

**OPTIMISASI SEDIAAN KONSENTRAT EKSTRAK ETANOL 70%
DAN 96% Herba kemangi SEBAGAI FITOESTROGEN PADA TIKUS PUTIH
BETINA (*Rattus norvegicus*)**

E. Mulyati Effendi¹, Hera Maheshwari² dan Evi Juliati Gani³
^{1,3}*Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Pakuan, Bogor*
²*Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.*

ABSTRAK

Perubahan hormonal pada wanita menopause menimbulkan berbagai macam keluhan seperti keluhan vasomotorik, keluhan fisiologis dan psikologis. Untuk menangani keluhan semacam biasanya digunakan terapi sulih hormon estrogenik baik hormon sintetik maupun hormon alami. Berdasarkan beberapa hasil penelitian, tanaman yang diduga memiliki khasiat estrogenik diantaranya adalah herba kemangi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui optimisasi dan potensi estrogenik dari sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% herba kemangi pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*). Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% diharapkan dapat menghasilkan dosis yang optimal dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%. Penelitian dilakukan berdasarkan metode *whitten effect* menggunakan 32 ekor tikus putih betina yang dibagi dalam 8 kelompok perlakuan (P1 sampai P8), setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. P1 adalah kontrol negatif (perlakuan CMC-Na 0,5%), P2 kontrol positif (perlakuan etinil estradiol), P3 (perlakuan 0,7g/200g BB ekstrak etanol 70%), P4 (perlakuan 0,8g/200g BB ekstrak etanol 70%), P5 (perlakuan 0,9g/200g BB ekstrak etanol 70%), P6 perlakuan (0,7g/200g BB ekstrak etanol 96%), P7 (perlakuan 0,8g/200g BB ekstrak etanol 96%) dan P8 (perlakuan 0,9g/200g BB ekstrak etanol 96%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 0,7g/200g BB sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi memiliki pengaruh yang sangat nyata terhadap bertambahnya lama waktu siklus estrus, tingkat vaskularisasi dan peningkatan bobot ovarium-uterus dibandingkan kontrol negatif (P1) serta memiliki pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif (P2).

Kata kunci: Optimisasi pelarut, herba kemangi, fitoestrogen

**OPTIMIZATION OF PREPARATIONS of 70% AND 96%
CONCENTRATED ETHANOLIC EXTRACT of
Ocimum americanum L. AS PHYTOESTROGEN IN FEMALE WHITE RAT
(*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

The hormonal changes in menopausal woman cause various health pains such as vasomotor, psychological and physiological complaints. These pain can be treated with Hormon Replacement Therapy (HRT) using synthetic or natural hormones. According to previous research, basil herb (*Ocimum americanum* L.) was believed to have potential estrogenic effect. The purpose of this research was to determine the optimization and estrogenic potency of 70% and 96% ethanol extract of basil herb on female rats. Extraction of basil herbs using 96% ethanol was predicted to produce optimal dose than extraction with 70% ethanol. Thirty two pre-menopause female rats which divided into 8

treatment groups were used in this study. The animals were tested with whitten effect method. Group P1 were administered with CMC-Na 0.5% as a negative control, group P2 were administered with 9×10^{-3} g/200g BW ethinyl estradiol as a positive control, group P3, P4 and P5 were administered with 0.7g/200g BW, 0.8g/200g BW and 0.9g/200g BW of 70% ethanol extract of basil herb respectively meanwhile group P6, P7 and P8 were administered with 0.7g/200g BW, 0.8g/200g BW and 0.9g/200g BW of 96% ethanol extract of basil herb. The result shows that administration of 0.7g/200g BW of 96% ethanol extract of basil herb had the most significant effect on the length of estrous cycle, the vascularisation of ovarium dan uterus and the increase in ovarium and uterus weight in female rats compared to the negative control (P1). This effect relatively similar to the effect of positif control (P2).

Keywords: Solvent optimization, *Ocimum americanum*, phytoestrogen

PENDAHULUAN

Wanita pada usia 40-50 tahun biasanya mengalami ketidakteraturan siklus menstruasi yang ditandai dengan tidak terjadinya ovulasi selama beberapa siklus menstruasi dan setelah beberapa tahun siklus berhenti sama sekali yang kemudian disebut masa menopause. Pada saat ini produksi hormon estrogen oleh ovarium menurun drastis sehingga tidak dapat lagi berperan dalam pembentukan hormon perangsang folikel (FSH) dan hormon luteinisasi (LH) yang cukup untuk memicu terjadinya ovulasi (Guyton, 1994). Perubahan hormonal yang drastis ini menimbulkan banyaknya keluhan di masa menopause seperti keluhan vasomotorik, keluhan fisiologis dan keluhan psikologis. Keluhan yang paling sering muncul adalah *hot flushes* (semburan rasa panas pada daerah-daerah tertentu seperti dada, leher dan kepala), kerusakan kulit, gangguan system urogenital, gangguan libido, osteoporosis dan hiperkolesterolemia (Badziad, 2003).

Untuk mengatasi masalah ini biasaya digunakan *Hormone Replacement Therapy* (HRT) atau terapi hormonal menggunakan estrogen sintetis seperti *ethinyl estradiol*. Namun penggunaan hormon sintetis menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan sehingga dewasa ini penggunaan hormon sintetis beralih pada

penggunaan obat-obatan asal bahan alam. Terdapat beberapa tanaman yang diduga memiliki khasiat estrogenik, diantaranya adalah kemangi (*Ocimum americanum* L.).

Kemangi memiliki kandungan aktif anetol, boron dan stigmaterol yang bersifat fitoestrogen dapat merangsang sekresi estrogen, senyawa arginin yang dapat mencegah kemandulan dan senyawa eugenol yang mampu membunuh jamur penyebab keputihan. Selain itu zat stigmaterol dalam kemangi dapat merangsang pematangan sel telur, tanin dan seng dapat mengurangi sekresi cairan vagina, triptofan yang terkandung di dalam kemangi dapat menunda menopause serta kandungan senyawa boron juga berperan dalam pencegahan pengeroposan tulang. Berdasarkan pengalaman empiris juga diperoleh data bahwa para wanita yang mengkonsumsi kemangi setiap hari dapat menunda masa menopause (Gunawan, 2004). Kemangi juga memiliki kandungan flavonoid (Vinca *et al.*, 2004) dan mempunyai efek estrogenik yaitu dapat bekerja seperti estrogen dengan cara menduduki reseptor estrogen (Satyaningtijas *et al.*, 2014).

Hasil yang diperoleh dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak etanol 70% herba kemangi dosis 0,8 g/200gBB dapat meningkatkan aktivitas estrogenik tikus putih (*Rattus*

norvegicus) betina pre-menopause setara dengan kontrol positif etinil estradiol 9×10^{-3} mg/200gBB (Effendi *et al.*, 2009). Selanjutnya penelitian Anatria (2011) terhadap ekstrak n-heksan herba kemangi, dan menyatakan bahwa ekstrak n-heksan herba kemangi dosis 0,2 g/200g BB dapat memperpanjang siklus estrus dan meningkatkan bobot ovarium dan uterus tikus putih usia 8-9 bulan sebanding dengan kontrol positif etinil estradiol 9×10^{-3} mg/200g BB. Penggunaan pelarut n-heksan akan lebih banyak menarik zat aktif (stigmaterol) dalam herba kemangi dari pada pelarut etanol 96%, namun karena n-heksan memiliki sifat toksik lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 96% sehingga kurang aman digunakan dalam ekstraksi zat aktif yang akan diaplikasikan pada manusia. Etanol dilihat sebagai pelarut pada penelitian ini dibandingkan heksan karena etanol merupakan jenis bahan kimia yang termasuk kedalam *food grade* dan *pharma grade*.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya seperti yang diuraikan diatas, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis efektif sehingga sediaan cair herba kemangi agar didapatkan konsentrasi minimal dengan efek terapi maksimal. Dosis efektif berkaitan dengan efektifitas ekstraksi yang tergantung pada macam pelarut dan tingkat kepolaran pelarut karena tingkat kepolaran pelarut mempengaruhi proporsi senyawa-senyawa yang tersari. Menurut Markham (1988), ekstraksi pelarut etanol 96% dapat menarik senyawa berpotensi estrogenik (salah satunya flavonoid) lebih banyak dibanding dengan ekstraksi menggunakan pelarut 70%. Dengan demikian dosis pemakaian pada penelitian sebelumnya dapat diturunkan.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba kemangi, yang

diambil dari perkebunan daerah Leuwiliang, Kabupaten Bogor.

Pembuatan Ekstrak Etanol 70% dan 96% Herba Kemangi

Sebanyak masing-masing 0,5 kg serbuk kering herba kemangi yang telah diayak dengan ayakan mesh ukuran 30 dimaserasi dengan 1 L etanol 70% dan 96%. dalam tabung kaca selama 1 hari. Selama perendaman dilakukan pengocokan setiap 6 jam sekali selama 15 menit. Setelah 1 hari rendaman disaring, filtrat diambil dan ampasnya dimaserasi kembali sebanyak 4 kali dengan perlakuan yang sama. Filtrat yang diperoleh divakum sampai beratnya konstan dan menghasikan ekstrak kental yang selanjutnya digunakan untuk uji estrogenik.

Nilai rendemen ekstrak dihitung dengan membandingkan berat awal simplisia dan berat akhir ekstrak yang dihasilkan. Rendemen merupakan parameter standar mutu ekstrak serta penentuan efisiensi ekstraksi.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

Analisis Karakteristik Serbuk Simplisia dan Ekstrak

Penetapan Kadar Air

Kadar air simplisia diukur menggunakan alat *moisture balance*. Kadar air simplisia tidak boleh lebih dari 10% (DepKes RI, 1995) dan kadar air ekstrak kental tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2008).

Penetapan Kadar Abu

Kadar abu total simplisia tidak lebih dari 13,1% (DepKes RI, 2008). Untuk mengukur kadar abu, sebanyak 2-3g simplisia dipijarkan dalam tanur pada suhu 700°C sampai menjadi abu dan bobotnya tetap. Kadar abu dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{\text{bobot abu yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

Pembuatan Sediaan Konsentrat

Sediaan konsentrat dibuat dengan cara mencampurkan masing-masing 70 g, 80 g dan 90 g ekstrak etanol 70% dan 96% dengan CMC 0,5% dan 100 mL *aquadest* yang telah dipanaskan. Selanjutnya masing-masing konsentrat disimpan dalam

Tabel 1. Sediaan Konsentrat

Perlakuan	Zat Aktif	CMC-Na 0,5%
P1	-	
P2	Etinilestradiol $9 \times 10^{-3} \text{g}/200 \text{g BB}$	
P3	700 mg ekstrak etanol 70% herba kemangi	
P4	800 mg ekstrak etanol 70% herba kemangi	
P5	900 mg ekstrak etanol 70% herba kemangi	add 100mL
P6	700 mg ekstrak etanol 96% herba kemangi	
P7	800 mg ekstrak etanol 96% herba kemangi	
P8	900 mg ekstrak etanol 96% herba kemangi	

Penentuan Aktifitas Estrogenik Dengan Metode Whitten Effect

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan RAL (Rancangan Acak Lengkap) menggunakan 8 kelompok tikus betina *Rattus norvegicus* pre menopause, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus diaklimatisasi selama dua minggu sebelum uji estrogenik dilakukan.

Metode *Whitten Effect* dilakukan dengan cara meletakkan kantung tikus jantan diletakkan di atas kantung tikus betina. *Whitten effect* berfungsi untuk

lemari pendingin sampai saat digunakan. Dosis pemakaian konsentrat adalah 1 mL dimana dalam masing-masing 1 mL tersebut mengandung ekstrak etanol 70% dan 96% sebesar 700mg/200gBB (P3 dan P6), 800mg/200gBB (P4 dan P7) dan 900mg/200gBB (P5 dan P8).

sinkronisasi birahi pada tikus betina dengan mencium bau feromon yang keluar bersama urin tikus jantan. Ketika tikus betina tidak mencium bau feromon tikus jantan, maka tikus mengalami fase anestrus, sedangkan pada saat tikus betina mencium bau feromon yang ikut keluar bersama urin tikus jantan, maka hari ke 3 berikutnya tikus betina mengalami masa estrus, ciri-ciri hewan estrus dapat dilihat dari keadaan vulva yang bengkak, berwarna merah dan basah (Hafez, 1980).

Pengambilan dan Pemeriksaan

Preparat Ulas Vagina

Sebelum dilakukan penelitian, hewan percobaan diamati terlebih dahulu ciri-ciri siklus estrusnya melalui pemeriksaan preparat ulas vagina (*vagina smear*) dengan pewarnaan Giemsa, yang dilaksanakan 2 kali setiap 12 jam yaitu pagi pada pukul 06.00 WIB dan malam pada pukul 18.00 WIB untuk mengamati perubahan-perubahan yang terjadi pada epitel vagina.

Pengambilan sampel preparat apus vagina dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Dilakukan sinkronisasi birahi tikus-tikus tersebut melalui metode *Whitten Effect*. Pada hari ke-3, tikus-tikus diperiksa siklus birahi melalui *vaginal smear*.
2. *Cutton bud* yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis diulaskan ke dalam lubang vagina tikus untuk mengambil selaput lendir vagina.
3. Sampel yang didapat kemudian diusapkan di atas gelas objek kemudian preparat difiksasi menggunakan methanol 10% selama 5 menit.

4. Setelah itu preparat ulas diwarnai dengan cara dicelupkan pada bak pewarna Giemsa selama 30 menit, kemudian dicuci dengan *aquadest* dan dikeringkan. Warna yang dihasilkan merah dadu.
5. Pemeriksaan preparat ulas vagina untuk menentukan fase siklus reproduksi dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran okuler 10x dan objektif 40x. Penentuan fase siklus reproduksi (proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus) dilakukan dengan mengamati ciri khas yang terdapat pada siklus reproduksi seperti tertera pada Tabel 4 (Hafez, 1980).
6. Apabila tikus-tikus tersebut sudah dalam keadaan fase estrus, kemudian diberikan perlakuan pemberian sediaan konsentrat ekstrak herba kemangi sesuai dengan dosis sesuai kelompok masing-masing (kelompok P1 sampai P8).

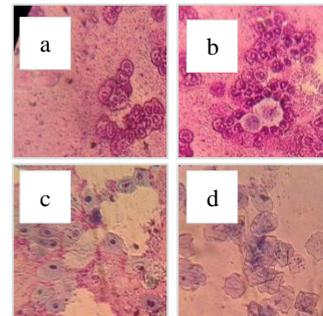
Uji Efek Estrogenik Ekstrak Herba Kemangi

Pemberian sediaan konsentrat ekstrak herba kemangi dilakukan sekali setiap hari pada jam 06.00 WIB selama 14 hari berturut-turut setelah tikus-tikus diperiksa fase estrus melalui cara makroskopis dan mikroskopis. Waktu estrus tersebut dicatat yang kemudian pemeriksaan fase estrus dilanjutkan setiap hari, dua kali sehari yaitu pagi jam 06.00 WIB dan malam pada pukul 18.00 WIB selama masa perlakuan. Pada hari ke-15 dilakukan dekapitasi hewan-hewan coba tersebut untuk mengamati vaskularisasi uterus dan menimbang bobot ovarium-uterusnya serta dilakukan penyimpanan ovarium dan uterus tersebut di dalam larutan etanol 70%.

Pengukuran Lama Siklus Estru

Pengukuran lama fase estrus dilakukan secara mikroskopis dengan metode preparat ulas vagina (*vaginal smear*) dan tanda-tanda estrus secara

makroskopis. Pembuatan preparat ulas vagina dilakukan setiap hari, dua kali sehari, pagi dan sore hari selama perlakuan, sekaligus melihat tanda-tanda estrus meliputi keadaan vulva dan vagina



Gambar 1. Fase-fase Siklus Estrus,

Fase Proestrus 12jam (a), Estrus 12jam (b), Metestrus 21jam (c) dan Diestrus 57jam (d)

Vaskularisasi dan Penimbangan Bobot Ovarium dan Uterus Tikus

Pengamatan vaskularisasi ovarium dan uterus pada tikus betina dilakukan dengan cara mematikan tikus yang sedang mengalami masa estrus dengan eter, lalu dibedah untuk mengeluarkan ovarium dan uterusnya, setelah itu dilihat warna mukosa pada ovarium dan uterus tikus. Pengamatan vaskularisasi dinyatakan dengan *scoring*, sesuai dengan modifikasi metode Rugh (1968), dimana :

Skor 1 → Sedikit Merah

Skor 2 → Merah

Skor 3 → Sangat Merah

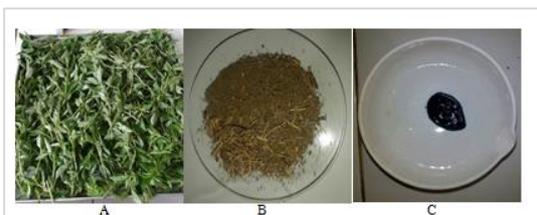
Setelah pengamatan vaskularisasi kemudian dilakukan penimbangan bobot ovarium dan uterus secara terpisah menggunakan timbangan analitik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Maserasi Herba Kemangi Dengan Etanol 70% dan 96%

Ekstrak kental hasil maserasi menggunakan etanol 70% memiliki nilai randemen 10,65% dan ekstrak kental hasil

maserasi menggunakan etanol 96% memiliki nilai randemen 10,78%. Randemen merupakan parameter standar mutu ekstrak serta penentuan efisiensi ekstraksi. Dari data yang diperoleh diketahui bahwa maserasi menggunakan etanol 96% menghasilkan rendemen dengan nilai yang tidak berbeda nyata.



Gambar 2. A. Simplisia basah herba kemangi; B. Simplisia Serbuk; C. Ekstrak Kental.

Karakteristik Simplisia dan Ekstrak Nilai Kadar Air dan Abu

Penetapan kadar air simplisia serbuk dilakukan menggunakan alat *moisture balance*, sedangkan ekstrak kental menggunakan metode gravimetri (DepKes, 2000). Hasil penetapan kadar air disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, kadar air serbuk simplisia dan ekstrak herba kemangi memenuhi persyaratan (DepKes RI, 1989) yaitu kadar air tidak lebih dari 10 %. Semakin kecil kandungan air dalam suatu simplisia, maka akan sangat berguna untuk memperpanjang daya tahan serbuk simplisia selama penyimpanan. Namun kadar air yang terlalu kecil juga dapat merusak senyawa aktif yang terkandung dalam suatu simplisia, sehingga proses pengeringan simplisia harus dilakukan secara optimal. Hasil penentuan kadar abu pada simplisia herba kemangi dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil ini memenuhi syarat yang ditetapkan Departemen Kesehatan (2008) yang menyatakan bahwa kadar abu total simplisia tidak lebih dari 13.1%. Pengotor mineral yang melebihi batas akan mempengaruhi kualitas senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia. Kadar abu

yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% memberikan hasil yang relatif sama serta kadar abunya lebih kecil dari kadar abu simplisia, hal ini dikarenakan sebagian senyawa mineral dan senyawa anorganik tidak ikut tersari dalam proses ekstraksi.

Tabel 2. Kadar Air dan Abu Simplisia dan Ekstrak

Bahan	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)
Simplisia	7,93	10,04
Ekstrak Etanol 70%	9,00	5,68
Ekstrak Etanol 96%	5,00	5,52

Hasil Kandungan Senyawa Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada kemangi baik simplisia dan ekstrak. Pengujian fitokimia merupakan suatu parameter yang spesifik dari suatu ekstrak (DepKes, 2000). Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan Khoirani (2013) herba kemangi mengandung alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan minyak atsiri.

Menurut Vinca, *et al.* (2004) bahwa hasil fitokimia dari daun kemangi mengandung senyawa triterpenoid. Steroid dalam tumbuhan dikenal dengan nama fitosterol yaitu sitosterol (kolesterol asal tanaman) dan stigmasterol. Selain itu kemangi juga mengandung anetol dan boron yang dapat merangsang produksi hormon estrogen (Gunawan, 2004). Kandungan kemangi golongan senyawa steroid (sitosterol) dapat berubah menjadi estrogen melalui proses aromatisasi sehingga dapat meningkatkan dan memperpanjang waktu siklus estrus yang disebut sebagai fitoestrogen (Wicaksono, 2013).

Menurut Raharjo (2009), fitoestrogen adalah estrogen lemah yang

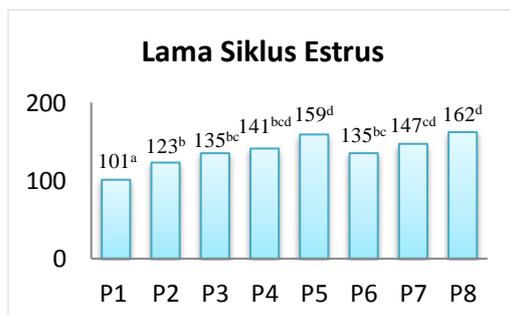
didapatkan pada tanaman. Istilah fitoestrogen berhubungan dengan beberapa kelas senyawa diantaranya senyawa kimia seperti flavon, flavonon, isoflavon, lignan dan kumestan.

Pengaruh Estrogenik Ekstrak Etanol 70% dan 96% Herba kemangi Terhadap Lama Siklus Estrus

Hasil penelitian tentang pengaruh estrogenik sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% terhadap lama siklus estrus dilakukan 12 jam sekali dengan mengamati sel-sel epitel (pemeriksaan sitologi) yang ditemukan dalam preparat *vaginal smear*.

Hasil penentuan aktivitas estrogenik terhadap lama siklus estrus (Gambar 3) menunjukkan bahwa pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% dan ekstrak etanol 70% herba kemangi pada tikus putih betina cenderung memperpanjang siklus estrus tikus. Tikus-tikus yang diberi sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% herba kemangi 0,9g/200g BB (P5) dan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,9g/200g BB (P8) menunjukkan lama siklus estrus yang paling panjang dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain.

Hasil analisis data statistik menunjukkan pengaruh perlakuan sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi yang sangat berbeda nyata terhadap lama siklus estrus hal ini dibuktikan pada tabel ANOVA dengan nilai sig = 0,000 ($P < 0,01$). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji lanjut Duncan.



Gambar 3. Histogram Lama Siklus Estrus

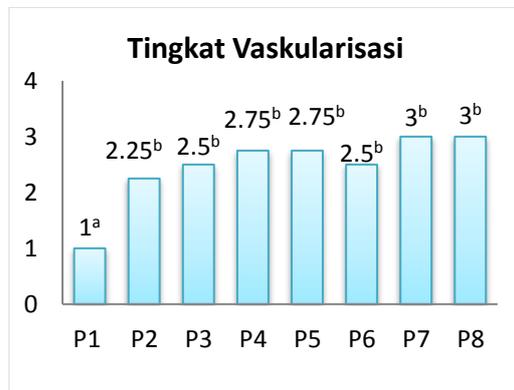
Keterangan:

Huruf superscript yang berbeda, menyatakan pengaruh yang sangat berbeda nyata pada setiap perlakuan ($P < 0,01$).

- P1 : kontrol negatif, diberi CMC 0,5% sebanyak 3 mL.
- P2 : kontrol positif diberi peroral etinil estradiol dengan dosis 9×10^{-3} gr/200g BB sebanyak 3 mL (Effendi, *et al.*, 2009).
- P3 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.
- P4 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.
- P5 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.
- P6 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.
- P7 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.
- P8 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.

Uji Duncan menunjukkan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap kontrol negatif serta memberikan pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif. Maka dapat dinyatakan bahwa pemberian dosis terendah ekstrak etanol 70% herba kemangi 0,7g/1mL/200gBB (P3) dan ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,7g/1mL/200gBB (P6) sudah memberikan pengaruh yang lebih baik dari kontrol positif (P2), tetapi antara ke dua jenis dosis dari ekstrak yang berbeda memiliki aktivitas yang sama dan memiliki nilai rata-rata yang sama dalam diagram Gambar 3. Semakin tinggi dosis ekstrak etanol 96% herba kemangi, kecenderungan adanya peningkatan aktivitas estrogenik dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% herba kemangi. Hal ini dapat dilihat diagram batang nilai rata-rata lama siklus estrus pada Gambar 4, P8 lebih tinggi dari pada P5 namun dalam uji

Duncan hasil relatif sama pengaruhnya terhadap lama siklus estrus.



Gambar 4. Histogram Tingkat Vaskularisasi

Peningkatan hasil aktivitas estrogenik pada tikus yang diberi perlakuan ekstrak etanol 96% herba kemangi dibanding dengan ekstrak etanol 70% herba kemangi dipengaruhi oleh kandungan senyawa perangsang keluarnya hormon estrogen (anetol, boron, stigmasterol dan flavonoid) lebih banyak tertarik oleh pelarut etanol 96%. Hal ini dapat diketahui melalui pemeriksaan sitologi vagina dengan melihat perubahan sel epitel vagina atau vulva pada setiap perubahan tahapan siklus estrus pada tikus putih. Pada fase luteal sel epitel dari vagina akan dikombinasikan oleh sel parabasal, sedangkan memasuki fase estrus sel epitel berubah menjadi sel superfisial dan sel tanduk (kornifikasi) yang menandakan bahwa tikus dalam keadaan puncak estrus (Madalina *et al.*, 2009).

Pengaruh Estrogenik Ekstrak Etanol 70% dan 96% Herba kemangi Terhadap Vaskularisasi Ovarium dan Uterus

Pengujian tingkat vaskularisasi organ reproduksi (ovarium dan uterus) tikus menggunakan modifikasi metode Rugh (1968) berdasarkan *scoring* setelah pemberian perlakuan ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi. Pemberian

ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi mempengaruhi warna pada mukosa uterus dan ovarium tikus. Data skor warna vaskularisasi ovarium dan uterus dipaparkan Gambar 5.



Gambar 5. Penampang Ovarium-Uterus

Keterangan:

Huruf superscript yang berbeda, menyatakan pengaruh yang sangat berbeda nyata pada setiap perlakuan ($P < 0,01$).

Skor 1 = Sedikit Merah

Skor 2 = Merah

Skor 3 = Sangat Merah

P1 : kontrol negatif, diberi CMC 0,5% sebanyak 3 mL.

P2 : kontrol positif diberi peroral etinil estradiol dengan dosis 9×10^{-3} gr/200gBB sebanyak 3 mL (Effendi, *et al.*, 2009).

P3 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

P4 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

P5 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

P6 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

P7 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

P8 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.

Hasil analisis data statistik menunjukkan bahwa pada perlakuan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap tingkat vaskularisasi ovarium dan uterus. Hal ini dibuktikan pada tabel ANOVA dengan nilai sig = 0,000 ($P < 0,01$) sehingga untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji lanjut Duncan.

Hasil Uji Duncan menunjukkan bahwa pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% (P6, P7 dan P8) herba kemangi memiliki aktivitas estrogenik yang sangat berbeda nyata dengan perlakuan pemberian CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif (P1) serta memberikan pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif. Semua perlakuan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi memberikan pengaruh yang sangat nyata dan paling baik dibandingkan dengan semua perlakuan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% herba kemangi terhadap tingkat vaskularisasi ovarium dan uterus pada tikus putih betina.

Tingkat vaskularisasi dapat dinilai secara makroskopik pada permukaan ovarium untuk setiap tikus yang mendapatkan perlakuan pemberian sediaan konsentrat dan terlihat permukaan yang kasar dan dipenuhi benjolan-benjolan sebagai penanda adanya perkembangan folikel pada ovarium. Perkembangan folikel dipicu hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dari kelenjar hipofisa anterior (Adenohipofisa). Folikel yang sedang berkembang akan mengeluarkan estrogen sehingga ukuran ovarium lebih besar dari biasanya diikuti dengan uterus yang terlihat membengkak akibat akumulasi cairan. Selama fase folikular dalam siklus, estrogen menstimulasi proliferasi endometrium sehingga uterus terjadi pembengkakan (Neal, 2006).

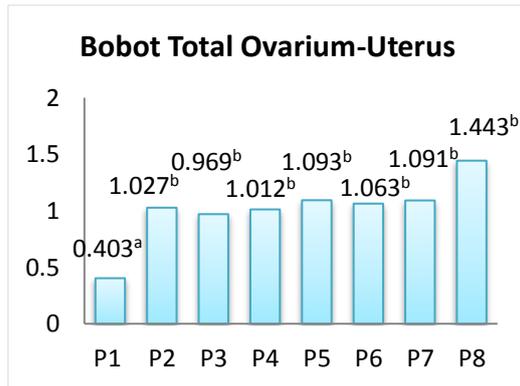
Terjadinya penebalan uterus telah membuktikan bahwa sediaan konsentrat ekstrak etanol herba kemangi memiliki potensi estrogenik dan dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah. Efek estrogenik herba kemangi terhadap jaringan epitel vagina dapat dilihat pada aktivitas mitogenik sel-sel epitel uterus dan vagina. Aktivitas mitogenik tersebut berupa proliferasi maupun diferensiasi sel-sel epitel. Aktivitas mitogenik sel epitel

dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Estrogen dapat berikatan langsung dengan RE α epitel ataupun secara tidak langsung dengan RE α stroma. Proliferasi yang terjadi pada sel-sel epitel endometrium uterus dan epitel vagina terjadi secara tidak langsung yang dibantu oleh faktor parakrin yang dihasilkan sel stroma akibat induksi estrogen (Buchanan *et al.*, 1998).

Ketebalan lapisan epitel vagina kemungkinan juga dipengaruhi oleh adanya diferensiasi sel-sel epitel vagina. Diferensiasi merupakan perubahan struktural maupun fungsional sel menuju kematangan (*maturity*). Diferensiasi dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui pengikatan estrogen pada masing-masing RE α yang terdapat pada sel stroma dan sel epitel. Mekanisme diferensiasi sel-sel epitel lebih rumit dan belum jelas sampai saat ini, namun diketahui bahwa rangkaian peristiwa diferensiasi epitel vagina memerlukan proses proliferasi epitel terlebih dahulu (Buchanan *et al.*, 1998). Diferensiasi sel dapat dilihat dari perubahan sitologi sel epitel vagina, yaitu sel-sel parabasal menjadi sel superfisial pada lapisan epitel vagina. Hal tersebut yang kemudian menyebabkan keratinisasi pada lapisan bagian atas epitel vagina sehingga daerah epitel bagian vagina dan uterus menjadi tebal.

Pengaruh Estrogenik Ekstrak Etanol 70% dan 96% Herba kemangi Terhadap Bobot Ovarium dan Uterus.

Pengujian pengaruh konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi terhadap peningkatan bobot total ovarium dan uterus dilakukan setelah terjadinya estrus hingga estrus siklus selanjutnya dengan cara menimbang ovarium dan uterus masing-masing tikus putih betina dari setiap perlakuan menggunakan neraca analitik.



Gambar 6. Histogram Nilai Rata-rata Bobot Total Ovarium dan Uterus

Keterangan:

Huruf superscript yang berbeda, menyatakan pengaruh yang sangat berbeda nyata pada setiap perlakuan ($P < 0,01$).

- P1 : kontrol negatif, diberi CMC 0,5% sebanyak 3 mL.
- P2 : kontrol positif diberi peroral etinil estradiol dengan dosis 9×10^{-3} gr/200gBB sebanyak 3 mL (Effendi, *et al.*, 2009).
- P3 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.
- P4 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.
- P5 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.
- P6 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,7g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.
- P7 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,8g dosis pemakaian 1mL/200gBB tikus.
- P8 : diberi peroral sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% kemangi 0,9g dosis pemakaian 1mL/200g BB tikus.

Hasil analisis data statistik yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi mempengaruhi bobot ovarium dan uterus seperti terlihat pada Gambar 6. Perlakuan CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif (P1), etinil estradiol sebagai kontrol positif (P2), ekstrak etanol 70% herba kemangi 0,7g/200gBB (P3), ekstrak etanol 70% herba kemangi 0,8g/200gBB (P4), ekstrak etanol 70%

herba kemangi 0,9g/200gBB (P5), ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,7g/200gBB (P6), ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,8g/200gBB (P7) dan ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,9g /200gBB (P8) memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap pengamatan bobot ovarium dan uterus. Hal ini dibuktikan pada tabel ANOVA dengan nilai sig = 0,006 ($P < 0,01$) sehingga untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji lanjut Duncan.

Uji Duncan menunjukkan bahwa semua perlakuan memberikan hasil yang sangat berbeda nyata terhadap kontrol negatif (P1) dan memiliki pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif (P2). Pemberian konsentrat ekstrak etanol 96% dengan dosis pemakaian 0,7g/1mL/200g BB merupakan dosis terendah yang dapat memberikan pengaruh yang sama dengan kontrol positif (P2). Sedangkan untuk pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dosis pemakaian 0,9g/1mL/200gBB (P5), sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% dosis pemakaian 0,8g/1mL/200gBB (P7) dan dosis pemakaian 0,9g/1mL/200gBB (P8) memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata dan lebih baik dari kontrol positif (P2). Berbeda dengan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 70%, dosis pemakaian 0,7g/1mL/200gBB (P3) dan dosis pemakaian 0,8g/1mL/200gBB (P4) menunjukkan hasil nilai rata-rata bobot ovarium-uterus yang lebih kecil dibanding kontrol positif (P2) tetapi karena terletak pada subset Duncan yang sama, itu berarti P3 dan P4 memiliki pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif (P2).

Adanya peningkatan bobot ovarium dan uterus tikus dikarenakan potensi estrogenik dalam herba kemangi yang mengandung senyawa steroid berupa stigmasterol berperan sebagai prekursor hormon seks steroid, salah satunya adalah estrogen. Hal ini disebabkan adanya kemiripan struktur senyawa steroid dengan

estrogen (Ismadi, 1993). Menurut Nikov *et al.*, (2000) dalam keadaan tidak adanya hormon estrogen, reseptor estrogen akan bersifat inaktif dan berada di dalam inti sel target dan berikatan dengan reseptor estrogen (RE) yang berada di inti dan menyebabkan reseptor estrogen menjadi aktif. Kompleks ikatan estrogen-reseptor dengan *estrogen responsive element* akan menginduksi terjadinya transkripsi mRNA. mRNA kemudian akan ditranslasi menjadi protein yang akan menghasilkan respons estrogenik pada sel target dan menginduksi produksi serta proliferasi sel-sel ovarium yang akan meningkatkan masa ovarium. Penambahan bobot ovarium diperkirakan berasal dari sel-sel mesenkim dan sel-sel folikular ovarium disertai dengan peningkatan kadar cairan dalam ovarium, cairan ini berupa transudat dari serum dan mukopolisakarida yang disekresikan oleh sel-sel granulosa. Menurut Hafez (1980), pada tikus yang sedang estrus terdapat akumulasi cairan di dalam lumen uterus yang akan meningkatkan berat basah organ.

Senyawa estrogenik selain steroid (stigmasterol), anetol dan boron, senyawa flavonoid ikut berperan sebagai estrogenik. Satyaningtijas *et al.*, (2014) menyebutkan bahwa flavonoid yang bersifat estrogenik akan menduduki reseptor estrogen yang berada di dalam tubuh. Lain halnya dengan steroid yang merupakan prekursor hormon testosteron yang kemudian diubah menjadi estrogen yang didukung dengan pernyataan dari Syarif, *et al.*, (2007) yang menyatakan bahwa golongan senyawa fitoestrogen yang termasuk kedalam estrogenik nonsteroid antara lain flavonoid, isoflavon (misalnya genistein) dan kumestan yang mekanisme kerjanya menyerupai senyawa estrogenik sintetik nonsteroid yaitu dietilstilbestrol (DES).

Berdasarkan hasil penelitian secara menyeluruh perlakuan pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi dapat meningkatkan pengaruh

estrogenik terhadap lama siklus estrus, tingkat vaskularisasi ovarium-uterus, bobot total ovarium-uterus dan ketebalan uterus dibandingkan dengan sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% herba kemangi, sehingga ekstrak etanol 96% dapat menurunkan dosis pemakaian daripada ekstrak etanol 70%. Hal ini dapat diduga flavonoid lebih banyak tertarik pada pelarut etanol 96% dibandingkan pelarut etanol 70% seperti penelitian yang dilakukan oleh Lusiana (2014) yang menyatakan bahwa jenis pelarut etanol 96% dapat menyari senyawa flavonoid lebih banyak dibandingkan dengan pelarut etanol 70%. Demikian halnya dengan tertariknya senyawa estrogenik selain flavonoid. Maka dapat dikatakan bahwa etanol 96% merupakan jenis pelarut pengekstraksi yang terpilih untuk pembuatan ekstrak sebagai bahan baku sediaan *herbal medicine*.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Pemberian sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi memberikan pengaruh yang sangat nyata dalam meningkatkan aktivitas estrogenik pada tikus putih betina.
2. Sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,7g/200g BB (P6) memiliki pengaruh yang sangat nyata terhadap lama siklus estrus, tingkat vaskularisasi, peningkatan bobot ovarium-uterus dibandingkan kontrol negatif (P1) dan memperpanjang siklus estrus dibandingkan kontrol positif (P2) sehingga memiliki pengaruh relatif sama dengan kontrol positif (P2).
3. Sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,7g/1mL/200g BB merupakan dosis efisien yang memberikan pengaruh yang relatif sama dengan kontrol positif (P2) dan sediaan konsentrat ekstrak etanol 96% herba kemangi 0,9g/1mL/200g BB adalah dosis efektif yang memiliki pengaruh

sangat nyata dibandingkan semua perlakuan terhadap lama siklus estrus, tingkat vaskularisasi, peningkatan bobot ovarium-uterus.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas folikel melalui pembuatan preparat histologis ovarium.
2. Perlu dilakukan penelitian teknik formulasi sediaan farmasi untuk mendapatkan dosis optimal dalam bentuk konsentrat ekstrak *Ocimum americanum* L.

DAFTAR PUSTAKA

- Anatria, K. 2011. Kajian Potensi Estrogenik Ekstrak n-Heksan Herba kemangi pada Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Universitas Pakuan. Bogor.
- Badzaid A. 2003. *Endokrinologi Ginekologi*. Media Aesculapius. FK-UI. Jakarta.
- Buchanan, D.L., T. Kurita, J.A Taylor, D.B. Lubahn, G.R. Cunha dan P.S. Cooke. 1998. Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification and cornification. *Journal of Endocrinology*. 139: 4345-4352.
- DepKes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta
- _____. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta
- _____. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta
- Effendi, E.M., H. Maheswari., dan Listya, M. 2009. Aktifitas Estrogenik Ekstrak Etanol 70% Herba kemangi pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Betina Pre-Menopause. *Fitofarmaka* 1(1): 11-17.
- Gunawan, D. 2004. *Ramuan Tradisional Untuk Keharmonisan Suami Istri*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Guyton, A.C. 1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi VII. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal: 330-331, 334-335.
- Hafez, E.S.E. 1980. *Reproduction In Farm Animals*. 6th ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Ismadi, M. dan S.D. Ismadi Dalam: R. R. Montgomery, T.W. Conway dan A.A. Spector. 1993. *Biochemistry: A Case-Oriented Approach*. UGM Press. Yogyakarta. Hal: 1377.
- Khoirani, N. 2013. *Karakterisasi Simplisia dan Standarisasi Ekstrak Etanol Herba kemangi*. Skripsi. Program Studi Farmasi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Lusiana, A., O D Rice Disi dan Idha K. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Ortosiphon Stamineus* Benth. *Journal Planta Husada*. (2)1: 1-4.
- Madalina, M., F.P. Carmen and P. Mitrut. 2009. Correlations between gonadotropins level, vaginal cytology and menopausen vessel-active phenomena. craiova. *Journal Morphology and Embryology*. 50(4): 631-637.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid* (Terjemahan). Penerbit ITB. Bandung.
- Neal, M.J. 2006. *At a Glance Farmakologi Medis*. Erlangga. Jakarta. Hal. 74-75.
- Nikov, G.N., M. Eshete, S. R.V Rajnarayan dan W.L. Alworth. 2001. Interactions of synthetic estrogens with human estrogen receptors. *Journal of Endocrinology*. 170: 137-145.

- Raharjo, H. Pengaruh diet vegan terhadap insiden terjadinya kanker payudara. 2009. *Jurnal Kesehatan*. 1(2): 1-9.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company. Menneapolis. USA
- Satyaningtijas, A.S., H. Maheswari, P. Achmadi, W.A. Pribadi, S. Hapsari, D. Jondriatno, I. Bustamin dan B. Kiradani. 2014. Kinerja Reproduksi Tikus Bunting Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8 (1): 35-37.
- Syarif, A., Ascobat, P., Estuningtyas, A., Setiabudy, R., Setiawati, A., Muchtar, A. *et al.*, 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Vinca, M., W.R. Komar dan N. As'ari N. 2004. Telaah Fitokimia Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.). Sekolah Farmasi ITB. Bandung.
- Wicaksono, A. W., I.G.N.G. Trilaksana dan D.N.D.I. Laksmi. 2013. Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum*) Terhadap Lama Siklus Estrus Pada Mencit. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. 2(4). 369-374.

