

**EFEKTIVITAS FORMULASI EKSTRAK AIR DAUN CIPLUKAN (*Physalis  
angulata L.*) DAN ALBUMIN TERHADAP JUMLAH OSTEOSIT PADA  
TULANG TIBIA TIKUS (*Rattus norvegicus*) PASCA OVARIEKTOMI**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Desak Gede Yuliana Eka Pratiwi**

**NIM 165070107111018**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**EFEKTIVITAS FORMULASI EKSTRAK AIR DAUN CIPLUKAN (*Physalis  
angulata L.*) DAN ALBUMIN TERHADAP JUMLAH OSTEOSIT PADA  
TULANG TIBIA TIKUS (*Rattus norvegicus*) PASCA OVARIEKTOMI**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Desak Gede Yuliana Eka Pratiwi**

**NIM 165070107111018**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**201**

## DAFTAR ISI

	Halaman
Judul .....	i
Lembar Pengesahan .....	iii
Pernyataan Keaslian Penulisan .....	iv
Kata Pengantar.....	v
Abstrak .....	vii
Abstract .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Gambar .....	xiii
Daftar Tabel .....	xiv
Daftar Singkatan.....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Menopause.....	5
2.1.1 Definisi .....	5
2.1.2 Patofisiologi Menopause .....	5
2.1.3 Sindroma Pasca Menopause.....	6
2.2 Osteoporosis .....	7
2.2.1 Definisi .....	7
2.2.2 Proses Pembentukan Tulang .....	9

2.3 Osteosit .....	10
2.4 Estrogen .....	11
2.4.1 Definisi .....	11
2.4.2 Pengaruh Estrogen Terhadap Sel Osteosit .....	12
2.5 Ciplukan ( <i>Physalis angulata L.</i> ).....	14
2.5.1 Taksonomi dan Karakteristik .....	14
2.5.2 Manfaat di Masyarakat .....	16
2.5.3 Kandungan Kimia .....	16
2.5.4 Uji Laboratorium <i>Physalis sp.</i> .....	17
2.6 Albumin .....	20
2.6.1 Definisi .....	20
2.6.2 Fungsi Albumin.....	20
2.6.3 Keadaan Albumin Pada Wanita Menopause .....	22
2.7 Hewan Coba Tikus <i>Rattus norvegicus</i> .....	23
2.7.1 Taksonomi dan Karakteristik .....	23
2.7.2 Tikus <i>Rattus norvegicus</i> Model Menopause .....	23

### BAB III KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	25
3.2 Hipotesis Penelitian .....	27

### BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	28
4.2 Sampel Penelitian.....	28
4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian .....	28
4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian .....	28
4.3 Variabel Penelitian.....	29

4.3.1 Variabel Bebas .....	29
4.3.2 Variabel Tergantung .....	29
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
4.5 Bahan dan Alat Penelitian.....	29
4.5.1 Bahan dan Alat Ekstraksi <i>Physalis angulata L.</i> dan Albumin .....	29
4.5.2 Bahan dan Alat Perawatan Tikus.....	30
4.5.3 Bahan dan Alat Ovariectomi .....	30
4.5.4 Bahan dan Alat Pemberian Perlakuan.....	30
4.5.5 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ yang akan diteliti.....	30
4.5.6 Alat Pembuatan Slide Histopatologi.....	31
4.5.7 Bahan dan Alat Observasi Jumlah Sel Osteosit Tibia .....	31
4.6 Definisi Operasional .....	31
4.6.1 Tikus Model Menopause .....	31
4.6.2 Ciplukan( <i>Physalis angulata L.</i> ) .....	31
4.6.3 Albumin .....	32
4.6.4 Jumlah Osteosit.....	32
4.7 Prosedur Penelitian .....	32
4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba.....	32
4.7.2 Ekstraksi Daun <i>Physalis angulata L.</i> dan Penyediaan Albumin .....	33
4.7.3 Pemberian Ekstrak <i>Physalis angulata L.</i> dan Albumin .....	33
4.7.4 Pembedahan Tikus.....	33
4.7.5 Penguburan Tikus .....	34

4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	34
4.7.7 Analisis Data .....	36
4.8 Alur Penelitian .....	37
4.9 Jadwal Kegiatan .....	39
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b>	
5.1 Hasil Penelitian.....	40
5.1.1 Gambar Histologi Osteosit .....	41
5.1.2 Hasil Perhitungan Osteosit .....	43
5.2 Analisis Data .....	44
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas Data .....	44
5.2.2 Uji <i>One Way ANOVA</i> .....	45
5.2.3 Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison</i> .....	45
5.2.4 Uji Korelasi <i>Pearson</i> .....	47
<b>BAB VI PEMBAHASAN</b>	
6.1 Rerata Jumlah Osteosit .....	49
6.1.1 Rerata Jumlah Osteosit <i>Tikus Rattus norvegicus</i> Strain Wistar pada Kontrol Negatif dan Kontrol Positif OVX 5 dan OVX 9.. .....	49
6.1.2 Rerata Jumlah Osteosit Tikus <i>Rattus norvegicus</i> Strain Wistar Pada Perlakuan Dengan Berbagai Dosis.....	50
6.2 Keterbatasan Penelitian.....	53
<b>BAB VII PENUTUP</b>	
7.1 Kesimpulan.....	54
7.2 Saran.....	55
Daftar Pustaka .....	56

Lampiran .....	60
----------------	----

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perubahan Hormonal Premenopause dan Postmenopause .....	6
Gambar 2.2	<i>Bone Remodeling</i> Tulang .....	10
Gambar 2.3	Ekspresi Gen Protein dan Fungsi Osteosit .....	11
Gambar 2.4	Regulasi Estrogen Terhadap <i>Turnover</i> Tulang .....	13
Gambar 2.5	Tanaman Ciplukan ( <i>Physalis angulata L.</i> ) .....	14
Gambar 2.6	Tikus <i>Rattus norvegicus</i> .....	23
Gambar 4.1	Bagan Alur Penelitian .....	37
Gambar 5.1	Gambaran Histologi Tulang Tibia Tikus: (a) K1 (Kontrol negatif); K2 (Ovariectomi minggu ke-5); K3 (Ovariectomi minggu ke-9) .....	41
Gambar 5.2	Gambaran Histologi Tulang Tibia Tikus: (a) K3 (Ovariectomi minggu ke-9); (b) P1 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg); (c) P2 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg); (d) P3 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg); (e) P4 (Perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB) (perbesaran 100x) .....	42
Gambar 5.3	Rerata dan Standar Deviasi Osteosit Tikus <i>Rattus norvegicus</i> .....	43

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Jadwal Kegiatan Penelitian .....	39
Tabel 5.1	Rerata dan Standar Deviasi Osteosit .....	43
Tabel 5.2	Hasil <i>Post Hoc Multiple Comparison Test</i> K1, K2, dan K3.....	45
Tabel 5.3	Hasil <i>Post Hoc Multiple Comparison Test</i> K3, P1, P2, P3 dan P4 .....	45



## DAFTAR SINGKATAN

TSH	: Terapi Sulih Hormon
cGMP	: <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
PLGA	: Poly Lactic-co-Glycolic Acid
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor-KappaB</i>

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**EFEKTIVITAS FORMULASI EKSTRAK AIR DAUN CIPLUKAN (*Physalis  
angulata L.*) DAN ALBUMIN TERHADAP JUMLAH OSTEOSIT PADA  
TULANG TIBIA TIKUS (*Rattus norvegicus*) PASCA OVARIEKTOMI**

Oleh:

**Desak Gede Yuliana Eka Pratiwi**

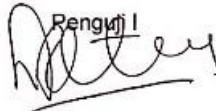
**NIM 165070107111018**

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 29 November 2019

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I  


Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

NIP. 195210271981032001

Pembimbing I/Penguji II



Dr. drg. Nur Permatasari, MS

NIP. 19601005199132001

Pembimbing II/Penguji III



Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA

NIP. 195011161980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,



dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001

## ABSTRAK

Pratiwi, Desak Gede Yuliana. 2019. **Efektivitas Formulasi Ekstrak Air Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan Albumin Terhadap Jumlah Osteosit Pada Tulang Tibia Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Ovariectomi.** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. drg. Nur Permatasari, MS, (2) Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA.

Menopause merupakan berhentinya secara fisiologis siklus menstruasi yang berkaitan dengan tingkat lanjut usia wanita yang ditandai dengan adanya penurunan fungsi ovarium yang menyebabkan berkurang atau hilangnya produksi estrogen. Salah satu gejala *postmenopausal syndrome* adalah osteoporosis. Osteoporosis ditandai dengan adanya gangguan siklus remodelling tulang dengan terhambatnya pembentukan osteosit dalam proses pembentukan matriks tulang. Selama ini, telah digunakan Terapi Sulih Hormon (TSH) untuk mengatasi gejala *postmenopausal syndrome*, namun terapi tersebut meningkatkan risiko kanker payudara dan rahim. Sehingga mulai dikembangkannya terapi fitoestrogen, yang merupakan senyawa estrogenik yang memiliki struktur dan fungsi seperti  $17\beta$ -estradiol yang berikatan dengan reseptor estrogen. Salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen adalah *Physalis angulata L.* Selain itu, wanita menopause juga mengalami penurunan kadar albumin serum, sehingga *penelitian* ini menggunakan kombinasi ekstrak air daun *Physalis angulata L.* dengan albumin berbagai dosis dalam meningkatkan jumlah osteosit tikus yang diovariectomi. Tikus yang diovariectomi diberikan kombinasi *Physalis* dan albumin dengan berbagai dosis kemudian dihitung jumlah osteosit pada preparat histologi setelah 9 minggu. Hasil penelitian dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan korelasi Pearson. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara rerata jumlah osteosit tikus normal dan tikus yang diovariectomi. Sedangkan rerata jumlah osteosit pada tikus yang diovariectomi dan tikus yang diberi kombinasi *Physalis* dan albumin menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p = 0.000$ ). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan korelasi positif yang sangat kuat dan signifikan ( $r = 0.883$ ,  $p = 0.000$ ) antara dosis albumin dengan rerata jumlah osteosit. Sehingga dapat disimpulkan dari penelitian ini bahwa, pemberian ekstrak air daun *Physalis* dengan kombinasi albumin berbagai dosis mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan jumlah osteosit.

**Kata kunci:** *Postmenopausal Syndrome*, Osteosit, Fitoestrogen, *Physalis*, Albumin

## ABSTRACT

Pratiwi, Desak Gede Yuliana. 2019. **Effectiveness Formulation of Ciplukan (*Physalis angulata L.*) Leaf Extract and Albumin on The Number of Osteocytes Tibia in Post Ovariectomy Rats (*Rattus norvegicus*).** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. drg. Nur Permatasari, MS, (2) Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA.

Menopause is a physiological cessation of menstrual cycle that associated with elderly woman by a decrease in ovarian function that causes reduced or loss of estrogen production. One of the symptoms of postmenopausal syndrome is osteoporosis. Osteoporosis characterized by the disruption of the bone remodeling cycle with inhibition of osteocyte formation in the process of bone matrix formation. During this time, Hormone Replacement Therapy (TSH) has been used to treat the symptoms of postmenopausal syndrome, but this therapy can increases the risk of breast and uterine cancer. Thus began the development of phytoestrogen therapy, which is an estrogenic compound that has a structure and function such as 17 $\beta$ -estradiol by binding to estrogen receptors. One of the plants that contain phytoestrogens is *Physalis angulata L.* In addition, menopausal women also experience decreased serum albumin levels, therefore this study uses a combination of *Physalis angulata L.* leaf water extract with albumin in various doses to increase the number of osteocyte on ovariectomized mouse. The ovariectomized mice were given a combination of *Physalis* and albumin with various doses and then the osteocytes counted in histological preparations after 9 weeks. The results of the study were analyzed with One Way ANOVA and Pearson correlation. The results of the One Way ANOVA test showed no significant difference between the average number of osteocytes in normal mice and ovariectomized mice. While the mean number of osteocytes in ovariectomized rats and mice given a combination of *Physalis* and albumin showed a significant difference ( $p = 0.000$ ). The Pearson correlation test showed a very strong and significant positive correlation ( $r = 0.883$ ,  $p = 0.000$ ) between the albumin dose and the average osteocyte count. From these results, it can be known that the *Physalis* leaf water extract with combination among various dosages of albumin can provide a significant effect on increasing the number of osteocytes.

**Keyword:** Postmenopausal Syndrome, Osteocyte, Phytoestrogen, *Physalis*, Albumin

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan berhentinya secara fisiologis siklus menstruasi yang berkaitan dengan tingkat lanjut usia wanita yang ditandai dengan adanya penurunan fungsi ovarium yang menyebabkan berkurang atau hilangnya produksi estrogen (Cassidy *et al.*, 2006). Pada tahun 2030, jumlah perempuan di seluruh dunia yang memasuki masa menopause diperkirakan mencapai 1,2 miliar orang (WHO, 2014). Apabila sudah tidak terjadi menstruasi (*amenorrhea*) selama 12 bulan, maka wanita tersebut sudah memasuki masa pasca menopause. Wanita pasca menopause mengalami berbagai gejala atau komplikasi seperti gejala vasomotor *hot flushes*, perubahan mood, insomnia, kekeringan vagina, kesulitan konsentrasi, delirium, inkontinensia, depresi, dan lain-lain (Dalal *et al.*, 2015). Bertambah lamanya keluhan pasca menopause dapat meningkatkan insiden terjadinya aterosklerosis, osteoporosis, dislipidemia, dan hypoalbuminemia (Murano *et al.*, 2003).

Osteoporosis adalah kejadian patah tulang yang biasanya terjadi setelah 5-10 tahun pasca menopause yang akan menyebabkan penurunan taraf atau kualitas hidup wanita menopause. Osteoporosis terjadi akibat adanya penurunan kadar estrogen pada wanita menopause yang menyebabkan terjadinya peningkatan resorpsi tulang, terganggunya siklus remodeling tulang, serta mempercepat proses terjadinya kerapuhan tulang (Siddapur *et al.*, 2015). Osteoporosis ditandai dengan rendahnya massa tulang dan rusaknya mikrostruktural tulang yang menyebabkan kerapuhan tulang sehingga dapat meningkatkan risiko fraktur akibat siklus remodeling tulang yang terganggu.

Remodeling merupakan proses pergantian jaringan tulang dengan cara menghancurkan komponen jaringan tulang yang sudah tua dan membentuk jaringan tulang baru oleh osteosit (Sihobing *et al.*, 2012). Remodeling dipengaruhi oleh ketersediaan hormon estrogen yang dapat mempengaruhi kepadatan tulang, sehingga turunnya hormon estrogen mengakibatkan terhambat atau berkurangnya produksi osteosit dalam proses pembentukan matriks tulang.

Saat ini dalam mengatasi osteoporosis telah digunakan adalah estrogen sebagai terapi sulih hormone (TSH), namun pemakaiannya selama ini masih kontroversi berkaitan dengan masalah efek samping jangka panjang, diantaranya kanker payudara, kanker rahim, gangguan fungsi hati, perdarahan pervaginam, tromboemboli, penyakit jantung koroner, dan infark miokard (Ghani, 2009). Untuk itu diperlukan pengembangan obat untuk mengatasi masalah yang ada antara penanganan osteoporosis pada wanita menopause dengan penanganan yang ada sekarang ini. Berdasarkan fakta tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk menemukan alternatif pencegahan terhadap osteoporosis.

Salah satu alternatif dalam mencegah terjadinya osteoporosis dapat menggunakan obat berbahan herbal. Indonesia menyimpan kekayaan alam yang melimpah, khususnya dalam bidang tumbuhan herbal. Beberapa tahun terakhir ini telah dilakukan penelitian terhadap potensi tumbuhan Ciplukan (*Physalis angulata L.*) yang banyak mengandung fitoestrogen (Murali *et al.*, 2013). Fitoestrogen adalah senyawa yang mempunyai struktur menyerupai 17- $\beta$  estradiol yang bersumber dari tumbuhan. Fitoestrogen diketahui berpotensi sebagai alternatif terapi sulih hormon yang memiliki struktur dan fungsi kerja

yang mirip dengan estrogen yaitu dapat meningkatkan ekspresi seluler *estrogen receptor*.

Albumin merupakan protein plasma yang berjumlah sekitar 50% dari seluruh serum protein. Albumin berfungsi untuk menjaga tekanan osmotik plasma, mengikat kation, hormon (Bairagi *et al.*, 2015) dan juga meningkatkan kadar kalsium pada daerah diafisis tulang yang memineralisasi tulang (Yadav *et al.*, 2015). Albumin memiliki fungsi sebagai transporter termasuk mineral yang dibutuhkan untuk pembentukan matriks tulang. Pada saat wanita mengalami menopause, kadar albumin dalam tubuh juga mengalami penurunan. Keadaan hipoalbuminemia pada wanita pasca menopause disebabkan karena terjadinya proses mikroalbuminuria (Ahn *et al.*, 2016), sehingga kadar serum albumin yang rendah juga sangat berpengaruh terhadap terjadinya osteoporosis.

Berdasarkan uraian diatas, terdapat kemungkinan bahwa formulasi kombinasi ekstrak *Physalis angulata L.* dan albumin memiliki efek terhadap sindroma pasca menopause, termasuk osteoporosis. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efek formulasi kombinasi ekstrak *Physalis angulata L.* dan albumin terhadap jumlah osteosit pada kondisi menopause. Melalui penelitian ini, penulis berharap kombinasi ekstrak *Physalis angulata L.* dan albumin dapat menjadi inovasi alternatif dalam peningkatan produksi osteosit pada wanita menopause.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah pemberian formulasi ekstrak air ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dapat meningkatkan jumlah osteosit pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca ovariectomi?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan efek formulasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dapat meningkatkan jumlah osteosit pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca ovariectomi.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membandingkan jumlah osteosit pada tikus pasca ovariectomi tanpa pemberian terapi dengan tikus normal.
2. Membandingkan jumlah osteosit pada tikus pasca ovariectomi pada pemberian ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dengan berbagai dosis yang disediakan.
3. Mengetahui korelasi penambahan dosis albumin pada formulasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap jumlah osteosit pada tikus pasca ovariectomi.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Akademis**

Pengembangan ilmu dalam bidang kesehatan, khususnya terkait potensi formulasi ekstrak air ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin untuk mengatasi penurunan jumlah osteosit pada keadaan osteoporosis pada wanita menopause.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Memberikan suatu alternatif baru dalam pembuatan obat untuk mengatasi osteoporosis dengan menggunakan formulasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Menopause**

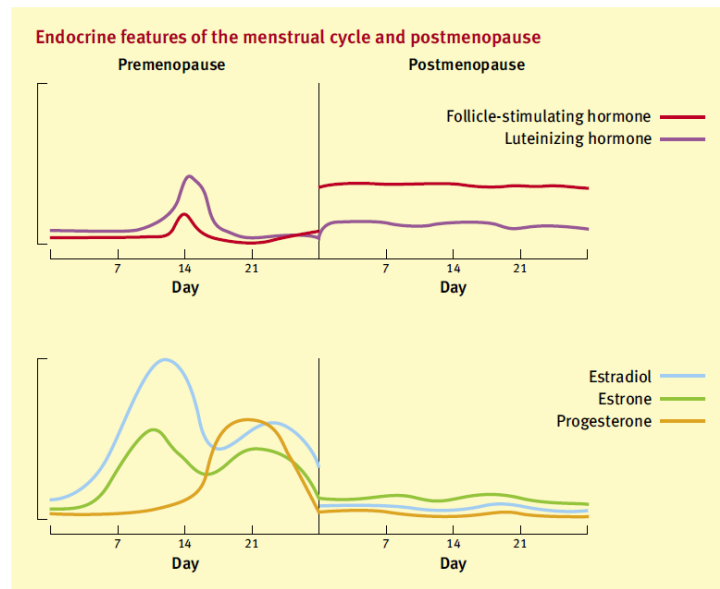
##### **2.1.1 Definisi**

Menopause menurut WHO merupakan suatu keadaan yang menggambarkan penghentian menstruasi secara permanen akibat hilangnya aktivitas folikular ovarium. Pada tahun 2030, jumlah perempuan di seluruh dunia yang memasuki masa menopause diperkirakan mencapai 1,2 miliar orang (WHO, 2014). Menopause terjadi karena jumlah folikel dalam ovarium mengalami atresia secara terus menerus, sehingga pada suatu ketika ovarium tidak dapat menghasilkan hormon-hormon seks seperti estrogen dan progesteron (Smith *et al.*, 2007). Apabila sudah tidak mengalami menstruasi (*amenorrhea*) selama 12 bulan berturut-turut, maka wanita tersebut sudah memasuki masa pasca menopause (Dalal *et al.*, 2015). Keadaan hipoestrogen pada wanita pasca menopause juga dapat menyebabkan turunnya kadar albumin plasma (Jagtap *et al.*, 2017).

##### **2.1.2 Patofisiologi Menopause**

Wanita dilahirkan dengan jumlah folikel primordial yang terbatas, yang kemudian akan tumbuh menjadi folikel matang dan berovulasi sehingga jumlahnya akan terus berkurang seiring usia (Hall et Guyton, 2016). Pada usia 45 tahun, hanya tinggal beberapa folikel primordial dan terjadi atresia folikular sehingga akan terjadi perubahan hormonal pada wanita. Saat cadangan folikel sudah habis, maka siklus ovarium dan siklus menstruasi akan berhenti, sehingga terjadilah menopause. Produksi estrogen akan menurun hingga hampir nol (Sherwood, 2012). Masa *post menopause* ditandai dengan penurunan

produksi estrogen, peningkatan kadar FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) (Dalal *et al.*, 2015). Dapat terjadi peningkatan gonadotropin, androgen, testosteron, dan dehydroepiandrosterone (DHEA) (Burger, 2008).



**Gambar 2.1 Perubahan Hormonal Premenopause dan Postmenopause**

### 2.1.3 Sindroma Pasca Menopause

Menopause memiliki efek pada berbagai fungsi organ tubuh wanita. Wanita yang mengalami menopause akan mengalami masalah kesehatan baru. Adapun beberapa permasalahan umum yang dirasakan wanita menopause antara lain munculnya gejala perubahan dari segi psikologis dan fisik seperti vasomotor, atrofi urogenital, penurunan kognitif, dan permasalahan seksual. Kumpulan berbagai gejala yang muncul pasca menopause disebut dengan istilah sindroma pasca menopause. Gejala yang dapat ditimbulkan yaitu gejala vasomotor *hot flushes*, perubahan mood, insomnia, kekeringan vagina, kesulitan konsentrasi, delirium, inkontinensia, depresi, dan yang lainnya (Dalal *et al.*, 2015). Selain itu, bertambah lamanya keluhan pasca menopause dapat meningkatkan insiden

terjadinya aterosklerosis, osteoporosis, dyslipidemia, dan hypoalbuminemia (Murano *et al.*, 2003).

## **2.2 Osteoporosis**

### **2.2.1 Definisi**

Osteoporosis adalah keadaan kurangnya masa tulang per unit volume dan mikroarsitektur jaringan tulang yang buruk namun bukan disebabkan oleh defek mineralisasi (osteomalasia). Osteoporosis adalah penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan rendahnya massa tulang yang menyebabkan tulang menjadi lebih rapuh sehingga risiko fraktur meningkat (Bianchi *et al.*, 2005).

Osteoporosis merupakan keadaan berkurangnya jaringan tulang perunit volume sehingga tidak mampu lagi melindungi atau mencegah terjadinya fraktur terhadap trauma minimal. Sebelum terjadi osteoporosis akan terlebih dahulu mengalami proses osteopenia, yaitu suatu kondisi berkurangnya massa tulang tidak disertai dengan adanya perubahan perbandingan antara substansi mineral dan organik tulang akibat berbagai keadaan. Penyakit ini dijuluki sebagai *Silent Epidemic Disease*, karena menyerang secara diam-diam tanpa adanya tanda-tanda khusus.

Osteoporosis dibagi menjadi dua golongan besar menurut penyebabnya, yaitu osteoporosis primer yang tidak disebabkan oleh suatu penyakit (proses alami degeneratif), dan osteoporosis sekunder yang disebabkan oleh berbagai kondisi klinis/penyakit, seperti infeksi tulang, tumor tulang, pemakaian obat tertentu dan immobilitas yang lama (Depkes, 2008).

#### **1. Osteoporosis primer**

Osteoporosis primer berhubungan dengan berkurangnya massa tulang dan terhentinya produksi hormon estrogen. Osteoporosis primer terdiri dari:

a) Osteoporosis primer tipe I

Disebut juga sebagai osteoporosis post menopause, yang terjadi pada wanita pasca menopause. Biasanya terjadi pada wanita usia 50-65 tahun, fraktur biasanya terjadi pada vertebra, iga atau tulang radius.

b) Osteoporosis primer tipe II

Istilah lainnya adalah osteoporosis senil, yang terjadi pada usia lanjut. Pasien biasanya berusia  $\geq 70$  tahun, fraktur biasanya terjadi pada tulang paha. Selain fraktur maka gejala yang perlu diwaspadai adalah kifosis dorsalis bertambah, makin pendek, dan nyeri tulang berkepanjangan.

2. Osteoporosis sekunder

Osteoporosis sekunder adalah osteoporosis yang disebabkan oleh berbagai penyakit tulang (*chronic rheumatoid*, artritis, tbc spondylitis, osteomalacia, dll), pengobatan steroid untuk jangka waktu yang panjang, astronot tanpa gaya berat, paralise otot, tidak bergerak untuk periode lama, hipertiroid, dan lain-lain.

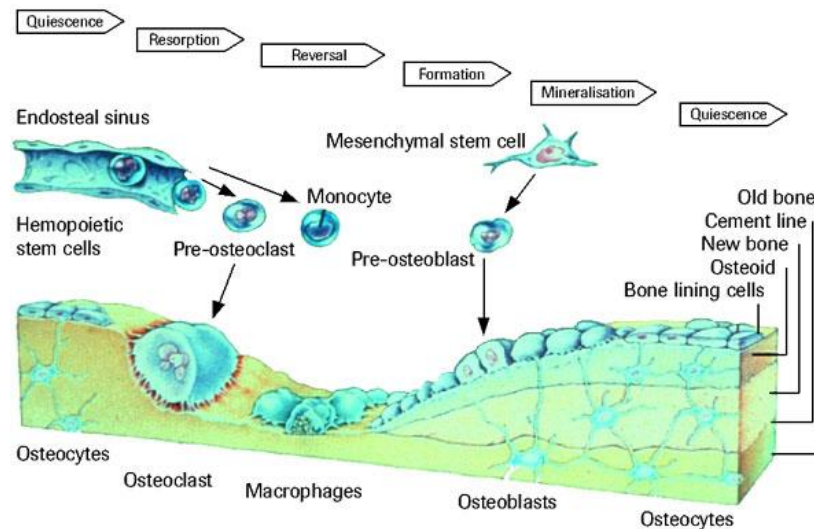
Osteoporosis terjadi secara seluler disebabkan oleh jumlah dan aktivitas osteoblas dan osetosit yang rendah dibandingkan dengan jumlah dan aktivitas osteoklas yang meningkat. Keadaan ini mengakibatkan penurunan massa tulang (Manolagas, 2000). Adapun penyebab terjadinya diferensiasi sel pembentuk tulang osteoblast dan osteoklas adalah sebagai berikut:

1. Defisiensi Estrogen
2. Faktor sitokin
3. Pembebanan

### **2.2.2 Proses Pembentukan Tulang**

Tulang merupakan jaringan ikat yang berfungsi sebagai pendukung kerangka tubuh, pelindung, penggerak tubuh, menyimpan mineral terutama kalsium dan fosfat, pembentukan sel darah (hematopoiesis) dan memproduksi *osteocalcin*. Jaringan tulang bersifat kaku namun memiliki kekuatan yang sangat besar dan juga memiliki elastisitas sangat terbatas. Tulang tibia merupakan jenis tulang panjang yang tersusun atas beberapa bagian, yakni: diafise, epifise, dan metafise. Diafise tersusun atas korteks tulang yang padat, sedangkan metafise dan epifise tersusun atas trabekula yang akan membentuk korteks tulang (Martini *et al.*, 2007). Bagian luar pada tulang disebut periosteum. Periosteum sebagai tempat perlekatan antara otot dan tulang dan memberikan nutrisi pada tulang. Periosteum mengandung saraf, pembuluh darah, dan limfatik. Endosteum merupakan membran vascular tipis yang menutupi rongga sumsum tulang yang terdapat pada bagian dalam periosteum (Samuelson, 2007).

Struktur tulang dewasa terdiri dari 30% bahan organik dan 70% mineral tulang. Bahan organik terdiri dari kolagen, *osteocalcin*, osteopontin, dan *bone morphogenetic protein* (BMP) (Compton dan Lee, 2014). Mineral tulang yang terutama adalah kalsium dan fosfat, dengan sedikit natrium, kalium karbonat, dan ion magnesium. Adanya bahan organik menyebabkan tulang memiliki kekuatan tensif (resisten terhadap tarikan yang meregangkan), sedangkan mineral pada tulang memiliki kekuatan kompresi (kemampuan menahan tekanan).



**Gambar 2.2 Bone Remodeling Tulang**

### 2.3 Osteosit

Osteosit atau sel tulang ialah osteoblas yang terpendam dalam lacuna matriks tulang dan termineralisasi dalam matriks tulang dengan morfologi stellate, dengan tonjolan dendritic yang merupakan penonjolan plasma membran dan berfungsi sebagai sistem syaraf. Mikroskop elektron memperlihatkan bahwa osteosit dan cabangnya tidak melekat langsung pada matriks sekitarnya, tetapi terpisah dari dinding lakuna dan kanalikuli oleh daerah amorf tipis. Daerah ini berfungsi sebagai medium pertukaran metabolit (Junqueira, 2007).

Osteosit merupakan sel tulang yang berbentuk gepeng berada dalam area lakuna sistem havers tulang keras. Osteosit jumlahnya 10 kali dari jumlah osteoblas. Osteosit adalah sel tulang yang paling banyak dan berumur panjang dan ditemukan di seluruh kerangka, berbeda dengan osteoblas hidup yang lebih pendek dan osteoklas yang hanya ditemukan sementara di permukaan tulang (Graham *et al.*, 2013). Osteosit melalui penonjolan plasma membran (panjang 5 - 30  $\mu\text{m}$ ) dalam kanalikuli dapat berkomunikasi dengan osteoblas. Selanjutnya osteoblas berkomunikasi dengan sel dalam sumsum tulang dengan

memproyeksikan selnya ke sel endotel di sinusoid, dengan demikian lokasi strategis osteosit menjadikan sel ini sebagai kandidat sel mekanosensori untuk deteksi kebutuhan tulang, menambah atau mengurangi massa tulang selama adaptasi fungsi skeletal. Osteosit juga mempunyai kemampuan deteksi perubahan aliran cairan interstisial dalam kanalikuli yang dihasilkan akibat pembebanan mekanik dan deteksi perubahan kadar hormon, oleh karena itu gangguan pada jaringan osteosit meningkatkan fragilitas tulang.

Osteosit aktif mensekresi faktor pertumbuhan yang merangsang pembentukan tulang. Selama perkembangan dan maturasi, osteosit mengekspresikan gen-gen yang spesifik. Adapun ekspresi gen protein penanda utama dan fungsi osteosit adalah sebagai berikut (Chen *et al.*, 2015):

Protein	Main function
E11/gp38	Formation of cell process
MT1-MMP	Matrix degradation and canalicular formation
PHEX	Regulating phosphate metabolism
DMP1	Regulating phosphate metabolism and mineralization
FGF23	Controlling phosphate metabolism
Dkk1	Inhibiting bone formation
Sclerostin	Inhibiting bone formation
RANKL	Osteoclast differentiation and survival
OPG	Inhibitor of osteoclast differentiation

**Gambar 2.3 Ekspresi Gen Protein dan Fungsi Osteosit**

## 2.4 Estrogen

### 2.4.1 Definisi

Estrogen adalah kelompok senyawa steroid yang berfungsi utama sebagai hormon seks wanita. Estrogen dihasilkan oleh *theca interna* folikel di ovarium (Murray *et al.*, 2012). Terdapat tiga jenis estrogen endogen utama yang memiliki efek estrogenik yaitu estrone, estradiol, dan estriol (Okkerman, 2001). 17- $\beta$  estradiol (E2) merupakan estrogen yang paling dominan dan paling aktif secara

biologis yang memiliki potensitas 12 kali estrone dan 80 kali estriol. 17- $\beta$  estradiol memiliki 18 rantai karbon dan *aromatic A-ring*. Estrone juga diproduksi ovarium dalam jumlah kecil, namun sebagian besar diproduksi oleh korteks adrenal di jaringan perifer dari androgen yang disekresi korteks adrenal dan sel theca ovarium. Estriol merupakan estrogen yang lemah. Estriol adalah produk oksidatif turunan estradiol dan estrone, dengan konversi yang umumnya terjadi di liver (Hall et Guyton, 2016).

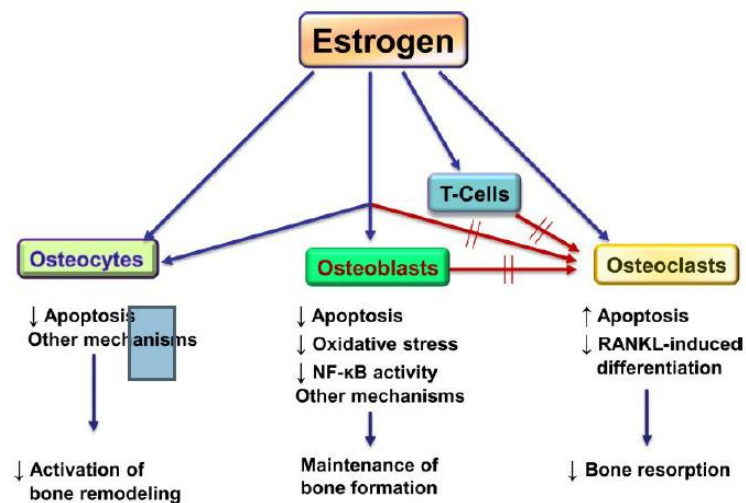
Estrogen sebagian besar diproduksi di ovarium. Namun, organ dan jaringan lain seperti jaringan adiposa, otak (sel saraf, astrosit, dan mikroglia), tulang, dan sistem imun juga turut serta memproduksi estrogen (Wise *et al.*, 2009). Hormon ini sangat diperlukan untuk proses homeostasis glukosa, kekuatan sistem imun, densitas tulang, kesehatan kardiovaskular, fertilitas, fungsi neuronal (Patel *et al.*, 2018), keseimbangan metabolisme (Hamilton *et al.*, 2017), pertumbuhan endometrium, menghambat *follicle stimulating hormone* (FSH) oleh pituitari, antioksidan, antiinflamasi dan pertumbuhan organ reproduksi dan ciri sekundernya (Horstman *et al.*, 2012). Hormon ini menyebabkan perkembangan dan mempertahankan tanda-tanda kelamin sekunder pada wanita, seperti panyudara, dan juga terlibat dalam penebalan endometrium maupun dalam pengaturan siklus haid (Dorland, 2006).

#### **2.4.2 Pengaruh Estrogen Terhadap Osteosit**

Pensinyalan estrogen diketahui penting dalam pemeliharaan massa tulang dan hilangnya estrogen karena menopause atau ovariectomi menyebabkan hilangnya massa tulang (Prideaux *et al.*, 2016). Pada wanita pasca menopause, keadaan defisiensi estrogen menyebabkan penurunan densitas tulang dan terdapat *high-turnover metabolism* sehingga terjadi ketidakseimbangan antara



osteoblas, osteosit dan osteoklas dan menyebabkan *postmenopausal osteoporosis* (Horstman *et al.*, 2012). Estrogen merupakan hormon seks steroid memegang peran yang sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas sel osteoblas, osteosit, maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin-parakrin. Peningkatan remodeling tulang dan resorpsi tulang pada keadaan defisiensi estrogen dikaitkan dengan peningkatan pembentukan tulang pada tingkat jaringan. Namun masih ada celah antara resorpsi tulang dan pembentukan karena laju pembentukan tidak mampu mengikuti laju resorpsi, yang mengakibatkan hilangnya tulang secara bersih. Oleh karena itu, kekurangan steroid seks dikaitkan dengan cacat dalam pembentukan tulang. Salah satunya ketika kurangnya hormone estrogen akan terjadi penurunan jumlah osteosit diakibatkan oleh berkurangnya proliferasi atau tingginya apoptosis osteosit ataupun sel prekursornya, yang keduanya dipengaruhi oleh adanya inflamasi (Graves, 2011).



**Gambar 2.4 Regulasi Estrogen Terhadap Turnover Tulang**  
(Okman-Kilic, 2015)

Berdasarkan bukti yang ada, saat ini setidaknya ada tiga mekanisme utama dimana defisiensi estrogen dapat menyebabkan defisit relatif dalam pembentukan tulang melalui efek langsung pada osteoblas: peningkatan apoptosis, peningkatan stres oksidatif, dan peningkatan aktivitas NF- $\kappa$ B (Khosla *et al.*, 2012). Estrogen memainkan peran penting dalam pemeliharaan homeostasis tulang dengan menghambat resorpsi tulang yang berlebihan dan apoptosis osteoblas / osteosit (Florencio-Silva *et al.*, 2018). Estrogen telah terbukti menghambat apoptosis osteosit dan meningkatkan umur osteosit, sehingga meningkatkan kapasitas fungsional masing-masing osteosit. Pada tingkat molekuler, efek estrogen pada pengurangan apoptosis osteosit adalah karena aktivasi jalur pensinyalan Src / Shc / ERK (Kousteni *et al.*, 2001).

## **2.5 Ciplukan (*Physalis angulata L.*)**

### **2.5.1 Taksonomi dan Karakteristik**



**Gambar 2.5 Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata L.*)**

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (2018), taksonomi dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata L.*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Tracheophyta  
Class : Magnoliopsida  
Ordo : Solanales  
Famili : Solanaceae  
Genus : *Physalis* L.  
Spesies : *Physalis angulata* L.

*Physalis angulata* L. adalah tumbuhan herba annual/tahunan dengan tinggi 0,1-1 m. Batang pokoknya tidak jelas, percabangan menggarpu, bersegi tajam, berusuk, berongga, bagian yang hijau berambut pendek atau boleh dikatakan gundul. Daunnya tunggal, bertangkai, bagian bawah tersebar, diatas berpasangan, helaian berbentuk bulat telur-bulat memanjang-lanset dengan ujung runcing, ujung tidak sama (runcing-tumpul-membulat-meruncing), bertepi rata atau bergelombang-bergigi, 5-15 x 2,5-10,5 cm. Bunga tunggal, di ujung atau ketiak daun, simetri banyak, tangkai bunga tegak dengan ujung yang menganggu, langsing, lembayung, 8-23 mm, kemudian tumbuh sampai 3 cm. Kelopak berbentuk genta, 5 cuping runcing, berbagi, hijau dengan rusuk yang lembayung. Mahkota berbentuk lonceng lebar, tinggi 6-10 mm, kuning terang dengan noda-noda coklat atau kuning coklat, di bawah tiap noda terdapat kelompokan rambut-rambut pendek yang berbentuk V. Tangkai benang sarinya kuning pucat, kepala sari seluruhnya berwarna biru muda. Putik gundul, kepala putik berbentuk tombol, bakal buah 2 daun buah, banyak bakal biji. Buah ciplukan berbentuk telur, panjangnya sampai 14 mm, hijau sampai kuning jika masak, berurat lembayung, memiliki kelopak buah.

Ciplukan adalah tumbuhan asli Amerika yang kini telah tersebar secara luas di daerah tropis di dunia. Di Jawa tumbuh secara liar di kebun, tegalan, tepi

jalan, kebun, semak, hutan ringan, tepi hutan. Ciplukan biasa tumbuh di daerah dengan ketinggian antara 1-1550 m dpl.

### **2.5.2 Manfaat di Masyarakat**

*Physalis angulata* L. dipercaya memiliki efek hipotensif, diuretik, analgetik, anti inflamasi, anti spasmodik, dan anti septic (Neelam, 2016). Dalam lingkungan masyarakat, tanaman ini selama ini digunakan sebagai obat antihipertensi, dysuria, asma, diabetes, sakit perut, cacingan, demam, penyakit kulit, dan luka-luka. Setiap bagian dari tanaman ini memiliki manfaat yang tersendiri. Pada bagian akar pada umumnya digunakan sebagai obat cacing dan penurun demam. Daunnya digunakan sebagai penyembuh patah tulang, bisul, borok, keseleo, nyeri perut, dan kencing nanah. Pada bagian buah dapat dimakan untuk mengobati epilepsy, penyakit kuning, dan diuria (Heyne, 1987).

### **2.5.3 Kandungan Kimia**

Studi fitokimia terhadap *Physalis angulata* mengungkapkan bahwa *Physalis angulata* memiliki beberapa komponen kimia utama seperti Physalins, Withanolides dan Carotenoid. Dari batang dan daun dari *P.angulata*, didapatkan 5 jenis Physalin yaitu E,F,H,I,K beserta Physalin B,G, dan D (Row *et al.*, 1978,1980). Ditemukan juga 2 physalin baru yaitu U dan V beserta 7 komponen ergostane steroidal (Kuo *et al.*, 2006), dan 1 physalin minor W (Damu *et al.*, 2007). Withanolides adalah kumpulan senyawa steroid alam dengan rangka ergostane yang rantai karbon C-22 dan C-26nya teroksidasi sempurna untuk membentuk cincin  $\delta$ -lactone. Jenis withanolides yang didapatkan pada *P.angulata* adalah Physagulin A,B,C,D yang didapat dari batang dan daun (Shinggu *et al.*, 1992) ; Physagulin F,H,I,J,K, Withangulatin A, Withaminimin (Nagafuji *et al.*, 2004); Physagulin L,M,N,O, pubesenolide (He *et al.*, 2007),

Physangulidines A,B,C (Jin *et al.*, 2012). Carotenoid adalah pigmen organik yang dihasilkan tanaman yang berfotosintesis. Carotenoid yang didapat pada *P.angulata* adalah all-trans- $\beta$ -carotene, 9-cis- $\beta$ -carotene, dan all-trans- $\alpha$ -cryptoxanthin (De-Rosso dan Mercadante, 2007)

Penelitian Permatasari (2010) membuktikan bahwa *Physalis* juga memiliki efek estrogenik. Pada kultur sel endothel (HUVECs), pemberian ekstrak daun *Physalis* dapat memicu sinyal transduksi  $Ca^{2+}$ , ekspresi Endothelial Nitric Oxide (eNOS), dan Nitric Oxide (NO).

#### **2.5.4 Uji Laboratorium *Physalis* sp.**

Berbagai penelitian telah dilaksanakan untuk mengetahui lebih lanjut terkait manfaat *Physalis*. Adapun hasil penelitian manfaat *Physalis* adalah sebagai berikut:

- a) Penelitian Lestari (2016) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak methanol daun ceplukan (*Physalis minima* L.) mampu mencegah fibrosis jantung dengan menghambat TNF- $\alpha$  pada tikus yang diovariectomi. Estrogen memiliki efek antiinflamasi dan kardioprotektif. Keadaan hipoestrogen pada tikus memicu terjadinya peningkatan TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  menginduksi apoptosis sel jantung melalui jalur eksternal, yang kemudian memicu *remodeling* yang ditandai dengan fibrosis. Ekstrak *physalis* mengandung withanolides yang memiliki efek estrogenik dan juga memiliki efek antifibrotik. Pemberian ekstrak *physalis* menunjukkan penurunan TNF- $\alpha$  yang signifikan, meskipun tidak diikuti dengan fibrosis yang kembali normal.
- b) Estrogen memiliki aktifitas antioksidan yang bisa mencegah radikal bebas. Keadaan hipoestrogen pada wanita menopause menyebabkan

menurunnya antioksidan dan memicu stress oksidatif, sehingga dapat meningkatkan berbagai kelainan salah satunya peningkatan resiko periodontitis (Permatasari *et al.*, 2013). Terjadinya stress oksidatif ditandai dengan peningkatan kadar MDA (Malonialdehid). Dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Physalis* yang mengandung withanolides sebesar 2500 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA mandibula tikus wistar betina yang telah divariektomi mendekati kadar MDA mandibula tikus normal.

- c) Kecemasan merupakan salah satu gejala dari sindroma pasca menopause yang diduga memiliki koerlasi dengan sitokin proinflamasi IL-6. Keadaan hipoestrogen menyebabkan IL-6 pada otak naik. Penelitian Nurfitriya (2015) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *physalis* 500 mg/kgBB mamou menurunkan derajat kecemasan dengan melakukan tes Elevated Maze Puzzle.
- d) Penelitian Permatasari (2010) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *physalis* pada pada kultur sel endotel pembuluh darah (HUVECs) secara *in vitro* dapat memicu sinyal transduksi  $Ca^{2+}$ , ekspresi endothelial nitric oxide (eNOS), dan nitric oxide (NO). Hasil kajian teoretis menunjukkan bahwa dalam daun *physalis* terkandung senyawa dengan unsur steroid yaitu *physalin*. Pada penelitian berikutnya, pemberian *physalin* juga ternyata juga memicu sinyal transduksi  $Ca^{2+}$ , ekspresi endothelial nitric oxide (eNOS), dan nitric oxide (NO). Kemudian, dilakukanlah penelitian untuk membuktikan *physalin* dan ekstrak *physalis* bekerja pada reseptor estrogen (ER) dengan melihat adanya *colocalized* antara ER dan eNOS di inti

menggunakan *confocal laser microscope* dengan 17- $\beta$  estradiol sebagai kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 17- $\beta$  estradiol menstimulasi *nuclear colocalization* dari ER dan eNOS. Pemberian ekstrak physalis ternyata juga menstimulasi *nuclear colocalization* dari ER dan eNOS. Dengan demikian, diduga kuat bahwa terdapat kesamaan mekanisme kerja antara ekstrak physalis dan 17- $\beta$  estradiol sehingga *P.minima* bisa digolongkan sebagai fitoestrogen baru yang memiliki *estrogen like effect*. Akan tetapi, pemberian physalin yang diduga sebagai senyawa aktif justru tidak menstimulasi translokasi eNOS ke nucleus. Dengan demikian, diduga bahwa physalin bukanlah merupakan senyawa aktif estrogenik *P.minima* (Permatasari *et al.*, 2010).

Dengan demikian, sementara ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak physalis dapat mengatasi *postmenopausal syndrome* pada model hewan menopause bukan melalui perbaikan kadar estradiol. Pada penelitian terdahulu ekstrak daun *Physalis minima* juga mengandung withanolides (Permatasari *et al.*, 2013). Withanolides merupakan sumber yang kaya akan fitoestrogen (Dongaonkar *et al.*, 2005). Dengan demikian diduga bahwa efek farmakologis ekstrak daun *Physalis minima* yang ada terkait dengan efek estrogenik withanolides (Permatasari *et al.*, 2013).

## **2.6 Albumin**

### **2.6.1 Definisi**

Albumin merupakan protein plasma yang paling banyak dalam tubuh manusia, yaitu sekitar 55-60% dan total kadar protein serum normal adalah 3,8-5,0 g/dl. Albumin terdiri dari rantai tunggal polipeptida dengan berat molekul

66,4 kDa dan terdiri dari 585 asam amino. Pada molekul albumin terdapat 17 ikatan disulfida yang menghubungkan asam-asam amino yang mengandung sulfur. Molekul albumin berbentuk elips sehingga dengan bentuk molekul seperti itu tidak akan meningkatkan viskositas plasma dan larut sempurna. Kadar albumin serum ditentukan oleh fungsi laju sintesis, laju degradasi, dan distribusi antara kompartemen intravaskular dan ekstrasvaskular. Cadangan total albumin 3,5-5,0 g/kg BB atau 250-300 g pada orang dewasa sehat dengan berat 70 kg, dari jumlah ini 42% berada di kompartemen plasma dan sisanya di dalam kompartemen ekstrasvaskular (Evans, 2002).

### **2.6.2 Fungsi Albumin**

Berdasarkan fungsi dan fisiologis, secara umum albumin di dalam tubuh mempertahankan tekanan onkotik plasma, peranan albumin terhadap tekanan onkotik plasma mencapai 80% yaitu 25 mmHg. Albumin mempunyai konsentrasi yang tinggi dibandingkan dengan protein plasma lainnya, dengan berat molekul 66,4 kDa lebih rendah dari globulin serum yaitu 147 kDa, tetapi masih mempunyai tekanan osmotik yang bermakna. Efek osmotik ini memberikan 60% tekanan onkotik albumin. Sisanya 40% berperan dalam usaha untuk mempertahankan intravaskular dan partikel terlarut yang bermuatan positif (Dubois *et al.*, 2006).

Albumin terkenal karena kapasitas pengikatan ligannya yang luar biasa. Albumin adalah protein serbaguna dengan antioksidan, imunomodulator, sifat detoksifikasi dan dapat bertindak sebagai pembawa obat yang kuat. Selain itu albumin dapat digunakan sebagai protein eksogen atau endogen (Bairagi *et al.*, 2015). Secara lengkap fungsi dan peran albumin dalam tubuh adalah sebagai berikut (Nicholson *et al.*, 2000):



a. Albumin sebagai pengikat dan pengangkut

Albumin akan mengikat secara lemah dan reversibel partikel yang bermuatan negatif dan positif, dan berfungsi sebagai pembawa dan pengangkut molekul metabolit dan obat. Meskipun banyak teori tentang pentingnya albumin sebagai pengangkut dan pengikat protein, namun masih sedikit mengenai perubahan yang terjadi pada pasien dengan hipoalbuminemia.

b. Efek antikoagulan albumin

Albumin mempunyai efek terhadap pembekuan darah. Kerjanya seperti heparin, karena mempunyai persamaan struktur molekul. Heparin bermuatan negatif pada gugus sulfat yang berikatan antitrombin III yang bermuatan positif, yang menimbulkan efek antikoagulan. Albumin serum juga bermuatan negatif.

c. Albumin sebagai buffer

Albumin berperan sebagai buffer dengan adanya muatan sisa dan molekul albumin dan jumlahnya relatif banyak dalam plasma. Pada keadaan pH normal albumin bermuatan negatif dan berperan dalam pembentukan gugus anion yang dapat mempengaruhi status asam basa. Penurunan kadar albumin akan menyebabkan alkalosis metabolik, karena penurunan albumin 1 g/dl akan meningkatkan kadar bikarbonat 3,4 mmol/L dan produksi basa >3,7 mmol/L serta penurunan anion 3 mmol/L.

d. Efek antioksidan albumin

Albumin dalam serum bertindak memblokir suatu keadaan neurotoxic oxidant stress yang diinduksi oleh hidrogen peroksida atau copper,

asam askorbat yang apabila teroksidasi akan menghasilkan radikal bebas.

- e. Selain yang disebut di atas albumin juga berperan mempertahankan integritas mikrovaskuler sehingga mencegah masuknya kuman-kuman usus ke dalam pembuluh darah, sehingga terhindar dari peritonitis bakterialis spontan.

### **2.6.3 Keadaan Albumin Pada Wanita Menopause**

Total serum protein dan kadar albumin menurun secara signifikan pada wanita pasca menopause. Keadaan hipoalbumin adalah keadaan dimana kadar albumin dalam serum darah  $<2,5$  g/dL (Jagtap *et al.*, 2017). Albumin berfungsi untuk menjaga tekanan osmotik plasma, mengikat kation, hormon (Bairagi *et al.*, 2015) dan juga meningkatkan kadar kalsium pada daerah diafisis tulang yang memineralisasi tulang (Yadav *et al.*, 2015). Albumin memiliki fungsi sebagai transporter termasuk mineral yang dibutuhkan untuk pembentukan matriks tulang. Pada saat wanita mengalami menopause, kadar albumin dalam tubuh juga mengalami penurunan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Jagtap *et al.* (2017) didapatkan bahwa pada wanita menopause dengan osteoporosis, kadar serum albumin rendah dan diduga mengalami keadaan hypoalbuminemia. Keadaan hipoalbuminemia pada wanita pasca menopause disebabkan karena terjadinya proses mikroalbuminuria (Ahn *et al.*, 2016). Sehingga kadar serum albumin yang rendah juga sangat berpengaruh terhadap terjadinya osteoporosis.

## **2.7 Hewan Coba Tikus *Rattus norvegicus***

### **2.7.1 Taksonomi dan Karakteristik**



**Gambar 2.6 Tikus *Rattus norvegicus***

Menurut *Interagency Taxonomic Information System (2018)*, taksonomi dari hewan coba tikus wistar adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Phylum : Vertebrata  
Class : Mammalia  
Ordo : Rodentia  
Subordo : Odontoceti  
Famili : Muridae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara sempurna, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (Depkes, 2008).

### 2.7.2 Tikus *Rattus norvegicus* Model Menopause

Pada penelitian ini untuk mencari dasar-dasar biologis pada transisi menstruasi sulit dievaluasi pada manusia karena banyaknya faktor kehidupan yang tidak mudah disingkirkan seperti usia, pola makan, status sosial ekonomi, paparan lingkungan, dll. Sehingga tikus dan hewan pengerat tikus *rattus norvegicus* dipilih sebagai hewan coba laboratorium, karena terdapat beberapa kemiripan fitur dan fungsi tubuh dengan manusia dan masa hidup yang cukup pendek (Koebele dan Nelson, 2016). Kesamaan fitur dan perubahan pada masa transisi menopause antara tikus dan manusia antara lain adanya penurunan jumlah folikel, siklus ireguler, fluktuasi hormon steroid, dan juga fertilitas yang ireguler.

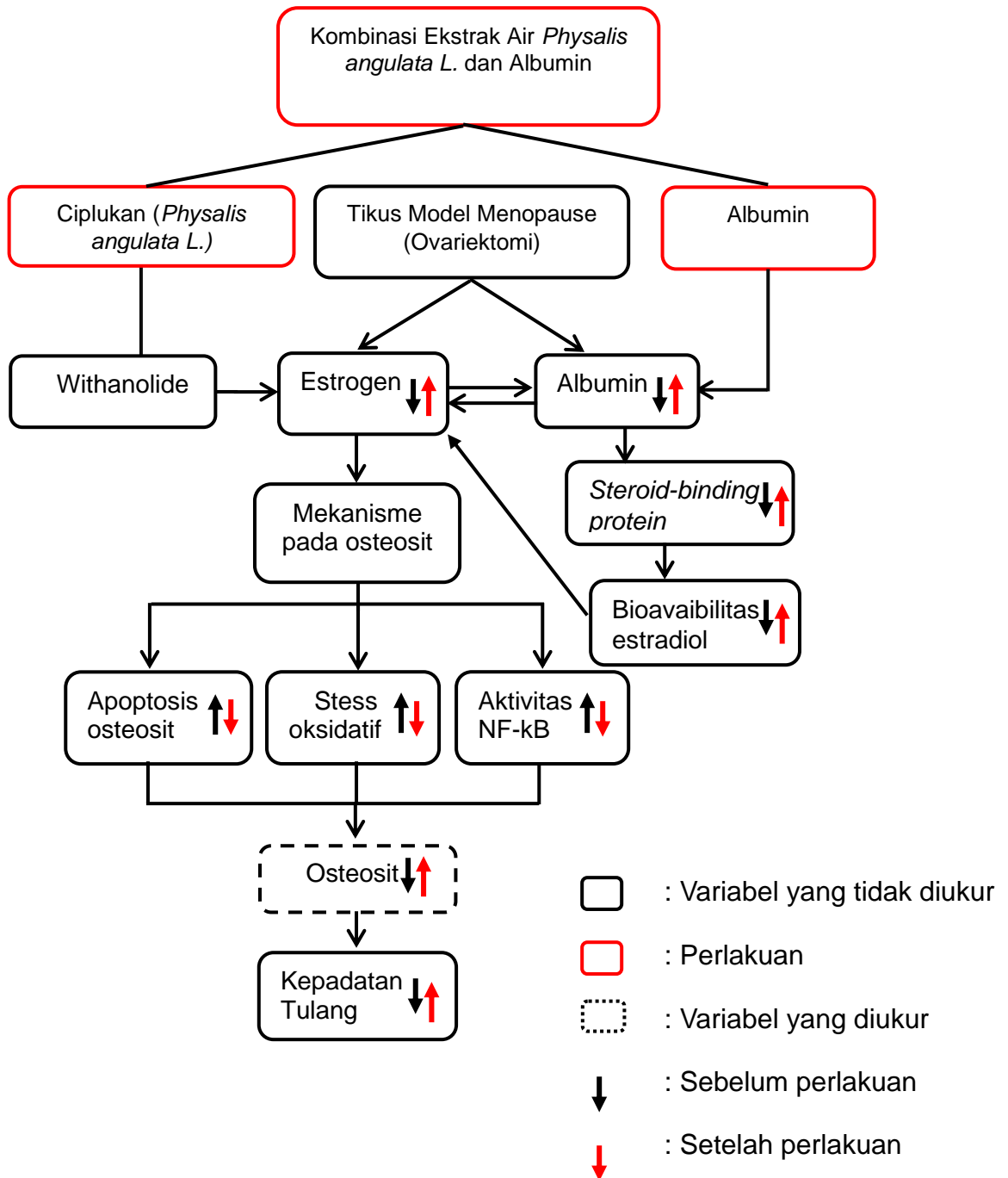
Terdapat beberapa perbedaan utama antara sistem reproduksi manusia dan tikus. Tikus memiliki siklus estrous, sedangkan manusia memiliki siklus menstruasi. Lama siklus estrous 4-5 hari, terdiri dari empat fase, yakni proestrous, estrous, metestrous, dan diestrous. Pada tikus *Rattus norvegicus*, durasi estrous 10-20 jam, waktu ovulasi 8-11 jam setelah estrous, dan menopause natural terjadi pada bulan ke 9-18 (Koebele dan Nelson, 2016).

Tikus model menopause dibuat dengan melakukan ovariektomi. Ovariektomi umumnya dilakukan pada hewan pengerat seperti tikus, karena uterus tikus cepat kembali ke ukuran normal setelah dilakukan pengambilan ovarium (Olson dan Bruce, 1986).

### BAB III

## KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



### **Uraian Kerangka Konsep**

Tikus yang diovariectomi merupakan hewan coba yang digunakan untuk model menopause. Ketika dalam keadaan menopause tubuh akan kehilangan salah satu sumber produksi estrogen. Hal ini menyebabkan keadaan hypoestrogen (Murano *et al.*, 2003). Defisiensi estrogen dapat menyebabkan defisit relatif dalam pembentukan tulang melalui efek langsung pada osteosit yaitu peningkatan apoptosis, peningkatan stres oksidatif, dan peningkatan aktivitas NF- $\kappa$ B (Khosla, 2012). Hal tersebut mengakibatkan osteosit dalam tulang berkurang. Ketika osteosit dalam tulang berkurang maka pembentukan matriks tulang baru akan terhambat sehingga dapat menyebabkan kepadatan tulang berkurang yang berakibat pada keadaan osteoporosis (Manolagas, 2000).

Pada saat yang bersamaan, keadaan ovariektomi atau menopause juga dapat dapat memediasi terjadinya penurunan albumin sehingga menciptakan keadaan hipoalbuminemia (Jagtap *et al.*, 2017). Albumin merupakan protein dalam plasma yang memiliki fungsi *steroid-binding protein* sebagai transporter mineral (Afshinnia *et al.*, 2016). Ketika kadar albumin dalam tubuh berkurang maka tubuh kehilangan transporter untuk mengedarkan estrogen pada beberapa organ tertentu. Selain itu, albumin juga dapat meningkatkan bioavailabilitas serta paruh waktu obat sehingga dapat bertahan lebih lama dan dapat terserap dengan baik pada target organ, salah satunya pada tulang (Bairagi *et al.*, 2015).

*Physalis angulata L.* Merupakan tanaman herba yang memiliki berbagai kandungan senyawa kimia, salah satunya fitoestrogen. Fitoestrogen adalah senyawa estrogenik yang memiliki struktur dan fungsi seperti 17 $\beta$ -estradiol dengan cara berikatan dengan reseptor estrogen (Cos *et al.*, 2003). Salah satu senyawa dalam *Physalis angulata L.* adalah withanolides yang merupakan

senyawa dengan struktur dan fungsi mirip dengan estrogen sehingga dapat diusulkan sebagai fitoestrogen (Permatasari *et al.*, 2010).

### **3.2 Hipotesis Penelitian**

Hipotesis pada penelitian ini adalah pemberian formulasi ekstrak air ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dapat memberikan efek peningkatan jumlah osteosit pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca ovariektomi.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental murni (*True Experiment Design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek formulasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angualata L.*) dan albumin terhadap jumlah osteosit pada tikus pasca ovariektomi.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

- a. Kriteria inklusi: kelamin betina, usia 12 minggu, berat badan  $\pm 200$  gram dan dalam kondisi sehat fisik ditandai dengan mata jernih, rambut putih dan tidak rontok, aktif bergerak, dan feces tidak lembek.
- b. Kriteria eksklusi: Tikus jantan, usia kurang dari 12 minggu, tikus kelompok ovariektomi yang mati sebelum pembedahan untuk pengambilan sampel organ.

##### 4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus wistar model menopause yang telah diovariektomi kemudian diberikan perlakuan. Teknik sampling yang dilakukan adalah *simple random sampling*. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel sesuai dengan rumus Federer (1977):

$(n-1)(t-1) \geq 15$      $n$  : jumlah sampel,  $t$  : jumlah kelompok perlakuan

Pada penelitian ini  $t = 7$  sehingga jumlah pengulangan adalah:

$(n-1)(t-1) \geq 15$



$$(n-1) (7-1) \geq 15$$

$n-1 \geq 15:6$ ,  $n > 3,5$  jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap kelompok adalah minimal 4 hewan coba. Sampel penelitian ini berjumlah 35 ekor tikus yang dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan sehingga setiap kelompok berisikan 5 ekor tikus. Pada setiap kelompok berjumlah 5 ekor tikus setelah penambahan 1 ekor dari jumlah minimal pengulangan sebagai cadangan apabila terjadi hal-hal yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak air daun *Physalis angulata L.* dan Albumin.

#### **4.3.2 Variabel Tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah osteosit pada tulang tibia tikus.

### **4.4 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk pemeliharaan, pemberian perlakuan, dan pembedahan hewan coba. Pembuatan slide histologi jaringan organ tibia serta penghitungan jumlah osteosit dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga September 2018.

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

#### **4.5.1 Bahan dan Alat Ekstraksi *Physalis angulata L.* dan Albumin**

Toples kaca, lampu TL, blower, refraktometer, spatula, wadah sampel, rotari evaporator, aluminium foil, metanol teknis, aquades.

#### **4.5.2 Bahan dan Alat Perawatan Tikus**

Kandang berupa bak plastik berukuran 30 cm x 45 cm x 15 cm sebanyak 30 buah dengan tutup anyaman kawat berongga (BPPOM, 2014). Tiap kandang berisi 5 tikus. Kandang diletakkan pada suhu ruang 20-25°C dan siklus gelap terang 12 jam/12 jam. Alas sekam pada kandang diganti 2 kali minggu. Makanan tikus berupa pakan PAR-S jenis comfeed (complete feed) br-1 berbentuk pellet dengan kebutuhan harian 40 gram/ekor. Minum tikus diletakkan pada botol minum dengan kebutuhan harian 60 ml/ekor.

#### **4.5.3 Bahan dan Alat Ovariektomi**

Alat yang digunakan adalah gunting bedah, pinset, cawan petri, papan bedah, tali kur, jarum pentul, catgut, benang catgut, silet, kassa steril, plester dan kapas. Bahan yang digunakan adalah novalgine (ampul 2L), Gentamycin (ampul, 2 mL), alcohol 70%, nebacetin powder. Pembiusan dilakukan dengan *disposable spuit* 1 ml dan ketamine dosis 0,2 cc.

#### **4.5.4 Bahan dan Alat Pemberian Perlakuan**

Pemberian dilakukan dengan cara per oral menggunakan sonde (pipa orogastrik) yang dihubungkan dengan spuit 3 cc, kombinasi ekstrak air daun *Physalis angulata L.* dan Albumin.

#### **4.5.5 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ yang Akan Diteliti**

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, cawan petri, papan bedah, ketamine, wadah plastik dan tutup 30 buah untuk tempat sampel. Tikus dibedah dan diambil organ sampel. Organ sampel yang telah diambil diletakkan dalam wadah plastik dengan label dan difiksasi dengan formalin 10% untuk kemudian dibuat preparat histologi.

#### **4.5.6 Alat Pembuatan Slide Histopatologi**

- Mesin Tissue Tex Processor
- Microtome
- Slide
- Cover glass
- Pewarna HE

#### **4.5.7 Bahan dan Alat Observasi Jumlah Osteosit Tibia**

Alat yang digunakan untuk observasi jumlah osteosit tibia tikus adalah Mikroskop merk Olympus XC10 dengan perbesaran 400x di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### **4.6 Definisi Operasional**

#### **4.6.1 Tikus Model Menopause**

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina dapat digunakan sebagai hewan model menopause (Wong *et al.*, 2016). Untuk membuat model menopause, tikus dengan jenis kelamin betina dilakukan pembedahan ovariektomi. Ovariektomi dilakukan operasi pengangkatan ovarium, oviduk, dan ujung dari cornu uteri secara bilateral. Keberhasilan ovariektomi dilihat dari penurunan kadar estradiol serum dan penurunan kadar FSH yang terjadi 5 minggu setelah ovariektomi (Arsana *et al.*, 2012).

#### **4.6.2 Ciplukan (*Physalis angulata L.*)**

*Physalis angulata L.* adalah tumbuhan yang dapat ditemukan di daerah tropis. Dalam penelitian ini bibit ciplukan diperoleh dari Universitas Brawijaya (UB) dan diidentifikasi di Institut Teknologi Bandung (ITB). Pembuatan serbuk ekstrak air ciplukan dilakukan di PT Ismut Fitomedika Indonesia. Daun diekstraksi dengan cara dikeringkan dengan oven, ditimbang (5g), ditambah air mendidih

sebanyak 5 mL kemudian di filter dan sisa ekstraksinya di ekstraksi kembali sebanyak 2 kali. Dosis ekstrak dinyatakan dalam mg/kg BB.

#### **4.6.3 Albumin**

Albumin merupakan protein plasma yang mencapai 55 – 60% dari total protein. Albumin yang digunakan dalam penelitian ini disediakan oleh pihak mitra PT Ismut Makassar. Dosis albumin dinyatakan dalam g/kgBB.

#### **4.6.4 Jumlah Osteosit**

Osteosit merupakan sel tulang yang berbentuk gepeng berada dalam area lakuna sistem havers tulang keras. Jumlah osteosit yang dihitung dalam penelitian ini adalah osteosit yang terdapat pada area lacuna permukaan tulang tibia tikus *Rattus norvegicus* yang telah dilakukan pengecatan HE. Hitung jumlah osteosit diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Dihitung rerata osteosit pada 20 area lapang pandang tiap preparat tulang tibia pada masing-masing kelompok.

### **4.7 Prosedur Penelitian**

#### **4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba**

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar betina dipelihara di dalam kandang Laboratorium Farmakologi FKUB. Sebelum penelitian dimulai, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu dengan dengan penimbangan berat badan. Tikus diletakkan dalam kandang berupa bak plastik ukuran 30 cm x 45 cm x 15 cm, dalam suhu ruang 20-25°C dan siklus gelap terang 12 jam/12 jam. Kandang beri alas sekam diganti 2 kali seminggu. Tikus diberi pakan berupa pakan PAR-S berbentuk pellet dengan kebutuhan harian 40 gram/ekor. Minum tikus diletakkan pada botol

minum dengan kebutuhan harian 60 ml/ekor, makan dan minum diberi setiap hari pada sore hari.

#### **4.7.2 Ekstraksi Daun *Physalis angulata* L. dan Penyediaan Albumin**

Ekstraksi *Physalis angulata* L. dengan metode maserasi dan evaporasi. Bahan simplisia yang didapatkan dari bibit tanaman UB, berumur 3 bulan dikeringkan menggunakan oven. Simplisia daun (serbuk kering) ditimbang (5 g) dan ditambahkan air mendidih (50 ml) selama 1 jam kemudian difilter. Sisa ekstraksi dilakukan ekstraksi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Hasil filtrasi dicampur dan disimpan dalam 4°C (Wu *et al.*, 2006).

Albumin yang digunakan pada penelitian ini disediakan oleh pihak mitra PT Ismut Fitomedika Indonesia. Pemberian dilakukan pada dosis 3.3 g/kgBB, 6.7 g/kgBB, dan 10 g/kgBB, yang dikombinasikan dengan ekstrak air daun *Physalis angulata* L. dosis 1500 mg/kgBB.

#### **4.7.3 Pemberian Ekstrak *Physalis angulata* L. dan Albumin**

Pemberian ekstrak *Physalis angulata* L. dan albumin dan pemberian tunggal ekstrak *Physalis angulata* L. dilakukan menggunakan metode sonde dengan menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit. Diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 1, 2, 3, dan 4 mulai minggu ke 5 hingga minggu ke-9 sebanyak 5cc/tikus/hari.

#### **4.7.4 Pembedahan Tikus**

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan dengan ketamin. Tikus yang sudah dianestes kemudian difiksasi kemudian dibedah. Tikus diletakkan pada penjepit (*block holder*), tulang tibia kanan diambil dan diletakkan pada wadah plastik berisi formalin 10%.

#### **4.7.5 Penguburan Tikus**

Penguburan tikus yang telah dibedah. Setelah pembedahan, organ tikus dikubur di tanah dengan ukuran 20cm x 20cm kedalaman 30 cm.

#### **4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi**

Langkah-langkah dalam pembuatan preparat histopatologi adalah sebagai berikut:

##### **a. Proses pemotongan jaringan berupa makros**

1. Memfiksasi jaringan atau spesimen penelitian dengan formalin 10% atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum proses berikutnya.
2. Memilih jaringan terbaik sesuai dengan lokasi yang akan diteliti.
3. Memotong jaringan kurang lebih ketebalan 2-3 mm
4. Memberikan kode sesuai dengan kode gross peneliti dan memasukkan ke kaset.
5. Kemudian, memproses jaringan dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 menit sesuai dengan standar Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.
6. Sampai alarm bunyi tanda selesai.

##### **b. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan**

1. Mengangkat jaringan dari mesin Tissue Tex Prosesor.
2. Mengeblok jaringan dengan parafin sesuai kode jaringan
3. Memotong jaringan dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron.

##### **c. Proses Deparafinisasi**

1. Setelah memotong dengan ketebalan 3-5 mikron, menaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat

2. Kemudian, memasukkan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing-masing 20 menit.
3. Setelah itu, memasukkan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan memasukkan air mengalir selama 15 menit.

**d. Proses Pewarnaan (HE)**

1. Pewarna utama menggunakan Harris Hemaktosilin selama 10-15 menit.
2. Mencuci dengan air mengalir selama 15 menit.
3. Dichelupkan ke dalam alkohol asam 1% sekitar 2-5 celup
4. Dichelupkan ke dalam amonia lithium karbonat sekitar 3-5 celup (jika kurang biru)
5. Eosin 10-15 menit

**e. Alkohol bertingkat:**

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| 1. Alkohol 70%     | 3 menit |
| 2. Alkohol 80%     | 3 menit |
| 3. Alkohol 96%     | 3 menit |
| 4. Alkohol Absolut | 3 menit |

**f. Penjernihan (Clearing) :**

- |          |          |
|----------|----------|
| 1. Xylol | 15 menit |
| 2. Xylol | 15 menit |

**g. Mounting dengan entelan dan deckglass**

Menutup slide dengan cover glass dan biarkan sampai kering pada suhu ruangan. Slide siap untuk diamati.

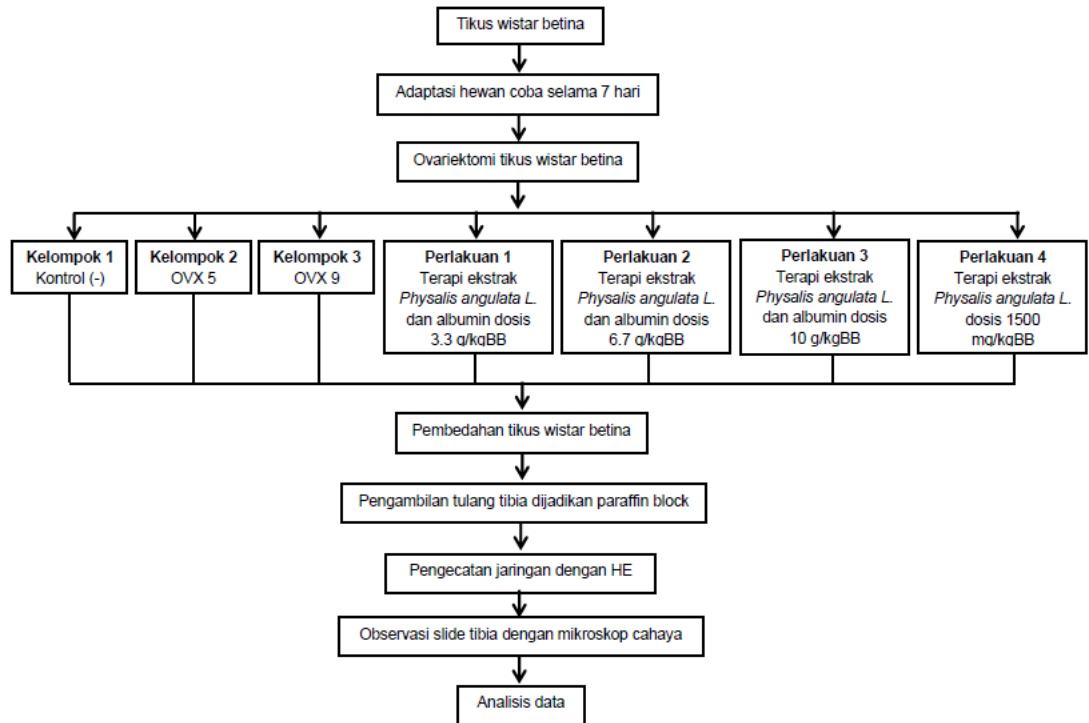
#### 4.7.7 Analisis Data

Seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Program *SPSS for windows Versi 16.0*. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

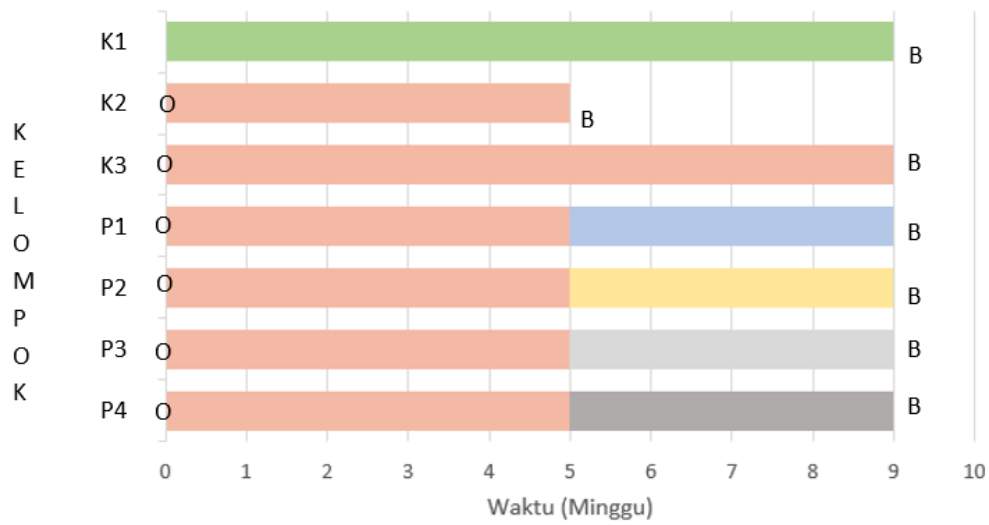
1. Uji normalitas dengan uji *Saphiro-wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data.
2. Uji Homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
3. Analisis komparasi dengan *One Way Anova* jika data berdistribusi normal dan homogen dan menggunakan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak berdistribusi normal atau data tidak homogen.
4. Uji *Post-hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok- kelompok yang mempunyai perbedaan.
5. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel satu dengan variabel lainnya.



## 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian



Keterangan:

O : Ovariektomi

B : Pembedahan untuk pengambilan sampel darah



Keadaan tidak dilakukan ovariektomi



Keadaan ovariektomi



Keadaan ovariektomi + pemberian ekstrak air daun *P.angulata* (1500 mg/kgBB) + Albumin (3,3 g/kgBB)



Keadaan ovariektomi + pemberian ekstrak air daun *P.angulata* (1500 mg/kgBB) + Albumin (6,7 g/kgBB)



Keadaan ovariektomi + pemberian ekstrak air daun *P.angulata* (1500 mg/kgBB) + Albumin (10 g/kgBB)



Keadaan ovariektomi + pemberian ekstrak air daun *P.angulata* (1500 mg/kgBB)



## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

#### 5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus Norvegicus*) galur wistar yang dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan yang terdiri dari sebagai berikut:

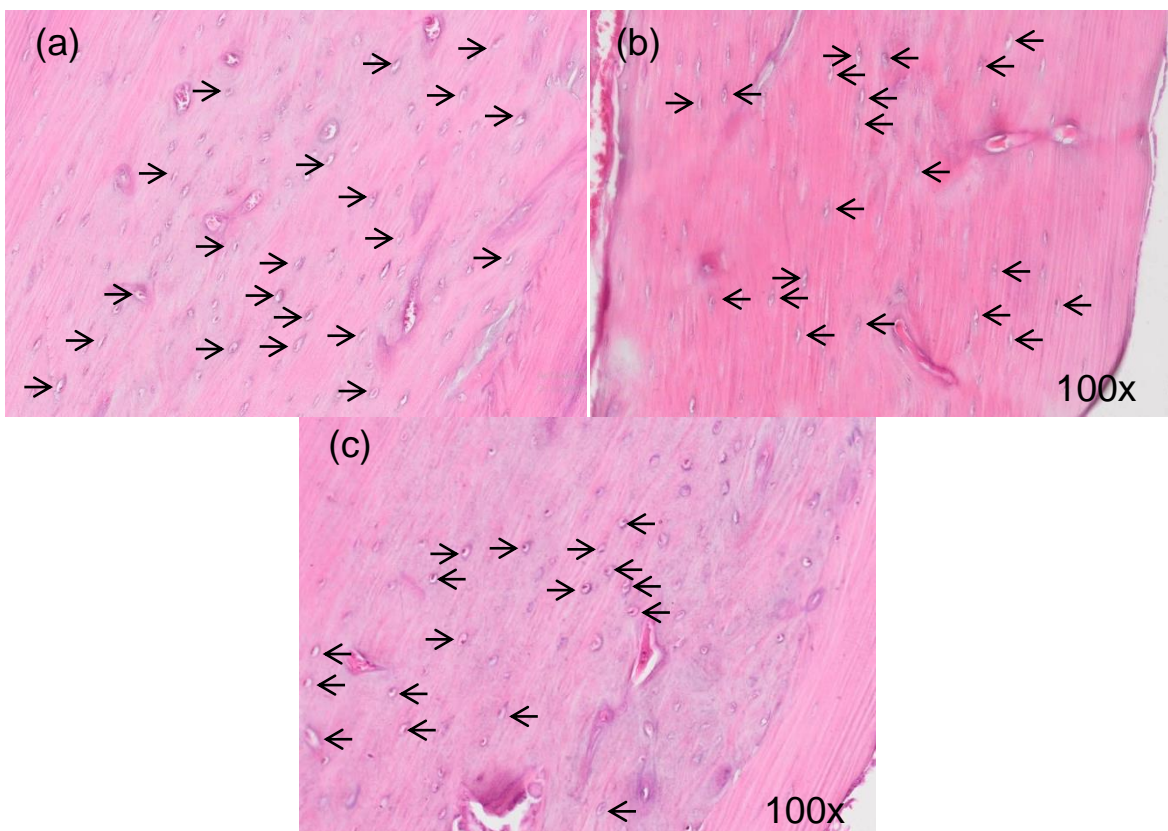
- K1 = Kelompok kontrol negatif
- K2 = Kelompok tikus ovariektomi tanpa terapi, yang diterminasi pada minggu ke-5
- K3 = Kelompok tikus ovariektomi tanpa terapi, yang diterminasi pada minggu ke-9
- P1 = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 3,3g/kg
- P2 = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 6,7g/kg
- P3 = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 10g/kg
- P4 = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg

Pengambilan data dilakukan dengan pengambilan organ tulang tibia yang kemudian dibuat menjadi preparat histologi. Dilanjutkan dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) (Paul, 2014), kemudian discan dan dilakukan penghitungan osteosit menggunakan *software dotslide* mikroskop pencahayaan Olympus XC

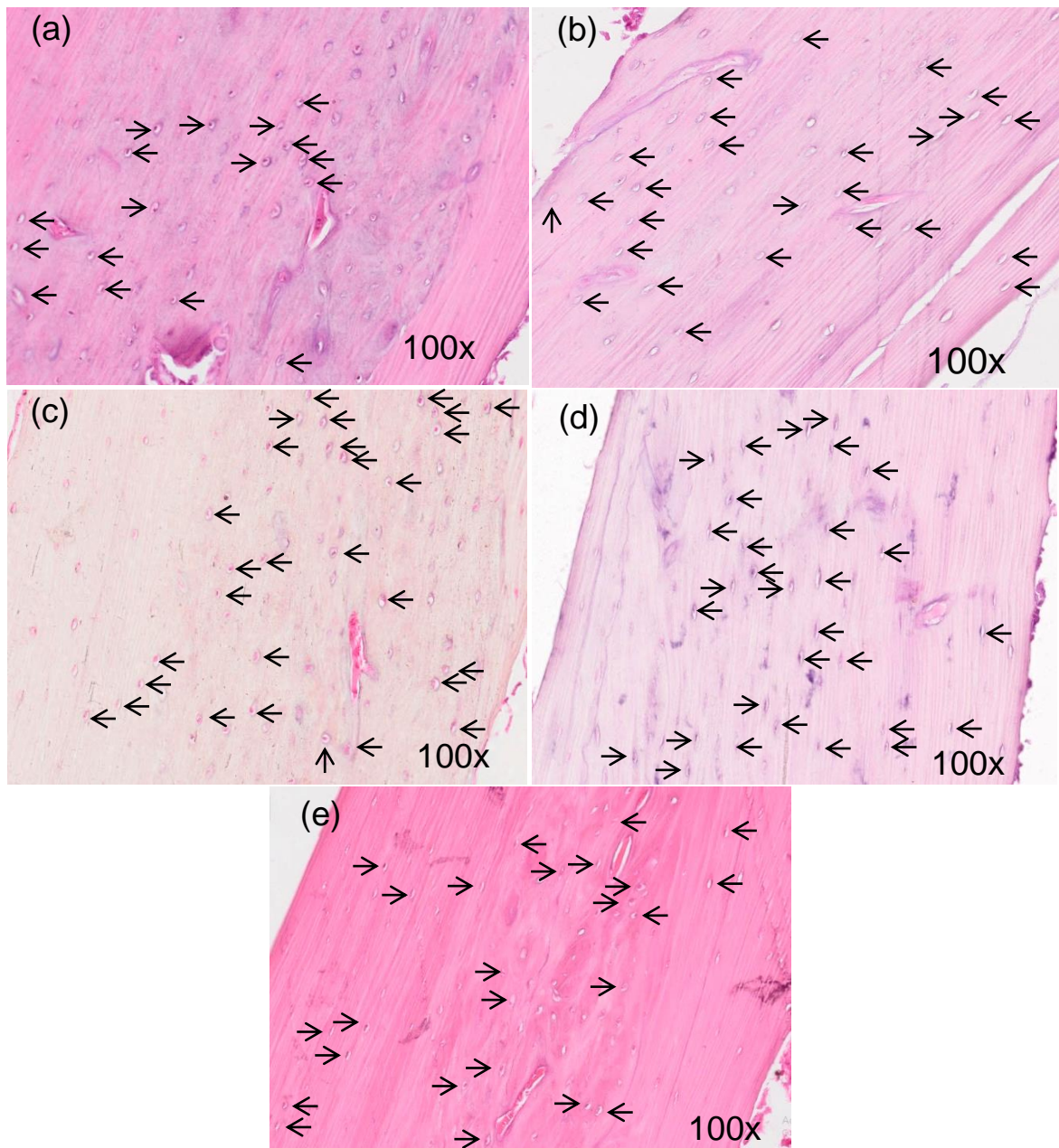
10 dengan perbesaran 400x di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya.

Selanjutnya dilakukan pengambilan data secara manual dengan menghitung jumlah osteosit pada preparat histologis dengan pemeriksaan mikroskop perbesaran 400x sebanyak 20 kali percobaan disetiap preparatnya, dari hasil tersebut dilakukan penentuan rerata osteosit.

### 5.1.1. Gambar Histologi Osteosit



**Gambar 5.1** Gambaran Histologi Tulang Tibia Tikus: (a) K1 (Kontrol negatif); K2 (Ovariectomi minggu ke-5); K3 (Ovariectomi minggu ke-9)



**Gambar 5.2** Gambaran Histologi Tulang Tibia Tikus: (a) K3 (Ovariectomi minggu ke-9); (b) P1 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg); (c) P2 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg); (d) P3 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg); (e) P4 (Perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB) (perbesaran 100x)

**Keterangan:** → : Osteosit

### 5.1.2. Hasil Perhitungan Osteosit

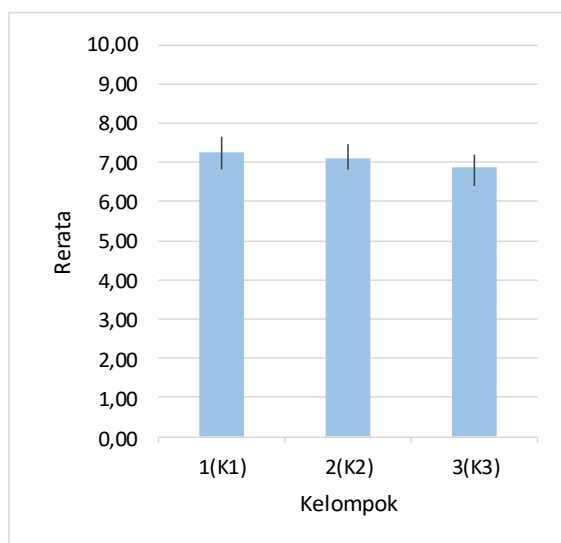
Perhitungan jumlah osteosit pada preparat menggunakan perbesaran 400x sebanyak 20 kali percobaan pada setiap preparat dalam masing masing kelompok perlakuan yang dapat dilihat pada lampiran 2. Osteosit pada tikus pada setiap kelompok adalah sebagai berikut:

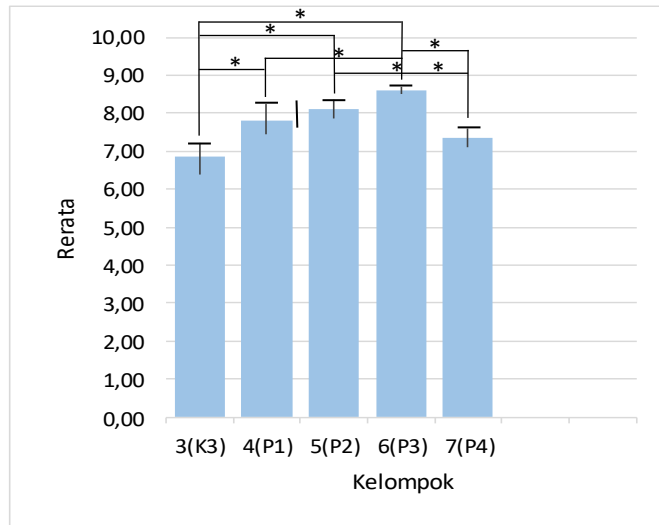
**Tabel 5.1 Rerata dan Standar Deviasi Osteosit**

Kelompok	$\bar{X}$ Jumlah Osteosit Tibia $\pm$ Standar deviasi
K1	7.26 $\pm$ 0.35
K2	7.10 $\pm$ 0.30
K3	6.87 $\pm$ 0.36
P1	7.79 $\pm$ 0.35
P2	8.10 $\pm$ 0.24
P3	8.60 $\pm$ 0.09
P4	7.35 $\pm$ 0.21

Ket: K1 (Kontrol negatif); K2 (Ovariectomi minggu ke-5); K3 (Ovariectomi minggu ke-9); P1 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg); P2 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg); P3 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg); P4 (Perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB).

Untuk penyajian data hasil perhitungan selanjutnya akan ditulis dalam format mean  $\pm$  standar deviasi:





Ket: \* $p < 0,05$ : terdapat perbedaan bermakna antar kedua kelompok

**Gambar 5.3 Rerata dan Standar Deviasi Osteosit Tikus *Rattus norvegicus***

## 5.2. Analisis Data

### 5.2.1. Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Normalitas data ditentukan berdasarkan hasil dari *test of normality* dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* (Lampiran 3), dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal apabila nilai  $p > 0.05$ . Pada penelitian ini didapatkan bahwa nilai  $p = 0.319$ , yang berarti bahwa data tersebut berdistribusi normal.

Selanjutnya menentukan apakah data jumlah osteosit memiliki varian yang homogen ( $p > 0.05$ ) atau tidak dengan *Levene Test Homogeneity of Variance* (Lampiran 3). Hasil uji homogenitas menunjukkan  $p = 0.399$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa variasi tiap sampel sama atau homogen.

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa sampel berdistribusi normal dan memiliki variasi homogen sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik yaitu *One Way ANOVA Test*.



### 5.2.2. Uji *One Way ANOVA*

Uji ini ditujukan untuk melihat variasi-variasi yang muncul pada beberapa kelompok. Pada penelitian ini, *One Way ANOVA Test* dilakukan dua kali (Lampira 4). *One Way ANOVA test* yang pertama membandingkan perbedaan jumlah osteosit antara K1 (kontrol negatif), K2 (OVX5), dan K3 (OVX9), sedangkan, *One Way ANOVA test* yang kedua membandingkan perbedaan jumlah osteosit antara K3 (OVX9), P1, P2, P3, dan P4.

Hasil *One Way ANOVA Test* pertama didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.315 ( $p < 0.05$ ), sehingga secara statistik, ovariektomi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah osteosit pada tikus OVX5 dan OVX9. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa jumlah osteosit setelah diovariektomi tetap meningkat, tetapi tidak signifikan secara statistik. *One Way ANOVA test* yang kedua didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.000 ( $p < 0.05$ ). Sehingga secara statistik dapat disimpulkan adanya perbedaan jumlah osteosit yang bermakna antar kelompok tikus K3, P1, P2, P3, dan P4.

### 5.2.3. Uji *Post Hoc Multiple Comparison*

Analisis untuk melihat perbedaan jumlah osteosit dari setiap kelompok jika dibandingkan dengan kelompok lainnya dapat diketahui dengan *Post Hoc Multiple Comparison test* (Lampiran 5). Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah dengan *Tukey HSD*. Pada uji ini dikatakan kelompok berbeda secara bermakna apabila nilai  $p < 0,05$ . Berdasarkan output uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.2 Hasil *Post Hoc Multiple Comparison Test* K1, K2, dan K3**

	K1	K2	K3
K1	-	0.782	0.288
K2	0.782	-	0.631
K3	0.288	0.631	-

\*p < 0,05 : terdapat perbedaan bermakna antar kedua kelompok

**Tabel 5.3 Hasil *Post Hoc Multiple Comparison Test* K3, P1, P2, P3, dan P4**

	K3	P1	P2	P3	P4
K3	-	0.002*	0.000*	0.000*	0.142
P1	0.002*	-	0.492	0.005*	0.196
P2	0.000*	0.492	-	0.113	0.010*
P3	0.000*	0.005*	0.113	-	0.000*
P4	0.142	0.196	0.010*	0.000*	-

\*p < 0,05 : terdapat perbedaan bermakna antar kedua kelompok

Ket: K1 (Kontrol negatif); K2 (Ovariektomi minggu ke-5); K3 (Ovariektomi minggu ke-9); P1 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg); P2 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg); P3 (Perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg); P4 (Perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB).

Dari tabel diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada penurunan jumlah osteosit pada kelompok tikus yang diberi perlakuan ovariektomi minggu ke-5 (K2) ataupun minggu ke-9 (K3) dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol negatif atau tikus normal tanpa perlakuan (K1).
2. Terdapat peningkatan jumlah osteosit yang bermakna pada kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg (P1), perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg (P2), perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg (P3) terhadap kelompok tikus ovariektomi minggu ke-9 (K3); Kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg (P2), perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg (P3) terhadap kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB (P4); Kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg (P3) terhadap kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg (P1).
3. Tidak adanya peningkatan yang bermakna pada jumlah osteosit pada perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB (P4) terhadap kelompok tikus ovariektomi minggu ke-9 (K3); Kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan

albumin 3.3 g/kg (P1) terhadap kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan 1500 mg/kgBB (P4); Kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg (P2) terhadap kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 3.3 g/kg (P1); Kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 10 g/kg (P3) terhadap kelompok perlakuan ekstrak air ciplukan dan albumin 6.7 g/kg (P2). Sehingga dapat disimpulkan bahwa antar kelompok data yang berdekatan tidak terdapat signifikansi yang cukup.

#### 5.2.4. Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *pearson* ditujukan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variable atau lebih, dalam penelitian ini digunakan untuk membuktikan korelasi antara peningkatan dosis albumin dengan kombinasi ekstrak air ciplukan terhadap jumlah osteosit. Adapun kategori untuk mengetahui kuat lemahnya sebuah korelasi adalah sebagai berikut (Sugiyono, 2009):

- Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah
- Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah
- Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang
- Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat
- Nilai Korelasi 0,800 – 1,000 = sangat kuat

Korelasi dapat berbentuk positif dan negatif, korelasi positif bermakna adanya hubungan yang searah antara dua variable, sedangkan untuk korelasi yang negatif artinya terdapat hubungan yang bertolakbelakang antara variable.

Signifikansi kedua variable dapat dianalisis dengan melihat nilai signifikansinya, dimana dikatakan bermakna bila nilai signifikansi  $p < 0.05$ . Hasil uji korelasi *pearson* (Lampiran 6) menunjukkan hasil sebagai berikut:

1. Terdapat koefisien korelasi sebesar 0.883 dimana menunjukkan korelasi yang sangat kuat antara pemberian berbagai dosis albumin terhadap jumlah osteosit pada tikus.
2. Nilai koefisien positif artinya semakin tinggi dosis albumin maka terjadi peningkatan jumlah osteosit pada tikus.
3. Didapatkan nilai signifikansi  $p = 0.000$ , dimana nilai  $p < 0.05$  maka nilai korelasi dapat disimpulkan bermakna atau signifikan.

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Rerata Jumlah Osteosit

##### 6.1.1 Rerata Jumlah Osteosit *Tikus Rattus norvegicus* Strain Wistar pada Kontrol Negatif dan Kontrol Positif OVX 5 dan OVX 9

Rerata jumlah osteosit tikus yang diovariectomi tanpa diberi perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan tikus normal. Rerata jumlah osteosit tikus OVX9 juga lebih rendah dibandingkan dengan tikus OVX5. Hal ini membuktikan bahwa jumlah sel osteosit yang diovariectomi lebih rendah dibandingkan tikus normal, dan jika keadaan hipoestrogen tidak diberi terapi dalam waktu lama akan dapat menurunkan jumlah osteosit seperti pada tikus OVX9. Hal ini selaras dengan penelitian Manolagas (2000) yang menyebutkan bahwa pada wanita menopause akan mengalami pengeroposan tulang atau osteoporosis seiring dengan bertambahnya usia jika tidak diberi terapi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa jumlah osteosit setelah diovariectomi akan mengalami penurunan meskipun tidak signifikan secara statistik, dan akan terus menurun jika tidak diberikan terapi. Selain itu menurut Bellido (2013), kehilangan steroid seks estrogen dan androgen dapat menyebabkan peningkatan prevalensi apoptosis osteosit dan osteoblas.

Keadaan hipoestrogen pada tikus yang diovariectomi akan berakibat pada terganggunya proses *bone remodeling* (Gruber, 2002). Pada tibia tikus yang diovariectomi, defisiensi estrogen meningkatkan stres oksidatif, yang kemudian menginduksi apoptosis pada osteoblas dan osteosit, sedangkan pemberian estrogen akan menangkal efek tersebut (Florencio-Silva *et al.*, 2018). Apoptosis dari osteosit dapat mengakibatkan rapuhnya matriks tulang terkait dengan

osteoporosis pasca menopause. Pada kondisi menopauseakan terjadi penurunan proliferasi osteoblas dan diferensiasi osteoblas mejadi osteosit, sehingga rerata jumlah osteosit pada tikus ovariektomi model menopause lebih rendah dibandingkan dengan rerata jumlah osteosit tikus normal (Tomkinson, 1998).

#### **6.1.2 Efek Formulasi Air Daun Ciplukan dan Albumin Dengan Berbagai Dosis Terhadap Rerata Jumlah Osteosit Tikus Pasca Ovariektomi**

Pada penelitian ini, jumlah osteosit cenderung meningkat pada kelompok yang diberikan kombinasi ekstrak air *Physalis* dan albumin maupun yang diberikan ekstrak air *Physalis* saja dibandingkan dengan tikus pasca ovariektomi. Selan itu, jumlah osteosit pada tikus yang diberikan kombinasi ekstrak air *Physalis* dan albumin meningkat secara signifikan jika dibandingkan dengan jumlah osteosit tikus pasca ovariektomi yang diberikan ekstrak air *Physalis* saja. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air *Physalis* dapat meningkatkan jumlah osteosit meskipun tidak secara signifikan, dan jika diberikan kombinasi ekstrak air *Physalis* dan albumin dapat memberikan peningkatan yang signifikan terhadap jumlah osteosit. Namun pada beberapa kelompok tikus dengan pemberian kombinasi ekstrak air *Physalis* dengan dosis albumin yang berdekatan tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan secara statistik.

Pada tikus pasca ovariektomi yang diberikan terapi estrogen, jumlah osteosit akan mengalami peningkatan. Pada penelitian ini, peningkatan rerata osteosit disebabkan oleh ekstrak air *Physalis* dengan dosis 1500 mg/kgBB. Berdasarkan penelitian Permatasari *et al.* (2013), pemberian ekstrak *Physalis minima* dosis 1500 mg/kgBB mampu meningkatkan kadar estradiol tikus *Rattus norvegicus* yang diovariektomi secara signifikan dibanding dosis lainnya (2500

mg/kgBB dan 500 mg/kgBB). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak physalis dosis 1500 mg/kgBB memiliki kandungan fitoestrogen dosis tinggi yang mampu meningkatkan kadar estradiol serum tikus.

Berdasarkan penelitian Karis (2019), pemberian ekstrak *Centella asiatica* yang mengandung fitoestrogen memberikan efek perlindungan terhadap stress oksidatif dengan mengaktifkan enzim *d-aminolevulinic dehydratase acid*, menghambat peroksidasi lipid, dan mengaktifkan enzim antioksidan, sehingga dapat mencegah apoptosis sel dan dapat mempertahankan homeostasis mineral serta memfasilitasi pembentukan tulang. Menurut Bellido (2013), Pemberian estrogen memberikan efek antiapoptotik yang disebabkan oleh aktivasi cepat jalur pensinyalan Src / Shc / ERK dan PI3 K melalui tindakan nongenotropik dari reseptor klasik untuk steroid seks. Selain itu menurut Khosla (2012), fitoestrogen dapat mencegah apoptosis sel dengan aktivasi osteosit yang diinduksi estrogen dari protein kinase yang bergantung pada *nitric oxide/ cGMP/ cGMP-dependent protein kinase cascade* yang mengarah pada persinyalan *pro-survival* karena *phosphorylation protein pro-apoptotic Bcl-2* terkait promotor kematian sel.

Pada proses pembentukan osteosit juga terjadi proses aktif didorong oleh perubahan ekspresi gen. Ekspresi dari transmembran glikoprotein E11 / gp38 dan membran tipe 1 matriks metalloproteinase (MT1-MMP) akan memproses pembentukan dendritik osteosit dan kanalikuli dengan mineralisasi dan fosfat metabolisme, termasuk protein matriks dentin 1 (DMP1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) matriks, gen pengatur fosfat dengan homologi untuk endopeptidase pada kromosom X (PHEX) dan faktor pertumbuhan fibroblast 23 (FGF23) pada osteosit (Chen et al., 2015).

Pada penelitian ini, dengan adanya penambahan albumin dapat meningkatkan jumlah osteosit secara signifikan daripada dengan perlakuan ekstrak air *Physalis* tanpa albumin. Hal ini selaras dengan penelitian Gil et al. (2017), yang menyatakan bahwa terjadi peningkatan pelepasan estrogen dari nanopartikel PLGA pada penambahan albumin sebesar 3 g/dL. Tanpa albumin, estrogen tidak ditranspor melewati membran, sehingga *total release* estrogen tidak signifikan. Sementara itu, dengan albumin, 95% *free estrogen* ditranspor melewati membran pada 3 hari pertama. Hal ini dapat dijelaskan oleh kemampuan albumin untuk mentranspor komponen hidrofobik yaitu estrogen melewati membran semipermeabel. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak air *Physalis* dengan albumin dapat mentranspor fitoestrogen dalam *Physalis* melewati membran, sehingga kombinasi tersebut lebih efektif dalam meningkatkan osteosit dibandingkan dengan hanya memberikan ekstrak air *Physalis*.

Berdasarkan uji korelasi Pearson, hubungan antara dosis albumin dan rerata jumlah osteosit tikus sangat tinggi ( $r = 0.883$ ) dan berkorelasi positif. Hal ini berarti, semakin tinggi dosis albumin, semakin tinggi rerata jumlah osteosit tikus. Tingginya korelasi antara dosis albumin dan rerata jumlah osteosit secara statistik disebabkan oleh afinitas albumin yang tinggi yang berfungsi sebagai buffer pada distribusi steroid plasma ketika konsentrasi meningkat (Nicholson et al., 2000). Dalam penelitian ini, albumin berperan dalam transporter fitoestrogen withanolides pada ekstrak air *Physalis* dan meningkatkan bioavailabilitas fitoestrogen serta paruh waktunya sehingga dapat bertahan lebih lama dan dapat terserap dengan baik pada target organ tulang yang ditandai dengan meningkatnya osteosit.



## **6.2 Keterbatasan Penelitian**

Adapun keterbatasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel tikus yang digunakan belum cukup bulan untuk penelitian pada tulang tikus. Tikus yang dapat digunakan untuk meneliti tulang adalah tikus usia 9-12 bulan.
2. Diperlukan metode lain dalam menilai kualitas dan kuantitas sel tulang dalam proses pembentukan tulang.

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Tikus *Rattus norvegicus* pasca ovariektomi memiliki rerata jumlah osteosit yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus normal meskipun tidak secara signifikan.
2. Tikus dengan pemberian formulasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin memiliki rerata jumlah osteosit yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan tikus *Rattus norvegicus* pasca ovariektomi.
3. Penambahan dosis albumin secara bertingkat (3,3 g/kgBB, 6,7 g/kgBB, dan 10 g/kgBB) yang diberikan pada formulasi kombinasi ekstrak air *Physalis angulata L.* (1500 mg/kgBB) memiliki hubungan yang signifikan, korelasi positif dan hubungan yang sangat tinggi terhadap peningkatan rerata jumlah osteosit tikus *Rattus norvegicus* strain wistar pasca ovariektomi.
4. Kombinasi ekstrak air daun *Physalis angulata L.* (1500 mg/kgBB) dan albumin (3,3 g/kgBB, 6,7 g/kgBB, dan 10 g/kgBB) mampu meningkatkan jumlah osteosit tibia tikus *Rattus norvegicus* pasca ovariektomi lebih baik dibandingkan dengan pemberian ekstrak air daun *Physalis angulata L.* saja.

## 7.2 Saran

Saran-saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan penelitian yang lebih dalam mengenai:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan senyawa lain yang memiliki efek estrogenik dengan potensi sebagai fitoestrogen dari tanaman *Physalis angulata L.* yang dapat meningkatkan jumlah osteosit pada keadaan pasca menopause atau pasca ovariektomi.
2. Diperlukan penelitian dengan metode lain dalam menilai kualitas dan kuantitas sel tulang dalam proses pembentukan tulang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahn H.J., Moond D.S., Kang D.Y., Lee, J.I., Kim D.Y., Kim J.H., *et al.* *Urinary Albumin Excretion Reflects Cardiovascular Risk in Postmenopausal Woman without Diabetes: The 2011 to 2013 Korean National Health and Nutrition Examination Survey.* *Endocrinol Metab*, 2016, 31: 537-546.
- Arsana W., Hidayat M., Permatasari N. Peran genistein dalam meningkatkan pembentukan dan menghambat resorpsi tulang rattus norvegicus wistar hipoestrogen melai superoksid dan hidrogen perokside. Disertasi *PDIK FKUB*, 2012.
- Afshinnia, F., Wong, K. K., Sundaram, B., Ackermann, R. J., & Pennathur, S. (2016). *Hypoalbuminemia and Osteoporosis: Reappraisal of a Controversy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(1), 167–175.
- Bairagi U., Mittal P., Mishra B. *Albumin: A Versatile Drug Carrier. Austin Therapeutics*, 2015, 2 (2): 1021.
- Bellido, T. (2013). *Osteocyte-Driven Bone Remodeling. Calcified Tissue International*, 94(1), 25–34.
- Bianchi ML, Orsini MR, Saraifoger S, Ortolani S, Radaelli G, Betti S. 2005. *Quality of Life in post-menopausal Osteoporosis*. 3:78
- Burger H. *The menopausal transition—Endocrinology. J Sex Med*. 2008;5:2266–2273.
- Cassidy A, Albertazzi P, Nielsen IL, Hall W, Williamson G, Tentens I, Steiner C. 2006. *Critical review of health effects of soyabean phytoestrogens in postmenopausal women. Proceedings of the Nutrition Society*. 65:76-92
- Chen, H., Senda, T., & Kubo, K. (2015). *The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. Medical Molecular Morphology*, 48(2), 61–68.
- Compton, J. T., & Lee, F. Y. (2014). *A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 96(19), 1659–1668.
- Cos P., Bruyne T.D., Apers,S., Berghe D.V., Pieters L., Vlietnick A.J. *Phytoestrogens : Recent Developments. Planta Med*, 2003, 69 : 589-599.
- Dalal P.K and Agarwal. Postmenopausal Syndrome. *Indian J Psychiatry*, 2015, 57 (2): 222-232.
- Damu A.G., Kno P., Su C., Kuo T., Chen T., Bastow KF., *et al.* Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1146 – 1152.
- Depkes. 2008. *Pedoman Pengendalian Tikus*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Jakarta.
- De-Rosso V.V and Mercadante, A.Z. Identification and quantification de carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 5062-5072.
- Dongaonkar D., Mehta R., Kolhapura S.A. *Evaluation of the efficacy and safety of reosto in postmenopausal osteoporosis: a prospective, randomized, placebo-controlled, double blind, phase III clinical trial. Obst & Gynae Today*, 2005, 10 (7):362-367.
- Dorland. 2006. *Dorland Illustrated Medical Dictionary*. Philadelphia. Pa 19105.
- Dubois, M.J., Orellana-Jimenez, C., Melot, C., De Backer, D., Berre, J., Leeman, M., Brimiouille, S., Appoloni, O., Creteur, J. and Vincent, J.L., 2006. *Albumin*

- administration improves organ function in critically ill hypoalbuminemic patients: a prospective, randomized, controlled, pilot study. *Critical care medicine*, 34(10), pp.2536-2540.
- Evans TW. 2002. *Albumin as a drug-biological effect of albumin unrelated to oncotic pressure*. 6-11
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2018). *Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 406–415.
- Gil, D., Frank-Kamenetskii, A., Barry, J., Reukov, V., Xiang, Y., Das, A., Vertegel, A. (2017). *Albumin-Assisted Method Allows Assessment of Release of Hydrophobic Drugs From Nanocarriers*. *Biotechnology Journal*, 13(1), 1700337.
- Graham, J. M., Ayati, B. P., Holstein, S. A., & Martin, J. A. (2013). *The Role of Osteocytes in Targeted Bone Remodeling: A Mathematical Model*. *PLoS ONE*, 8(5), e63884.
- Graves DT, Li J. Cochran DL. *Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss*. *J Dent Res* 2011; 90(2): 143-53.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). *Production and Actions of Estrogens*. *New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352.
- Guyton and Hall. 2016. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 403-15.
- Hamilton K.J., Hewitt S.C., Korach K.S. *Estrogen Human Biology*. *Current Topics in Developmental Biology*, 2017, 125: 109-147.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta
- He Q.P., Ma L., Luo J.Y., He F.Y., Lou L.G., Hu L.H. *Cytotoxic withanolides from Physalis angulata L*. *Chem Biodivers*, 2007, 4: 443-449.
- Horstman A.M., Dillon E.L., Urban R.J., Moore M.S. *The Role of Androgens and Estrogens on Health Aging and Longevity*. *Journal of Gerontology*, 2012, 67 (11) : 1140-1152.
- Jagtap V.R. *Serum Total Proteins, Albumin and Magnesium Levels in Pre and Post Antiresorptive Therapy in Postmenopausal Osteoporosis. Can Magnesium Play a Key Role in Osteoporosis? International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2017, 13 (1): 23-29.
- Jin Z., Mashuta M.S., Stolowich N.J., Vaisberg A.J., Stivers N.S., Bates P.J., et al. *Physangulidines A, B and C: Three new antiproliferative withanolides from Physalis angulata*. *Org Lett*, 2012, 14: 1230-1233.
- Junqueira L.C., J.Carneiro, R.O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari *Basic Histology*. Jakarta: EGC.
- Karis, V., Soekanto, S. A., & Idrus, E. (2019). *Effect of Centella asiatica L. On THE Number of Osteoclasts, Osteoblasts, and Osteocytes in the Tibiae of Ovariectomized Rats*. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 71–74.
- Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). *Estrogen and the skeleton*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(11), 576–581.
- Koebele S.V and Nelson H.A.B. *Modelling menopause: the utility of rodents in translational behavioral endocrinology research*. *Maturitas*, 2016, 87: 5-7.

- Kousteni, S. et al. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719–730.
- Kuo P.Q., Kuo T.H., Damu A.G., Su C.R., Lee E., Wu T., et al. Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotox principles from *Physalis angulata*. *Org Lett*, 2006, 8: 2953-2956.
- Lestari B., Permatasari N., Saifur M. Methanolic Extract of Ceplukan Leaf Attenuates Ventricular Fibrosis through Inhibition of TNF alpha in Ovariectomized Rats. *Advance in Pharmacologic Science*, 2016, 2016: 1-7.
- Manolagas SC. 2000. *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. 21(2):115-37
- Martini G, Gennari L, Merlotti D, Nuti R. 2007. *Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development*. 24(5):361-79
- Murano T., Izumi S., Kika G., Haque S.F., Okuwaki S., Mori A., et al. Impact of Menopause in Lipid and Bone Metabolism and Effect of Hormone Replacement Therapy. *Tokai J Exp Clin Med*, 2003, 28 (3): 109–199.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Haper's Illustrated Biochemistry 26<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill Medical, New York, 2012.
- Nagafuji S., Okabe H., Akahane H., Abe F. Trypanocidal constituents in plants 4 Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27:193-197.
- Nicholson, J.P., Blunt, M.C., and Park, G.R., 2000. Serum albumin and colloid osmotic pressure in survivors and nonsurvivors of prolonged critical illness. *Anaesthesia*, 53(8), pp.755-761.
- Nurfitri S., Permatasari N., Ratnawati. Evaluation Anxiolytic Effect of Methanolic Extract of Ceplukan Leaves in The Elevated Plus Maze Test Through IL-6 Changes in Ovariectomized Rats. *The Journal of tropical life sciences*, 2015, 5 (1): 8-13.
- Okkerman, P.C., Grochart C.P., Pijnenburg, A.M.C.M, Chemical Study on Estrogens. 2011
- Okman-Kilic, T. (2015). *Estrogen Deficiency and Osteoporosis*. *Advances in Osteoporosis*.
- Olson, Merle & Bruce, Jim. (1986). Ovariectomy, Ovariohysterectomy and Orchidectomy in Rodents and Rabbits. The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne. 27. 523-7.
- Patel S., Homaei A., Raju A.B., Meher B.R. Estrogen : The necessary evil for human health and ways to tame it. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018, 102:403-411.
- Paul, Held. 2014. *Hematoxylin and Eosin Stained Tissue : Using Color Brightfield Imaging with the Cytation 5 to Image Fixed and Stained Tissue*. Biotek. Hal 1-5.
- Permatasari N., Nugrahenny D., Prasetyawan S. Efek Daun Ceplukan (*Physalis minima* L.) dan Physalin pada Reseptor Estrogen pada Sel Endothel Pembuluh Darah Manusia (HUVECs). 2010.
- Permatasari N., Nugrahenny D., Setyawati. Pengembangan obat herbal terstandar Ceplukan (*Physalis Minima* L) sebagai terapi sulih hormon pada wanita post menopause. *Laporan Penelitian Unggulan BOPTN*, 2013.

- Permatasari N., Yuliana R Kuala, Tito Sulakso. Efek Estrak Daun Ciplukan (*Physalis minima L.*) terhadap Kadar Malondialdehid Tulang Manibula Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Pasca Ovariektomi. Vol 1, No 1 (2013), 35-46.
- Prideaux, M., Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2016). *Osteocytes: The master cells in bone remodelling. Current Opinion in Pharmacology, 28, 24–30.*
- Row L., Reddy K., Sarma M., Matsuura T., Nakashima R. New Physalins from *P.angulata* and *P.lancifolia*. Structure and Reactions of Physalin D,I,G,and K. *Phytochemistry, 1980, 19 : 1175-1181.*
- Row L., Sarma M., Matsuura T., Nakashima R. Physalin E and H, new Physalins from *P.angulata* and *P.lancifolia*. *Phytochemistry, 1978, 17: 1641-1645.*
- Samuelson DA. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Philadelphia (US): Saunders-Elvier.
- Sherwood, L. 2012. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Edisi 6. Jakarta: EGC. h.708-710.
- Shingu K. 1992. Three New Withanolides, Physangulins E, F and G from *Physalis angulata L.* Chem Pharm Bull, 40, 2448-2451.
- Smith-DiJulio, Woods, N.F., K., Percival, D.B., Tao, E.Y., Taylor, H.J. and Mitchell, E.S., 2007. Symptoms during the menopausal transition and early postmenopause and their relation to endocrine levels over time: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Journal of Women's Health, 16(5)*, pp.667-677.
- Sugiyono, 2009, *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*, Bandung: Alfabeta.
- Tomkinson, A., Gevers, E. F., Wit, J. M., Reeve, J., & Noble, B. S. (1998). *The Role of Estrogen in the Control of Rat Osteocyte Apoptosis. Journal of Bone and Mineral Research, 13(8), 1243–1250.*
- Wise P.M., Suzuki S., Brown C.M. Estradiol : a hormone with diverse and contradictory neuroprotective action. *Dialogues in Clinical Neuroscience, 2009, 11 (3) :297-303.*
- World Health Organization. Research on the menopause. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser. 2014;670.*
- Yadav M., Singh A., Ali S., Rizivi N., Hussain S.R., Kumar V. Role of Serum Albumin in Fracture Healing. *International Journal of Biomedical Research, 2015, 6 (7): 452-455.*

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Surat Pernyataan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN  
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755  
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 213 / EC / KEPK / 07 / 2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Pengembangan Formulasi Kombinasi Ekstrak *Physalis* dan Albumin untuk Mengatasi *Post Menopausal Syndrome*.

**PENELITI UTAMA** : Dr. drg. Nur Permatasari, MS

**ANGGOTA** : dr. Dian Nugrahenny, M.Biomed  
Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc  
Dr. Ciptati, MS., M.Sc  
Desak Gede Yuliana Eka  
Feronia Augustine Setiawan  
Christian Ambrosius Soeiono  
Michelle Rimbawan  
Kadek Putri Paramita Abyuda

**UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch. Istadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)  
NIPK. 20180246051611001

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)



## Lampiran 2. Hasil Perhitungan Jumlah Osteosit

Klp	Tikus	Hasil Pengulangan																		Rerata	Rerata Klp		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			19	20
K1 (N)	1	12	6	9	10	8	5	5	10	8	12	10	8	6	5	4	5	8	7	7	8	7.65	7.2625
	2	8	6	7	6	8	7	8	8	12	10	8	8	6	6	5	6	7	7	8	6	7.35	
	3	6	4	5	7	6	4	8	7	8	8	7	5	10	11	7	8	12	8	8	6	7.25	
	4	10	9	8	6	6	7	8	8	6	7	8	8	7	7	5	6	6	5	4	5	6.80	
K2 (OVX5)	1	10	5	15	12	8	8	6	6	6	6	8	3	10	12	8	7	3	5	5	6	7.45	7.1000
	2	5	7	5	4	6	7	7	8	12	6	7	6	5	3	9	6	10	8	6	9	6.80	
	3	8	7	6	5	3	9	6	11	10	6	9	5	7	5	4	6	7	6	6	12	6.90	
	4	7	4	3	7	7	12	6	6	9	8	4	6	8	10	8	6	8	9	10	7	7.25	
K3 (OVX9)	1	5	7	5	4	6	7	6	6	12	6	7	6	5	3	9	6	11	10	6	9	6.80	6.8750
	2	9	9	10	4	8	12	7	8	8	6	7	5	5	6	7	8	9	4	5	7	7.20	
	3	7	8	9	8	5	8	7	4	6	5	7	5	9	6	8	8	6	8	10	8	7.10	
	4	4	5	1	4	9	9	8	8	3	4	5	6	8	8	9	7	5	11	8	6	6.40	
P1 (D1)	1	7	10	9	11	8	12	8	7	8	9	6	5	9	7	3	6	6	12	4	5	7.60	7.7875
	2	10	10	8	8	7	7	8	6	7	6	10	8	8	6	11	10	6	9	8	12	8.25	
	3	10	9	8	6	7	7	6	6	8	8	9	4	5	8	9	10	10	4	8	7	7.45	
	4	8	9	7	9	10	9	6	8	8	7	6	4	12	8	4	8	7	9	8	10	7.85	
P2 (D2)	1	7	11	4	5	3	4	6	6	8	15	11	14	4	11	6	11	8	9	10	12	8.25	8.1000
	2	7	5	7	6	10	12	6	6	7	7	8	8	6	8	8	10	8	10	12	8	7.95	
	3	6	13	9	6	9	13	11	13	4	10	10	8	7	5	11	7	6	9	6	4	8.35	
	4	8	12	5	7	7	8	6	4	7	8	10	8	6	8	9	10	8	8	6	12	7.85	
P3 (D3)	1	10	8	6	5	6	7	7	8	9	9	10	10	14	8	9	11	8	9	10	7	8.55	8.6000
	2	7	5	16	12	7	10	7	9	3	9	10	11	8	5	12	10	8	8	6	7	8.50	
	3	8	11	7	6	6	8	5	5	11	8	8	6	12	4	10	11	16	11	8	12	8.65	
	4	8	7	19	9	9	13	10	8	8	7	10	6	7	8	6	6	7	8	9	9	8.70	
P4 (C)	1	8	5	13	9	9	7	6	3	4	9	7	9	9	10	8	7	7	5	6	7	7.40	7.3500
	2	12	8	9	7	6	8	10	8	8	6	5	5	6	4	5	8	8	7	6	6	7.10	
	3	10	9	8	4	3	8	4	5	6	7	7	9	8	8	10	8	8	6	8	10	7.30	
	4	10	8	7	6	8	9	8	5	6	6	8	8	9	4	6	8	9	9	8	10	7.60	

### Lampiran 3. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji Normalitas *Shapiro-Wilk Test*

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Osteosit	.119	28	.200 <sup>*</sup>	.958	28	.319

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

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas *Levene Homogeneity of Variances Test*

#### Test of Homogeneity of Variances

Osteosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.092	6	21	.399

#### Lampiran 4. One Way ANOVA Test

Uji One Way ANOVA Kelompok Kontrol Negatif, (K1) dan Kontrol Positif OVX 5 (K2) dan OVX 9 (K3)

#### Descriptives

Osteosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K1	4	7.2625	.35208	.17604	6.7023	7.8227	6.80	7.65
K2	4	7.1000	.30277	.15138	6.6182	7.5818	6.80	7.45
K3	4	6.8750	.35940	.17970	6.3031	7.4469	6.40	7.20
Total	12	7.0792	.34867	.10065	6.8576	7.3007	6.40	7.65

#### ANOVA

Osteosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.303	2	.151	1.318	.315
Within Groups	1.034	9	.115		
Total	1.337	11			

Uji One Way ANOVA Kelompok Kontrol Positif OVX 9 (K3) dan Kelompok Perlakuan (P1, P2, P3, P4)

#### Descriptives

Osteosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K3	4	6.8750	.35940	.17970	6.3031	7.4469	6.40	7.20
P1	4	7.7875	.34970	.17485	7.2310	8.3440	7.45	8.25
P2	4	8.1000	.23805	.11902	7.7212	8.4788	7.85	8.35
P3	4	8.6000	.09129	.04564	8.4547	8.7453	8.50	8.70
P4	4	7.3500	.20817	.10408	7.0188	7.6812	7.10	7.60
Total	20	7.7425	.65560	.14660	7.4357	8.0493	6.40	8.70

**ANOVA**

Osteosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.087	4	1.772	24.622	.000
Within Groups	1.079	15	.072		
Total	8.166	19			

### Lampiran 5. Post Hoc Tukey HSD

Uji *Post Hoc Tukey HSD* Kelompok Kontrol Negatif (K1) dan Kelompok Kontrol Positif OVX 5 (K2) dan OVX 9 (K3)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osteosit

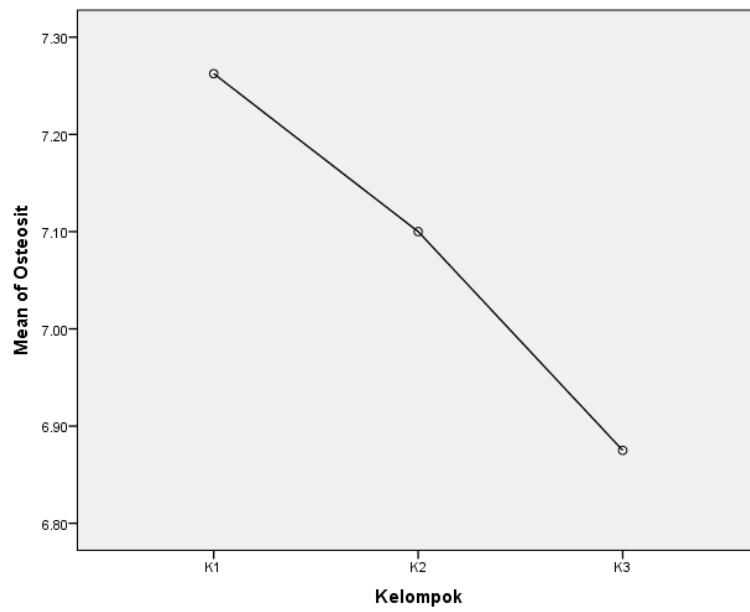
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	.16250	.23972	.782	-.5068	.8318
	K3	.38750	.23972	.288	-.2818	1.0568
K2	K1	-.16250	.23972	.782	-.8318	.5068
	K3	.22500	.23972	.631	-.4443	.8943
K3	K1	-.38750	.23972	.288	-1.0568	.2818
	K2	-.22500	.23972	.631	-.8943	.4443

Nilai Signifikansi dari *Uji Post Hoc Tukey HSD* antara Kelompok Kontrol Negatif (K1) dan Kelompok Kontrol Positif OVX 5 (K2) dan OVX 9 (K3)

	K1 (Kontrol Negatif)	K2 (OVX 5)	K3 (OVX 9)
K1 (Kontrol Negatif)		0.782	0.288
K2 (OVX 5)	0.782		0.631
K3 (OVX 9)	0.288	0.631	

## Means Plots



Uji *Post Hoc Tukey HSD* Kelompok Kontrol Positif OVX 9 (K3) dan Kelompok Perlakuan (P1, P2, P3, P4)

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osteosit

Tukey HSD

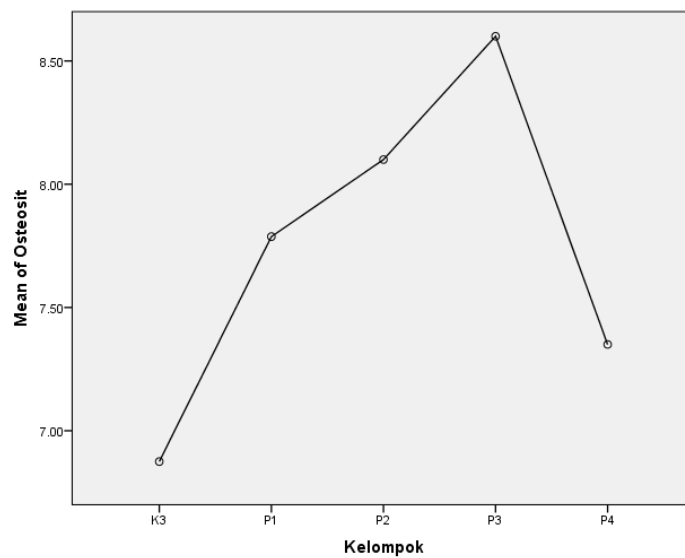
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K3	P1	-.91250*	.18968	.002	-1.4982	-.3268
	P2	-1.22500*	.18968	.000	-1.8107	-.6393
	P3	-1.72500*	.18968	.000	-2.3107	-1.1393
	P4	-.47500	.18968	.142	-1.0607	.1107
P1	K3	.91250*	.18968	.002	.3268	1.4982
	P2	-.31250	.18968	.492	-.8982	.2732
	P3	-.81250*	.18968	.005	-1.3982	-.2268
	P4	.43750	.18968	.196	-.1482	1.0232
P2	K3	1.22500*	.18968	.000	.6393	1.8107
	P1	.31250	.18968	.492	-.2732	.8982
	P3	-.50000	.18968	.113	-1.0857	.0857
	P4	.75000*	.18968	.010	.1643	1.3357
P3	K3	1.72500*	.18968	.000	1.1393	2.3107
	P1	.81250*	.18968	.005	.2268	1.3982
	P2	.50000	.18968	.113	-.0857	1.0857
	P4	1.25000*	.18968	.000	.6643	1.8357
P4	K3	.47500	.18968	.142	-.1107	1.0607
	P1	-.43750	.18968	.196	-1.0232	.1482
	P2	-.75000*	.18968	.010	-1.3357	-.1643
	P3	-1.25000*	.18968	.000	-1.8357	-.6643

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

Nilai Signifikansi dari Uji *Post Hoc Tukey HSD* Kelompok Kontrol Positif OVX 9 (K3) dan Kelompok Perlakuan (P1, P2, P3, P4)

	K3 (OVX 9)	P1	P2	P3	P4
K3 (OVX 9)		0.002	0.000	0.000	0.142
P1	0.002		0.492	0.005	0.196
P2	0.000	0.492		0.113	0.010
P3	0.000	0.005	0.113		0.000
P4	0.142	0.196	0.010	0.000	

### Means Plots





### Lampiran 6. Uji Korelasi *Pearson*

#### Correlations

		Dosis	Osteosit
Dosis	Pearson Correlation	1	.883**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	28	28
Osteosit	Pearson Correlation	.883**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	28	28

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

#### Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.167	.071		100.521	.000
	Dosis	.145	.015	.883	9.609	.000

a. Dependent Variable: Osteosit

## Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

### 7.1 Alat dan Bahan Penelitian



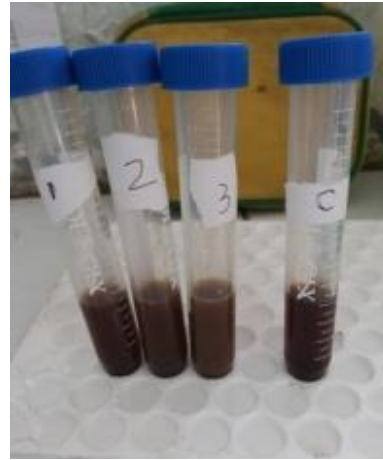
**Gambar 7.1** Kandang plastik ukuran 30cm x 45 cm x 15 cm yang ditutupi anyaman kawat-kawat berongga serta diberi label sesuai kelompok perlakuan dan kontrol berisikan tikus wistar (*Rattus norvegicus*)



**Gambar 7.2** Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.)



**Gambar 7.2** Simplisia Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*)



**Gambar 7.3** Ekstrak C, D1, D2, dan D3



**Gambar 7.4** Ketamine untuk prosedur ovariektomi



**Gambar 7.5** Nebacetine untuk prosedur ovariektomi



**Gambar 7.6** Peralatan ovariektomi

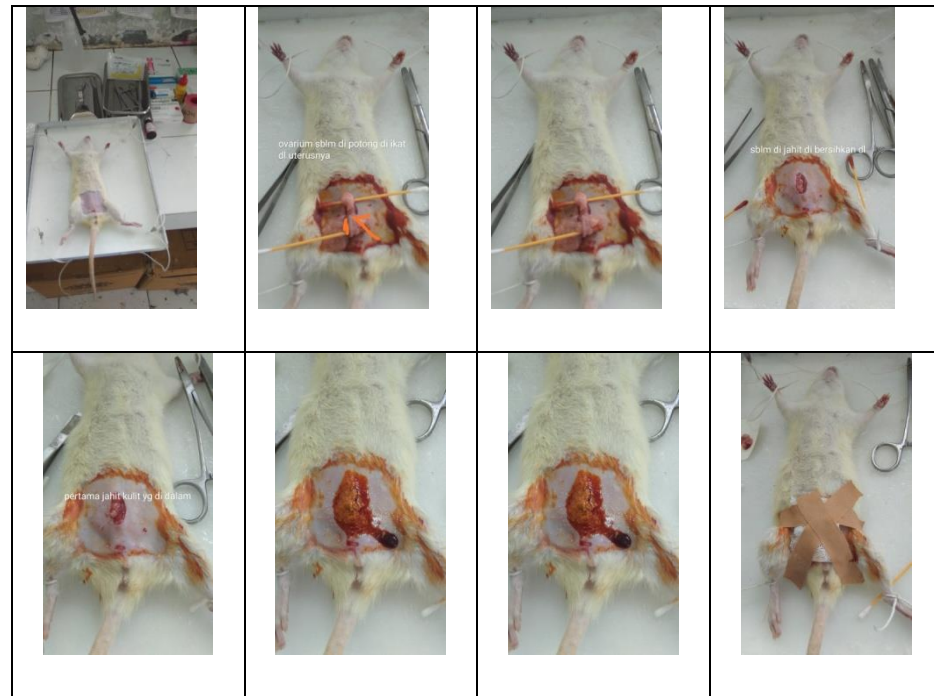


**Gambar 7.7** Novalgin dan salticin untuk prosedur ovariektomi



**Gambar 7.8** Kapsul Albumin

## 7.2 Prosedur Penelitian

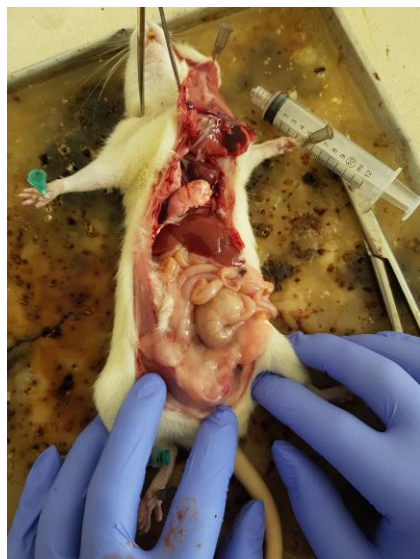


**Gambar 7.9** Ovariektomi hewan coba

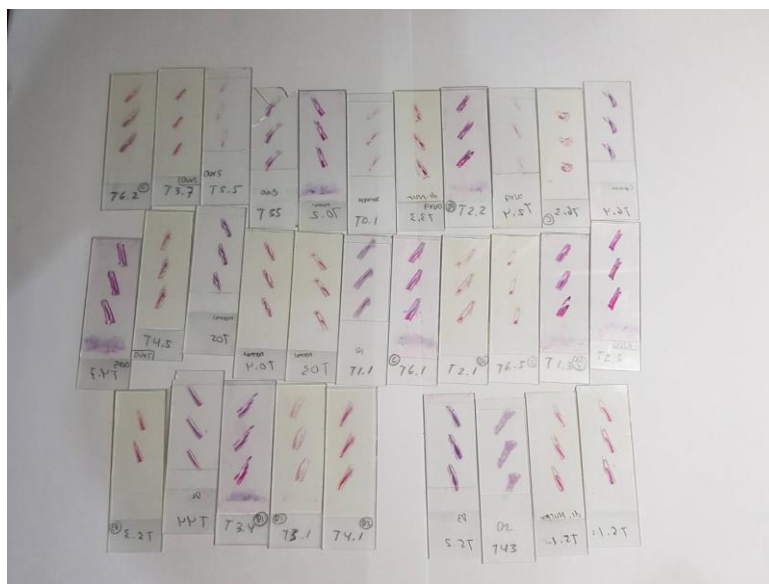


**Gambar 7.10** Pemberian perlakuan pada hewan coba





**Gambar 7.11** Terminasi hewan coba untuk pengambilan sampel tulang



**Gambar 7.12** Hasil pembuatan preparat histologi tulang hewan coba