

## AN IN VITRO ANTIOSTEOPOROTIC ACTIVITY OF 96% ETHANOL EXTRACT OF *Abelmoschus manihot* L. MEDIK LEAVES USING MC3T3-E1 PREOSTEOBLAST CELLS

### AKTIVITAS ANTIOSTEOPOROSIS EKSTRAK ETANOL 96 % DAUN *Abelmoschus manihot* L. MEDIK SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN SEL PREOSTEOBLAS MC3T3-E1

Agnis Pondinekaria Aditama, Mangestuti Agil, Hening Laswati\*  
Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

#### ABSTRACT

*Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and structural deterioration of bone tissue. Estrogen deficiency causes loss of bone mineral density which causes osteoporosis. Phytoestrogen is a potential alternative of estrogen that can be used as Hormone Replacement Therapy on osteoporosis with minimum side effects. Many edible plants contain phytoestrogens that are believed to promote bone health. Abelmoschus manihot (L.) Medik has been known as a plant that is empirically used in the traditional medicine and has potency to prevent osteoporosis. The aim of this research is to determine whether the Abelmoschus manihot (L.) Medik leaves have the potential to increase bone formation in an in vitro assays using preosteoblast cell line MC3T3-E1. The results showed an increasing activity of Alkaline phosphatase using confocal laser scanning microscopy technique.*

**Keywords:** *Abelmoschus manihot* L. Medik, preosteoblast MC3T3-E1 cell, alkaline phosphatase, in vitro.

#### ABSTRAK

*Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai dengan berkurangnya massa tulang dan kerusakan struktur jaringan tulang. Defisiensi estrogen menyebabkan hilangnya kepadatan mineral tulang yang dapat menyebabkan osteoporosis. Fitoestrogen berpotensi sebagai alternatif pengganti fungsi estrogen yaitu sebagai Hormon Replacement Therapy pada penyakit osteoporosis yang memiliki efek samping minimal. Banyak tanaman yang mengandung phytoestrogen diyakini dapat meningkatkan kesehatan tulang. Abelmoschus manihot (L.) Medik merupakan tanaman yang diketahui secara empiris mempunyai banyak efek yang digunakan sebagai pengobatan tradisional dan berpotensi untuk mencegah osteoporosis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96 % daun Abelmoschus manihot (L.) Medik untuk meningkatkan pembentukan tulang secara in vitro pada sel preosteoblast MC3T3-E1. Hasil penelitian in vitro menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun Abelmoschus manihot (L.) Medik mampu meningkatkan aktivitas Alkaline Phosphatase yang diukur dengan Confocal Laser Scanning Microscopy.*

**Kata kunci :** *Abelmoschus manihot* L. Medik, sel preosteoblast MC3T3-E1, alkaline phosphatase, in vitro.

#### PENDAHULUAN

*Abelmoschus manihot* L. Medik atau yang dikenal dengan nama daun geddi merupakan sayuran khas Sulawesi Utara yang biasa digunakan sebagai sayuran untuk membuat *tinutuan* atau yang dikenal dengan bubur Manado. Selain memberikan aroma lebih enak dan gurih, daun geddi juga berfungsi sebagai pengental sehingga bubur menjadi bening kental seperti larutan kanji.

Tanaman yang di Sulawesi Utara dikenal pula dengan sebutan *sayur yondok* ini juga dapat dimasak dengan berbagai macam cara disesuaikan dengan selera masing-masing. Bunga *Abelmoschus manihot* mengandung quercetin-1-O-robinobioside, hyperine, isoquercetine, gossipetin-8-O-glukuronide, dan myricetine (Liu *et al.*, 2006). Jia *et al.*, (2011) melaporkan telah mengisolasi beberapa senyawa terpenoid dan flavonoid dalam genus *Abelmoschus*. Senyawa yang berhasil diisolasi adalah 6-hydroxystigmasta-4-en-3-one, 6-hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one, stigmasta-5-en-3-ol-7-one, stigmasta-5,22-dien-3-ol-7-one,

---

Corresponding Author : Agnis P. Aditama  
Email : agnisaditama@yahoo.co.id

stigmast-5-en-3,7-diol, stigmast-5,22-dien-3,7-diol, stigmast-4,22-dien-3,6-dione, stigmasta-4,22-dien-3-one, ergosta-7,2-dien-3-ol, cycloart-25-en-3,24-diol, lupeol, aurantiamide acetate, hexadecanoic acid. Lai *et al.* (2009), telah mengisolasi senyawa hibifolin dan adenosin. Jain *et al.* (2009), telah mengisolasi dua steroid yaitu stigmasterol dan  $\gamma$ -sitosterol dari ekstrak petroleum eter batang kayu *A. manihot*. Satu senyawa steroid yaitu senyawa sitosterol dapat diisolasi dari fraksi n-heksana dari daun tumbuhan gedi merah (*Abelmoschus manihot*) (Mamahit, 2009). *Abelmoschus manihot* mengandung isoflavon, steroid dan terpenoid (Brotosudirdjo., 2000). Kandungan senyawa dalam tanaman telah diteliti dapat mengendalikan terjadinya osteoporosis, senyawa yang telah terbukti secara ilmiah dapat digunakan sebagai antiosteoporosis yaitu terpenoid dan flavonoid. Menurut Jia *et al.*, (2011) tanaman yang memiliki potensi digunakan untuk antiosteoporosis salah satunya adalah dari familia Malvaceae.

Penelitian Puel *et al* (2005), konsumsi harian serbuk simplisia daun *Abelmoschus manihot* yang dicampur dalam makanan tikus terkait aktivitasnya untuk mencegah keropos tulang pada tikus yang telah diangkat ovariumnya. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat peningkatan nilai *Bone Mineral Content* (BMC) dan *Bone Mineral Density* (BMD) dengan dosis optimal 15 % daun gedi, sehingga tanaman ini dapat membantu mengurangi keropos tulang pada kondisi defisiensi estrogen. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa daun gedi dapat memberikan perlindungan terhadap osteoporosis.

Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini, salah satunya adalah fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover *and* Assinder, 2006). Fitoestrogen adalah juga dianggap sebagai zat alternatif yang efektif dalam mencegah keropos tulang yang disebabkan oleh defisiensi estrogen (Urasopon *et al.*, 2008). Selanjutnya menurut Jefferson *et al.*, (2002), fitoestrogen merupakan senyawa yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten.

Flavonoid (isoflavon) diklasifikasikan sebagai fitoestrogen, berdasarkan kemiripan aktivitasnya dengan estrogen. Secara klasik komponen fitoestrogen terdiri dari (isoflavon, lignan, coumestane, stilbene, flavonoid quercetin dan kaemferol) (Grippio *et al.*, 2007).

Triterpenoid telah diteliti secara *in vivo* dan *in vitro* berperan sebagai terapi pada defisiensi

estrogen dan proses penuaan penyebab *bone loss*. Triterpenoid *oleanolic acid*, *betulinic acid* dan *ursolic acid* dilaporkan dapat menstimulasi sel osteoblas untuk peningkatan *bone formation* (Badole *and* Katwal., 2014). Efek estrogenik juga terdapat pada glikosida triterpen (Kovalchuk., 2006).

Mekanisme fitoestrogen secara *in vitro* untuk pencegahan osteoporosis dengan merangsang aktivitas pembentukan sel osteoblas dan menghambat pembentukan osteoklas (Branca., 2003). Secara *in vitro*, fitoestrogen dapat merangsang osteoblas untuk menstimulasi sintesis protein dan melepaskan *alkaline phosphatase* (Yamaguchi *and* Sugimoto., 2000). Penggunaan bahan alam yaitu tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen bertujuan untuk mengendalikan dan mengantisipasi kejadian osteoporosis, salah satu tanaman yang dikonsumsi dan secara empiris telah digunakan sebagai pengobatan di Indonesia salah satunya yaitu daun gedi merah.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiosteoporosis *in vitro* dari ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik pada sel preosteoblas MC3T3-E1.

## METODOLOGI

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu : alat gelas untuk maserasi, *Microplate 24 well, cover slip*, mikropipet, *shaker, lamina air flow* (LAF), inkubator CO<sub>2</sub>, Confokal Laser Scanning Microscopy (CLSM) type Olympus FV1000. Bahan yang digunakan yaitu : Daun *Abelmoschus manihot* L. Medik diperoleh dari daerah Kotamobagu, Manado, Sulawesi Utara. Dipanen pada tanggal 15 Februari 2015 dalam usia 90 hari. Identifikasi dilakukan di Balai Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. *Cell line* jenis sel preosteoblas MC3T3-E1 didapatkan dari kultur sel calvaria (C57BL/6) dan dibeli dari *American Type Culture Collection* (ATCC, CRL-2593; Manassas, VA, USA) *subclone* preosteoblas tipe 4 dari Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Etanol 96 %, aquades steril, tween 80, FBS, *Bovine Serum Albumine*, dapar fosfat, DMSO, asam ascorbat, kit ALP antibodi, antibodi sekunder ALP, dll.

### Pembuatan simplisia

Daun *Abelmoschus manihot* L. Medik sejumlah 3,2 kg yang didapat disortasi dan dilakukan pencucian dan dikeringkan dengan diangin-anginkan untuk meminimalkan jumlah air yang terkandung di dalam daun. Serbuk kering yang didapatkan sejumlah 320 g.

### Pembuatan ekstrak

Serbuk daun *Abelmoshus manihot* L. Medik sejumlah 320 gram diremaserasi dengan etanol 96 % selama 5 hari. Hasil maserasi di lakukan pemekatan ekstrak dengan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental dan menghasilkan 34 gram ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik.

### Preparasi ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. medik

Ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik sejumlah 50 mg dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 ml ditambahkan tween 80 (0,5% dari volume maksimal) diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan DMSO 0,5 % dalam *deionized water* pada labu ukur 50 ml untuk membuat larutan sampel induk yaitu suspensi ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik 1000 ppm. Saring larutan sampel induk ekstrak etanol 96 % dengan *milipore* 0,22  $\mu$ m dan disimpan dalam tabung steril. Membuat larutan sampel untuk perlakuan dengan beberapa dosis dari larutan sampel 500 ppm yang telah disaring, yaitu : dosis 40 ppm, dosis 25 ppm, dosis 12,5 ppm, dosis 6,25 ppm, dosis 3,125 ppm.

Kontrol negatif berupa *well* yang ditambah larutan berisi Tween 80 dan DMSO 0,5 % ad 50 ml dalam labu ukur, dilakukan replikasi tiga kali. Kontrol positif berisi 17 $\beta$ -estradiol yang dilarutkan terlebih dahulu dalam DMSO 0,5 % dan Tween 80 dalam labu ukur kemudian dimasukkan kedalam *well* dilakukan replikasi tiga kali.

Larutan sampel dari berbagai dosis, kontrol negative dan kontrol positif dimasukkan ke dalam *microplate 24-well* berisi sel preosteoblas MC3T3-E1 yang telah dipersiapkan sebelumnya, replikasi masing-masing dosis dilakukan tiga kali. Kemudian *Microplate 24-well* diinkubasi selama 48 jam dan dianalisis dengan metode *Immunocytochemistry* (ICC) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

### Preparasi pengamatan dengan CLSM

Media dalam *microplate 24-well* dibuang kemudian sel difiksasi dengan *paraformaldehyde* (PFA). Membilas *well* dengan *phosphate buffer saline* (PBS), kemudian dilakukan penambahan *blocking buffer* 5 % dan di *shaker*. Dilakukan pembilasan *well* dengan PBS dan di *shaker*. Dilakukan penambahan antibodi primer (*anti rabbit ALP*) lalu tunggu selama 1 jam. Dilakukan pembilasan *well* dengan PBS dan di *shaker*. Dilakukan penambahan antibodi sekunder (*anti rabbit FITC*) lalu simpan selama 45 menit dalam keadaan gelap. Dilakukan pembilasan *well* dengan

PBS dan di *shaker*. Pengamatan dengan CLSM dilakukan pada panjang gelombang 488 nm dan menganalisa intensitas fluoresensi ALP.

### Identifikasi golongan senyawa aktif

Identifikasi golongan senyawa flavonoid menggunakan metode KLT : ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dengan fase diam plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak (BAW) butanol : asam asetat glasial ; air (4 : 1 : 5) dan penampak noda uap ammonia dan pereaksi sitrat borat.

Identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan metode KLT : ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dengan fase diam lempeng plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etil asetat (6:4) menggunakan penampak noda Anisaldehyd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi di Balai Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur Daun *Abelmoschus manihot* L. Medik diperoleh dari daerah Kotamobagu, Manado, Sulawesi Utara, menyatakan bahwa daun tersebut adalah benar Daun *Abelmoschus manihot* L. Medik.

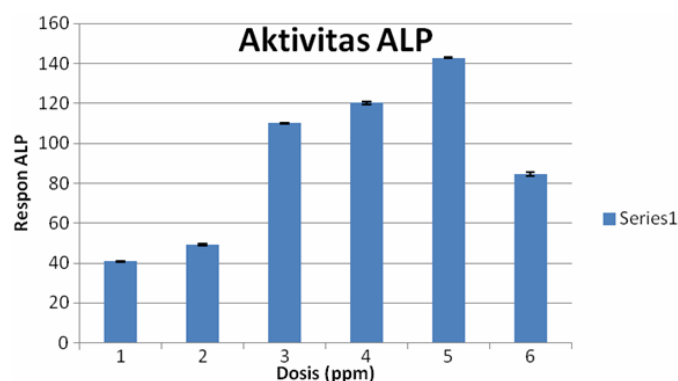
Identifikasi golongan senyawa flavonoid dan terpenoid menggunakan metode KLT. Flavonoid teridentifikasi menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>, fase gerak BAW (4 : 1 : 5) dengan pereaksi penampak noda Amonia dan sitroborat berupa bercak noda berwarna kuning dengan hRf 70 yang juga muncul pada totalan perbandingan Quercetin. Terpenoid teridentifikasi menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>, fase gerak n-heksana : etil asetat (6 : 4) dengan pereaksi penampak noda Anisaldehyd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Pengujian *in vitro* ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. medik menggunakan sel preosteoblas MC3T3-E1 dengan metode ICC dilakukan menggunakan CLSM. Pemilihan *cell line* preosteoblas MC3T3-E1 karena jenis sel ini merupakan model yang sangat baik untuk mengetahui proses pembentukan tulang secara *in vitro* dan sering digunakan untuk penelitian *in vitro* untuk mengetahui peran suatu senyawa dalam proses *bone remodeling cycle*. Metode ICC dipilih karena memiliki sensitivitas yang tinggi untuk mendeteksi adanya aktivitas ALP pada sel dengan prinsip antigen-antibodi serta waktu yang diperlukan untuk melihat aktivitas yang terjadi di dalam sel relatif lebih singkat (Javois, 1999; Fujiwara *et al.*, 2011; Taylor dan Rudbeck, 2013).

Penyiapan proses uji *in vitro* diawali dengan preparasi sel preosteoblas MC3T3-E1. Pemilihan media harus sesuai karena sangat berpengaruh terhadap perkembangan sel kultur, dalam

Tabel I. Hasil rata-rata  $\pm$  SD pengukuran aktivitas ALP pada masing-masing perlakuan

Kelompok	Rata-rata Respon Aktivitas ALP ( $\mu$ m)	SD
Kontrol negatif	40,81	0,09
Ekstrak dosis 3,125 ppm	49,20	0,34
Ekstrak dosis 6,25 ppm	110,03	0,10
Ekstrak dosis 12,5 ppm	120,16	0,88
Ekstrak dosis 25 ppm	142,74	0,33
Ekstrak dosis 40 ppm	84,41	1,02



Gambar 1. Grafik pengukuran aktivitas ALP (Alkaline Phosphatase) melihat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik dengan dosis : 1 (Kontrol Negatif); 2 (Dosis 3,125 ppm); 3 (Dosis 6,25 ppm); 4 (Dosis 12,5 ppm); 5 (Dosis 25 ppm); 6 (Dosis 40 ppm).

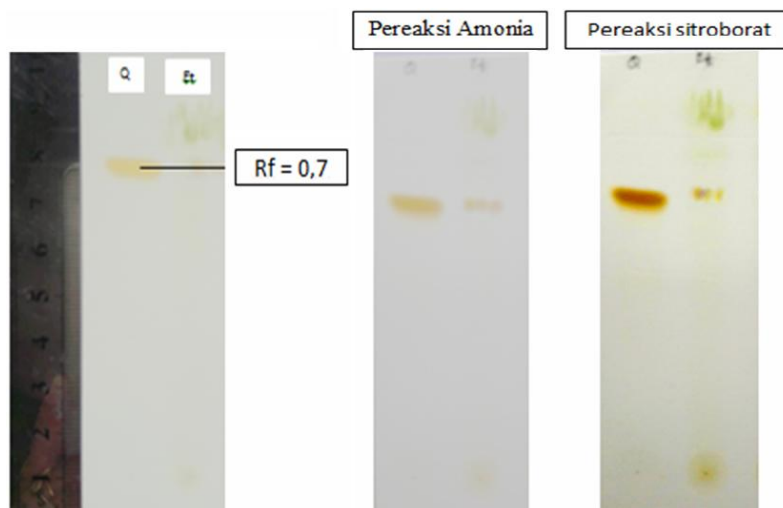
penelitian ini menggunakan media *Alpha-Minimum Essential Medium Eagle* ( $\alpha$ -MEM) yang merupakan media kultur sel yang sangat baik yang dapat digunakan untuk berbagai jenis sel. Pemilihan nutrisi pada media  $\alpha$ -MEM dikondisikan sesuai dengan kebutuhan sel yang akan dikultur dan disesuaikan dengan karakteristik sel sesuai persyaratan dalam prosedur dari ATCC. Penambahan bahan seperti asam ascorbat, natrium piruvat, natrium bikarbonat, Asam amino non esensial, FBS dan antibiotik agar sel dapat tumbuh dengan baik. Fungsi dari penambahan bahan asam ascorbat yang diperlukan untuk menginduksi diferensiasi sel, asam amino yang digunakan yaitu L-glutamin yang diperlukan dalam pertumbuhan sel, natrium piruvat sebagai sumber energi sel, natrium bikarbonat memper-tahankan pH media dan FBS untuk *membuat complete medium* sebagai sumber *growth factor* yang akan menginduksi pertumbuhan sel. Antibiotik berfungsi untuk menghindari terjadinya kontaminasi pada media. Proses preparasi dilakukan di dalam *laminar air flow* dengan menggunakan teknik kerja aseptik untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

Pemilihan dosis dilakukan dengan studi literatur penelitian *in vitro* yang menyebutkan bahwa penggunaan dosis ekstrak pada jenis sel preosteoblas MC3T3-E1 untuk uji ALP tidak terlalu besar, yaitu *range* dosis 1 – 50 ppm (Choi *et*

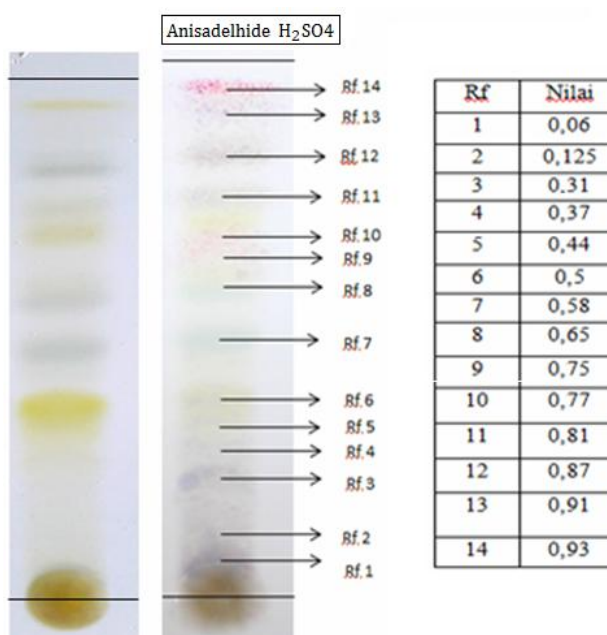
*al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Widyowati, 2011). Fraksi n-heksana daun *Abelmoschus manihot* L. Medik memiliki nilai  $IC_{50}$  pada dosis 50 ppm (Mamahit., 2009). Dari data tersebut maka *range* dosis ekstrak etanol 96 % yang digunakan yaitu, dengan 3 *range* dosis dibawah 25 ppm dengan kelipatan setengah dan 1 dosis diantara 25 ppm dan 50 ppm yaitu 40 ppm untuk melihat pengaruh dosis pada dosis antara 25 ppm dan 50 ppm. Sehingga *range* dosis yang dipilih untuk pengujian yaitu 3,125 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm dan 40 ppm.

Preparasi sampel ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dibuat larutan dalam DMSO 0,5 % dan dengan penambahan *surfactant* (tween 80) 0,5 %. Pemilihan DMSO karena merupakan pelarut *inert* dan sering digunakan sebagai pelarut pada penelitian *in vitro* dengan persyaratan kadar DMSO tidak boleh lebih dari 1 %. Sifat polar dari DMSO maka diperlukan penambahan surfaktan yaitu tween 80 agar sampel yang bersifat non polar dapat terdispersi secara homogen.

Data aktivitas ALP dari  $17\beta$ -estradiol sebagai kontrol positif digunakan untuk melihat adanya kemampuan  $17\beta$ -estradiol dalam menginduksi diferensiasi sel preosteoblas menjadi sel osteoblas. Kontrol negatif menggunakan *well* yang berisi media yaitu  $\alpha$ -MEM dan sel



Gambar 2. Profil KLT identifikasi golongan senyawa flavonoid menggunakan KLT : quercetin (Q) dan ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik (Et) dengan fase diam plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak (BAW) butanol : asam asetat glasial ; air (4 : 1 : 5) dan penampak noda uap ammonia dan pereaksi sitrat borat.



Gambar 3. Profil KLT identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan KLT : ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dengan fase diam plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana : etil asetat (6 : 4) menggunakan penampak noda Anisaldehyd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

preosteoblas MC3T3-E1 untuk melihat keadaan normal dimana tidak ada perlakuan pemberian larutan sampel ekstrak etanol 96 %.

Preparasi sel preosteoblas sebelum pengamatan dengan CLSM yaitu dengan melakukan proses fiksasi dengan penambahan *paraformaldehyde* (PFA). Proses fiksasi bertujuan untuk membunuh sel tanpa adanya kerusakan lanjutan pada sel yang diperlukan agar dapat

menganalisis sel pada waktu yang tepat sesuai dengan yang diinginkan dan mencegah adanya reaksi lanjutan. Kemudian dilakukan pemberian *blocking buffer* yaitu FBS dalam *phosphate bovine serum* (PBS) pada sel yang bertujuan untuk mencegah terjadinya ikatan non spesifik dari antibodi ALP yang akan diberikan terhadap protein lain yang bukan ALP yang dapat mempengaruhi ikatan antara antibodi ALP dengan

ALP. Selanjutnya diberi antibodi primer yaitu antibodi ALP (*anti rabbit ALP*) yang akan mengikat ALP yang diproduksi sel preosteoblas ketika berdiferensiasi. Pengikatan ALP oleh antibodi primer tersebut akan berikatan dengan antibodi sekunder yaitu *anti rabbit FITC* yang telah terkonjugasi dengan gugus fluorofor. Ikatan antara ALP, antibodi primer dan antibodi sekunder akan berfluorosensi pada panjang gelombang 488 yang akan terdeteksi pada CLSM (Fujiwara *et al.*, 2011; Taylor and Rudbeck, 2013).

Aktivitas ALP uji *in vitro* menggunakan CLSM ditunjukkan dari intensitas fluoresensi yang terdeteksi. Semakin tinggi intensitas fluoresensi yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas ALP. Aktivitas ALP menunjukkan kemampuan dari senyawa dalam ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. medik dalam menginduksi diferensiasi sel preosteoblas MC3T3-E1 menjadi sel osteoblas serta masing-masing dapat dibandingkan dengan kontrol negatif.

Pengamatan yang dilakukan secara visual terhadap sel preosteoblas MC3T3-E1 menunjukkan tidak ada perubahan morfologi pada sel setelah perlakuan dengan pemberian larutan sampel ekstrak etanol 96 %. Morfologi sel preosteoblas masih berbentuk poligonal dan menempel pada *cover slip*, tidak terjadi *shrinking* atau *swelling* dan mengambang pada media. Hal ini menunjukkan pemberian larutan sampel ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik pada semua *range* dosis tidak memberikan efek toksik pada sel preosteoblas MC3T3-E1. Kemampuan ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dalam menginduksi proses diferensiasi sel preosteoblas menjadi osteoblas dapat dibandingkan satu sama lain dengan membandingkan persentasenya terhadap kontrol negatif.

Berdasarkan data yang diperoleh, kelompok kontrol negatif memiliki nilai aktivitas ALP lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dengan dosis 3,125 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm dan 40 ppm.

Persentase aktivitas ALP ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. medik pada *range* 3,125 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm dan 40 ppm terhadap kontrol negatif secara berurutan yaitu 1.20 %, 2.69 %, 2.94 %, 3.49 %, 2.06 %. Sehingga terdapat dugaan kuat ekstrak etanol tersebut mampu menginduksi diferensiasi sel preosteoblas MC3T3-E1 melalui peningkatan aktivitas ALP.

Hasil pengujian *in vitro* ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik menunjukkan hubungan yang tidak linear antara peningkatan dosis dan

aktivitas ALP, dimana peningkatan dosis tidak disertai dengan adanya peningkatan aktivitas ALP.

Keadaan tersebut kemungkinan besar berkaitan dengan teori yang menyatakan tidak dapat ditetapkannya linieritas hubungan antara konsentrasi hormon dan ikatan dengan reseptor. Pada konsentrasi diatas K, yaitu konstan disosiasi untuk kinetika ikatan reseptor dan ligand, terjadi penjujukan respons awal, dimana peningkatan konsentrasi selanjutnya akan terjadi penjujukan reseptor (Vandenberg *et al.*, 2012).

Pada hasil pengujian ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik didapatkan data yaitu, pada dosis rendah yang ditingkatkan konsentrasinya dari 3,125; 6,25; 12,5 dan 25 terjadi peningkatan aktivitas ALP. Peningkatan dosis berikutnya sebesar 40 ppm tidak menunjukkan peningkatan kekuatan yang lebih tinggi.

Terdapat beberapa alasan yang dapat membantu menjelaskan fenomena tersebut, yaitu faktor-faktor yang menyebabkan hormon endogen dapat menunjukkan aktivitasnya pada dosis rendah: Reseptor hormon yang bersifat spesifik mempunyai afinitas tinggi, sehingga dapat berikatan dengan molekul hormon dalam jumlah cukup untuk memacu respons; Terdapatnya hubungan non linier antara konsentrasi hormon dan jumlah reseptor yang dapat berikatan; Terdapatnya hubungan non linier antara jumlah reseptor yang berikatan dan efek biologik terkuat yang dapat diamati.

*Non monotonic dose response* dapat berlangsung karena terdapatnya perbedaan afinitas reseptor yang mengakibatkan terdapatnya selektivitas respons pada dosis tinggi versus dosis rendah. Jadi, ada senyawa yang dapat terikat secara kuat pada sebuah reseptor estrogen pada dosis rendah, namun pada dosis tinggi senyawa itu juga terikat pada reseptor hormon lain secara lemah, seperti pada reseptor androgen dan tiroid. Dalam kenyataannya, beberapa zat kimia yang menunjukkan efek pada dosis rendah ternyata menunjukkan aktivitas lewat kerjanya melalui ikatan multi reseptor dan multi jalur. Efek yang terlihat pada dosis tinggi dapat terjadi karena ikatan dengan multi reseptor dibandingkan dengan efek pada dosis rendah yang terjadi melalui ikatan hanya pada satu reseptor (Vandenberg *et al.*, 2012).

Ini sesuai dengan sifat multi-komponen ekstrak yang memberikan efek sinergisme yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit yang kompleks (Yang Y *et al.*, 2014). Ekstrak *Abelmoschus manihot* L. Medik diketahui mempunyai kandungan senyawa golongan flavonoid, terpenoid dan steroid (Liu *et al.*, 2006;

Brotsudirdjo., 2000; Mamahit., 2009). Jadi, terdapat kemungkinan kandungan senyawa tersebut bekerja memberikan efek sinergisme yang belum diketahui mekanismenya secara langsung dalam menginduksi diferensiasi sel preosteoblas.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik dapat menunjukkan aktivitas pembentukan alkaline fosfatase pada percobaan in vitro dengan sel preosteoblas MC3T3-E1.

## DAFTAR PUSTAKA

- Badole S and Kotwal S. 2014. Equisetum arvense: Ethanopharmacological and Phytochemical review with reference to osteoporosis. RTM Nagpur University. Issue 4, Vol 1.
- Branca F. 2003. Dietary Phyto Oestrogens and Bone Health. Proceeding of the Nutrition Society, 877-887.
- Brotsudirdjo M. 2000. Telaah fitokimia daun Gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik), Malvaceae. Dalam : Penelitian Tanaman Obat Di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia. Buku X. Jakarta: Depkes RI. Balitbang Kesehatan Puslitbang Farmasi.
- Chen, L., Lei, L., Ding, P., Tang, Q., Wu, Y. 2011. Osteogenic effect of *Drynariae rhizoma* extracts and Naringin on MC3T3-E1 cells and an induced rat alveolar bone resorption model. Elsevier : Archives of oral biology. Vol 56. Page 1655-1662.
- Choi, E. M. 2012. Liquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* stimulates osteoblast function in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Elsevier : International Immunopharmacology. Vol 12. Page 139-143.
- Fujiwara, K., Shin, M., Hougaard, D. M., Saita, T. Distribution study of peplomycin in rat kidney revealed by immunocytochemistry using monoclonal antibodies. Histochem Cell Biology. Vol 135. page 93-101.
- Glover A and Assinder S. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormon receptor expression. Jour. Endoc. 189: 565-573.
- Grippio A, Capps K, Rougeau B and Gurley BJ. 2007. Analysis of flavonoid phytoestrogens in botanical and ephedra-containing dietary supplements. Ann Pharmacother. 41:1375-82.
- Jain P and Bari S. 2009. Isolation of Stigmaterol and  $\gamma$ -sitosterol from petroleum ether extract of woody stem of *Abelmoschus*

*manihot*. Asian Journal of Biological Sciences.

- Jefferson W, Padilla-Banks E, Clark G and Newbold R. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. Journal of Chromatography. B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 777(1-2):179-189.
- Jia L and Guo Li M. 2011. Chemical constituents from petroleum ether portion of *Abelmoschus esculentus* II. China journal of chinese Materia Medica.
- Jia L and Guo Li M. 2011. Chemical constituents from petroleum ether portion of *Abelmoschus esculentus* II. China journal of chinese Materia Medica.
- Kovalchuk S, Kozhemyako, V, Atopkina S, Silchenko A, Avilov S, Kalinin V, Rasskazov V and Aminin D. 2006. Estrogenik activity of triterpene glycosides in yeast two-hybrid assay. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Volume 101. Issue s 4 - 5. Pages 226 - 231.
- Lai X, Liang H, Zhao Y and Wang B. 2009. Simultaneous determination of seven active flavonols in the flowers of *Abelmoschus manihot* by HPLC. J. Chromatogr. Sci. 3, 206-210.
- Liu Y, Xianyin L, Xiaomei, yuying Z and Jingrong C. 2006. Interactions Between Thrombin with Flavonoids from *Abelmoschus manihot* Medicus by CZE. Chromatographia.
- Mamahit L. 2009. Satu Senyawa Steroid Dari Daun Gedi (*Abelmochus manihot* L. Medik) Asal Sulawesi Utara. Chem. Prog. Vol. 2, No 1.
- Puel C, Mathey J, Davicco M, Labecque P, Chanteranne B, Horcajada M and Coxam V. 2005. Preventive effect of *Abelmoschus manihot* L. Medik on bone loss in the ovariectomised rats. J Ethnopharmacology. 99:655-660.
- Taylor, C. R., and Rudbeck, L. 2013. Immunohistochemical Staining Methods. Dako Denmark : IHC Handbook sixth edition.
- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008. "Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats," Maturitas, vol. 59, no. 2, pp. 137-148.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D-H., Shioda, T., Soto, A. M., Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., Myers, J. P. 2012. Review : Hormones and Endocrine-Disrupting

- Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Journal*. Vol 33. No 3.
- Widyowati, R. 2011. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthes acmella* Fractions Against MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3. Suppl 1.
- Yamaguchi M, Lai Y 2006. Oral administration of phytochemical p-hydroxycinnamic acid has anabolic effects on bone calcification in femoral tissues of rats in vivo. *J Health Sci* 52; 308 – 312.
- Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, He K. 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*. Vol 92, P 133–147