

Efek Induksi Proliferasi Sel Osteoblas Tulang Trabekular Mencit Jantan oleh Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.)

Induction Effect of Proliferation of Osteoblas Cells Trabecular Bone Male Mice by 96% Ethanol Extract of Semanggi Leaves (*Marsilea crenata* Presl.)

Agnis Pondineka Ria Aditama^{1,*}, Faisal Akhmal Muslikh², Izza Nailia Shirvi³, Firsta Roisatul Islamiyah³, Kurniawan Hidayat Perdana Putra³, Fidia Rizkiah Inayatillah³, Weka Sidha Bhagawan³, Burhan Ma'arif³, Asri Wido Mukti⁴, Asti Rahayu⁴

¹Farmasi, Akademi Farmasi Jember, Jember, Indonesia

²Mahasiswa Magister Ilmu Farmasi, Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

³Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia

⁴Departemen Farmasi, Universitas PGRI Adi Buana, Surabaya, Indonesia

*Email korespondensi: agnisaditama@gmail.com

Abstrak

Osteoporosis adalah kondisi penurunan kepadatan mineral tulang dan berisiko patah tulang yang disebabkan oleh defisiensi estrogen. Fitoestrogen adalah senyawa pada tanaman yang memiliki kemampuan berikatan dengan reseptor estrogen untuk menggantikan fungsi estrogen. Daun *M. crenata* Presl. diketahui mengandung senyawa fitoestrogen. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular femur dan vertebra pada mencit yang mengalami osteoporosis. Penelitian ini dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. dosis 1,2; 2,4; 4,8; dan 9,6/20 g BB mencit/hari. Analisis dilakukan dengan cara pemeriksaan histomorfometri menggunakan pewarnaan HE, dan pengamatan sel osteoblas menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* dengan *software optilab*. Data dianalisis menggunakan metode *one way ANOVA*. Hasil yang didapat yaitu kelompok PIV dengan dosis 9,6/20g BB mencit/hari dapat meningkatkan jumlah rerata sel osteoblas dengan nilai tertinggi yaitu 224,60 pada tulang trabekular femur dan 540,11 pada trabekular vertebra. Nilai perhitungan ED₅₀ ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. yaitu 1,908 mg pada tulang trabekular femur dan 2,878 mg pada tulang trabekular vertebra.

Kata Kunci: histomorfometri; in vivo; *M. crenata* Presl.; mencit; osteoporosis

Abstract

Osteoporosis is a condition of decreased bone mineral density and risk of fractures caused by estrogen deficiency. Phytoestrogens are compounds in plants that have the ability to bind to estrogen receptors to replace estrogen function. *M. crenata* Presl. known to contain phytoestrogen compounds. The purpose of this study was to prove 96% ethanol extract of *M. crenata* Presl. leaves can increase the number of osteoblast cells of the trabecular bone of the femur and vertebra in mice with osteoporosis. This research was conducted by administering 96% ethanol extract of *M. crenata* Presl leaves. dose 1,2; 2,4; 4,8; and 9.6 / 20 g mice BW/day. The analysis was carried out by means of histomorphometric examination using HE staining, and observation of osteoblasts using an Olympus light microscope with optilab software. Data were analyzed using the one-way ANOVA method. The results obtained were that the PIV group with a dose of 9.6 / 20g mice BW/day could increase the mean number of osteoblasts with the highest value, 224.60 in the trabecular femur and 540.11 in the trabecular vertebrae. ED50 value of 96% ethanol extract of *M. crenata* Presl. 1.908 mg in the trabecular femur and 2.878 mg in the trabecular vertebrae.

Keywords: histomorphometry; in vivo; *M. crenata* Presl. ; mice; osteoporosis

Submitted: 11 Mei 2021

Accepted: 09 Juni 2021

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i4.634>

1 Pendahuluan

Osteoporosis adalah kondisi dimana terjadi penurunan kepadatan mineral tulang dan kerusakan komponen mikro tulang, yang dapat meningkatkan resiko patah tulang [1,2]. Menurut *International Osteoporosis Foundation* (IOF) peningkatan secara signifikan pada wanita yang mengalami resiko patah tulang akibat osteoporosis lebih tinggi dibandingkan dengan laki-laki dan biasa dialami pada usia lebih dari 50 tahun [3].

Ketidakseimbangan proses remodeling tulang karena defisiensi estrogen dapat meningkatkan resorpsi tulang sehingga terjadi penurunan kepadatan mineral tulang yang berlanjut pada osteoporosis [4]. Terapi sulih hormon (TSH) merupakan pilihan pertama untuk mengatasi ketidakseimbangan antara proses resorpsi dan formasi pada tulang. Akan tetapi penggunaan secara terus-menerus menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan seperti *venous thromboembolism*, *coronary event*, *stroke*, demensia, endometrium dan kanker payudara [5,6,7,8].

Fitoestrogen adalah senyawa pada tanaman yang memiliki kemampuan berikatan dengan reseptor estrogen untuk menggantikan fungsi estrogen. Senyawa golongan fitoestrogen dilaporkan mudah diperoleh serta memiliki efek samping yang minimal, dan dapat meningkatkan kepadatan tulang [9,10,11,12], sehingga sangat potensial untuk mencegah osteoporosis [12].

Marsilea crenata Presl. (*M. crenata* Presl.) dikenal oleh masyarakat khususnya di Surabaya, Jawa Timur sebagai makanan khas dan diketahui mempunyai kandungan fitoestrogen yang bermanfaat untuk pengobatan [13,14]. Hasil penelitian Laswati (2011) menunjukkan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. secara *in vivo* mampu menghambat osteoporosis pada mencit betina. Penelitian *in silico* pada daun *M. crenata* Presl. diketahui memiliki kandungan senyawa agonis terhadap *estrogen receptor-β*, ekstrak *n*-heksana dan fraksi hasil pemisahan daun *M. crenata* Presl. diketahui secara *in vitro* mampu meningkatkan proses proliferasi serta

diferensiasi dari sel preosteoblas MC3T3-E1 [15].

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. dapat meningkatkan jumlah dari sel osteoblas tulang trabekular femur dan vertebra pada mencit yang mengalami osteoporosis setelah pemberian deksametason. Peningkatan jumlah sel osteoblas diketahui dengan melakukan pemeriksaan histomorfometri menggunakan pewarnaan *hematoksilin eosin* (HE) terhadap tulang trabekular vertebra dan femur mencit jantan.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

M. crenata Presl. dari daerah Benowo, Surabaya, Indonesia, dan teridentifikasi dengan spesimen 1a-17b-18a-1 di UPT Materia Medica, Batu, Indonesia, Daun tanaman dipreparasi untuk mendapatkan serbuk kering *M. crenata* Presl. Bahan kimia dan reagen yang digunakan merupakan *analytical grade*. Etanol 96% diperoleh dari Merck. Aquades, alendronat, ammonia, asam klorida, asam asetat, asam nitrat 3%, asam formiat 10%, cat pembanding eosin, cat harris hematoksilin, CMC-Na 0,5%, deksametason, formalin 10%, gliserin, kloroform, *paraffin*, *xylo*l.

2.2 Prosedur Ekstrak

Serbuk daun *M. crenata* Presl. sebanyak 30 mg diekstraksi dengan etanol 96% sebanyak 500ml menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) selama 2 menit dengan replikasi 3 kali secara berulang. Filtrat kemudian dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* Heidolph Hei-VAP ML/G3. Ekstrak disiapkan untuk menghasilkan suspensi ekstrak dalam air dengan dosis 1,2; 2,4; 4,8; dan 9,6/20 g BB mencit/hari.

2.3 Prosedur In Vivo

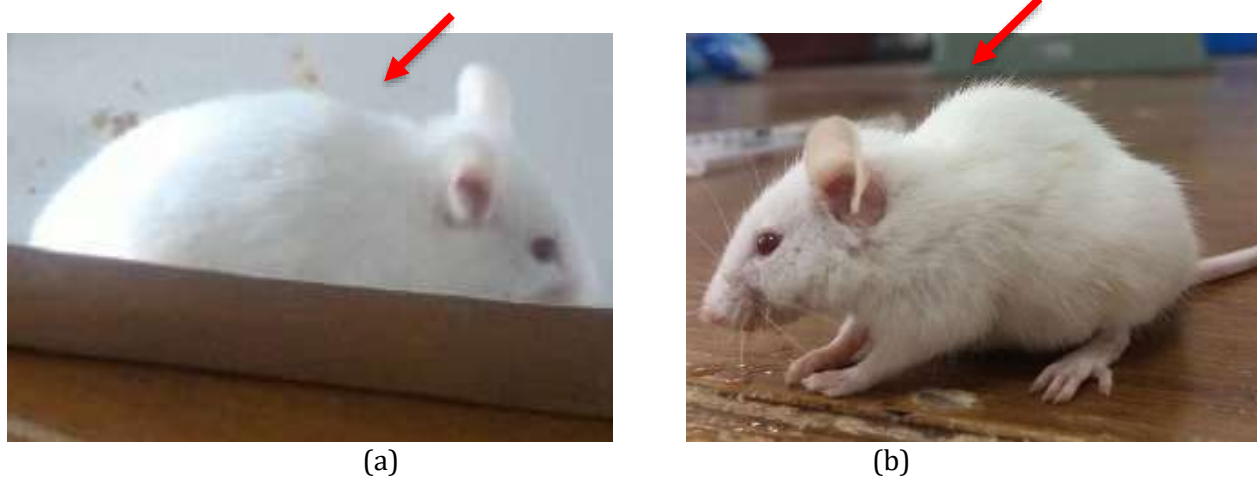
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan

true experiment post-test only control group design dengan kode etik 020/EC/KEPK-FKIK/2018. Mencit diberi deksametason peroral sebanyak 0,0029 mg/20BW mencit/hari [14]. Setiap kelompok diberi perlakuan sampel dengan dosis 1,2; 2,4; 4,8; dan 9,6/20 g BB mencit/hari, dan kontrol positif yaitu alendronat sebanyak 0,026 mg/20 BB [14]. Pemberian dilakukan selama 28 hari, kemudian dikelompokkan sesuai kelompok perlakuan. Kelompok pertama adalah pemberian suspensi alendronate sebagai kontrol positif, kedua yaitu pemberian suspensi CMC-Na sebagai kelompok kontrol negatif dan kelompok dosis ekstrak etanol *M. crenata* Presl. (1.2; 2.4; 4.8 dan 9.6 mg/20 g BB mencit). Preparat histologi jaringan dilakukan menggunakan metode pengamatan histomorfometri dengan menggunakan cat HE yang kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dan diambil gambarnya menggunakan kamera *optilab* dan *software optilab*, yang kemudian dianalisis menggunakan metode *one way ANOVA*.

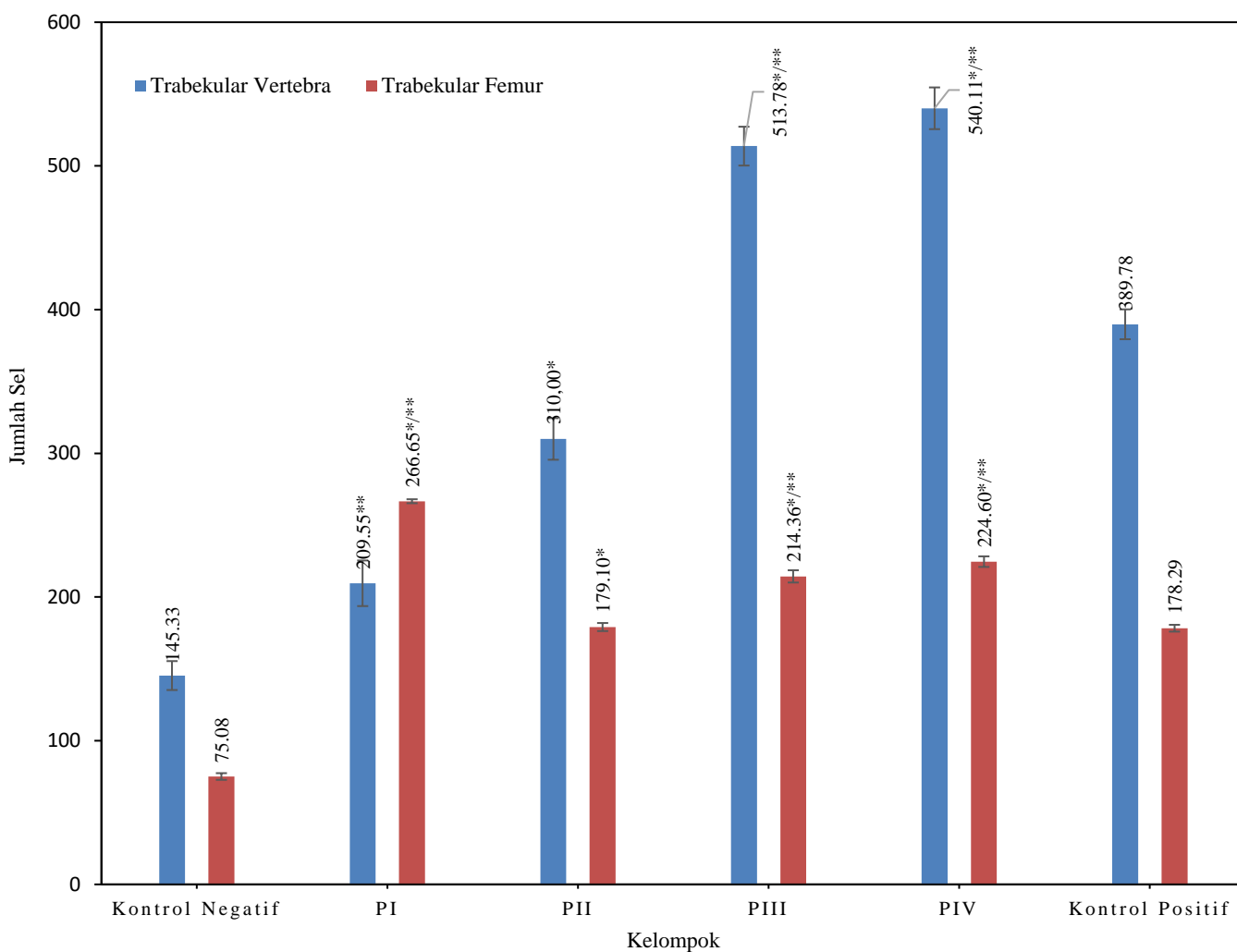
3 Hasil dan Pembahasan

Pengamatan aktivitas ekstrak etanol 96% *M. crenata* Presl. dalam meningkatkan jumlah dari sel osteoblas pada tulang trabekular femur dan vertebra mencit jantan yang diberi deksametason peroral untuk membuat model penelitian osteoporosis. Deksametason adalah zat sintesis dari kelompok kortikosteroid yang memiliki kandungan glukokortikoid yang tinggi [16,17]. Glukokortikoid memiliki sifat agonis terhadap reseptor estrogen dan berstruktur inti sama dengan estrogen yaitu steroid, yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen (ER) dan diproduksi oleh mRNA sulfotransferase yang dapat menyebabkan defisiensi estrogen [18]. Penggunaan glukokortikoid dalam waktu lama menyebabkan pembentukan tulang terhambat [18,19]. Mencit yang bentuk tulangnya terlihat membungkuk atau kifosis merupakan pertanda dalam keadaan osteoporosis [18,20,21,22] Gambar 1.

Efek Induksi Proliferasi Sel Osteoblas Tulang Trabekular Mencit Jantan oleh Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.)



Gambar 1. (a) mencit normal; (b) mencit dalam keadaan osteoporosis



Gambar 2. Grafik jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular mencit (*: signifikan terhadap kontrol negatif, **: signifikan terhadap kontrol positif)

Mencit yang telah diberi deksametason (28 hari) dan mengalami osteoporosis dikelompokkan. Kelompok I yaitu kelompok kontrol positif (alendronat 0,38 ml suspensi per oral dosis 0,026 mg/20g BB mencit per hari). Kelompok II yaitu kelompok kontrol negatif (suspensi CMC-Na). Kelompok perlakuan yaitu mencit osteoporosis yang diberi ekstrak daun *M. crenata* Presl. dengan dosis PI yaitu 1.2 mg/20 g BB mencit ; PII; 2.4 mg/20 g BB mencit; PIII; 4.8 mg/20 g BB mencit; dan PIV; 9.6 mg/20 g BB mencit.

Pemeriksaan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra dan femur mencit menggunakan metode histomorfometri. Preparat histologi yang didapat selanjutnya dilakukan pengecatan dengan HE. Metode histomorfometri sangat efektif untuk mendapatkan hasil pemeriksaan bagian jaringan yang lebih lengkap [23]. Mikroskop cahaya *Olympus* digunakan untuk pengamatan dan dengan bantuan *software optilab*. Grafik jumlah sel osteoblas hasil pengamatan pada tulang trabekular vertebra dan femur mencit dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil pengamatan didapatkan data kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular femur dan vertebra lebih banyak daripada kontrol negatif. Sehingga ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. dan kontrol positif yang diberikan sebagai perlakuan berperan dalam peningkatan jumlah sel osteoblas mencit osteoporosis pada tulang trabekular vertebra dan femur.

Data jumlah sel osteoblas yang diperoleh dari perhitungan menggunakan mikroskop kemudian diolah dan dianalisis menggunakan metode *one way ANOVA*. Data uji normalitas dan homogenitas didapatkan *p-value* >0,05 dari keenam kelompok perlakuan, sehingga data semua kelompok perlakuan terdistribusi normal dan homogen. Data uji *one way ANOVA* didapatkan *p-value* 0,000 (<0,05), sehingga terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah sel osteoblas tulang trabekular femur dan vertebra tiap kelompok. Data uji *Least Significant Difference* (LSD) menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dan keempat kelompok dosis.

Berdasarkan data pengujian LSD, kelompok PI menunjukkan adanya efek farmakologis dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas dalam tulang trabekular femur tetapi tidak memberikan efek farmakologis pada tulang trabekular vertebra. Sedangkan kelompok PII, PIII dan PIV ada peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular vertebra dan femur pada mencit. Kelompok PIV diketahui mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang trabekular femur yang paling tinggi dengan jumlah nilai rerata sel osteoblas pada mencit sebesar 224,60 dan pada pengukuran trabekular vertebra sebesar 540,11. Hasil perhitungan *effective dose* (ED₅₀) dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. yang berperan dalam peningkatan jumlah sel osteoblas yaitu 2,878 mg pada tulang trabekular vertebra mencit serta 1,908 mg pada tulang trabekular femur mencit.

Alendronat mampu mengurangi produksi dari proton dan enzim lisosomal pada sel osteoklas sehingga mampu mengikat mineral pada tulang serta menghambat diferensiasi osteoklas [24,25]. Pada penelitian ini, ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. diketahui memberikan peningkatan jumlah sel osteoblas yang lebih tinggi daripada alendronat. Diduga adanya kandungan fitoestrogen dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. memiliki peran menggantikan estrogen dalam ikatannya reseptor estrogen. Sehingga dapat mencegah resorpsi tulang serta meningkatkan mineralisasi tulang dan meningkatkan proses pembentukan tulang. Testosteron adalah hormon androgen yang ditemukan pada laki-laki yang merupakan hasil metabolisme enzim sitokrom P450 yang berperan sebagai prekursor estrogen, sehingga defisiensi testosteron sebanding dengan defisiensi estrogen [26]. Mekanisme alendronat diketahui dapat meningkatkan mineral pada tulang serta menghambat diferensiasi dari sel osteoklas yang menyebabkan resorpsi tulang, sedangkan fitoestrogen memiliki kemampuan dalam mengikat mineral pada tulang, menghambat diferensiasi sel osteoklas, serta meningkatkan jumlah sel osteoblas sehingga pembentukan tulang juga meningkat.

4 Kesimpulan

Ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. dosis 9,6 mg/20 g BB mencit berperan secara optimal dalam peningkatan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekular femur dan vertebra mencit jantan. Nilai ED₅₀ ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* Presl. yang diperoleh yaitu 1,908 mg pada peningkatan jumlah sel osteoblas tulang trabekular femur mencit serta 2,878 mg pada tulang trabekular vertebra mencit.

5 Etik

Nomor 020/EC/KEPK-FKIK/2018 yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Malang.

6 Daftar Pustaka

- [1] Elmantaser, S. F. and Ahmed, M. 2009. "Secondary Osteoporosis," vol. 16, pp. 170–190.
- [2] Agrawal, V. and Gupta, D. 2013. "Recent update on osteoporosis," *Int J Med Sci Public Heal.*, vol. 2, no. 2, doi: 10.5455/ijmsph.2013.2.162-166.
- [3] Syam, Y. Noersasongko, D., and Sunaryo, H. 2014. "Fraktur akibat osteoporosis," *J. e-Clinic*, vol. 2, no. 2, doi: <https://doi.org/10.35790/ecl.2.2.2014.4885>.
- [4] Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G. and Posey, L. M. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach Seventh Edition*. USA: McGraw-Hill, 2008.
- [5] Bjarnason, N. H. and Christiansen, C. 2005. *Osteoporosis. In (Lauritzen C, Studd J ed). Current Management of the Menopause. 1st*. London: Taylor and Francis.
- [6] Constantine, G. D. and Pickar, J. H. 2003. "Estrogens in postmenopausal women : recent insights," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 3, no. 6, pp. 626–634, doi: 10.1016/j.coph.2003.07.003.
- [7] Speroff, L. 2004. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 6th. Ed*. Amerika Serikat: Lippincott Williams & Wilkins.
- [8] Lee, W., Tsui, K., Seow, K., Cheng, M. and Su, W. 2013. "Hormone therapy for postmenopausal women-An unanswered issue," *Gynecol. Minim. Invasive Ther.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–17, doi: 10.1016/j.gmit.2012.12.003.
- [9] Cos, P. and Apers, S. 2003. "Phytoestrogens : Recent Developments," *Planta Med*, vol. 69, no. 7, pp. 589–599, doi: 10.1055/s-2003-41122.
- [10] Ososki, A. L. and Kennelly, E. J. 2003. "Phytoestrogens: A review of the present state of research," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 845–869, doi: 10.1002/ptr.1364.
- [11] de Villiers, T. J. 2009. "Bone health and osteoporosis in postmenopausal women," *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 23, no. 1, pp. 73–85, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2008.10.009.
- [12] Yang, T. S., Wang, S. Y., Yang, Y. C., Su, C. H., Lee, F. K., Chen, S. C., Tseng, C. Y., Jou, H. J., Huang, J. P., and Huang, K. E. 2012. "Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women," *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 51, no. 2, pp. 229–235, doi: 10.1016/j.tjog.2012.04.011.
- [13] Yacoeb, A. M., Nurjanah., Arifin, M., Sulistiono, W. and Kristiono, S. S. 2010. "Deskripsi Histologis dan Perubahan Komposisi Kimia Daun dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan," *J. Pengolah. Has. Perikan. Indones.*, vol. 12, no. 2, pp. 81–95, doi: <https://doi.org/10.17844/jphpi.v13i2.5350>.
- [14] Laswati, H. 2011. "Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women," *Folia Medica Indones.*, vol. 47, no. 2, pp. 112–117.
- [15] Burhan. M. 2015. "Aktivitas Ekstrak n-Heksana dan Fraksi Hasil Pemisahan Daun *Marsilea crenata* Presl. terhadap Diferensiasi Sel Preosteoblas MC3T3-E1 melalui pengukuran Alkaline phosphatase In Vitro." [Thesis]. Universitas Airlangga, Surabaya.
- [16] Brunton, L. L., Goodman and Gilman's. 2005. *The Pharmacological Basic Of Therapeutics*. San Diego: McGraw-Hill.
- [17] Noor, Z. 2014. *Buku Ajar: Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Jakarta: Salemba Medika.
- [18] Gong, H., Michael, J., Jarzynka, Timothy, J. C., Jung, H. L., Taira, W., Bin, Z., Jie, G., I Wen-Chao, S., Donald, B., DeFranco, Shi-Yuan, C., Wen, X. 2008. "Glucocorticoids Antagonize Estrogens by Glucocorticoid Receptor – Mediated Activation of Estrogen Sulfotransferase," *Res. Cancer Artic.*, vol. 68, no. 18, pp. 7386–7394, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1545.
- [19] Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G. and Posey, L. M. 2014. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach, 9th Ed*. New York: Mc Graw Hill.
- [20] Hernández-gil, I. F., Angel, M., Gracia, A., Pingarrón, C., Jerez, L. B. and Carlos, R. J. 2006. "Physiological bases of bone regeneration II . The remodeling process," *Med, Oral Patol, Cir, Bucal*, vol. 11, pp. 151–157.

- [21] Karmakar, S., Jin, Y. and Nagaich, A. K. 2013. "Interaction of Glucocorticoid Receptor (GR) with Estrogen Receptor (ER) α and Activator Protein 1 (AP1) in Dexamethasone-mediated Interference of ER α Activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 33, pp. 24020–24034, doi: 10.1074/jbc.M113.473819.
- [22] Laswati, H., Subadi, I., Widyowati, R. and Agil, M. 2015. "Spilanthes Acmella and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells In Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Male Mice," *Bali Med. J.*, vol. 4, no. 2, pp. 76–81.
- [23] Sari, D. P., Fatmawati, U., Prabasari, R. M. and Word, K. 2016. "Profil Hands On Activity pada Mata Kuliah Mikroteknik di Prodi Pendidikan Biologi FKIP UNS," *Proceeding Biol. Educ. Conf. Biol. Sci. Environmental, Learn.*, vol. 13, no. 1, pp. 476–481.
- [24] Partan, R. 2018. *Peran Risendronat pada Penatalaksanaan Osteoporosis (PIB XVIII IPD 2018)*. Padang: FK Universitas Andalas.
- [25] Bronner, F. and Carson, M. C. F. 2007. *Bone and Osteoarthritis*. London: Library of Congress Control.
- [26] Reid, I. R., Wattie, D. J., Evans, M. C., & Stapleton, J. P. 1996. "Testosterone Therapy In Glucocorticoid-Treated Men," *Arch. Intern. Med.*, vol. 156, no. 11, pp. 1173–1177, doi: 10.1001/archinte.1996.00440100065008.