

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol biji *C.moschata* terhadap kadar kalsium dalam tulang tikus ovariektomi. Ekstrak yang digunakan adalah ECM (Ekstrak *Cucurbita moschata*) sedangkan bahan uji yang digunakan adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Durch.). Pada penelitian ini, determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada untuk mengetahui kebenaran bahan uji yang digunakan dalam penelitian. Dari hasil determinasi yang dilakukan pada biji labu kuning, diketahui identitas bahan uji yang digunakan pada penelitian ini termasuk ke dalam famili *Cucurbitaceae* dengan nama spesies *Cucurbita moschata* (Durch.) Poir. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

Biji labu kuning yang diperoleh dari daerah Salatiga, Jawa Tengah dibersihkan pada air yang mengalir untuk memisahkan biji dengan daging buah yang masih menempel. Biji labu yang sudah bersih kemudian dioven untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam biji. Biji labu kuning dikeringkan pada suhu 60°C. Suhu yang baik dalam pengeringan adalah tidak melebihi 60°C, tapi bahan aktif yang tidak tahan panas atau mudah menguap harus dikeringkan pada suhu serendah mungkin, misalnya 30°C sampai 45°C (Puspitasari, 2012). Suhu pengeringan yang dipilih yaitu 60°C untuk mencegah hilangnya senyawa-senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan. Biji labu kuning yang telah

kering kemudian disortasi untuk memperoleh biji dengan kualitas baik. Biji tersebut kemudian dihaluskan untuk menaikkan efektivitas pada proses ekstraksi.

Sebanyak 2 kg serbuk diekstraksi. Ekstraksi adalah proses penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah dengan menggunakan pelarut tertentu (Anshel, 1989). Ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan zat aktif dalam bentuk ekstrak. Metode yang digunakan adalah maserasi yang merupakan cara ekstraksi paling sederhana. Serbuk dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut sampai seluruh bahan terendam. Maserasi dilakukan selama 6 hari, hal ini sesuai dalam Farmakope Indonesia Edisi 4 berkisar 4-10 hari (Voight, 1994). Maserasi memiliki keuntungan yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan cukup sederhana (Agoes, 2007). Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol adalah pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa polar dan non polar. Setelah dilakukan maserasi, selanjutnya dilakukan remaserasi selama 2 hari. Remaserasi merupakan metode ekstraksi ulang menggunakan pelarut baru setelah dilakukan penyaringan maserat pertama. Pelarut kedua ditambahkan sebanyak penambahan pelarut pertama (Depkes, 2000). Proses selanjutnya adalah penyaringan untuk memisahkan serbuk dan cairan yang berisi ekstrak. Ekstrak yang masih bercampur dengan pelarut harus dipisahkan dengan cara penguapan, penguapan dilakukan di atas penangas air (*waterbath*) bertujuan untuk menjaga suhu tetap di bawah suhu air mendidih yaitu 100°C sehingga dapat melindungi zat-zat yang terkandung dalam ekstrak yang bisa rusak akibat pemanasan. Ekstrak kental kemudian ditimbang dan diperoleh 95 gram ekstrak.

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih betina Sprague dawley dewasa. Semua subjek uji diovariectomi kecuali kelompok KN. Ovariectomi adalah pengambilan ovarium (Hartiningsih *et al.*, 2012). Sebelum ovariectomi, subjek diinjeksikan dengan antibiotik Sanpicillin® secara intramuskular dengan dosis sesuai berat badan subjek uji sebagai profilaksis. Sanpicillin® mengandung Amoxicillin. Katzung (1998) mengatakan bahwa antibiotik golongan penisilin yang memiliki indikasi untuk mencegah infeksi yang diakibatkan oleh bakteri gram positif dan gram negatif. Kemudian diberi anastesi Ketamin injeksi dengan dosis sesuai berat badan hewan uji. Katzung (1998) juga mengatakan bahwa Ketamin diindikasikan untuk anastesi jalur intravena yang bersifat lipofilik yang akan segera didistribusikan ke seluruh organ yang dilalui pembuluh darah (*vaskularisasi*). Setelah tikus teranestesi, bulu di bagian peritoneal dihilangkan untuk mempermudah proses pembedahan. Proses ovariectomi dimulai dengan membuat sayatan pada bagian peritoneal dengan menggunakan gunting bedah (*cutgut*) lalu diovariectomi. Sebelum dijahit, luka bedah diolesi dengan Povidon iodine yang bertujuan untuk mencegah infeksi pasca pembedahan serta berfungsi sebagai desinfektan.

Pada hari ke-21 pasca ovariectomi, subjek uji diberi estradiol atau ECM dengan teknik penyondean (pemberian melalui oral) selama 30 hari yang setara dengan 34 bulan pada manusia (Benitz, 1970). ECM dilarutkan dalam CMC-Na. CMC-Na berfungsi sebagai suspending agent (Rowe, 2006). Subyek penelitian diberi perlakuan yaitu kelompok KN normal tanpa perlakuan, kelompok negatif ovariectomi K.OVX, kelompok positif estradiol K.EST, kelompok ekstrak etanol

dosis 100 mg/kgBB ECM 100, kelompok ekstrak etanol dosis 200 mg/kgBB ECM 200, dan kelompok ekstrak etanol dosis 400 mg/kgBB ECM 400 masing-masing selama 30 hari. Subyek ditimbang setiap 1 minggu sekali untuk mengetahui berat badan untuk penyesuaian dosisnya.

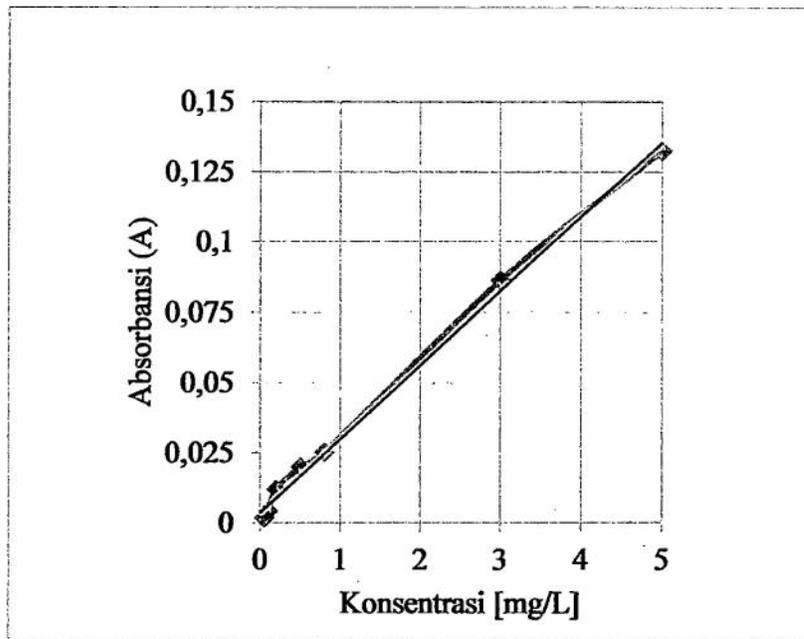
Pada hari ke-31 pasca pemberian estradiol atau ECM, semua subyek uji dikorbankan dan diambil kaki kanan belakang untuk keseragam. Tulang femur, tibia dan fibula dibersihkan dari sisa jaringan yang masih menempel dan dikeringkan untuk mempermudah proses penelitian selanjutnya. Tulang kemudian diuji kadar kalsiumnya dengan menggunakan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom). Penentuan kadar kalsium menggunakan spektrofotometri serapan atom dengan pertimbangan bahwa alat ini dapat mengukur kadar logam dalam jumlah yang sangat kecil dengan hasil yang akurat (Marzuki *et al.*, 2013).

Prosedur preparasi sampel tulang tikus dengan metode destruksi basah dan pengukuran kadar kalsium menggunakan SSA. Destruksi basah yaitu penguraian sampel dengan asam-asam kuat baik tunggal ataupun campuran, kemudian dioksidasi dengan menggunakan zat oksidator. Destruksi basah dilakukan karena proses pengerjaannya yang relatif lebih cepat dan praktis. Pelarut-pelarut yang dapat digunakan untuk destruksi basah antara lain asam nitrat, asam sulfat, asam perklorat, dan asam klorida, semua pelarut tersebut dapat digunakan tunggal ataupun campuran (Kristianingrum, 2015). Pelarut yang digunakan adalah HNO_3 dan HClO_4 . Tulang ditimbang dalam wadah Erlenmeyer, ditambahkan 15 ml HNO_3 sedikit demi sedikit melalui dinding, lalu ditambahkan 3 ml HClO_4 sedikit demi sedikit melalui dinding Erlenmeyer. HNO_3 dikombinasikan dengan HClO_4

sebagai campuran asam untuk mendestruksi. HClO_4 bertindak sebagai oksidan yang kuat (oksidator) untuk membantu HNO_3 mendekomposisi matriks organik tulang serta sebagai agen pengoksidasi utama karena HNO_3 merupakan pelarut logam yang baik. Kalsium teroksidasi oleh HNO_3 dan menjadi larut sehingga tulang dapat larut secara sempurna. Sampel kemudian didestruksi di plat pemanas hingga larut dan jernih. Kesempurnaan destruksi ditandai dengan diperolehnya larutan jernih pada larutan destruksi, yang menunjukkan bahwa semua konstituen yang ada telah larut sempurna atau perombakan senyawa-senyawa organik telah berjalan dengan baik (Kristianingrum, 2015). Destruksi kemudian dilanjutkan hingga sampel tersisa ± 3 ml, ditambahkan 25 ml air suling untuk mengencerkan, kemudian disaring di labu 100 ml, dan ditambahkan air suling hingga tanda, lalu dibaca nilai kadar kalsium tulang dengan SSA. Pembacaan kadar kalsium dalam tulang pada λ 422,7 nm karena panjang gelombang tersebut mampu mendeteksi ada atau tidaknya kandungan kalsium dalam sampel (Gandjar, 2007).

Tabel 1. Data Konsentrasi dan Absorbansi Kadar Kalsium

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi (A)
0	-0,00001
0,05	0,00188
0,1	0,00423
0,2	0,01195
0,5	0,01996
0,8	0,02531
1	0,05299
2	0,06825
3	0,08626
4	0,10222
5	0,13249



Gambar 2. Kurva Larutan Standar Kalsium

Persamaan garis linear, $y = 0,0034 + 0,0263x$, koefisien korelasi (r) = 0,9941.

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan induk kalsium karbonat (CaCO_3) dalam beberapa seri konsentrasi larutan standar kalsium yaitu: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 3; 4; dan 5 mg/L. Larutan standar kalsium kemudian diukur serapannya pada λ 422,7 nm yang spesifik untuk mengukur absorbansi kalsium pada Spektrofotometri Serapan Atom sehingga diperoleh nilai absorbansinya (Gandjar, 2007).

Tabel. 2 Pengaruh ECM terhadap Kadar Kalsium Model Ovariectomi

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Kadar Ca Tulang (%)
KN	18,30 ± 3,16
K.OVX	16,44 ± 3,93
K.EST	16,59 ± 2,63
ECM 100	17,79 ± 2,87
ECM 200	18,90 ± 2,13
ECM 400	18,28 ± 3,75

Data yang diperoleh kemudian diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan untuk sampel yang jumlahnya ≤ 50 , sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 sampel. Nilai sig atau signifikansi yang diperoleh $>0,05$ sehingga dikatakan normal. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dapat dilihat pada lampiran 4. Selanjutnya uji homogenitas menunjukkan nilai sig atau signifikansi $>0,05$ yang artinya data tersebut homogen. Data yang terdistribusi normal kemudian diuji dengan *One Way Anova*, uji ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan, hasilnya 0,815 yaitu $>0,05$ yang artinya tidak terdapat perbedaan data. *One Way Anova* digunakan pada saat jumlah kelompok perlakuan lebih dari 2 dan pada penelitian ini terdapat 6 kelompok dengan asumsi data yang terdistribusi normal, hasil uji terdapat pada lampiran 5. Uji *Tukey* dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan, nilai rata-rata pada *output* terletak pada satu kolom *subsets* yang sama, artinya adalah tidak ada perbedaan yang nyata, hasil uji dapat dilihat pada lampiran 6.

Kadar kalsium kelompok KN sebesar $18,30 \pm 3,16\%$. Terjadi keseimbangan antara pengendapan dan pengikisan tulang secara normal (Guyton, 1997), kadar estrogen yang stabil mempengaruhi aktifitas osteoblas dan osteoklas serta membantu proses absorpsi kalsium sehingga kadarnya lebih tinggi dari kelompok lain. Pada kelompok K.OVX, yang diberi aquades secara oral, kadar kalsium tulangnya sebesar $16,44 \pm 3,93\%$ yaitu lebih rendah dibandingkan kelompok KN. Ovariectomi menyebabkan menurunnya kadar estrogen sehingga kadar kalsium juga mengalami penurunan karena estrogen membantu dalam proses absorpsi kalsium pada usus dan reabsorpsi kalsium di ginjal (Hartiningsih, *et al.*, 2012).

Menurunnya produksi estrogen karena ovariectomi mengakibatkan kecepatan resorpsi tulang melampaui kecepatan pengendapan tulang (Johnson, 2011). Kadar estrogen yang menurun mengakibatkan berkurangnya deposit kalsium tulang (Guyton, 1997). Penurunan kadar kalsium akibat ovariectomi yaitu ovarium tidak lagi menghasilkan estrogen sehingga mempengaruhi kalsium dalam tubuh.

Kadar kalsium kelompok K.EST sebesar $16,59 \pm 2,63\%$, kadar kalsiumnya lebih tinggi dibanding kelompok K.OVX. Terdapat 3 jenis estrogen dalam tubuh yaitu: β -estradiol ; estron dan estriol, kekuatan estrogenik β -estradiol 12 kali kekuatan estron dan 80 kali kekuatan estriol sehingga dianggap sebagai estrogen utama (Guyton, 1990). Pemberian estradiol dari luar dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah sehingga penurunan kadar kalsium dihambat.

Kadar kalsium kelompok ECM 100 sebesar $17,79 \pm 2,87\%$, kadar kalsium kelompok ECM 200 sebesar $18,90 \pm 2,13\%$ dan kadar kalsium kelompok ECM 400 sebesar $18,28 \pm 3,75\%$. Fitoestrogen bermanfaat sebagai antiosteoporosis dan merupakan agen estrogenik (Purwoko, 2001). Penelitian yang dilakukan Permatasari, *et al.*, (2015) mengatakan bahwa pengaruh pemberian isoflavon dapat menghambat penurunan tinggi tulang alveolar. ECM yang mengandung isoflavon yaitu agen fitoestrogen sebagai antiosteoporosis sehingga penurunan kadar kalsium dapat dihambat. Sharma (2013) mengatakan bahwa dosis 200 mg/kgBB adalah dosis maksimum. Kadar kalsium kelompok ECM 200 lebih tinggi dari semua kelompok perlakuan bahkan kelompok KN karena ECM yang dipaparkan pada subjek uji mampu mengisi kekosongan estrogen dalam tubuh sehingga dapat menghambat penurunan kadar kalsium. Kadar kalsiumnya

kelompok ECM 400 lebih rendah dari kadar kalsium kelompok ECM 200. Hal ini disebabkan adanya penjenahan sehingga kadar kalsium lebih rendah dari kelompok ECM 200 walaupun dosis *C.moschata* dinaikkan. Pemberian ECM yang memiliki kandungan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga dapat membantu mempertahankan ketersediaan kalsium dalam tubuh.

ECM dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB merupakan agen fitoestrogen dari biji *C.moschata* yang mengandung isoflavon jenis glikosida fenolik. Fitoestrogen memiliki dua gugus hidroksil (OH). Gugus OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik, sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen. Struktur kimia fitoestrogen memiliki kemiripan dengan struktur kimia estrogen pada mamalia. Cincin fenolat pada isoflavon merupakan struktur penting pada sebagian besar komponen isoflavon yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptor estrogen (Sitasiwi, 2015).