisis kualitatif yang mencakup pada aneka ragam senyawa organik yang dibentuk dan ditimbun oleh makhluk hidup (Harborne, 1987). Pada penelitian ini dilakukan uji kandungan kimia ekstrak/fitokimia untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar kacang panjang dalam pelarut etanol. Identifikasi kandungan kimia tersebut terdiri dari identifikasi flavonoid, identifikasi steroid/triterpenoid, identifikasi saponin dan identifikasi alkaloid.

3.5.4.1. Identifikasi Flavonoid

Sejumlah 0.5 g ekstrak dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan sedikit serbuk magnesium (Mg), 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Bila lapisan amil alkohol berwarna jingga atau merah jingga berarti ekstrak mengandung flavonoid. Metode dilakukan di lemari asam (Harbone, 1987). Identifikasi dilakukan dengan ekstrak etanol 50 % kulit manggis sebagai pembanding.

3.5.4.2. Identifikasi Steroid/Triterpenoid dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Proses analisis dengan metode KLT menggunakan lempeng aluminium silica gel dilakukan terhadap ekstrak etanol kacang panjang dan ekstrak metanol bunga cengkeh sebagai pembanding. Eluen yang digunakan heksan : etil asetat, 7:3. Noda yang terbentuk pada lempeng diamati dengan sinar tampak dan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya lempeng disemprot dengan pereaksi asam sulfat 10% dalam metanol dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dan diamati kembali perubahan warna pada noda lempeng yang terbentuk baik langsung maupun dibawah sinar UV.

3.5.4.3. Identifikasi Saponin

Ekstrak sebanyak 500 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian 10 mL air panas ditambahkan lalu didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang tidak hilang selama tidak kurang dari 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih juga tidak hilang maka ekstrak mengandung saponin (Harbone, 1987). Identifikasi dilakukan dengan ekstrak etanol 50% kulit manggis sebagai pembanding.

3.5.4.4. Identifikasi Alkaloid

a. Metode Bouchardat

Ekstrak sebanyak 500 mg dimasukkan erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air lalu dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu 95° C selama 5 menit, didinginkan dan disaring. Enam tetes filtrat dipindahkan pada kaca arloji lalu ditambahkan 4 tetes larutan Bouchardat LP (dengan melarutkan 2 g iodium dan 4 g kalium iodide hingga mencapai volume 100 mL). Jika terbentuk endapan warna coklat hingga hijau maka ekstrak mengandung alkaloid. Metode dilakukan di lemari asam (Harbone, 1987).

b. Metode Mayer, Wagner dan Dragendorff

Ketiga metode ini juga dapat digunakan untuk uji alkaloid. Sebanyak 1 g sampel dilarutkan dalam 10 mL kloroform dan 4 tetes amonium hidroksida,

kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup. Ekstrak kloroform dalam tabung reaksi dikocok dengan 6 mL asam sulfat 2N dan lapisan asamnya dipisahkan ke dalam tabung reaksi yang lain. Lapisan asam ini diteteskan pada lempeng (spot) tetes dan ditambahkan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff yang akan menimbulkan endapan warna berturut-turut putih, coklat dan merah jingga (Harbone, 1987). Identifikasi dilakukan dengan ekstrak metanol kulit batang kina sebagai pembanding.

3.5.4.5. Analisa Isoflavon

Analisa isoflavon dilakukan dengan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

Preparasi sampel

- a. Ditimbang $\pm 0,05$ g ekstrak etanol kacang panjang. Dicatat berat sampel S(w).
- b. Ditambahkan 0,025 mL larutan standar internal (apigenin) dan digoyangkan untuk membasahi sampel.
- c. Ditambahkan 0,4 mL asetonitril dan digoyangkan untuk menyempurnakan pembentukan padatan tersuspensi.
- d. Ditambahkan 0,25 mL aquades dan dicampur. Dipastikan sampel yang dimasukkan tidak tertinggal di dalam tabung uji dengan cara penggojogan kuat.
- e. Dicampurkan 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 ekstraksi (proses ini tidak perlu dilakukan untuk produk yang larut sempurna pada awal pencampuran).
- f. Ditambahkan 0,325 mL aquades dan dikocok.
- g. Disentrifus selama 10 menit pada 200 x g untuk menjadi residu pelet tidak larut (tahap ini tidak diperlukan untuk produk yang larut dengan sempurna).
- h. Diambil sebagian supernatan dan difilter melalui *syringe filter* 0,45 μm
- i. Sampel siap untuk dianalisis menggunakan KCKT.

Kondisi alat

Diatur modul KCKT dengan kondisi sebagai berikut :

- a. Kolom : LiChocart 60 RP-Select B, 5 μ m, 250x4 mm
- 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 : Asetonitril

- h. Elusi gradien

awal 10% B, dengan tidak ada waktu jeda setelah injeksi, gradien linier sampai 30% B selama 30 menit, 3 menit pencucian pada 90 %, 10 menit kesetimbangan pada 10% B.

Tabel 3.2. Elusi gradien.

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

Ditunggu 6 menit untuk injeksi standar/sampel selanjutnya.

3.5.5. Kultur *Cell Line*

Untuk pembuatan kultur *cell line*, prosedur kerja disesuaikan dengan protokol dari abcam dengan sedikit modifikasi.

3.5.5.1. Persiapan medium pertumbuhan *cell line*

Medium yang digunakan adalah α -MEM dengan kode M 0894 (Sigma Aldrich). Medium berbentuk serbuk dengan berat 10,1 g untuk dilarutkan menjadi 1L medium kultur. Serbuk α -MEM dimasukkan ke dalam aquades sambil diaduk hingga homogen, kemudian ditambahkan aquades sampai volume mencapai 1000 mL. Setelah itu diukur pH medium dan selanjutnya medium disaring dengan menggunakan filter 0,2 μ m menggunakan penyaring vakum. Medium yang sudah steril kemudian disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4°C sampai saat akan digunakan.

3.5.5.2. *Thawing cell line*

Sebelum dilakukan *thawing* sel, medium disiapkan dengan menambahkan 50 mL FBS dan 5 μ L penisilin streptomisin ke dalam 500 mL medium kultur. Adapun tahap yang dilakukan dalam kultur sel adalah mengeluarkan *cell line* RAW 264 P21 dalam *cryo vial* dari tempat penyimpanan (nitrogen cair) dan dihangatkan sampai setengah cair. Telah disiapkan *T-flask* kecil yang berisi medium kultur 5 mL, sel dimasukkan dalam *T-flask* dan dihomogenkan dengan menggunakan pipet. Campuran sel-medium dalam *T-flask*, diperiksa dibawah mikroskop kemudian disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C, CO₂ 5%, kelembaban 80-90%.

2.5.5.3. Pemeriksaan sel

Sel harus diperiksa dibawah mikroskop setiap hari untuk memastikan mereka tumbuh dengan baik. Sel dibuang bila sel lepas sangat banyak atau tidak tumbuh sama sekali. Apabila sel yang tumbuh sudah memenuhi medium 70-80% maka sudah dapat dilakukan sub kultur.

2.5.5.4. Sub Kultur *cell line*

T-flask dikeluarkan dari inkubator dimasukkan *laminair*, medium dibuang dengan hati-hati dari *T-flask*. Dengan teknik aseptik, sel dicuci dengan menggunakan larutan PBS (*Phospat Buffer Saline*) steril untuk membersihkan sisa medium, dilakukan 2 kali. Kemudian dimasukkan 1 mL larutan yang terdiri dari 900 μL PBS dan tripsin 100 μL . *T-flask* digoyang dengan hati-hati untuk memastikan semua sel berkontak dengan tripsin, diinkubasi selama 3 menit. Kemudian dilakukan *scrapping* untuk melepaskan sel dari permukaan *T-flask*. Setelah itu tripsin dinonaktifkan dengan memasukkan medium kultur sebanyak 5 mL lalu campuran sel dan medium dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Selanjutnya supernatan dibuang, ke dalam tabung sentrifus dimasukkan medium 1 mL. Kemudian sel ditanam di petri *dish* baru dengan diameter 10 cm, dan diamati di bawah mikroskop. Sel diinkubasi pada suhu 37°C, CO₂ 5% dan kelembaban 80-90%. Sel harus diperiksa dibawah mikroskop setiap hari untuk memastikan mereka tumbuh dengan baik. Dibuang sel bila sel lepas sangat banyak atau tidak tumbuh sama sekali. Apabila sel yang tumbuh sudah memenuhi medium 70-80% maka sudah dapat dilakukan eksperimen.

3.5.6. Uji MTT

Pemeriksaan sitotoksisitas ekstrak kacang panjang dengan menggunakan uji MTT. Sel dipanen dari *petri dish* dengan tripsin-EDTA dan *discrapping*. Kemudian ditambahkan 5 mL medium untuk menghentikan kerja tripsin. Diambil 7 mL (campuran sel + medium) kemudian disentrifus 1500 rpm 5 menit suhu 22°C. Supernatan dibuang, peletnya ditambahkan medium 5 mL dan dihomogenkan/resuspensi. Kemudian diambil 50 μL + *Trypan blue* 50 μL diresuspensi dan dihitung sel dengan hemositometer, jumlah yang didapat $\times 10^4$ kemudian diencerkan dengan medium secara serial sampai di dapatkan 5×10^4 sel/mL. Sel ditanam pada 2 buah 96 *microwell plate* (untuk pemeriksaan 24 jam dan 48 jam) berisi masing-masing 50.000 sel/mL. Setelah 24 jam dimasukkan medium bercampur ekstrak kacang panjang untuk 7 pemeriksaan (kontrol negatif dan 6 dosis perlakuan : 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$), masing- masing

dibuat triplo kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C. Setelah 24 jam plate 1 dikeluarkan dari inkubator, medium dibuang, dicuci dengan PBS dua kali kemudian ditambahkan MTT *reagent* yang sudah diencerkan dengan medium (konsentrasi 10 % sebanyak 100 μ L/*well*) dan diinkubasi 4 jam. Setelah diinkubasi 4 jam plate 1 ditambahkan SDS 10 % 100 μ L/*well*. Plat kemudian ditutup dengan aluminium *foil* dan disimpan pada suhu ruang semalaman di tempat gelap, Keesokan harinya plat dikeluarkan dan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 570 nm. Plate 2 setelah 48 jam dilakukan perlakuan yang sama, kemudian hasil pembacaan absorbansi 24 jam dan 48 jam dicatat dan dilakukan pengolahan data untuk mengetahui konsentrasi ekstrak kacang panjang yang mempengaruhi proliferasi sel RAW 264 dibanding kontrol. Apabila nilai absorbansi lebih rendah dari sel kontrol mengindikasikan adanya reduksi kecepatan proliferasi sel. Sebaliknya nilai absorpsi yang lebih tinggi mengindikasikan percepatan proliferasi sel. Dari pemeriksaan ini akan didapatkan konsentrasi ekstrak etanol kacang panjang yang tidak mengganggu viabilitas sel RAW 264, apabila ada konsentrasi yang menurunkan viabilitas sel RAW 264 dibandingkan dengan kontrol setelah 48 jam maka konsentrasi tersebut tidak dimasukkan pada pemeriksaan osteoklastogenesis.

3.5.7. Pemeriksaan Osteoklastogenesis

Untuk melakukan pemeriksaan osteoklastogenesis sel RAW 264, sel dipanen dari cawan petri dengan tripsin dan discrapping. Kemudian ditambahkan 5 mL medium untuk menghentikan kerja tripsin. Diambil 7 mL (campuran sel + medium) kemudian disentrifus 1500 rpm 5 menit suhu 220⁰C. Supernatan dibuang, peletnya ditambahkan lagi medium 5 mL dan diresuspensi. Kemudian diambil 50 μ L + Trypan blue 50 μ L diresuspensi dan dihitung sel dengan hemositometer, jumlah yang didapat x 10⁴ kemudian diencerkan dengan medium secara serial sampai di dapatkan 5 x 10⁴ sel/mL. Untuk pemeriksaan ini dipakai plate 48 well dengan kapasitas volume 250 μ L/*well*. Penanaman sel dilakukan sore hari. Keesokan harinya medium diganti dengan medium baru yang berisi RANKL (1 μ L/ mL medium) dan ekstrak konsentrasi 25, 50, 100, 200, 400

$\mu\text{g/mL}$, kontrol medium (sel + medium) dan kontrol negatif (sel + medium + RANKL). Semua perlakuan diperiksa dengan triplo sehingga well yang terpakai adalah 18 well, selanjutnya diinkubasi sampai 72 jam.

Setelah 72 jam plat dikeluarkan dari inkubator dan medium kultur dikeluarkan. Selanjutnya diganti dengan medium baru yang berisi RANKL (1 μL /mL medium) dan ekstrak konsentrasi 0 (kontrol), 25, 50, 100, 200 dan 400 $\mu\text{g/mL}$, selanjutnya diinkubasi sampai 96 jam. Setelah 96 jam, plat dikeluarkan dari inkubator dan medium dikuras. Dicuci dengan PBS 2 kali, selanjutnya dikeringkan. Setelah itu dimasukkan metanol 200 $\mu\text{L/well}$. Setelah 2 menit metanol dibuang dan plat dikeringkan lagi pada posisi terbalik dan dibiarkan selama 1 hari supaya benar-benar kering. Setelah itu diwarnai dengan TRAP staining dan dikeringkan selama 24 jam. Kemudian dilihat di bawah mikroskop dan dihitung jumlah sel osteoklas (sel dengan inti 3 atau lebih) dan positif dengan pewarnaan TRAP, 5 lapangan pandang per/well.

TRAP staining merupakan pewarna yang terdiri dari reagen (1) yaitu dari fiksatif (formalin 10%, buffer netral), reagen (2) yang berisi buffer yang mengandung trastrat 50 mM, pH5 dan reagen (3) yang terdiri dari substrat kromogenin.

3.5.8. Pemeriksaan *Western Blotting*

Untuk pemeriksaan *Western Blotting*, prosedur kerja disesuaikan dengan protokol dari abcam dengan sedikit modifikasi.

3.5.8.1. Persiapan Sampel

a. Penanaman Sel

Sel ditanam dalam 6 buah cawan petri 6 cm. Kemudian diinkubasi *overnight* dengan suhu 37°C . Keesokannya medium diganti dengan medium baru berisi kontrol negatif (sel + medium), kontrol positif (sel + medium + RANKL) dan perlakuan (sel + medium + RANKL + 25 $\mu\text{g/mL}$ sampel) masing-masing untuk diinkubasi 24 jam dan 48 jam, sel $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$. Medium yang digunakan 4 mL/cawan petri. Konsentrasi ekstrak etanol kacang panjang yang dipilih adalah 25 $\mu\text{g/mL}$.

b. *Buffer* Lisis

Buffer lisis digunakan untuk memecah sel sehingga protein yang diinginkan bisa terlepas, proses ini membantu melarutkan protein sehingga bisa bermigrasi melewati *separating gel*. Di sini *buffer* lisis yang digunakan adalah RIPA *buffer* (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*) yang bisa bekerja di seluruh sel. RIPA *buffer* terdiri dari 150 mM sodium klorid; 1,0 % NP-40 atau triton X-100; 0,5 % sodium deoksikolat; 0,1% SDS (*sodium dodecyl sulphate*); 50 mM *Tris base* ph 8,0.

c. Persiapan lisat dari sel kultur

Setelah 24 jam ketiga cawan petri diletakkan di es yang dihancurkan, dicuci PBS dingin sebanyak 2 kali, dan ditambahkan 100 μ L RIPA/cawan petri dan *discrapper*, didiamkan 15 menit di es supaya protein larut semua. Sel dari masing-masing petri dipindahkan dengan hati-hati ke dalam 3 tabung *ependorf*, kemudian disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4⁰C. Supernatan diambil, dimasukkan dalam 3 tabung *ependorf* yang tetap diletakkan diatas es, kemudian dicampurkan dengan *sampel loading buffer laemml* 6x dengan perbandingan 5 : 1 yaitu 100 μ L supernatan : 20 μ L sampel *buffer* 6x. Kemudian lisat (campuran sampel dan sampel *buffer*) dipanaskan 100⁰C selama 5 menit, dan disimpan di -80⁰C, sambil menunggu 3 cawan petri yang diinkubasi 48 jam.

Untuk memberikan warna pada lisat ditambahkan sampel *buffer*, karena sel + RIPA tidak berwarna. Sampel *buffer* yang digunakan adalah sampel *buffer* 6 kali (6 x *laemml* *buffer*). Resep untuk membuat 10 mL: 1,2 g SDS (*sodium dodecyl sulfate*); 6 mg *bromophenol blue* (pewarna lisat); 4,7 ml gliserol; 1,2 mL *Tris* 0,5M Ph 6,8; 2,1 mL aquades. Campuran ini dihangatkan dan diaduk sampai semua larut, kemudian ditambahkan DTT (*dithiothreitol*) 0,93 g. Selanjutnya didinginkan dan disimpan pada -20⁰C.

Antibodi pada umumnya mengenali sebagian kecil dari protein yang dituju yang mungkin terletak dalam konformasi 3 dimensinya. Untuk mendapatkan akses ke bagian ini maka perlu untuk membuka lipatan protein, misalnya dengan mendenaturasi protein tersebut. Denaturasi bisa menggunakan deterjen anionik seperti SDS dan memanaskan campuran sampel 95-100°C selama 5 menit.

Sebagai standar *loading buffer* biasanya digunakan 2 x *Laemmli buffer* yang mencampur sampel : *loading buffer* dengan perbandingan 1:1. Bisa juga digunakan *loading buffer* 4 x kuat atau 6 x kuat untuk meminimalkan pengenceran sampel.

DTT berfungsi melepaskan ikatan disulfida intra dan intermolekul, sedangkan SDS berfungsi untuk mendenaturasi protein dan memberi muatan negatif pada protein. *Bromophenol blue* berguna sebagai indikator pewarna (*dye*) dan indikator migrasi protein. Gliserol pada *Laemmli buffer* berfungsi meningkatkan densitas sampel sehingga dapat turun ke dasar sumur.

Setelah 48 jam 3 cawan petri yang diinkubasi 48 jam diperlakukan sama dengan 3 cawan petri yang diinkubasi 24 jam seperti diatas. Lisat dalam 6 tabung *ependorf* siap di running elektroforesis.

d. Pembuatan PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Dicampurkan 40 mL 2 x PBS dan 960 mL aquades untuk membuat 1 x PBS dan di *autoclave* kemudian disimpan pada suhu kamar. Untuk membuat 25 x PBS digunakan KCl 5g, KH₂PO₄ 5g, Na₂HPO₄ 12 g, H₂O 72,4 g dan NaCl 100 g. Dilarutkan dalam aquades dan volumenya ditepatkan sampai 1000 mL. Selanjutnya di *autoclave* dan disimpan pada suhu kamar.

e. Pembuatan SDS 10% 200 mL

Untuk pembuatan 200 mL SDS 10% dibutuhkan 20 g SDS dicampur dengan aquades 190 mL dan 10 mL asam klorida 0,2N, kemudian diaduk dan disimpan.

f. Pembuatan larutan stok *acrylamide/bysacrylamide* 30%

Untuk pembuatan 100 mL stok *acrylamide/bysacrylamide* 30% digunakan 29,2 g *acrylamide* yang ditambah dengan 0,8 g *N'-N'-bis-methylene-acrylamide* dan dilarutkan dalam 100 mL aquades. Selanjutnya larutan disaring dan disimpan pada suhu 4°C dan dihindarkan dari cahaya. Maksimal disimpan 30 hari.

g. Pembuatan *buffer resolving gel* 1,5 M Tris-HCl pH 8.8

Untuk membuat *buffer resolving gel* 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 dibutuhkan 27,23 g *Tris base* dan dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah diisi 80 mL aquades. Kemudian diatur pH sampai 8,8 dengan ditambahkan 6N HCl. Setelah itu ditambahkan aquades sampai volume 150 mL dan disimpan di 4°C.

h. Pembuatan *stacking buffer* 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Untuk membuat *stacking buffer* 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 caranya : ditimbang 6 g *Tris base* dan dilarutkan dalam 60 mL aquades, diatur pH sampai 6,8 dengan penambahan 6 N HCl, kemudian tambahkan aquades sampai volume total 100 mL. Disimpan pada suhu 4°C.

i. Pembuatan *running buffer (electrode buffer)* 10 x pH 8,3

Untuk membuat *running buffer (electrode buffer)* 10 x ditimbang 30,3 g *Tris base*; 144 g Glisin; 10 g SDS dan dilarutkan dalam 1000 mL aquades, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C. Larutan ini adalah larutan stok. Cara penggunaannya : dilarutkan 50 mL 10x stok dengan 450 mL aquades untuk 1x *running elektroforesis*

3.5.8.2. Determinasi Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein bisa disamakan dengan menyamakan jumlah sel di masing-masing cawan petri yaitu 5×10^4 sel/ μ L.

3.5.8.3. Persiapan SDS-PAGE

Untuk pemeriksaan ini gel yang digunakan adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*). Konsentrasi gel

poliakrilamid ini ditentukan oleh berat molekul protein yang ingin dipisahkan. Semakin kecil berat molekul proteinnya semakin besar konsentrasi gel. Semakin besar proteinnya semakin kecil konsentrasi gel.

Tabel.3.3. Berat molekul protein 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

[Sumber : www.abcam.com/technical].

Protein yang akan diperiksa berat molekulnya adalah NFAT2 (125 kDa). Konsentrasi gel disesuaikan dengan berat molekul protein yaitu 8 %.

a. Pembuatan SDS-PAGE 8%

Untuk *resolving gel* dibutuhkan aquades 6,9 mL; *acrylamide/bisacrylamide* 30% 3,9 mL; *resolving buffer* (pH 8,8) 3,9 mL; SDS 0,15 mL; APS 0,15 mL dan TEMED 0,009 mL.

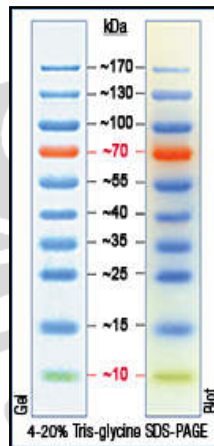
Sedangkan untuk *stacking gel* digunakan aquades 4,2 mL; *acrylamide/bisacrylamide* 0,99 mL; *stacking buffer* (pH 6,8) 0,75 mL; SDS 0,06 mL; APS 0,06 mL; TEMED 0,006 mL.

b. Loading kontrol

Pada pemeriksaan ini diperlukan *loading kontrol* yang gunanya untuk melihat apakah gel nya sudah *terloading* oleh sampel, juga untuk melihat nantinya apakah keseluruhan gel sudah ditransfer ke membran. Pita di *loading kontrol* juga dapat digunakan untuk melihat kuantitas protein yang melewati masing-masing baris. *Loading kontrol* yang kami gunakan adalah β -actin dengan berat protein 43 kDa.

c. *Marker* berat protein

Dengan menggunakan *marker* berat protein kita dapat memperkirakan lokasi protein yang kita cari. Selain itu *marker* ini juga dapat membantu memonitor proses elektroforesis berjalan baik atau tidak. *Marker* berat protein yang digunakan adalah *Pageruler™ Prestained Protein Ladder #SM0671* (Fermentas).



[Sumber gambar <http://www.fermentas.com>]

Gambar 3.1. *Marker* berat protein yang digunakan.

Marker berat protein yang digunakan pada bagian/pita yang berwarna merah menunjukkan berat protein 70 kDa, maka protein NFat2 diperkirakan berada diantara dua garis diatas warna merah.

3.5.8.4. Elektroforesis

Proses elektroforesis dimulai dengan membuat gel dengan konsentrasi 8% sesuai penjelasan diatas. Setelah alat elektroforesis dirakit, dimasukkan *resolving gel* sampai kira-kira menyisakan setinggi sisir (*comb*) elektroforesis dan dibiarkan gel mengeras. Apabila terdapat gelembung udara (*bubble*) maka dihilangkan dengan *isopropanol*. Gel di alat elektroforesis dianggap sudah mengeras apabila gel yang masih tersisa di luar sudah mengeras. Setelah itu sisa isopropanol dibuang, dan selanjutnya dimasukkan stacking gel. Kemudian diselipkan *comb*

(sisir) elektroforesis diantara kaca pada *stacking gel* dan dibiarkan mengeras. Setelah *stacking gel* mengeras, sisir dikeluarkan dan sampel siap dimasukkan.

a. Loading sampel

Dari campuran sampel dan sampel *buffer laemmli* yang di dapat tadi dimasukkan pada tiap kolom sisir sebanyak 10 μ L/ kolom.

Setelah semua sampel, *loading* kontrol dan protein *marker* sudah dimasukkan ke masing-masing kolom, maka arus listriknya dinyalakan 200 V, selama 60 menit.

Membran + sel + RANKL + sampel	Membran + sel + RANKL	Membran + sel	Medium + sel + RANKL + sampel	Medium + sel + RANKL	Medium + sel	Protein Marker	Medium + sel	Medium + sel + RANKL	Medium + sel + RANKL + sampel	Membran + sel + RANKL	Membran + sel + RANKL + sampel
Inkubasi 48 jam		Inkubasi 24 jam			Inkubasi 24 jam			Inkubasi 48 jam			
SEPARATION GEL											

Gambar.3.2. Posisi *loading* sampel pada penelitian.

Arus dihentikan bila migrasi protein sudah mencapai dasar gel. Pada tahap ini protein bisa dengan mudah terlepas dari gel sehingga harus segera dilakukan transfer. SDS-PAGE dibuat sepasang, satu untuk ditransfer ke membran, sedangkan satunya lagi untuk diwarnai dengan *coomassie blue* sebagai salah satu cara untuk visualisasi protein. Larutan *coomassie blue* terdiri dari 0,25% *Coomassie brilliant Blue R-250* (BioRad) dalam 40% aquades, 10% asam asetat dan 50% metanol. Pewarnaan dilakukan dengan cara merendam gel dalam larutan *coomassie blue* sambil digoyang selama 4 jam. Setelah itu dilakukan *destaining* dengan menggunakan *Coomassie destaining solution R-250* (BioRad) sampai cairannya bening dan gel terlihat jelas.

3.5.8.5. *Western Blotting*

a. **Transfer**

Tahapan berikutnya adalah transfer gel ke membran. Prinsip dari transfer membran adalah protein yang telah diberi muatan listrik oleh SDS dapat diinduksi untuk bergerak keluar dari gel melalui medan listrik dan menempel di membran. Membran yang digunakan adalah nitroselulosa. Gel dikeluarkan dari mesin elektroforesis, kemudian diletakkan di atas kertas membran pada *sandwich transfer buffer*. Urutannya yaitu kertas serap – membran – gel – kertas serap. Kemudian menempatkan transfer *buffer* di antara elektroda positif dan negatif. Harus diperhatikan bahwa membran berada di dekat elektroda positif dan gel di dekat elektroda negatif. Kemudian menyalakan arus dengan tegangan 350 mA V selama 60 menit.

b. **Visualisasi protein membran dengan *Ponceau Red*.**

Untuk memeriksa keberhasilan transfer, membran dicuci pada PBST selama 5 menit. Kemudian direndam dengan larutan *Ponceau red* selama 5 menit sambil digoyang. Setelah itu dicuci dengan larutan asam asetat 2 kali atau sampai larutan asam asetat jernih. Transfer dianggap berhasil bila pita protein dapat terlihat dengan jelas. Selanjutnya sisa pewarna *Ponceau red* dibersihkan dengan menggunakan PBST sampai warna merah hilang.

c. ***Blocking* membran**

Blocking membran berguna untuk mencegah latar non spesifik berikatan dengan antibodi primer atau sekunder. Ada dua larutan yang bisa digunakan untuk blocking membran ini yaitu susu non fat atau BSA (*Bovine Serum Albumin*). Pada penelitian ini kami menggunakan 5 mL BSA 5 % dalam PBST selama 60 menit. Caranya setelah membran diwarnai dengan *Ponceau Red* Sigma-Aldrich membran di *destainning* dengan dicuci PBST 5 menit, kemudian direndam dalam 5 mL BSA 5 % dalam PBST selama 60 menit.

d. Inkubasi dengan antibodi primer/pertama

Setelah 1 jam, dimasukkan antibodi pertama. Antibodi dilarutkan dengan 5 % BSA/PBST (*Phosphat Buffer Saline Tween 20*) dengan perbandingan 1: 1000 (5 μ L antibodi : 5 mL 5% BSA/PBST). Harus diperhatikan antibodi yang digunakan berasal dari tikus atau yang lain dan nantinya disesuaikan dengan antibodi kedua. Inkubasi antibodi pertama dilakukan selama 2 jam sambil digoyang/*dishaker*.

e. Inkubasi dengan antibodi sekunder/kedua

Setelah diinkubasi dengan antibodi pertama, membran di cuci dengan PBST sebanyak 3 kali selama 5, 15 dan 5 menit. Kemudian membran diinkubasi dengan antibodi ke dua. Pada 5 mL 5 % *skim milk* (1 gr *skim milk* Tropicana dilarutkan dalam 20 ml PBST) masukkan antibodi ke 2 sejumlah 0,5 μ L (HRP dari spesies yang sama dengan antibodi pertama) diinkubasi selama 45 menit. Setelah itu dicuci dengan PBST 3 kali yaitu 5, 5 dan 5 menit. Membran siap di deteksi dengan DAB

f. Kit Deteksi

Di sini digunakan DAB (*diaminobenzidine*). Membran yang sudah di cuci PBST setelah diinkubasi dengan antibodi kedua direndam ke dalam larutan DAB *Substrat Kit* abcam (yang harus disimpan dalam botol gelap), kemudian diinkubasi selama 10 menit. Setelah itu membran dikeluarkan dan dilihat *band* protein.

3.6. Analisa data

Data hasil pemeriksaan fitokimia diolah secara manual, sedangkan data kuantitatif hasil dari pemeriksaan uji MTT dan osteoklastogenesis diolah secara statistik dengan menggunakan metode *one way* ANOVA SPSS 17.0 dengan taraf kepercayaan 95% ($p < 0.005$) (Dahlan, 2011).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak dibuat dari 2 kg kacang panjang segar. Maserasi dilakukan dengan menggunakan etanol diulang 3 kali, didapatkan maserat sebanyak 7.000 mL. Setelah itu pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan ekstrak etanol kental 59,9128 g. Ekstrak etanol kental yang didapat dihitung rendemen total sebanyak 2,996%. Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Efektifitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain, oleh jenis dan jumlah pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel bahan/simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Ekstrak kental yang didapat kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan dan siap dilakukan uji fitokimia, uji proliferasi dan uji osteoklastogenesis.

4.2. Karakteristik Ekstrak Spesifik

4.2.1. Identitas Ekstrak

Nama ekstrak	: Extractum unguiculata fructus (ekstrak buah kacang panjang).
Nama tanaman	: <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp.
Bagian Tanaman	: Buah.
Nama Indonesia tanaman	: Kacang panjang.

4.2.2. Deskripsi Organoleptik

Tabel 4.1. Data identifikasi organoleptik ekstrak etanol kacang panjang.

Nama ekstrak	Pemerian
Ekstrak etanol kacang panjang	Konsistensi kental, warna hijau kehitaman, berbau khas, rasa sepat.

Pada pemeriksaan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Dari pengamatan didapatkan hasil seperti Tabel 4.1 diatas. Penentuan organoleptik ini termasuk salah satu parameter spasifik yang ditentukan dengan menggunakan panca indera dan bertujuan untuk pengenalan awal secara sederhana dan subyektif (Badan POM RI, 2006).

4.3. Karakteristik Ekstrak Non-Spesifik

4.3.1. Kelarutan dalam Air dan Etanol

Tabel 4.2. Data kelarutan dalam air dan etanol ekstrak etanol kacang panjang.

Ekstrak kacang panjang	etanol	Kelarutan dalam air	Kelarutan dalam etanol
		Sukar larut	Mudah larut

Keterangan : sukar larut = larutan coklat jernih dengan banyak endapan, mudah larut = larutan hijau tanpa endapan.

Dari pemeriksaan kelarutan ekstrak dalam air didapatkan data bahwa ekstrak etanol kacang panjang sukar larut dalam air, sedangkan medium pertumbuhan *cell line* menggunakan bahan dasar air. Untuk membantu kelarutan ekstrak di dalam medium maka digunakan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dalam batasan yang masih aman untuk *cell line*. DMSO merupakan pelarut organik yang sangat polar dan sering digunakan sebagai pelarut pada zat-zat yang sukar larut,

untuk digunakan pada material biologi atau sebagai agen *cryoprotektif*. Konsentrasi DMSO dibawah 1% tidak mempengaruhi hasil (Santos, Coelho, Silva dan Saldanha, 2003).

4.3.2. Susut Pengeringan

Tabel 4.3. Data susut pengeringan ekstrak etanol kacang panjang.

Ekstrak	Bobot ekstrak (g)	Bobot sisa pengeringan (g)	Susut (%)	Susut kering rata-rata (%)
I	2,0044	0,3262	16,27	15,53
II	2,0366	0,3053	14,99	
II	2,0123	0,3084	15,32	

Keterangan : bobot sisa pengeringan I= 25,6219-25,2957; II =22,9042-22,5989; III =24,6214-24,313.

Dari pengukuran susut pengeringan diperoleh 15,53%. Nilai ini menyatakan jumlah maksimal senyawa yang mudah menguap atau hilang pada proses pengeringan. Nilai susut pengeringan dalam hal khusus identik dengan kadar air jika bahan tidak mengandung minyak atsiri dan sisa pelarut organik yang menguap. Susut pengeringan ditetapkan untuk menjaga kualitas ekstrak. Disamping untuk penentuan kadar air dalam ekstrak dapat juga untuk menentukan jumlah zat lain yang mudah menguap pada ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000). Kadar air dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10%. Hal ini bertujuan untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur dalam ekstrak (Soetarno dan Soediro, 1997).

4.3.3. Penentuan Kadar abu

Pemeriksaan kadar abu menggunakan prinsip memanaskan bahan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tertinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuan penentuan kadar abu untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang

berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Tabel 4.4. Data kadar abu ekstrak etanol kacang panjang.

Bobot ekstrak (g)	Bobot abu (g)	Kadar abu (%)	Kadar abu rata-rata (%)
2,0203	0,109	5,4	5,4
2,0158	0,1125	5,6	
2,0018	0,1046	5,2	

Kadar abu ekstrak didapat sebesar 5,4 %. Hal ini menunjukkan bahwa sisa unsur mineral dan anorganik yang terdapat dalam ekstrak sebesar 5,4 %.

4.3.4. Kadar Abu tidak larut asam

Penentuan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal, disini ekstrak dipanaskan hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik saja. Kemudian ditentukan kadar abu dan kadar abu tidak larut asam (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Tabel 4.5. Data kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol kacang panjang.

Bobot ekstrak (g)	Bobot abu (g)	Kadar abu tidak larut asam (%)	Kadar abu tidak larut asam rata-rata (%)
2,0203	0,0066	0,33	0,44
2,0158	0,0048	0,24	
2,0018	0,0015	0,75	

Kadar abu yang tidak larut dalam asam sebesar 0,44%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar unsur anorganik yang tidak larut dalam asam sebesar 0,44 %.

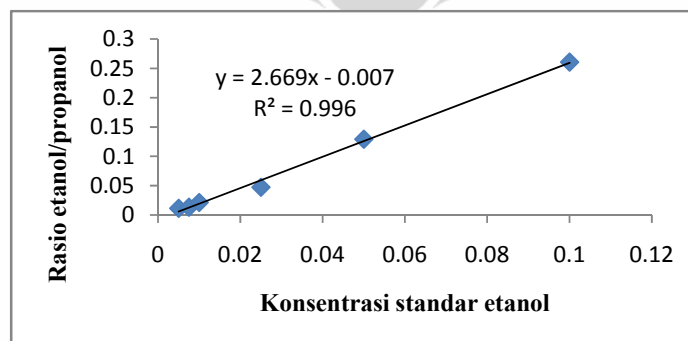
4.3.5. Pemeriksaan Kadar Sisa Pelarut

Salah satu hal yang penting dalam proses ekstraksi adalah pemisahan pelarut dari ekstrak. Pemisahan biasa dilakukan dengan pemanasan dibawah 60°C . Karena jika pemanasan berlebihan, dikhawatirkan ada komponen yang ikut menguap atau rusak, dan jika penguapan dilakukan terlalu hati-hati dikhawatirkan pelarut yang tersisa dalam ekstrak masih banyak. Karena itu penguapan pelarut dilakukan dalam kondisi vakum dengan suhu dibawah titik didih pelarut pada penelitian ini ekstrak diuapkan dengan suhu 40°C , sementara titik didih etanol adalah $78,4^{\circ}\text{C}$, pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol.

Tabel 4.6. Kadar sisa pelarut ekstrak etanol kacang panjang.

Ulangan		Waktu retensi	Area	Rasio etanol/propranolol (y)	Rerata y	Konsentrasi (%)
1	Etanol	1,567	73,134	0,016	0,0163	0,0087299
	Propranolol	2,837	4716,897			
2	Etanol	1,530	71,357	0,017		
	Propranolol	2,780	4160,748			

Keterangan : rasio 1 = $73,134/4716,897$; rasio 2 = $71,357/4160,748$; rerata rasio = 0,0163; konsentrasi : $x = (0,0163 + 0,007)/2,669 = 0,0087299$ (Lampiran 4).



Keterangan : y = rasio etanol/propranolol, x = konsentrasi standar etanol.

Gambar 4.1. Kurva kalibrasi standar etanol.

Kadar sisa pelarut dalam ekstrak etanol kacang panjang yang dihasilkan sebesar 0,0087299%. Menurut Apriyantono (2001), pelarut masih boleh digunakan tapi harus dihilangkan dengan sisa residu $\pm 0,1\%$ dan dengan pertimbangan yaitu tidak bersifat memabukkan dengan kandungan maksimal 1% (untuk bahan pangan). Sehingga sisa pelarut dalam ekstrak etanol kacang panjang dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat standar mutu kandungan sisa pelarut dalam bahan pangan yaitu 0,0087299 %.

4.4. Identitas Kandungan Kimia

4.4.1. Identifikasi Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, kemungkinan keberadaannya dalam daun dan buah kacang panjang dipengaruhi adanya proses fotosintesis sehingga daun dan buah muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988). Dalam tanaman flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tanaman dalam bentuk kombinasi glikosida (Harborne, 1987). Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam (Harborne, 1987), dan berupa senyawa yang polar, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut etanol dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon cenderung mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Tabel 4.7. Data identifikasi flavonoid ekstrak etanol kacang panjang.

Perbandingan	Perubahan warna	Hasil
Ekstrak etanol kacang panjang	Larutan amil alkohol berwarna merah jingga	Positif
Ekstrak etanol 50% kulit manggis	Larutan amil alkohol berwarna merah jingga	Positif

Keterangan : terbentuk larutan/endapan berwarna merah jingga.

Dari hasil identifikasi di atas ekstrak etanol kacang panjang menunjukkan positif adanya kandungan flavonoid. Hasil yang sama didapat oleh Meiyanto, Handayani dan Jenie (2008) dengan pelarut etanol 70%. Didapat hasil positif juga oleh Fitriyani, Wijayanti, Fitriyah, Dewi, Mayasari dan Meiyanto (2007) dengan pelarut etanol 96% dan Chang and Wong (2004) yang berhasil mengidentifikasi flavonoid pada biji *Vigna Sinensis* dengan LC-ESI/MS (*Liquid Chromatography - elektropray mass spectrometry*).

4.4.2. Identifikasi Steroid/Triterpenoid dengan KLT

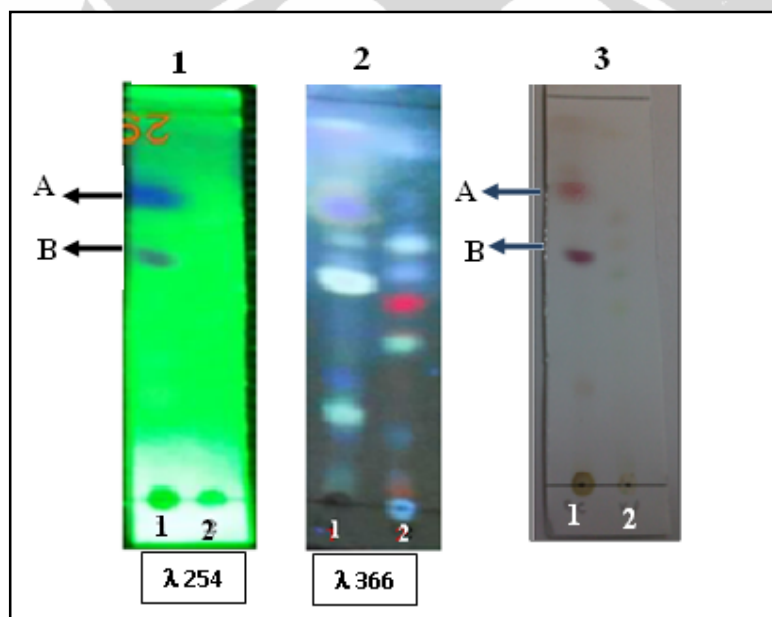
Triterpenoid merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik, yaitu skualena. Senyawa tersebut tidak berwarna, kristalin, memiliki titik lebur yang tinggi dan umumnya sulit dikarakterisasi karena secara kimia tidak reaktif (Harborne, 1987).

Steroid merupakan triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantren. Pada awalnya, steroid diduga merupakan senyawa yang hanya terdapat pada hewan (sebagai hormon seks dan asam empedu). Saat ini, senyawa tersebut telah ditemukan pada jaringan tumbuhan yang dikenal dengan fitosterol (Sirait, 2007).

Pemeriksaan kromatografi lapis tipis digunakan untuk pemisahan zat secara cepat. Pada penelitian ini digunakan lempeng KLT silica gel 60 F₂₅₄. Sebagai eluen digunakan heksan dan etil asetat dengan perbandingan 7 : 3.

Penggunaan eluen ini berdasarkan optimasi dari beberapa eluen dan berbagai konsentrasi sehingga didapatkan pemisahan yang baik pada kromatogram yang dihasilkan. Hasil KLT dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat 7 : 3 untuk ekstrak etanol kacang panjang tidak menampakkan bercak pada cahaya tampak dan pada cahaya UV dengan λ 254 nm, namun pada λ 366 nm bercak yang ada berfloresens menjadi beberapa warna.

Kemudian kromatogram ini disemprot dengan menggunakan pereaksi asam sulfat 10% dalam methanol dan dipanaskan dengan *hot plate* untuk mengidentifikasi adanya senyawa steroid/triterpenoid dan memberikan hasil negatif dibandingkan dengan ekstrak metanol bunga cengkeh hasilnya terdapat bercak berwarna ungu yang kemungkinan senyawa yang muncul adalah golongan terpenoid yang tidak berwarna pada pelat KLT sebelum disemprot dengan asam sulfat dan dipanaskan (Harborne, 1983, p 125).



Keterangan : Pemeriksaan (1) Ekstrak metanol bunga cengkeh dan (2) ekstrak etanol kacang panjang. A dan B bercak yang tampak pada ekstrak bunga cengkeh.

Gambar 4.2. Hasil KLT pada cahaya UV λ 254 nm, 366 nm dan setelah dilakukan penyemprotan dengan asam sulfat 10% dalam metanol dan dipanaskan dengan *hot plate* (3).

4.4.3. Identifikasi Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tanaman. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan, bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk buih karena sifat dasar saponin yang membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa ketika pengocokan (Harborne, 1987).

Tabel 4.8. Data identifikasi saponin ekstrak etanol kacang panjang.

Perbandingan	Buih yang terbentuk	Hasil
Ekstrak etanol kacang panjang	Buih < 1 cm, hilang dengan penambahan HCl 2N	Negatif
Ekstrak etanol 50% kulit manggis	Buih > 2 cm, tidak hilang dengan penambahan HCl 2N	Positif

Dari data di atas diperoleh informasi bahwa dalam ekstrak etanol kacang panjang tidak mengandung saponin.

4.4.4. Identifikasi Alkaloid

Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Sebagai basa, alkaloid biasanya diekstraksi dari tumbuhan dengan pelarut alkohol yang bersifat asam lemah (HCl 1 M atau asam asetat 10%), kemudian diendapkan dengan ammonia pekat (Harborne, 1983, p 239).

Tabel 4.9. Data identifikasi alkaloid ekstrak etanol kacang panjang.

Metode	Uji	Terbentuk endapan berwarna	Hasil
Bouchardat	I	Tidak ada endapan	Negatif
	II	Ada endapan berwarna coklat	Positif
Mayer	I	Tidak ada endapan	Negatif
	II	Tidak ada endapan	Negatif
Wagner	I	Tidak ada endapan	Negatif
	II	Ada endapan berwarna merah	Positif
Dragendorf	I	Tidak ada endapan	Negatif
	II	Ada endapan berwarna merah	Positif

Keterangan : Uji (I) ekstrak etanol kacang panjang, uji (2) ekstrak metanol kulit batang kina. Pereaksi dragendorf mengandung bismutsubnitrat dan Kalium Iodida, Pereaksi Bouchardat mengandung Iodium dan Kalium Iodida, Pereaksi Mayer mengandung larutan raksa (II) klorida dan Kalium Iodida, Pereaksi Wagner mengandung Iodium dan Kalium Iodida (Departemen Kesehatan RI, 1979).

Pada identifikasi dengan Bouchardat, Mayer, Wagner dan Dragendorf tidak terdeteksi adanya alkaloid. Hasil uji dinyatakan positif bila dengan pereaksi dragendorf terbentuk endapan merah hingga jingga, endapan putih dengan pereaksi Mayer, endapan merah dengan pereaksi Wagner dan endapan coklat dengan pereaksi Bouchardat. Hasil dibandingkan dengan uji terhadap ekstrak metanol kulit batang kina.

4.4.5. Analisa Isoflavon

Analisa isoflavon dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) karena sifat isoflavon yang tidak mudah menguap (Harborne, 1992) dan tidak stabil secara termal (Fleury et al, 1992 dalam Huang et al,1992). KCKT adalah alat yang sangat bermanfaat dalam analisis. Kerja KCKT pada prinsipnya adalah pemisahan setiap komponen dalam sampel (analit-analit) berdasarkan kepolarannya, untuk selanjutnya diidentifikasi (kualitatif) dan dihitung berapa konsentrasi dari masing-masing komponen tersebut (kuantitatif). Alatnya terdiri dari kolom (sebagai fase diam) dan larutan

tertentu sebagai fase gerak. Yang membedakan KCKT dengan kromatografi lainnya adalah pada KCKT digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak. Fase diam yang digunakan (pada kolom) LiChrospher 60 RP-Select B, 5 μm , 250x4 mm. Sementara fase gerak berupa larutan yang diatur komposisinya (gradien elusi), yaitu air yang mengandung 0,05% asam fosfat dan asetonitril hal ini bergantung pada kepolaran analit yang akan dipisahkan. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya dan waktu retensinya akan berbeda, hal ini akan teramati pada spektrum yang puncak-puncaknya terpisah. Waktu retensi yaitu waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak yang maksimum dari senyawa sampel. Senyawa-senyawa yang berbeda memiliki waktu retensi yang berbeda. Untuk beberapa senyawa, waktu retensi akan sangat bervariasi dan bergantung pada : tekanan yang digunakan (karena itu akan berpengaruh pada laju alir dari pelarut), kondisi dari fase diam (tidak hanya terbuat dari material apa, tetapi juga pada ukuran partikel), komposisi yang tepat dari pelarut dan temperatur pada kolom (Harmita, 2006).

Isoflavon terdiri atas 4 bentuk, yaitu aglikon, glikosida, malonil glikosida dan asetil glikosida, yang masing-masing bentuk tersebut memiliki 3 jenis isomer. Di sini hanya akan dibahas 2 yaitu : bentuk aglikon terdiri atas genistein, daidzein dan glisitein, sedangkan bentuk glikosida terdiri atas genistin, daidzin dan glisitin

Hasilnya :

- a. Berat sampel ekstrak kacang panjang (S_w) = 0,0506 g.
- b. Menggunakan standar daidzin, glisitin, genistin, daidzein, glisitein, genistein dan standar internal apigenin (Lampiran 6).
- c. Analisis kuantitatif dengan membandingkan masing-masing puncak yang muncul pada kromatogram dengan puncak senyawa standar.

Tabel 4.10. Data identifikasi isoflavon ekstrak etanol kacang panjang berdasarkan rasio luas area.

Nama sampel	Parameter	Jenis senyawa	Hasil (mg/100 g)
Ekstrak etanol kacang panjang	Kadar Isoflavon	Daidzin	43,6
		Glicitin	41,4
		Genistin	24,2
		Daidzein	2,94
		Glicitein	0,82
		Genistein	0,44

Keterangan : analisis KCKT dengan fase gerak air yang mengandung 0,05% asam fosfat dan asetonitril, fase diam yang digunakan (pada kolom) LiChrospher 60 RP-Select B, 5 μ m, 250x4 mm, dengan laju alir 0,8 mL/menit.

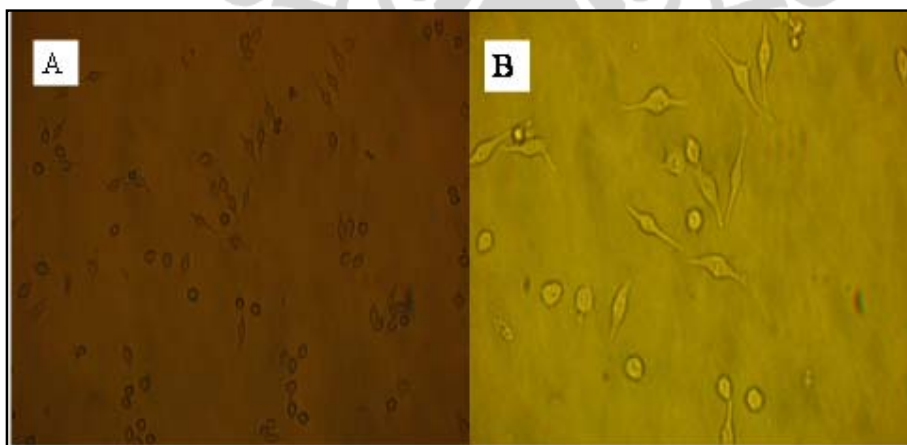
Dari data di atas terlihat bentuk glikosida (terikat) lebih tinggi dibanding bentuk aglikon (bebas), karena ekstraksi kacang panjang dilakukan secara maserasi dengan etanol tidak dihidrolisa. Sedangkan untuk mendapatkan isoflavon aglikon ekstrak harus dihidrolisa. Hasil ini sesuai bahwa jumlah terbesar isoflavon berada dalam bentuk glikosidanya dan lebih kecil yang berada dalam bentuk aglikon (bebas). Isoflavon dalam bentuk bebas bersifat kurang polar, sehingga cenderung lebih mudah larut dalam pelarut organik. Isoflavon dalam bentuk terikat bersifat lebih polar, sehingga mudah larut dalam air dan kurang reaktif. Sehingga untuk mendapatkan dalam bentuk aglikon harus dilakukan reaksi hidrolisa yang salah satunya oleh enzim hidrolitik bakteri di lumen usus. Sehingga untuk lebih mengetahui efektifitas isoflavon aglikon (bebas) perlu dilakukan penelitian *in vivo*.

4.5. *Thawing* dan Pengkulturan Sel

Setelah dilakukan *thawing* sel, maka dilakukan pengamatan pertumbuhan sel. Pada hari pertama banyak sel yang tidak menempel di dasar *T Flask* dan kemudian dilakukan penggantian medium dengan medium baru (belum digunakan

PBS karena dikhawatirkan sel yang belum terlalu menempel akan ikut terbang). Selanjutnya dimasukkan kembali ke inkubator dan diamati pertumbuhannya setiap hari. Pada hari ke -3 pertumbuhan sel sudah mencapai 10% dari luas permukaan *T Flask* kecil (25 cm²) dan tidak dilakukan penggantian medium, dan hari ke-5 pertumbuhan sel sudah mencapai 50% dan sel tumbuh bergerombol dan bertumpuk. Pada saat itu dilakukan sub kultur yang pertama, sel dipindahkan ke medium dalam *T Flask* besar.

Hari ke -2 setelah subkultur, pertumbuhan sel pada *T Flask* besar lebih baik dan sel tumbuh mencapai 50% dari luas permukaan *T Flask* dan tidak menumpuk. Pada hari ke-5 setelah subkultur di *T Flask* besar pertumbuhan sel sudah mencapai 70-80% luas permukaan *T Flask* besar dan sudah dapat dilakukan panen sel. Sebagian sel di subkultur ke satu buah petri dish berdiameter 10 cm, diisi 10 mL medium dengan konsentrasi 2×10^3 sel/mL, dan satu buah *T Flask* besar berdiameter 75 cm, berisi 15 mL medium dengan konsentrasi sel yang sama, dan sisanya dilakukan *cryo* pada 5 buah *cryotube*. Sebagai agen *cryoprotective* digunakan DMSO 10% dan *cryotube* disimpan pada suhu -20°C selama 4 jam kemudian dipindahkan -80°C untuk selanjutnya dipindahkan ke nitrogen cair.



Keterangan : gambar (A) dilihat dengan mikroskop dengan pembesaran 10 x, gambar (B) dilihat dengan mikroskop dengan pembesaran 40 x. Foto diambil dengan filter hijau.

Gambar 4.3. Morfologi sel RAW 264.

4.6. Uji MTT

Sebelum dilakukan pemeriksaan uji MTT, ekstrak terlebih dahulu dilarutkan dengan menggunakan DMSO karena dalam uji kelarutan yang dilakukan sebelumnya ekstrak etanol kacang panjang sukar larut dalam air.

Ekstrak etanol kacang panjang ditimbang sebanyak 14,5 mg dan dilarutkan dengan 290 μ L DMSO (10 mg ekstrak diperlukan DMSO 200 μ L) untuk membuat larutan stok 50.000 ppm (Lampiran 12). Selanjutnya dilakukan pengenceran beberapa kali sampai didapatkan konsentrasi ekstrak 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 μ g/mL. Konsentrasi DMSO yang terdapat dalam larutan ekstrak juga dihitung untuk memperkirakan pengaruh DMSO terhadap hasil pemeriksaan.

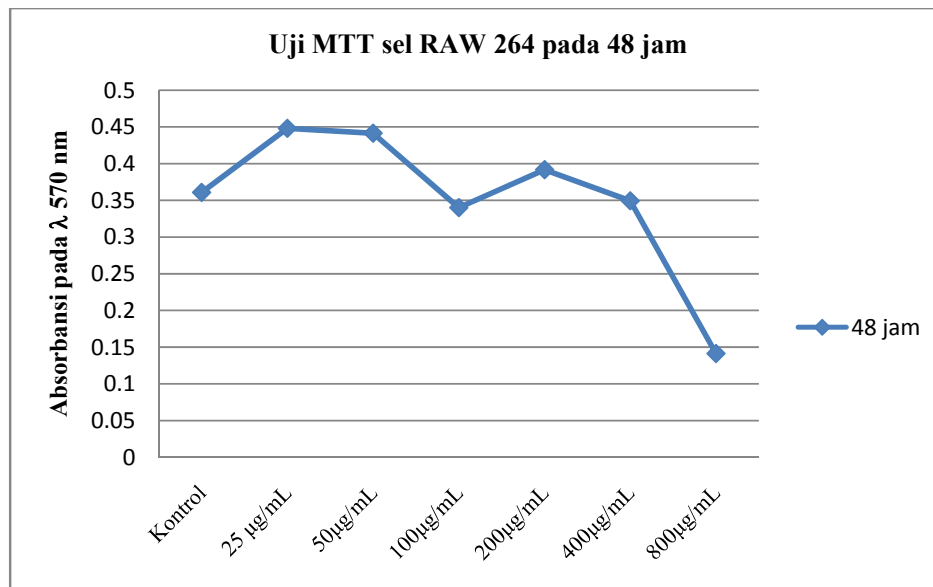
Pemeriksaan uji MTT dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol kacang panjang mempengaruhi proliferasi atau viabilitas sel RAW 264. Terhadap sel RAW 264 diberikan beberapa konsentrasi ekstrak etanol kacang panjang (kontrol negatif, 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 μ g/mL). Data MTT dibaca dengan ELISA reader pada λ 570 nm setelah 24 dan 48 jam.

Tabel 4.11. Absorbansi uji MTT 48 jam dibaca dengan ELISA reader dengan λ 570 nm (setelah dikurangi absorbansi media 0,22).

	Absorbansi 48 jam (rata-rata \pm SE)
Kontrol	0,3607 \pm 0,01596
Konsentrasi 25 μ g/mL	0,4480 \pm 0,00896
Konsentrasi 50 μ g/mL	0,4413 \pm 0,01634
Konsentrasi 100 μ g/mL	0,3400 \pm 0,01300
Konsentrasi 200 μ g/mL	0,3917 \pm 0,02074
Konsentrasi 400 μ g/mL	0,3493 \pm 0,01765
Konsentrasi 800 μ g/mL	0,1413 \pm 0,03503

Keterangan : kontrol adalah sel tanpa pemberian ekstrak etanol 96% kacang panjang. SE = *Standar Error*, dihitung dengan menggunakan SPSS statistik 17.0.

Apabila data diatas dibuat menjadi grafik maka akan terlihat pola absorbansi 24 dan 48 jam seperti di bawah ini.



Keterangan : Pada 48 jam sel yang mendapat ekstrak dengan konsentrasi 25, 50 dan 200 $\mu\text{g/mL}$ meningkatkan laju proliferasi dibanding kontrol. Konsentrasi 100 dan 400 $\mu\text{g/mL}$ memiliki laju proliferasi yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Sedangkan konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ menurunkan laju proliferasi dibanding kontrol. Pada 48 jam ini signifikan secara statistik ($p < 0.05$). Analisis statistik menggunakan program SPSS statistik 17.0

Gambar 4.4. Grafik absorbansi MTT *assay* RAW 264 pada 48 jam ekstrak etanol kacang panjang dibaca dengan ELISA *reader* dengan λ 570 nm (setelah dikurangi absorbansi media 0,22)

Uji MTT dapat mengukur kecepatan proliferasi sel. Apabila terjadi reaksi metabolik yang menyebabkan apoptosis atau nekrosis maka akan menurunkan viabilitas sel.

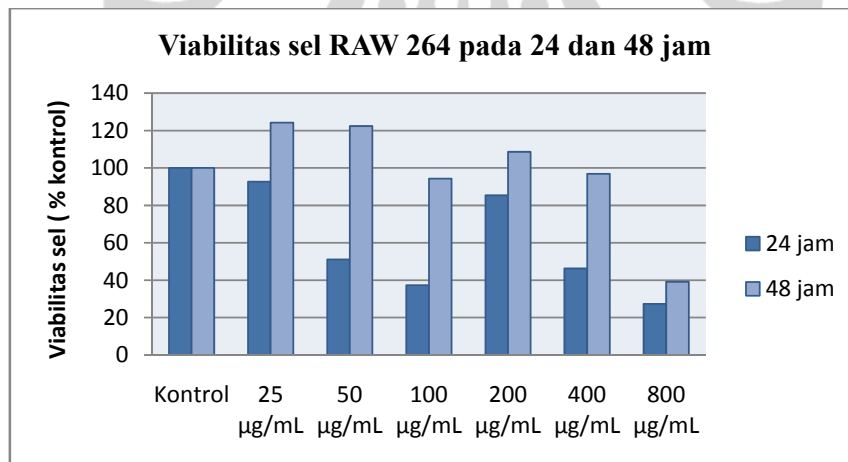
Dari data absorbansi yang didapat, dikonversikan dalam prosentase kehidupan (viabilitas sel) ke dalam rumus :

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

Tabel 4.12. Viabilitas sel RAW pada 24 dan 48 jam (kontrol dan dengan ekstrak etanol kacang panjang 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 µg/mL).

Perlakuan	Viabilitas RAW 264 pada 24 jam (%)	Viabilitas RAW 264 pada 48 jam (%)
Kontrol	100	100
Konsentrasi 25 µg/mL	92,7007	124,2029
Konsentrasi 50µg/mL	51,0949	122,3454
Konsentrasi 100µg/mL	37,3074	94,6116
Konsentrasi 200µg/mL	85,4015	108,5944
Konsentrasi 400µg/mL	46,2288	96,3948
Konsentrasi 800µg/mL	27,3317	39,17383

Tabel di atas apabila dipindahkan ke dalam bentuk grafik histogram, maka terlihat sebagai berikut.



Gambar 4.5. Viabilitas sel RAW 264 pada 24 dan 48 jam.

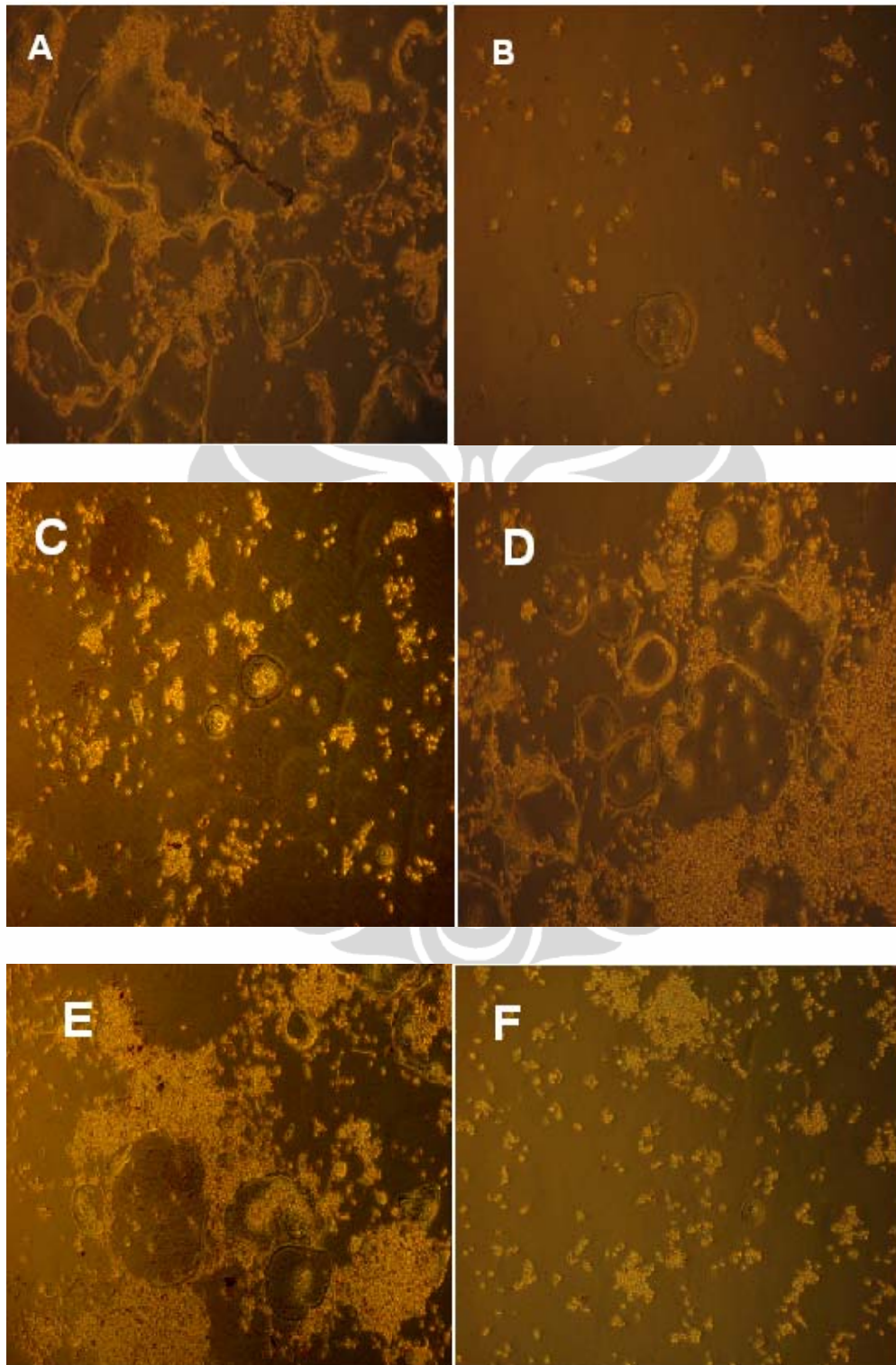
Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa pada 48 jam pemberian ekstrak etanol kacang panjang dengan konsentrasi 25, 50 dan 200 µg/mL tidak mengganggu proliferasi dari sel RAW 264, sedangkan konsentrasi 100 dan 400 µg/mL sedikit menurunkan proliferasi sel RAW 264 dibanding kontrol tetapi menurut statistik penurunannya tidak bermakna, namun pada konsentrasi 800

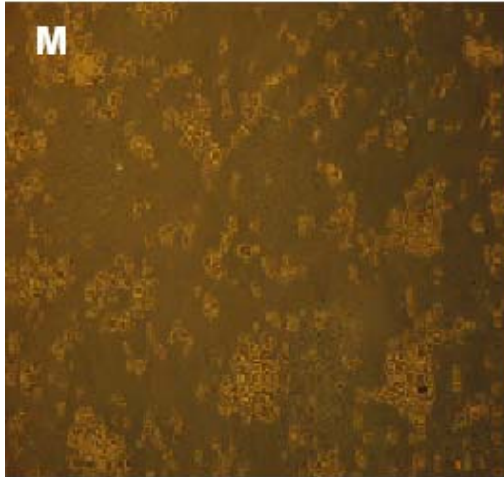
$\mu\text{g/mL}$ viabilitas sel sangat rendah yaitu 39,2% maka untuk pemeriksaan osteoklastogenesis konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ tidak digunakan lagi. Disamping itu diperoleh data pemberian ekstrak etanol kacang panjang pada kultur sel RAW 264 menunjukkan fenomena pertumbuhan yang tidak konsisten terhadap dosis. Pemberian ekstrak dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ memberikan efek proliferasi maksimal dan menurun pada konsentrasi 50 sampai 100 $\mu\text{g/mL}$, kemudian meningkat lagi pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ dan menurun lagi dengan penambahan konsentrasi. Hasil yang sama diperoleh Meiyanto, Handayani dan Jenie (2008, p.193) pada pemberian ekstrak etanol 70% kacang panjang terhadap proliferasi sel MCF-7, juga oleh Fitriyani, Wijayanti, Fitriyah, Dewi, Mayasari dan Meiyanto (2007, p. 46) pada pemberian ekstrak etanol kacang panjang terhadap proliferasi sel T47D. Hasil tersebut menunjukkan adanya dosis optimum dari ekstrak etanol kacang panjang untuk memberikan efek proliferasi yang maksimum terletak pada dosis yang kecil dan hal ini merupakan potensi yang besar yang dimiliki buah kacang panjang.

4.7. Pemeriksaan Osteoklastogenesis

Untuk pemeriksaan osteoklastogenesis sel RAW 264 ditanam pada *plat 48 well* dengan konsentrasi 5×10^4 /mL. Pada masing-masing *well* dimasukkan campuran medium berisi sel dan ekstrak etanol dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 $\mu\text{g/mL}$, kontrol medium (sel + medium) dan kontrol negatif (sel + medium + RANKL). Keesokan harinya medium diganti dan ditambah RANKL dengan konsentrasi 1 $\mu\text{L/mL}$ medium kemudian diinkubasi 72 jam. Setelah 72 jam medium diganti dan diinkubasi sampai 96 jam. Pengamatan dilakukan setelah 96 jam setelah dilakukan pewarnaan TRAP.

Osteoklas dihitung sebagai sel yang positif TRAP dengan inti sama atau lebih dari 3. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x di 5 lapangan pandang berbeda setiap *well*-nya, dimana satu perlakuan dibuat dengan triplikasi. Jumlah osteoklas yang didapat kemudian diolah secara statistik dengan menggunakan SPSS 17.0 untuk mencari apakah ada perbedaan bermakna osteoklas yang terbentuk dari masing-masing perlakuan dibandingkan kontrol.





Keterangan : M. medium + sel, A. kontrol negatif (sel + medium + RANKL), B. konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$, C. konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$, D. konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, E. konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ dan F. konsentarsi 400 $\mu\text{g/mL}$.

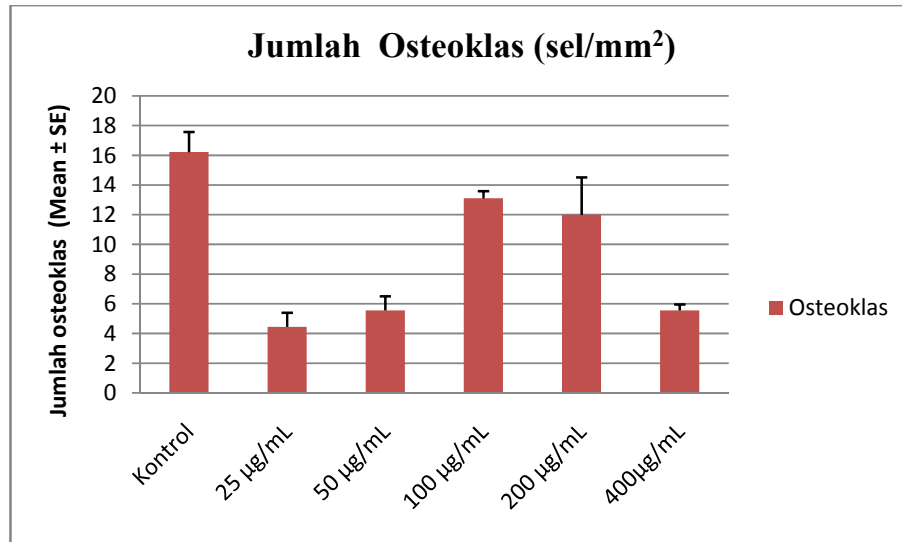
Gambar 4.6. Foto sel osteoklas pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol kacang panjang dibanding kontrol dan medium.

Tabel 4.13. Jumlah sel osteoklas dengan inti lebih atau sama dengan 3.

	Jumlah rata-rata osteoklas (mean \pm SE)
Kontrol	16,2233 \pm 1,353
Konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$	4,45 \pm 0,95
Konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$	5,56 \pm 0,95
Konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$	13,11 \pm 0,48
Konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$	12 \pm 2,52
Konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$	5,56 \pm 0,403

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

Data kemudian diolah dengan menggunakan SPSS statistik 17.0. Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas maka data diolah dengan *one-way* ANOVA untuk melihat signifikansi perbedaan antara perlakuan dengan kontrol.

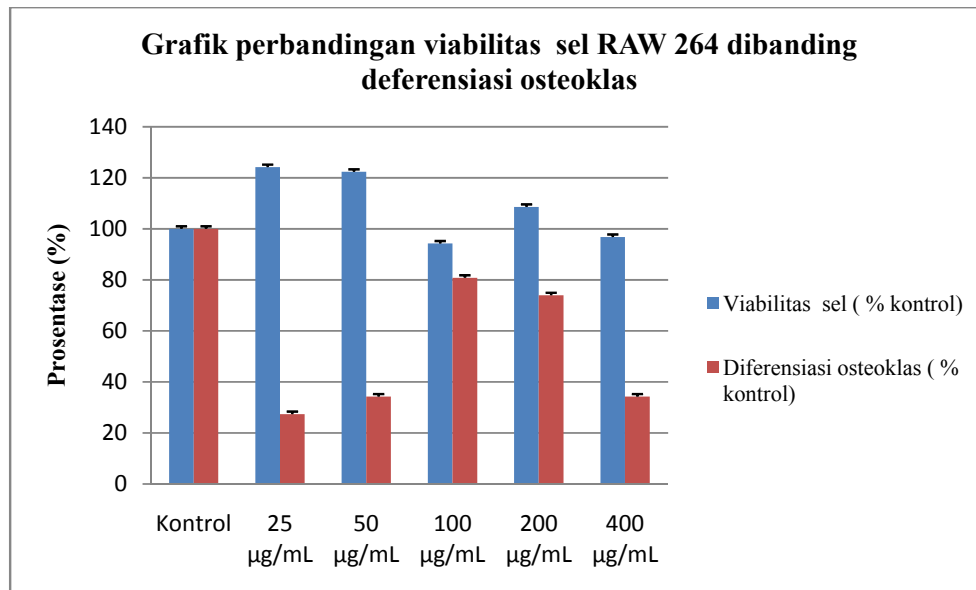


Keterangan : jumlah sel osteoklas yang dihitung adalah positif dengan pewarnaan TRAP dengan inti sama atau lebih dari 3.

Gambar 4.7. Grafik jumlah osteoklas pada masing-masing perlakuan (kontrol dan sel yang mendapat RANKL dan ekstrak dengan berbagai konsentrasi). Data disajikan dalam mean \pm SE.

Dari data di atas didapatkan bahwa jumlah rata-rata sel osteoklas yang berdiferensiasi dari sel RAW 264 yang diinduksi RANKL dan diberi perlakuan ekstrak etanol kacang panjang pada konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut 4; 5; 13; 12 dan 5 sel/ mm^2 dan pada kontrol 16 sel/ mm^2 , menunjukkan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ maksimal menghambat osteoklastogenesis secara signifikan ($p < 0.05$).

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.



Keterangan : Konsentrasi ekstrak 25 µg/mL tidak menghambat proliferasi, bahkan lebih tinggi dibanding kontrol (124,2029 %) tetapi maksimal menghambat osteoklastogenesis dibanding kontrol dan bermakna secara statistik ($p < 0,05$, SPSS 17.0).

Gambar 4.8. Gambaran viabilitas sel RAW 264 (dibanding kontrol) dengan diferensiasi osteoklas (dibanding kontrol) sesuai konsentrasi ekstrak kacang panjang.

Hasil yang didapat memberi gambaran bahwa ekstrak etanol kacang panjang mungkin dapat bermanfaat sebagai antiosteoklastogenesis dan efektif pada konsentrasi sangat kecil (25 µg/mL) dan mungkin mempunyai batas keamanan yang cukup lebar, namun hal ini harus dibuktikan lebih lanjut pada penelitian *in vivo*.

Apabila dibandingkan dengan penelitian terdahulu efek fitoestrogen ekstrak etanol kacang panjang, menunjukkan adanya fenomena efek yang tidak konsisten terhadap dosis pada percobaan *in vitro* menggunakan sel MCF-7 dan T47D. Hal ini menarik untuk dicermati. Dimana efek ini menyerupai efek genistein. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa pada kadar rendah, genistein menunjukkan efek estrogenik, sedang pada kadar tinggi menunjukkan efek antiestrogen, sehingga mampu menekan pertumbuhan sel epitel dan sel kanker payudara. Efek antagonis ini disebabkan karena genistein memiliki target aksi yang tidak tunggal. Pada kadar tinggi genistein tidak hanya berinteraksi

dengan reseptor estrogen saja melainkan juga menghambat kerja beberapa protein kinase yang berperan penting pada transduksi sinyal. Dengan mekanisme seperti ini maka genistein mampu menghambat sinyal pertumbuhan yang umumnya melalui protein kinase sehingga menyebabkan *cell cycle arrest* (Ji, Wills, Frank, Cornelius and Spurlock, 1999). Efek supresi genistein pada osteoklas tikus dapat berperan dalam induksi apoptosis yang dimediasi mekanisme Ca^{2+} signaling, inhibisi protein kinase dan aktivasi protein *tyrosine phosphatase* dalam sel (Yamaguchi, 2002). Blair, Jordan, Peterson, Barnes (1996), dengan osteoklas avian sebagai model, diberi genistein atau daidzein, menemukan inhibisi resorpsi tulang oleh genistein tetapi tidak oleh daidzein. Mungkin karena efek inhibisi genistein terhadap tyrosine kinase. Mekanisme tersebut kemungkinan juga memperantarai efek yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol kacang panjang pada sel RAW 264. Namun belum dapat dipastikan senyawa mana yang bekerja sebagai penghambat osteoklastogenesis dan apakah ekstrak etanol kacang panjang juga bekerja pada sel osteoblas. Selain itu perlu penelitian lebih lanjut terhadap fenomena penyebab meningkatnya diferensiasi osteoklas pada konsentrasi yang lebih tinggi. Demikian juga penelitian *in vivo* dibutuhkan untuk mengetahui konsentrasi yang tepat untuk kacang panjang dapat mencegah osteoporosis.

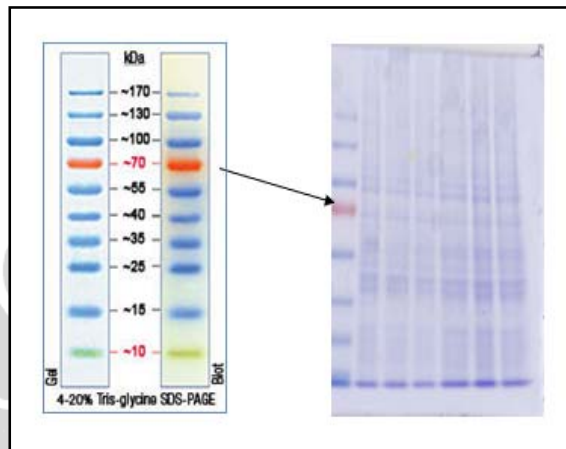
4.8. Hasil Western Blot

Pemeriksaan *Western Blot* telah dilakukan dengan cara seperti diterangkan pada bab sebelumnya (menurut protokol abcam), namun hasil yang didapat belum bisa dianalisis. Untuk mengulangi pemeriksaan kami kehabisan antibodi, sehingga pemeriksaan ini tidak dapat diulangi.

Gel SDS-PAGE dibuat dengan konsentrasi gel 8% karena berat molekul protein NFAT2 yang dicari adalah 125 kDa. Protein yang sudah dicampur dengan *loading buffer Laemmli* 6x dengan perbandingan sampel : *Loading buffer* 5 : 1 kemudian didenaturasi pada suhu 100°C dengan menggunakan gelas beker berisi air yang dipanaskan pada *hotplate*. *Loading* sampel dilakukan sebanyak 10 μ L/*well* dengan voltase 200 volt selama 60 menit.

Selanjutnya dilakukan transfer ke membran nitroselulosa dengan arus 350 mA selama 1 jam, selanjutnya diwarnai dengan pewarna ponceau red untuk melihat keberhasilan transfer.

4.8.1. SDS-Page dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue*

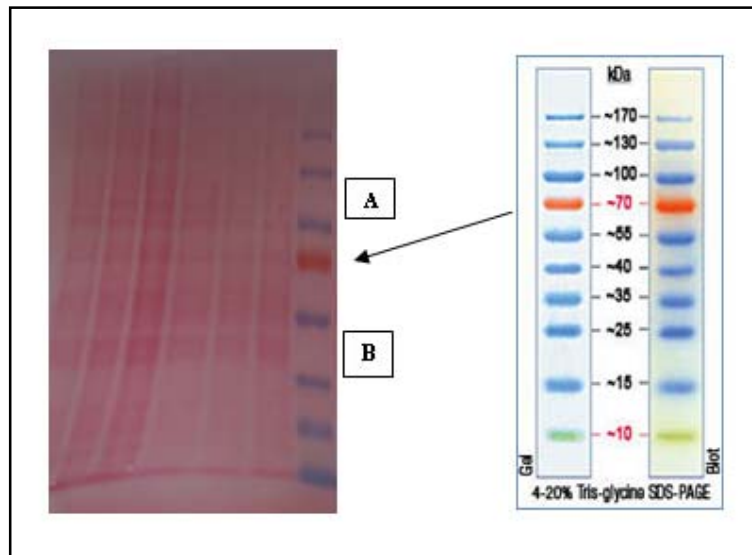


Keterangan : SDS-PAGE yang diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* untuk melihat keberhasilan *running* SDS-PAGE dengan melihat adanya pita protein yang muncul. *Loading* dan *running* terlihat baik dengan warna biru yang rata di dasar gel, juga terlihat sejumlah pita protein, namun pita protein yang terlihat sangat tipis.

Gambar 4.9. SDS-Page dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue*.

Dari gambar diatas dapat dilihat bahwa terdapat beberapa pita protein yang muncul pada gel, namun hanya berupa pita yang tipis. Pada daerah antara pita 100 dan 130 (tempat seharusnya ada pita NFAT2) tidak terlihat pita. Sedangkan pada daerah antara pita 40 dan 55 (tempat seharusnya pita β -actin, terlihat pita yang lebih jelas).

4.8.2. Hasil transfer dari gel ke membran yang diwarnai dengan *Ponceau red*.



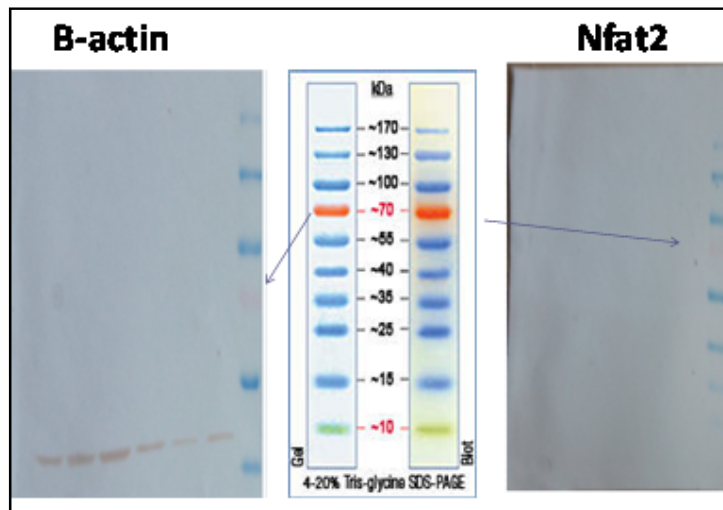
Keterangan : Membran nitroselulosa yang sudah selesai transfer dan diwarnai dengan larutan *Ponceau red*. Terlihat marker protein tertransfer sempurna dan beberapa pita protein, namun pita protein sangat tipis. (A) menunjukkan daerah yang seharusnya muncul pita NFAT2 terletak antara 100-130 kDa, daerah (B) seharusnya muncul pita β -actin terletak antara 40 dan 55. Marker protein yang digunakan (Fermentas).

Gambar 4.10. Membran yang diwarnai dengan *Ponceau red*.

Dari gambar diatas dapat dilihat bahwa terdapat beberapa pita protein pada membran, namun hanya berupa pita yang tipis. Pada daerah antara pita 100 dan 130 (tempat seharusnya ada pita NFAT2) tidak terlihat pita. Sedangkan pada daerah antara pita 40 dan 55 (tempat seharusnya pita β -actin, terlihat pita yang lebih jelas).

Tahap selanjutnya adalah *blocking* membran yang sudah 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.

4.8.3. Hasil *Western Blot* untuk Nfat2 dan β actin



Keterangan : Hasil *western blot* sebelah kiri adalah yang menggunakan antibodi β -actin dan sebelah kanan menggunakan antibodi Nfat 2. Pada gambar kiri terlihat pita β -actin yang berbeda ketebalannya antara inkubasi 24 jam dan 48 jam, sedangkan pada gambar kanan tidak terdapat pita/ bercak yang terdeteksi dengan DAB kit.

Gambar 4.11. Hasil *Western Blot* setelah dideteksi dengan DAB kit.

Hasil diatas belum bisa dianalisa dengan demikian kita tidak dapat mengetahui apakah ekstrak etanol kacang panjang mempengaruhi ekspresi protein NFAT 2 atau tidak. Untuk itu perlu dilakukan penelitian dimasa datang dengan memperhatikan kemungkinan penyebab *western blot* yang kami lakukan tidak memberikan hasil optimal.

Kemungkinan yang bisa diperbaiki adalah jumlah protein yang diloading mungkin harus ditingkatkan. Selain itu waktu inkubasi dengan antibodi pertama ditambah (hingga semalaman) untuk lebih memastikan antibodi berikatan dengan protein yang dituju.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

- a. Ekstrak etanol kacang panjang pada konsentrasi 25 dan 50 $\mu\text{g/mL}$ tidak menghambat proliferasi sel RAW 264 dan justru meningkatkan proliferasi sel RAW 264 setelah 48 jam, namun konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ menghambat proliferasi dengan signifikan.
- b. Ekstrak etanol kacang panjang pada konsentrasi 25 dan 50 $\mu\text{g/mL}$ menghambat osteoklastogenesis sel RAW 264 yang telah diinduksi RANKL secara signifikan.
- c. Pada penelitian ini dengan metode yang digunakan belum berhasil mendeteksi NFAT 2 bahkan pada kontrol positif.

5.2. SARAN

- a. Perlu dilakukan fraksinasi lebih lanjut untuk mengetahui kandungan kimia yang mempunyai efek antiosteoklastogenesis tetapi tidak mengganggu proliferasi.
- b. Perlu dilakukan penelitian *in vivo* untuk mengetahui efek perlindungan terhadap sel tulang dan dosis efektif serta keamanan ekstrak etanol kacang panjang.
- c. Digunakan cara deteksi yang lebih sensitif pada pemeriksaan *western blotting* contohnya dengan metode *X ray film*.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono, A. (2001). *Tinjauan kritis status kehalalan alkohol (etanol)*. Jurusan Tehnologi Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor.
www//Indohalal.com/artikel.php.23 Januari 2012, 10.00
- Arjmandi, B.H., et al. (2005). One year soy protein supplementation has positive effect on bone formation markers but not bone density in post menopausal woman. *Nutr J*, 4 (8), 1-9.
- Arts, et al. (1997). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoclast SV-HFO cells. *Endocrinol J*, 138 (11), 5067-5070.
- Aubin, J.E., Bonnelye, E., (2000). Osteoprotegerin and its ligand a new paradigm for regulation of osteogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int*, 11 (11), 905-13.
- Badan POM RI. (2006). *Monografi ekstrak tumbuhan obat Indonesia*, Volume 2. Jakarta : Badan POM Republik Indonesia.
- Belcher, S.M., and Zsarnovszky, A. (2001). Estrogenic action in the brain : estrogen, phytoestrogens and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp. Ther*, 299 (2), 408-414.
- Blair, H.C., Jordan, S.E., Peterson, T.G., Barnes, S. (1996). Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclast activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 61 (4), 629-37.
- Boyce, B.F., and Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1:S1.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., dan Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337- 342.
- Branca F. (2003). Dietary phytoestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc*, 62,877-887.
- Bustamam, N. (2008). Fitoestrogen dan kesehatan tulang. *Bina Widya*, 19 (3),146-150.
- Cell Bank Riken Bio Resource Center, Ibaraki-Japan
www.brc.riken.jp/lab/cell/.../contribution.shtm diunduh 5 Mei 2012 jam 16.22.
- Chiechi, L.M., and Micheli, L. (2005). Utility of dietary phytoestrogens in preventing postmenopausal osteoporosis. *Nutraceut Res*, 3 (1), 15-28.
- Dahlan, M.S. (2011). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Deskriptif, Bivariat dan Multivariat dilengkapi Aplikasi dengan menggunakan SPSS*, Edisi V, Jakarta : Penerbit Salemba.
- Dang, Z.C., and Lowik, C. (2005). Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrin Met*, 16 (5), 207-213.

- Doyle, A., and Griffiths, J.B. (2000). *Cell and tissue culture for medical research*. New York : John Willey and Sons.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Pedoman Pengendalian Osteoporosis*. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Nomor 1142/MENKES/SK/XII/2008.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI, 1989. *Materia Medika Indonesia* jilid V.
- Fitriasari, A., Wijayanti, N.K., Fitriyah, N.Q., Dewi, I.K., Mayasari, M.P., dan Meiyanto, E. (2007). Efek proliferasi ekstrak etanol kacang panjang pada sel T47D. *Pharmakon*, 8 (2), 44-50.
- Gruber, C.J., Tschugguel W, Schneeberger, C., Huber, J.C. (2002). Production and action of estrogen. *Eng J Med* 346, 340-352.
- Handri and Rafira (2003). *Mempercantik Diri dengan Buah dan Sayur*. Pikiran Rakyat Cyber Media, 22 Juni 2003.
- Hans Tandra. (2009). *Segala sesuatu yang harus anda ketahui tentang OSTEOPOROSIS*, Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokomia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (a.b: Kosasih Padmawinata), terbitan kedua, Bandung : Penerbit ITB.
- Harmita. (2006). *Buku ajar kromatografi*. Jakarta : Departemen Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia.
- Health Technology Assessment (HTA) Indonesia. (2005). *Penggunaan Bone Densitometry pada Osteoporosis*, pg 1-27.
- Huang, H., et al. (2006). Induction c-Fos and NFAT2 integrated pathway RANKL in differentiation osteoclast with p 38. *Biochem Bioph Res Co*, 351 (1), 99-105.
- Hutapea, J.R. (1994). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (III)*. Badan Peneliti dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Ilyas M. (2006). Perbandingan Morfologi Vertebra Lumbal dengan Metacarpal untuk Mendeteksi Dini Osteoporosis di RS DR. Wahidin Sudirohusodo Makassar. *Jurnal Medeka Nusantara*, 27 (4), Oktober- Desember 2006.
- Ji, S., Willis, G.M., Frank, G.R., Cornelius, S.G. and Spurlock, M.E. (1999). Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis. *J Nutr*, 129 (7), 1291-1297.
- Jones, D.H., Kong, Y.Y., Penninger, J.M. (2002). Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2, 1132-9.

- Kawiyana, I.K.S. (2009). Osteoporosis patogenesis diagnosis dan penanganan terkini. *J Peny Dalam*, 10 (2), 157-170.
- Kears, A.E., Khosla, S. Kostenuik, P.J. (2008). Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*, 29 (2), 155-92.
- Khosla, S. (2001). Minireview the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol*, 142 (12), 5050-5.
- Kumagai N., et al. (2004). Induction of mouse c-src in RAW 264 cells is dependent on AP-1 and NF-K β and important for progression to multinucleated cell formation. *Biochem Bioph Res Co*, 325 (3), 758-768.
- Lattanzio, V., Arpaia, S., Cardinali, A., Di Venere, D., and Linsalata, V. (2000). Role Endogenous Flavonoids In Resistance Mechanism Of Vigna To Aphids, *J. Agric. Food Chem*, 48 (11), 5316-5320.
- Lindsay, R., Cosman, F. (2005). *Osteoporosis*. In ; Kasper DL, Fauci AS, Longo DL eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine Vol 2* 16th edition. New York : Mc Graw Hill, page. 2268-2278.
- Liswati, H. (2007). *Kombinasi latihan fisik dan pemberian daun semanggi menghambat peningkatan ketidakseimbangan proses remodeling tulang perempuan pascamenopause melalui peran reseptor estrogen α sel*. Surabaya: Doktoral (Disertasi). Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Lydeking-Oslen, E, Jansen J., Setchel, K.D.R., Damhus M., Jensen, T.H. (2002). Isoflavon –rich soymilk prevents bone-loss in the lumbar spine of postmenopausal women, a 2 year study. *J Nutr*, 132, 5825.
- 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.
- Mayo Foundation for Medical Educational Research. November 16, 2011. www.mayoclinic.com.
- Meiyanto, E., Handayani, S., dan Jenie, R.I (2008). Ekstrak etanolik kacang panjang (*Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk) meningkatkan proliferasi sel epitel payudara. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19 (4), 191-197.
- Minimum Essential Medium Eagle. Mei 6, 2012. <http://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salt/mem-media.html>.
- Monroe, D.G., Sereto, F.J., Spelsberg, T.C. (2003). Overview of estrogen action in osteoblasts: Role of the ligand the receptor and the co-regulators. *J Muscul Neuron Interact* , 3 (4), 357-62.
- Nurrocmad, A., Leviana, F., Wulancarsari, C.G. , Lukitaningsih E. (2010). Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent BoneLoss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. *Int J Phyt*, 2, 363-372.

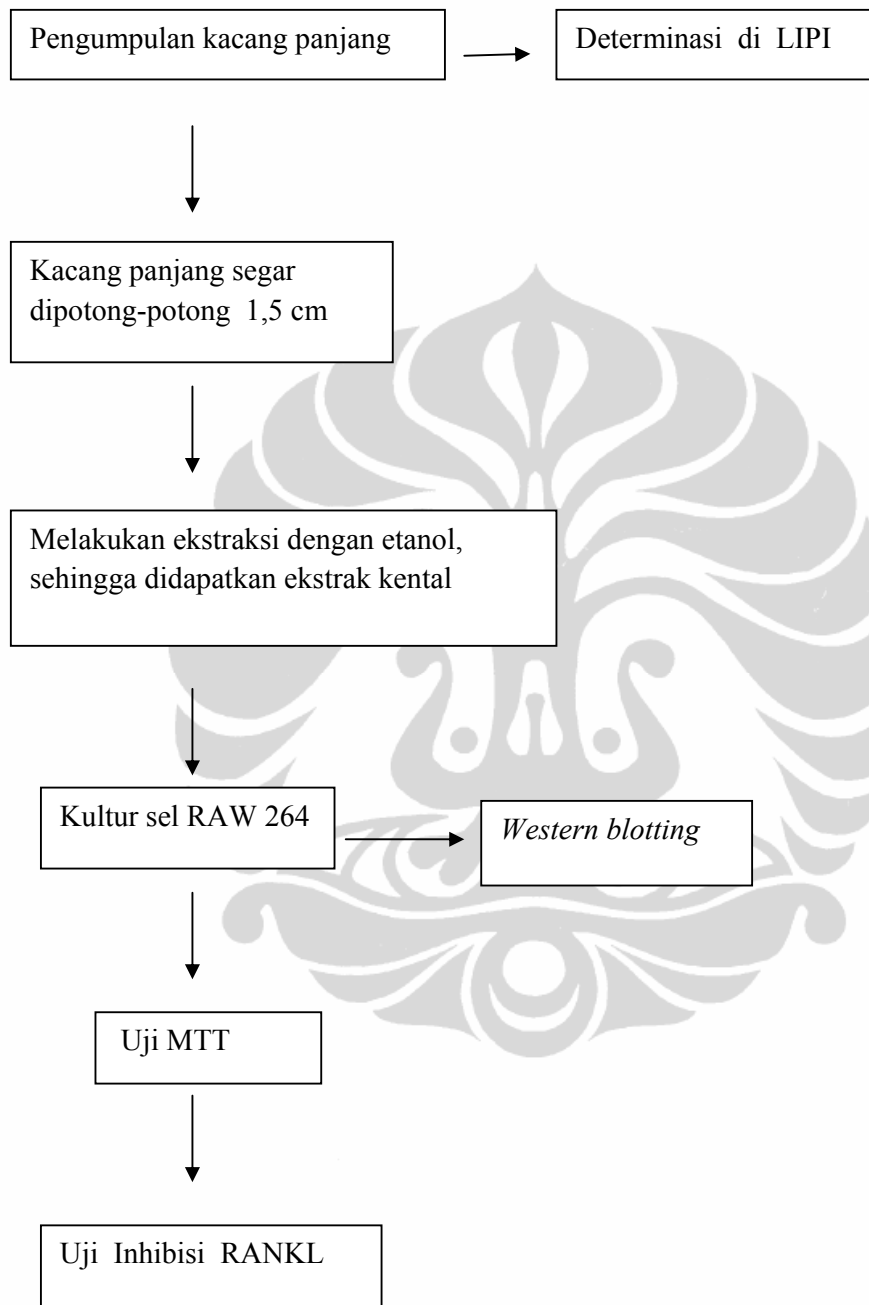
- Oursler, M.J. (2003). Direct and indirect effect of estrogen on osteoclast. *J Muscul Neuron Interact*, 394, 363-6.
- Pitojo, S. (2006). *Benih Kacang Panjang*, Jakarta : Penerbit Kanisius.
- Quaedackers, M.E. et al. (2001). 4-hydroxytamoxipen trans-represses nuclear factor-kb activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through Er β . *Endocrinol J*, 142-3.
- Roudsari, A.H., Tahbaz, F., Hossein-Nezhad, A., Arjmandi, B., Larijani, B., Kimiagar, S.M. (2005). Assessment of soy phytoestrogens effects on bone turnover indicator in menopausal women with osteopenia in Iran : a before and after clinical trial. *Nutr J*, 4 (30), 1-5.
- Santos, N.C., Coelho J.F., Silva JM, Saldanha C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide : Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*, 65, 1035-1041.
- Setchell K, Lydeking-Oslen E. (2003). Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 78 (3), 593S-609S.
- Setiyohadi, B. (2006). *Perkembangan terbaru dalam penatalaksanaan osteoporosis. Osteoporosis*. Edisi 1. Jakarta : Perhimpunan Osteoporosis Indonesia. CV Infomedika, pg.61-73.
- Sihombing, H.C. (2009). Karakteristik kasus menopause osteoporosis di Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FK UI Tahun 2006-2008. www.lontar.ui.ac.id.
- Sirait, M. (2007). *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung : Penerbit ITB.
- Soetarno, S dan Soediro IS. (1997). *Standardisasi mutu simplisia dan ekstrak bahan obat tradisional*. Presidium Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi.
- Takayanagi, H., et al. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 6, 889-901.
- Vigna unguiculata* (L) Walp. Integrated Taxonomy Information System Report. Juni 25, 2012. <http://www.itis.gov/index.html>.
- Western blotting – a beginner’s guide. abcam. Oktober 24, 2011. www.abcam.com/technical.
- Wong, Y.S., and Chang, Q. (2004). Identification Of Flavonoids In Hakmeitau Beans (*Vigna Sinensis*) By High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry (LC-ESI/MS). *J. Agric. Food Chem*, 52 (22), 6694 -6699.
- Wratsangka, R. (1999). Pemberian terapi sulih hormon sebagai upaya meningkatkan kesehatan wanita menopause. *J Kedokt Trisakti*, 18 (3), 155-162.

Yamaguchi, M. (2002). Isoflavone and bone metabolism : its cellular mechanism prevention role in bone loss. *J Health Sci*, 48 (3), 209-22



Lampiran 1. Determinasi *Vigna unguiculata* (L) Walp



Lampiran 2. Alur Penelitian

Lampiran 3. Pembuatan ekstrak etanol kacang panjang.



A



B



C



D



E



F



G



H

Keterangan : Kacang panjang segar dicuci bersih dan dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih sama 1,5 cm (A) diblender (B) diaduk dengan kecepatan 500 rpm selama 2 jam (C), dibiarkan selama 24 jam (D). Maserat dipisahkan dengan penyaringan dengan *vacuum pump* (E). Semua maserat dikumpulkan dan diukur volumenya (F), pemekatan ekstrak dengan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* (G) hingga diperoleh ekstrak kental dan ekstrak ditimbang (H).

Lampiran 4. Pemeriksaan sisa pelarut



A



B



C



D



E



F



G



H

Keterangan : (A). Sampel ditimbang 10,15 mg (ekstrak etanol kacang panjang) dalam eppendorf. (B) Ditambahkan air 1 mL, kemudian disonifikasi 10 menit, (C) disentrifus 10 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. (D). Supernatan diambil, dipindahkan ke dalam labu takar 5 ml. (E). Ditambahkan 1-propanol 25 mL. (F). Ditambah air sampai tanda batas. (G,H). Dihomogenkan dan dispuat 1 μ L, kemudian diinjeksikan ke Kromatografi Gas merk : Dani 1000 DPC no. 031203LHL3.

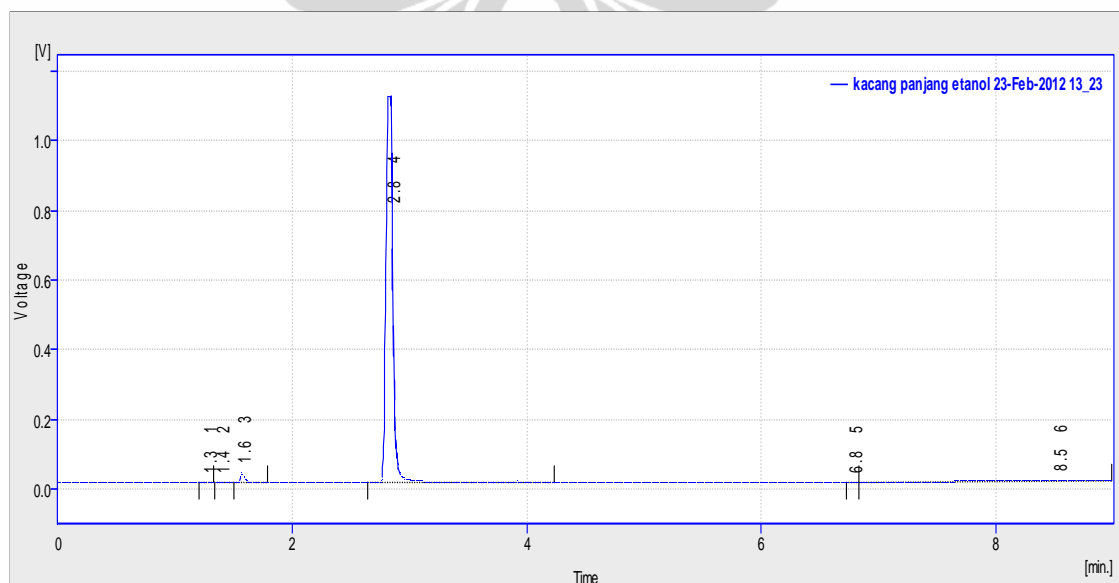
Hasil pemeriksaan sisa pelarut ekstrak etanol kacang panjang secara Kromatografi Gas.

Ekstrak etanol kacang panjang					
Ulangan	Waktu retensi	Area	Rasio	Rerata	Konsentrasi (%)
1	1,567	73,134	0,016	0,0163	0,0087299
	2,837	4716,897			
2	1,530	71,357	0,017		
	2,780	4160,748			

Tabel hasil kromatografi ulangan 1.

	Reten. Tim	Area [mV]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1.273	0.939	0.936	1.90E-02	0.1	0.02
2	1.38	1.796	0.341	3.70E-02	3.00E-02	0.13
3	1.567	73.134	29.301	1.5	2.6	0.04
4	2.837	4716.897	1112.078	96.8	97.2	0.06
5	6.78	1.305	0.508	2.70E-02	4.40E-02	0.04
6	8.533	78.252	1.521	1.6	0.1	0.39
	Total	4872.323	1144.685	100	100	

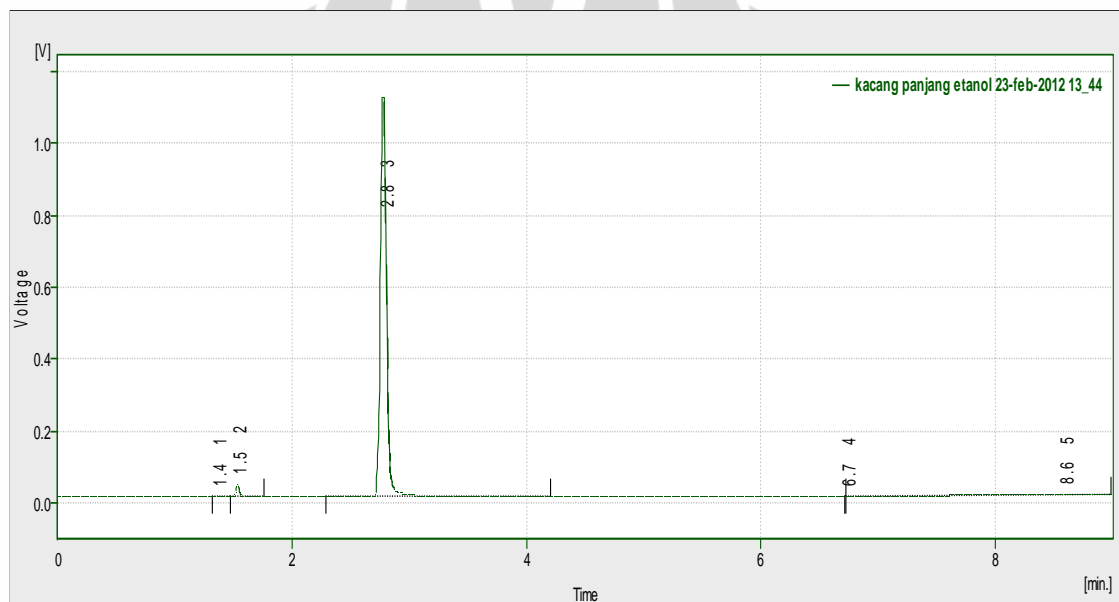
Gambar kromatogram ulangan 1.



Tabel hasil kromatografi ulangan 2.

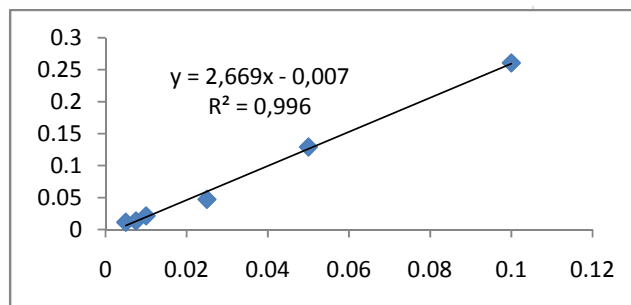
Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1.35	1.861	0.353	4.30E-02	3.10E-02
2	1.53	71.357	33.341	1.7	2.9
3	2.78	4160.748	1111.915	96.3	96.9
4	6.723	0.003	0.001	5.80E-05	1.20E-04
5	8.587	85.719	1.492	2	0.1
Total		4319.688	1147.102	100	100

Gambar kromatogram ulangan 2.

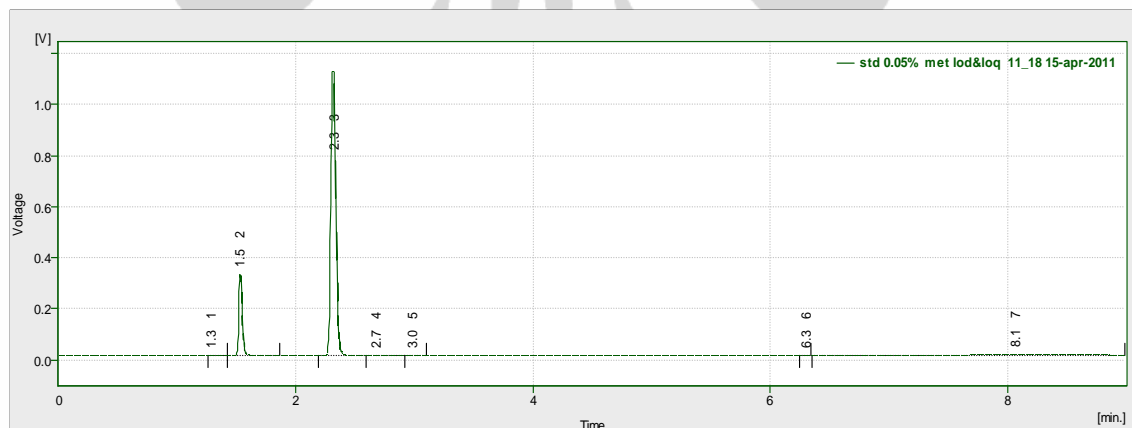


Kurva standar

Standar	
Konsentrasi (%) (x)	Rasio (y)
0,005	0,011388
0,0075	0,013333
0,01	0,021328
0,025	0,047205
0,05	0,129130
0,1	0,260610



Gambar kromatogram standar (1-propanol).



Tabel hasil kromatografi standar (1-propanol)..

Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1.287	2.462	1.414	0.1	0.03
2	1.53	623.526	319.915	14.7	0.03
3	2.32	3385.619	1115.598	79.6	0.05
4	2.68	9.915	1.089	0.2	0.15
5	2.983	1.801	0.435	4.20E-02	0.06
6	6.3	0.556	0.214	1.30E-02	0.05
7	8.07	229.582	5.05	5.4	0.54
Total		4253.46	1443.716	100	100

Lampiran 5. Pemeriksaan Fitokimia



A



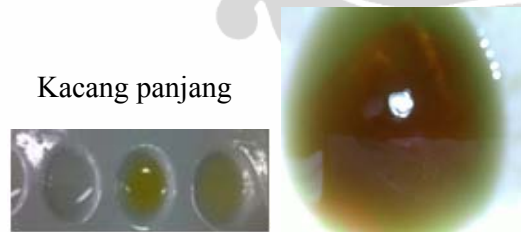
B



C.



D. 1



Kacang panjang

D. 2

Keterangan : A (1) larut dalam etanol, A (2) tidak larut dalam air. B (1) Identifikasi flavonoid ekstrak etanol kacang panjang, B (2) Ekstrak etanol 50% kulit manggis. C (1) Identifikasi saponin ekstrak etanol 50% kulit manggis, C (2) ekstrak etanol kacang panjang. D (1) Uji alkaloid Dragendorff, D (2) Uji Bouchardat.

Lampiran 6. Hasil Analisa Isoflavon dengan KCKT.

Hasil :

Berat sampel ekstrak kacang panjang (Sw) = 0,0506 gram

standar daidzin

C daidzein (mg/ml)	area daidzin	area apigenin	rasio luas area
0,044	194694	179385	1,0853
0,094	431004	199888	2,1562
0,143	591773	181564	3,2593
0,189	765658	177734	4,3079
0,237	954336	176022	5,4217

standar glisitin

C glisitin (mg/ml)	area glisitin	area apigenin	rasio luas area
0,011	64057	179385	0,3571
0,023	139730	199888	0,6990
0,035	180871	181564	0,9962
0,046	232633	177734	1,3089
0,058	287345	176022	1,6324

standar genistin

C genistin (mg/ml)	area genistin	area apigenin	rasio luas area
0,04	320204	179385	1,7850
0,09	691322	199888	3,4585
0,14	950143	181564	5,2331
0,19	1214602	177734	6,8338
0,24	1480200	176022	8,4092

standar daidzein

C daidzein (mg/ml)	area daidzein	area apigenin	rasio luas area
0,005	38097	179385	0,2124
0,010	84766	199888	0,4241
0,015	115317	181564	0,6351
0,020	148857	177734	0,8375
0,025	184136	176022	1,0461

standar glisitein

C glisitein (mg/ml)	area glisitein	area apigenin	rasio luas area
0,004	34284	179385	0,1911
0,009	75824	199888	0,3793
0,014	103574	181564	0,5705
0,019	134724	177734	0,7580
0,023	167028	176022	0,9489

standar genistein

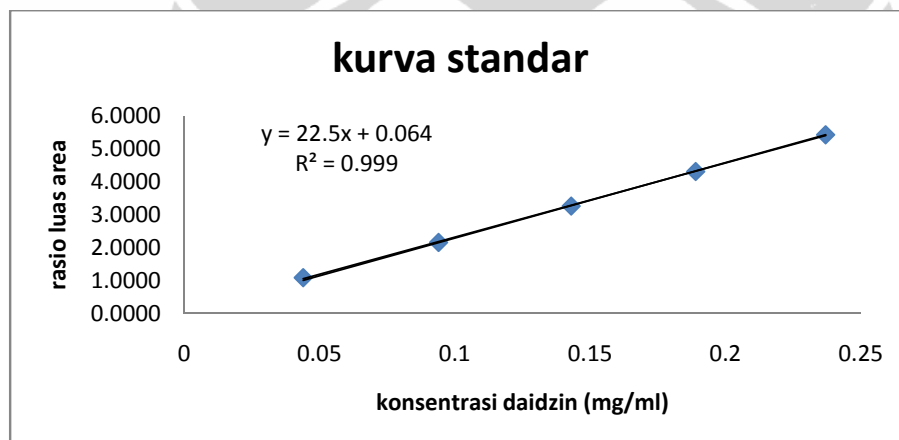
C genistein (mg/ml)	area genistein	area apigenin	rasio luas area
0,005	44967	179385	0,2507
0,010	102254	199888	0,5116
0,015	139489	181564	0,7683
0,020	181087	177734	1,0189
0,025	223427	176022	1,2693

sampel kacang panjang

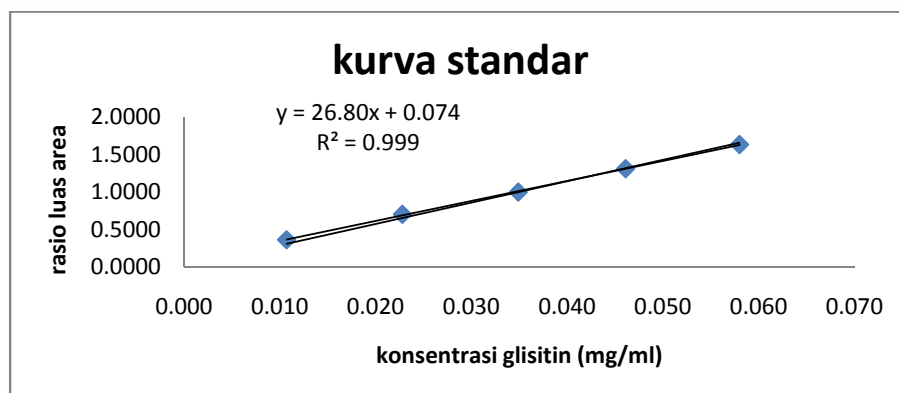
	Area sampel	Area apigenin	Rasio luas area
daidzin	62714	111068	0,56464508
glisitin	69931	111068	0,62962329
genistin	76781	111068	0,69129722
daidzein	7489	111068	0,06742716
glisitein	964	111068	0,00867937
genistein	1197	111068	0,01077718

1. Kurva standar

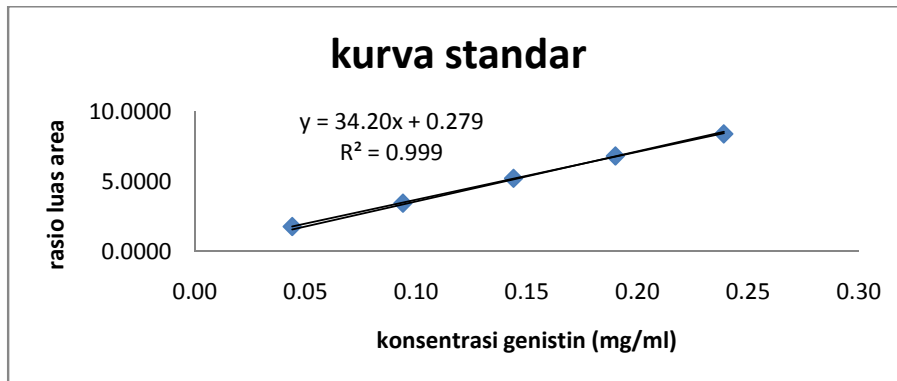
Kurva standar daidzin



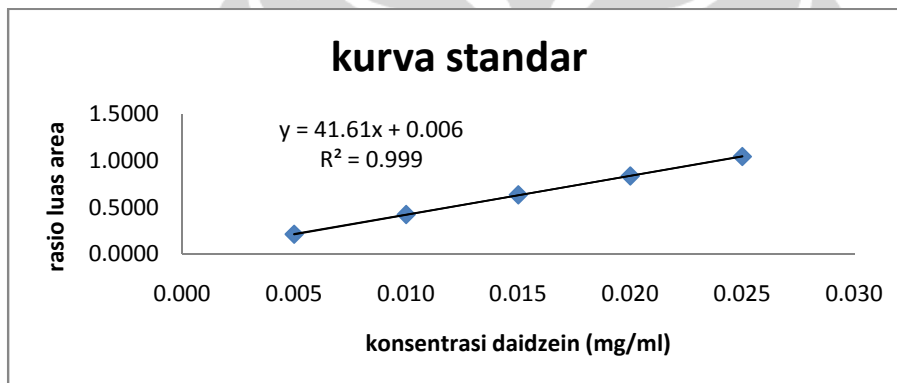
Kurva standar glisitin



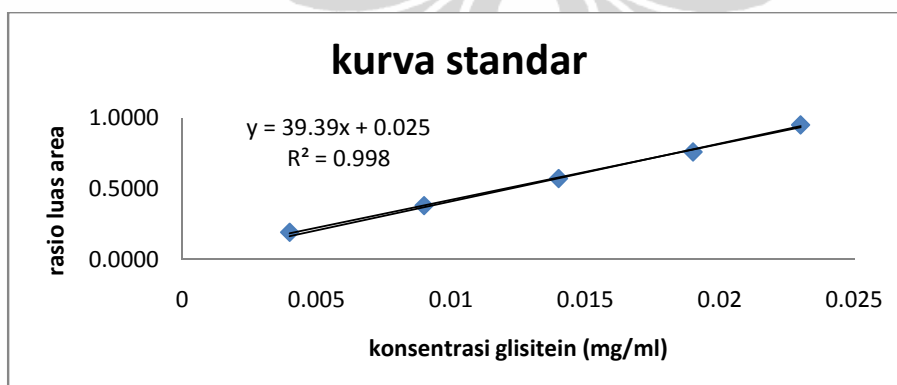
Kurva standar genistin



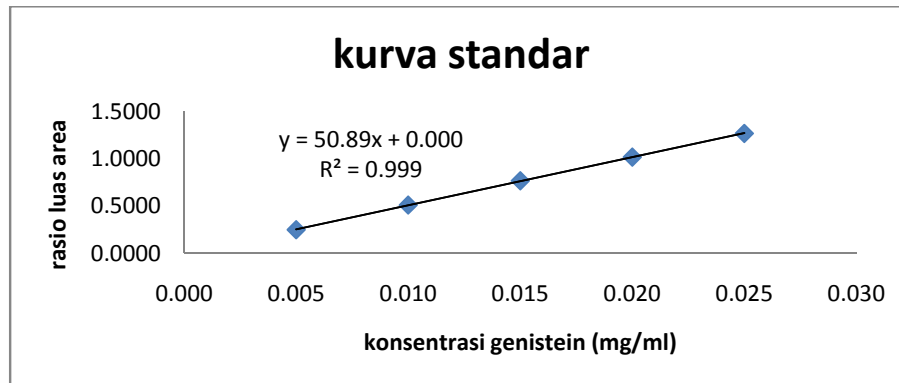
Kurva standar daidzein



Kurva standar glisitein



Kurva standar genistein



2. Perhitungan

Kons. (X)_{sebenarnya}, mg/g = kons. (X)_{analisis} mg/ml x 1 ml/berat sampel S(w)

Nilai a dan R² standar

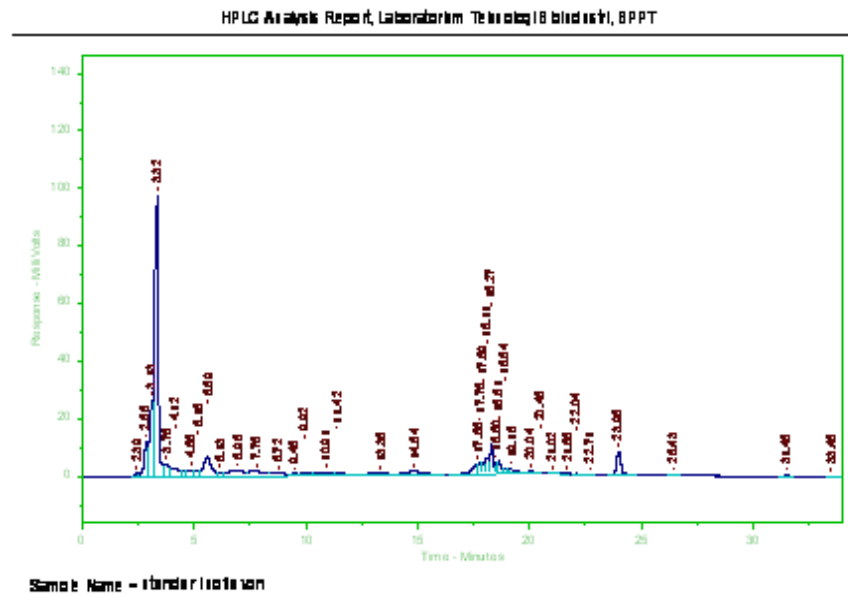
Komponen standar	Nilai	
	A	R ²
Daidzin	22,5	0,999
Glisitin	26,80	0,999
Genistin	34,20	0,999
Daidzein	41,61	0,998
Glisitein	39,39	0,998
Genistein	50,89	0,9999

Kacang panjang

	C analisa (mg/ml)	C sebenarnya (mg/g)
daidzin	0,0218	0,436
glisitin	0,0207	0,414
genistin	0,0121	0,242
daidzein	0,00147	0,0294
glisitein	0,00041	0,0082
genistein	0,00022	0,0044

No.	Nama sampel	Jenis analisis	Hasil	Satuan
1.	Kacang panjang	Daidzin	43,6	mg/100g
		Glycitin	41,4	
		Genistin	24,2	
		Daidzein	2,94	
		Glycitein	0,82	
		Genistein	0,44	

Gambar kromatogram isoflavon ekstrak etanol kacang panjang



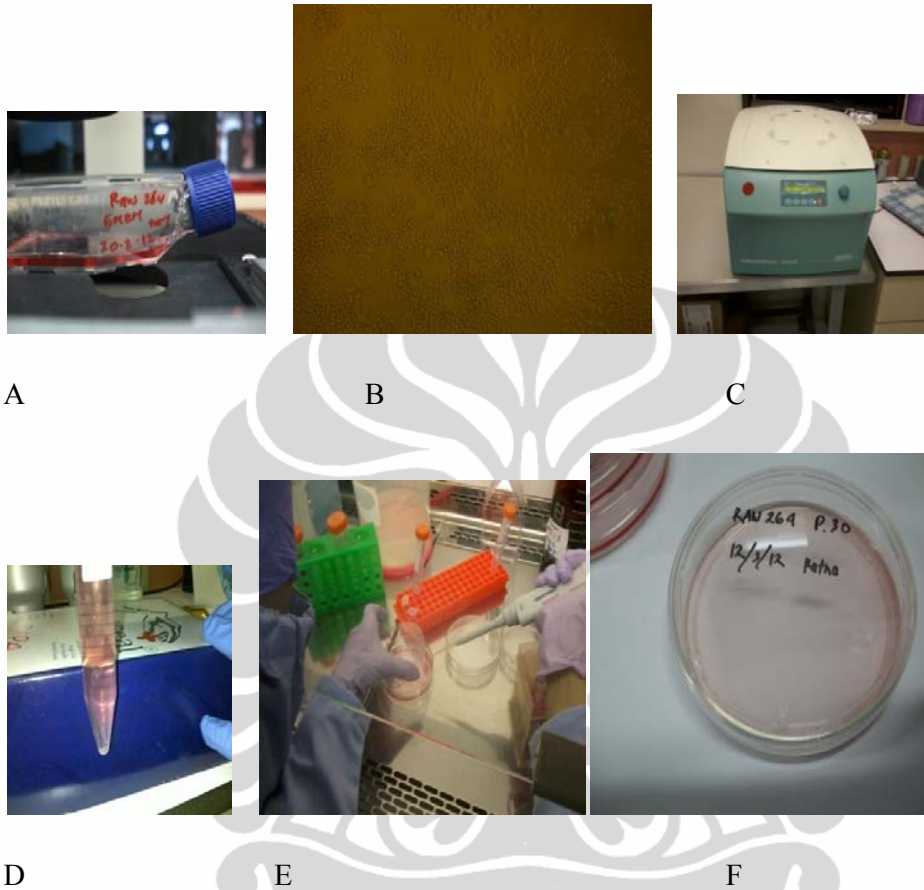
Keterangan :

Waktu retensi standar

15,50	17,56	18,36	20,104	20,75	22,85	24,09
9,11	6,45	6,15	4,87	4,58	1,78	
dadizin	glisitin	genistin	daidzein	glisitein	Genistein	Apigenin

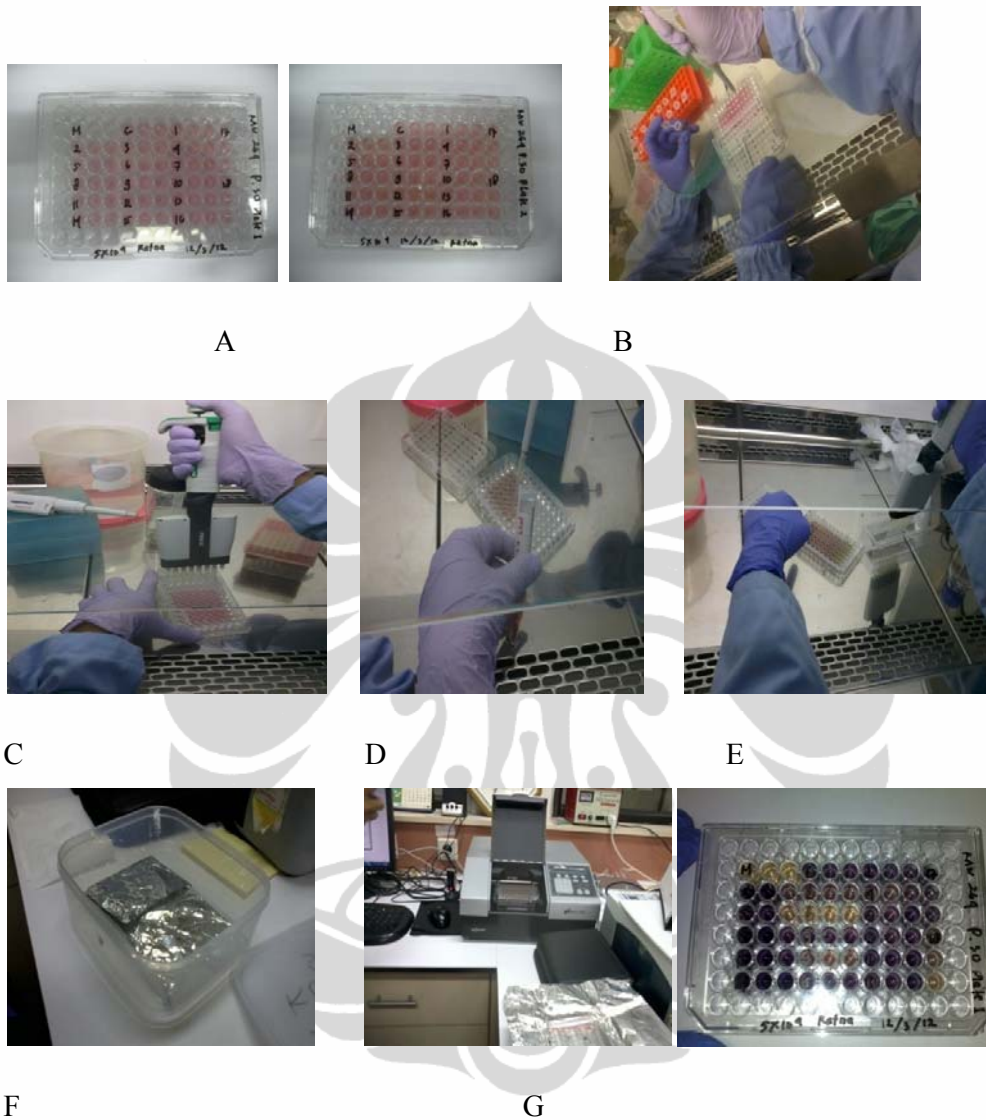
Waktu retensi kacang panjang						
14,84	17,65	18,27	20,04	20,46	22,71	23,96
9,12	6,31	5,69	3,92	3,5	1,25	
dadizin	glisitin	genistin	daidzein	glisitein	Genistein	Apigenin

Lampiran 7. Sub Kultur sel RAW 264.



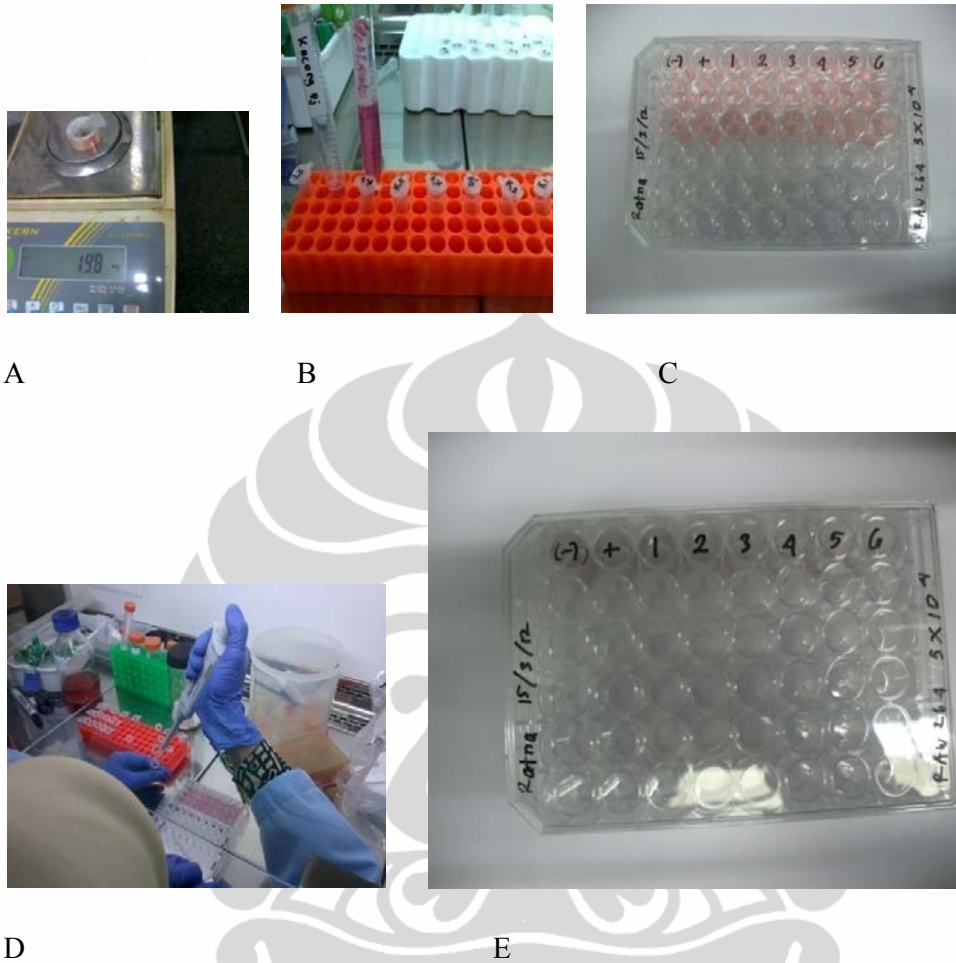
Keterangan : (A,B). Subkultur karena kepadatan sel 50 %. (C). Setelah dipanen dengan tripsin, disentrifus 1500 rpm, 5 menit. (D). Supernatan dibuang, *pellet* ditambahkan medium 900 μL dan dihomogenkan. (E). Disiapkan *petri dish* baru yang telah diisi medium kultur 10 mL dan dimasukkan sel dengan konsentrasi 1×10^3 sel/ mL. (F). *Petri dish* diberi label, dilihat di bawah miroskop kepadatan selnya kemudian diinkubasi.

Lampiran 8. Pemeriksaan Uji MTT.



Keterangan : (A). Sel ditanam pada dua *plate 96 well* dengan konsentrasi 5×10^4 sel/ mL. (B). Setelah 24 jam ditambahkan ekstrak dengan berbagai konsentrasi kemudian diinkubasi 24 jam. (C dan D). Medium dikuras dan dimasukkan larutan MTT 10 %, 100 μ L ke semua *well*. (E). Ditambahkan SDS 100 μ L setelah 4 jam. (F). Plate ditutup dengan aluminium *foil*, disimpan semalam pada suhu ruang. (G). Dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 570 nm.

Lampiran 9. Pemeriksaan Osteoklastogenesis



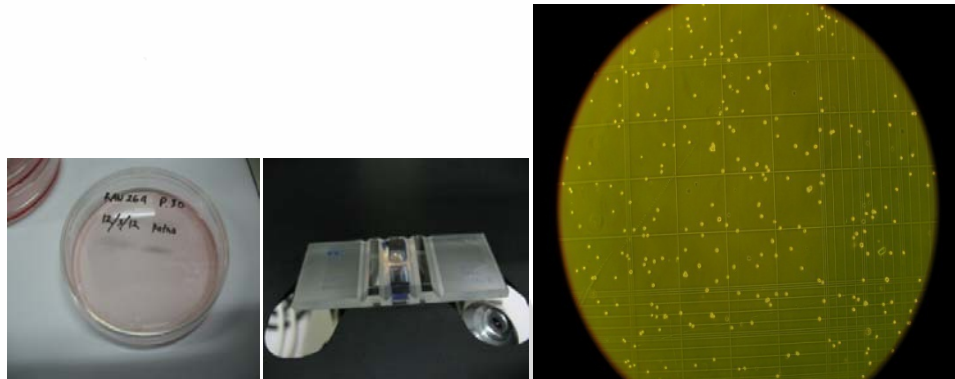
Keterangan : (A dan B). Menimbang ekstrak dan membuat berbagai konsentrasi ekstrak. (C). Sel dan medium yang mengandung ekstrak ditanam pada *plat 48 well* sore hari. (D). Pagi hari diganti medium + ekstrak + RANKL/ *well*, dan diinkubasi 72 jam, setelah 72 jam diganti lagi dan diinkubasi lagi 96 jam. (E). Setelah 96 jam dilakukan prosedur pewarnaan TRAP kemudian sel osteoklas dihitung dibawah mikroskop.

Lampiran 10. Pemeriksaan SDS-PAGE dan *Western Blot*



Keterangan : (A). Sel ditanam pada 6 cawan petri 6 cm. (B). Lisat protein yang telah dicampur *loading buffer* Laemmli 6x. (C). Didenaturasi dengan dipanaskan 95⁰ C. (D). Pembuatan SDS-PAGE 8 %. (E). *Running* SDS-PAGE dengan alat elektroforesis. (F). Persiapan transfer gel ke membran. (G). Membran yang telah berhasil ditransfer. (H). Inkubasi dengan antibodi primer dan sekunder. (I). Deteksi dengan DAB Kit.

Lampiran 11. Perhitungan jumlah sel.



Jumlah sel yang didapat kemudian dimasukkan ke rumus :

$$\sum \text{ sel/ mL} = \frac{\text{jumlah total sel yang dihitung} \times 10^4 \times 10 \times 2}{4}$$

Dimana : 10^4 = jumlah sel dalam 1 mL

10 = pengenceran pertama $10 \times (50 \mu\text{L sel} + 450 \mu\text{L medium})$

2 = pengenceran kedua $2 \times (50 \mu\text{L sel dari pengenceran pertama diencerkan lagi dengan } 50 \mu\text{L trypan blue})$

Perhitungan jumlah sel pada *plating* untuk uji MTT.

Jumlah total sel yang dihitung pada 4 bilik = 318 sel .

$$\sum \text{ sel/mL} = \frac{318}{4} \times 10^4 \times 10 \times 2$$

$$= 159 \times 10^5 \text{ sel/ mL}$$

$$= 15.9 \times 10^6 \text{ sel/ mL}$$

Konsentrasi sel 15.9×10^6 sel/ mL disebut konsentrasi awal (n1).

Untuk mendapatkan konsentrasi sel yang diinginkan maka dimasukkan 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 μL campuran sel dan medium 5×10^4 / *well* (n2) maka volume sel awal yang diambil adalah ;

$$\begin{aligned} v1 &= v2 \times n2 / n1 \\ &= 100 \mu\text{L} \times 5 \times 10^4 / 15.9 \times 10^6 \\ &= 0.314 \mu\text{L} / \text{well} = 0.3 \mu\text{L} / \text{well}. \end{aligned}$$

Lampiran 12. Konsentrasi DMSO dalam ekstrak.

Ekstrak kacang panjang yang ditimbang : 14,5 mg.

1. Untuk membuat larutan stok 50.000 ppm jumlah DMSO yang dibutuhkan = $14,5/10 \times 200 \mu\text{L} = 290 \mu\text{L}$ (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 800 ppm (konsentrasi 1) diambil 448 μL larutan stok 2 ditambah 952 μL medium kultur.
4. Untuk membuat larutan 1400 μL dengan konsentrasi ekstrak 400 ppm (konsentrasi 2) diambil 448 μL larutan konsentrasi 1 ditambah 952 μL medium kultur.
5. Untuk membuat larutan 1400 μL dengan konsentrasi ekstrak 200 ppm (konsentrasi 3) diambil 448 μL larutan konsentrasi 2 ditambah 952 μL medium kultur.
6. Untuk membuat larutan 1400 μL dengan konsentrasi ekstrak 100 ppm (konsentrasi 4) diambil 448 μL larutan konsentrasi 3 ditambah 952 μL medium kultur.
7. Untuk membuat larutan 1400 μL dengan konsentrasi ekstrak 50 ppm (konsentrasi 5) diambil 448 μL larutan konsentrasi 4 ditambah 952 μL medium kultur.
8. Untuk membuat larutan 1400 μL dengan konsentrasi ekstrak 25 ppm (konsentrasi 6) diambil 448 μL larutan konsentrasi 5 ditambah 952 μL medium kultur

Tabel konsentrasi akhir DMSO pada masing-masing konsentrasi ekstrak.

No	Konsentrasi ekstrak	Konsentrasi DMSO
1	800 $\mu\text{g}/\text{Ml}$	1,6 %
2	400 $\mu\text{g}/\text{Ml}$	0,8 %
3	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,4 %
4	100 $\mu\text{g}/\text{Ml}$	0,2 %
5	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,1 %
6	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,05%

Lampiran 13. Analisis statistik uji MTT 24 jam (dengan SPSS 17.0)

Tests of Normality

	<i>Kolmogorov-Smirnov^a</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>Df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
kontrol	.176	3	.	1.000	3	.978
dosis25	.268	3	.	.951	3	.573
dosis50	.289	3	.	.927	3	.477
dosis100	.238	3	.	.976	3	.702
dosis200	.240	3	.	.975	3	.694
dosis400	.307	3	.	.904	3	.398
dosis800	.191	3	.	.997	3	.900

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0.05$ berarti data tersebar secara normal.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

VAR00017

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.873	6	14	.156

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

ANOVA

VAR00017

	<i>Sum of Squares</i>	df	<i>Mean Square</i>	F	Sig.
Between Groups	.023	6	.004	6.431	.002
Within Groups	.008	14	.001		
Total	.032	20			

$p < 0.05$ berarti terdapat kelompok data yang mempunyai rerata yang berbeda bermakna.

Post Hoc Tests

Serapan

VAR00017

Duncan^a

VAR00018	N	<i>Subset for alpha = 0.05</i>		
		1	2	3
7	3	.0333		
4	3	.0460		
6	3	.0570		
3	3	.0630	.0630	
5	3		.1053	.1053
2	3			.1143
1	3			.1233
Sig.		.194	.054	.410

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Keterangan : kategori 1 = Kontrol, kategori 2 = Konsentrasi 25 µg/ mL, kategori 3 = Konsentrasi 50 µg/ mL, kategori 4 = Konsentrasi 100 µg/ mL, kategori 5 = Konsentrasi 200 µg/ mL, kategori 6 = Konsentrasi 400 µg/ mL, kategori 7 = Konsentrasi 800 µg/ mL

Lampiran 14. Analisis statistik uji MTT 48 jam (dengan SPSS 17.0)

Tests of Normality

	<i>Kolmogorov-Smirnov^a</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
kontrol	.339	3	.	.851	3	.242
dosis25	.192	3	.	.997	3	.893
dosis50	.373	3	.	.780	3	.067
dosis100	.184	3	.	.999	3	.927
dosis200	.237	3	.	.977	3	.707
dosis400	.197	3	.	.996	3	.874
dosis800	.310	3	.	.898	3	.380

a. *Lilliefors Significance Correction*

$p > 0.05$ berarti distribusi data normal.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

VAR00008

<i>Levene Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>Sig.</i>
1.733	6	14	.186

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

ANOVA

VAR00008

	<i>Sum of Squares</i>	df	<i>Mean Square</i>	F	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	.190	6	.032	26.985	.000
<i>Within Groups</i>	.016	14	.001		
Total	.207	20			

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

Post Hoc Tests

VAR00008

Duncan^a

VAR00009	N	<i>Subset for alpha = 0.05</i>		
		1	2	3
7	3	.1413		
4	3		.3400	
6	3		.3493	
1	3		.3607	
5	3		.3917	.3917
3	3			.4413
2	3			.4480
Sig.		1.000	.109	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Keterangan : kategori 1 = Kontrol, kategori 2 = Konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kategori 3 = Konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kategori 4 = Konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kategori 5 = Konsentrasi 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kategori 6 = Konsentrasi 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kategori 7 = Konsentrasi 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Lampiran 15. Analisis statistik pemeriksaan osteoklastogenesis (dengan SPSS 17.0)

Tabel data jumlah osteoklas perlapang pandang.

Well	No	Kontrol (-)	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
1	1	10	1	1	6	10	9
	2	11	2	1	7	15	2
	3	10	3	2	8	8	5
	4	9	4	5	9	4	3
	5	16	0	2	9	13	0
2	1	8	5	7	6	6	9
	2	8	3	2	11	4	2
	3	15	2	3	7	6	2
	4	7	3	5	5	2	0
	5	10	6	2	8	6	2
3	1	8	1	4	9	11	4
	2	8	4	3	8	4	2
	3	13	4	5	5	7	4
	4	7	1	4	7	5	3
	5	6	1	4	13	7	3

Tests of Normality

	<i>Kolmogorov-Smirnov^a</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol	.205	3	.	.993	3	.842
dosis25	.349	3	.	.831	3	.192
dosis50	.349	3	.	.831	3	.192
dosis100	.221	3	.	.986	3	.775
dosis200	.227	3	.	.983	3	.748
dosisi400	.294	3	.	.921	3	.456

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0.05$ berarti distribusi data normal.

Test of Homogeneity of Variances

VAR00007

<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	Sig.
2.284	5	12	.112

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

ANOVA

VAR00007

	<i>Sum of Squares</i>	df	<i>Mean Square</i>	F	Sig.
<i>Between Groups</i>	363.302	5	72.660	13.968	.000
<i>Within Groups</i>	62.421	12	5.202		
Total	425.723	17			

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

Post Hoc Tests

Osteoklas

VAR00007

Duncan^a

VAR0 0008	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	3	4.4500	
6	3	5.5567	
3	3	5.5600	
5	3		12.0033
4	3		13.1133
1	3		16.2233
Sig.		.581	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Keterangan : kategori 1 = Kontrol, kategori 2 = Konsentrasi 25 µg/ mL, kategori 3 = Konsentrasi 50 µg/ mL, kategori 4 = Konsentrasi 100 µg/ mL, kategori 5 = Konsentrasi 200 µg/ mL, kategori 6 = Konsentrasi 400 µg/ mL.