

Efek Penghambatan Ekspresi ER β Bebas oleh Fraksi *n*-Butanol Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) pada Sel hFOB 1.19

Inhibitory Effect of Free-ER β Expression by *n*-Butanol Fraction of Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) Leaves on hFOB 1.19 Cells

**Burhan Ma'arif^{*1}, Agnis Pondinekaria Aditama², Faisal Akhmal Muslikh³,
Dewi Perwito Sari⁴, Ira Purbosari⁴, Hening Laswati⁵, Mangestuti Agil⁶**

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Malang, Indonesia

²Farmasi, Akademi Farmasi Jember, Jember, Indonesia

³Mahasiswa Magister Ilmu Farmasi, Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

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

⁵Departemen Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁶Departemen Farmasi Sains, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Email korespondensi: burhan.maarif@farmasi.uin-malang.ac.id

Abstrak

Wanita pascamenopause seringkali mengalami berbagai macam masalah kesehatan, diantaranya adalah osteoporosis yang diakibatkan gangguan produksi hormon estrogen dalam tubuh. Salah satu alternatif yang potensial menggantikan hormon estrogen adalah fitoestrogen. Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) diketahui mengandung senyawa fitoestrogen dengan kadar tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* yang mengandung fitoestrogen dalam meningkatkan aktivitas human fetal osteoblast 1.19 (hFOB 1.19) cells pada proses pembentukan tulang. Peningkatan aktivitas sel hFOB 1.19 diketahui melalui pengukuran ekspresi *estrogen receptor* β (ER β) bebas dengan metode *immunocytochemistry* dan instrumen *confocal laser scanning microscopy* (CLSM). Fraksi *n*-butanol diberikan dengan varian konsentrasi 62,5; 125; dan 250 ppm, serta genistein sebagai kontrol positif diberikan dengan konsentrasi 1 μ M. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* dapat meningkatkan aktivitas sel hFOB 1.19, yang ditunjukkan dengan penurunan ekspresi ER β bebas pada sel hFOB 1.19 setelah pemberian fraksi *n*-butanol semua konsentrasi, yaitu sebesar 594,108; 1245,216; dan 1205,592 *arbitrary unit* (AU) pada $p < 0,05$. Dari data dapat disimpulkan bahwa fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* potensial dikembangkan sebagai produk antiosteoporosis.

Kata Kunci: *M. crenata* fitoestrogen, sel hFOB 1.19

Abstract

Postmenopausal women often experience various health problems, including osteoporosis which is caused by a disruption in the production of the estrogen hormone in the body. One of the potential alternatives to replace the estrogen is phytoestrogens. Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) leaves are known to contain high levels of phytoestrogen compounds. The purpose of this study was to determine the effect of the *n*-butanol fraction of *M. crenata* leaves which containing phytoestrogens in increasing the activity of human fetal osteoblast 1.19 (hFOB 1.19) cells in the bone formation process. The increase in hFOB 1.19 activity was known by measuring the expression of free *estrogen receptor* β (ER β) using the *immunocytochemistry* method and the *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) instrument. The *n*-butanol fraction was given with a concentration variant of 62.5; 125; and 250 ppm, and genistein as a positive control was given at a concentration of 1 μ M. The results showed that the *n*-butanol fraction of *M. crenata* leaves increased the activity of hFOB 1.19 cells, which was indicated by a decrease in free ER β expression in hFOB 1.19 cells after giving *n*-butanol fraction of all concentrations, namely 594,108; 1245,216; and 1205,592 *arbitrary units* (AU) at $p < 0.05$. From the data, it can be concluded that the *n*-butanol fraction of *M. crenata* leaves have the potential to be developed as an antiosteoporosis product.

Keywords: *M. crenata*, phytoestrogen, hFOB 1.19 cell

Submitted: 11 Mei 2021

Accepted: 10 Juni 2021

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i4.635>

1 Pendahuluan

Seiring dengan bertambahnya usia, proses penuaan pada wanita akan diikuti dengan proses degenerasi, perubahan fisik, serta penurunan/produksi hormon, estrogen dalam tubuh [1]. Penurunan produksi hormon estrogen pada perempuan pasca menopause dapat menimbulkan berbagai jenis penyakit degeneratif, salah satunya adalah osteoporosis. Osteoporosis merupakan gangguan pada tulang yang ditandai dengan penurunan masa tulang disertai kerusakan mikro arsitektur tulang dan mengarah pada peningkatan resiko patah tulang [2,3,4]. Faktor terjadinya osteoporosis pada wanita pascamenopause disebabkan oleh penurunan hormon estrogen, yang merupakan salah satu faktor penting terjadinya ketidakseimbangan proses remodelling tulang dan berperan dalam proses peningkatan resorpsi tulang [5].

Jenis pengobatan yang sering digunakan dalam menangani defisiensi estrogen adalah terapi sulih hormone (TSH) [6]. Namun penggunaan TSH dalam jangka waktu yang panjang dapat meningkatkan resiko efek samping seperti munculnya penyakit kanker ovarium, dan endometrium [7,8]. Penelitian penggunaan bahan alam untuk menggantikan fungsi estrogen dengan efek samping yang minimal telah dilakukan dan hasil yang didapatkan mengarah pada penggunaan senyawa golongan fitoestrogen [9,10,11].

Fitoestrogen merupakan pengobatan alternatif pengganti TSH, yang dapat ditemukan pada tanaman [12]. Salah satu tumbuhan yang mengandung fitoestrogen adalah *M. crenata* dan banyak ditemui di beberapa daerah di Indonesia, terutama di daerah Surabaya yang umumnya digunakan sebagai salah satu makanan khas masyarakat setempat [13,14,15]. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* dalam

meningkatkan aktivitas proliferasi dan diferensiasi sel *human fetal osteoblast* 1.19 (hFOB 1.19) pada proses pembentukan tulang, yang diketahui melalui pengukuran ekspresi *estrogen receptor β* (ER β) bebas pada sel hFOB 1.19 menggunakan metode *immunocytochemistry* dan instrumen *confocal laser scanning microscope* (CLSM). Pelarut *n*-butanol dipilih dengan tujuan untuk menarik senyawa-senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun *M. crenata*, flavonoid terutama isoflavon diketahui merupakan salah satu kelompok senyawa fitoestrogen yang paling banyak dijumpai [16].

2 Metode Penelitian

2.1 Bahan

2.1.1 Bahan Tumbuhan

Daun *M. crenata* didapatkan dari daerah Surabaya, Jawa Timur pada November 2019, dan diidentifikasi di UPT. Materia Medika, Batu dengan spesimen 1a-17b-18a-1. Daun *M. crenata* dipreparasi hingga didapatkan serbuk-daun berwarna hijau.

2.1.2 Bahan Kimia

Pelarut *n*-butanol diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman), *anti-rabbit* ER β ab3576 diperoleh dari Abcam (Cambridge, Inggris), serta bahan kimia lain yang digunakan dalam penelitian seperti penisilin, streptomisin, genistein, 0,1% Triton X-100, *bovineserum albumin* (BSA), *phosphatase-buffered saline* (PBS), 4% *paraformaldehid* (PFA), Tween 80, 0,5% *dimethylsulfoxide* (DMSO), 10% *fetal bovine serum* (FBS), *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), dan *anti-rabbit fluorescein isothiocyanate* (FITC) yang didapat dari Sigma-Aldrich (Munich, Jerman). Sel hFOB 1.19 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, USA), dan dikultur di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

2.2 Metode

2.2.1 Ekstraksi dan Fraksinasi *n*-Butanol Daun *M. crenata*

1,6 kg *M. crenata* serbuk daun diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan

bantuan ultrasonik untuk mendapatkan 70 g ekstrak. Proses fraksinasi menggunakan ekstraksi cair-cair. Ekstrak disuspensikan dengan 700 mL air dan difraksinasi dengan *n*-Heksana dalam perbandingan 1: 1. Fase air yang diperoleh kemudian difraksinasi lebih lanjut menggunakan etil asetat dan kemudian *n*-butanol. Fase *n*-butanol kemudian dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* Heidolph Hei-VAP ML / G3 untuk mendapatkan 5,97 g fraksi *n*-butanol.

2.2.2 Kultur sel

Sel hFOB 1.19 dimasukkan ke dalam *flask culture* 25 cm² dan dikultur dalam media komplit yang terdiri dari campuran DMEM, G418, penisilin-streptomisin 1%, FBS 10%, dan diinkubasi dalam incubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 6 hari. Selama proses tersebut, perkembangan sel diamati setiap 24 jam, dan media kultur diganti setiap saat jika warna media berubah yang disebabkan karena menipisnya nutrisi. Setelah mencapai *confluence* 80-90%, sel-sel dipindahkan pada *microplate* 24 *well*.

2.2.3 Pengukuran ER β Bebas Pada Sel hFOB 1.19

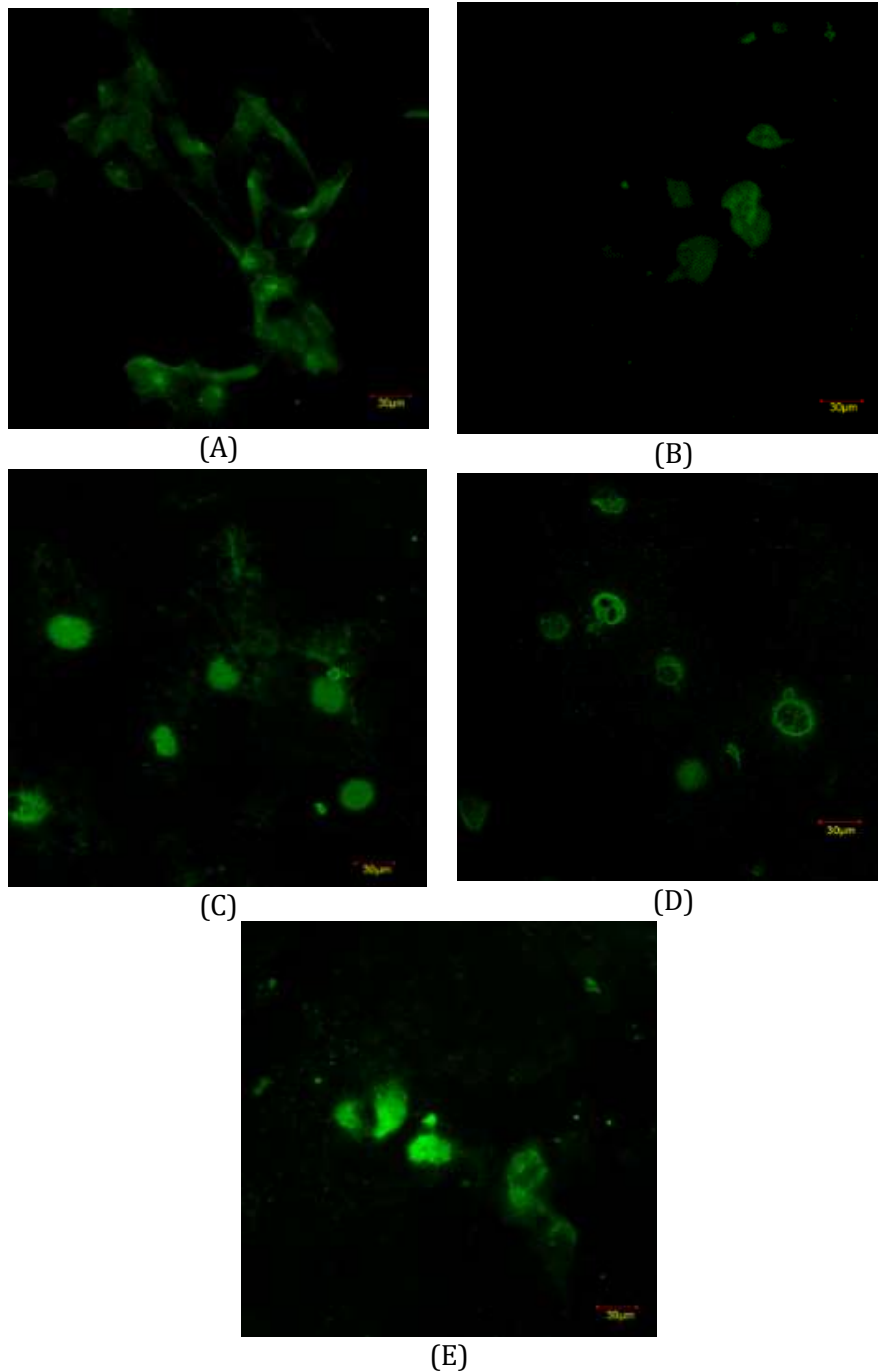
Sebanyak 50 mg fraksi *n*-butanol ditambahkan dengan 0,5% Tween 80 dan DMSO 0,5% (b/v) dan dijadikan suspensi untuk pembuatan larutan induk 5.000 ppm, yang kemudian diencerkan menjadi variasi konsentrasi 62,5; 125; 250 ppm. Setelah sel dalam *microplate* 24 *well* mencapai *confluence* kemudian diinduksi dengan larutan sampel yang telah dibuat dan genistein 1 μ M sebagai kontrol positif [17]. Analisis imunofluoresensi dilakukan dengan menggunakan *software* *fluoview Olympus FV1000* pada panjang gelombang 595 nm untuk menentukan nilai ekspresi ER β bebas. Sel dapat dikatakan *confluence*, jika sel dapat berkembang dengan baik, tumbuh homogen dan merata menutupi wadah serta menempel pada wadah kultur [18,19,20,21].

3 Hasil dan Pembahasan

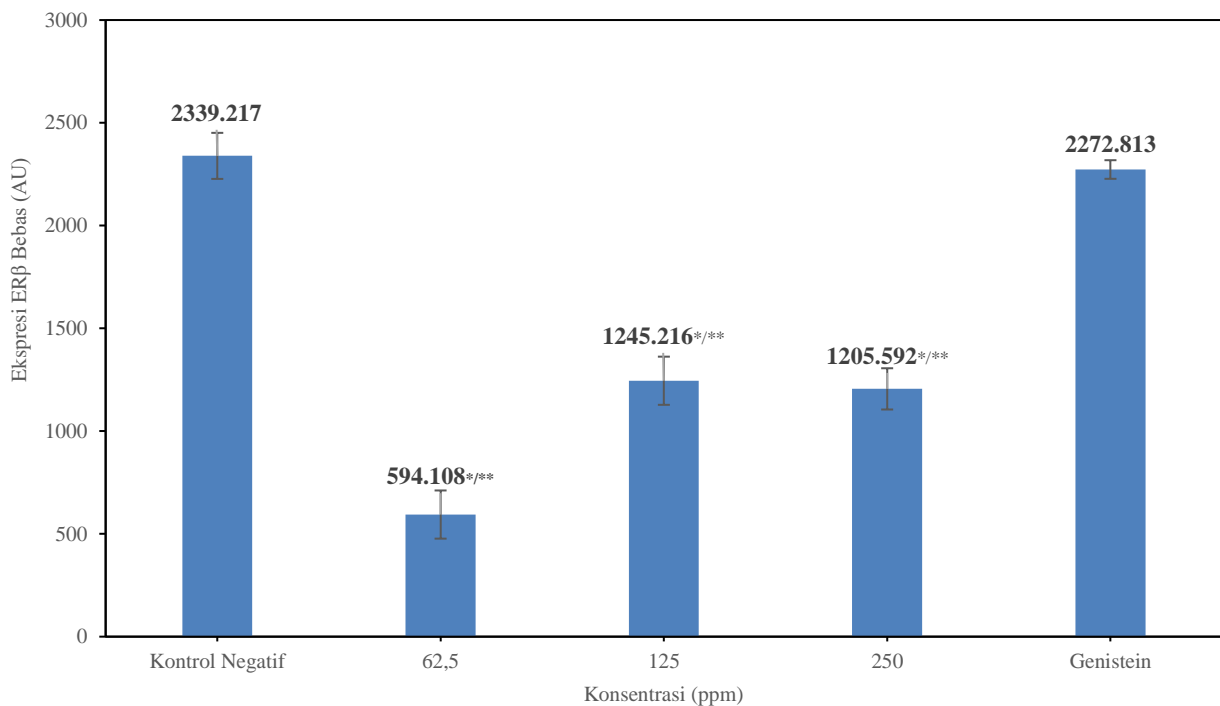
Penelitian ini menggunakan metode *immunocytochemistry* dan instrumen CLSM. Metode ini memungkinkannya untuk mengevaluasi sel-sel pada sampel tertentu dengan

menghasilkan fluoresensi pada faktor petanda yang diinginkan [22,23,24], dalam hal ini adalah ER β bebas. Berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan menggunakan metode ICC menggunakan instrumen CLSM didapatkan hasil intensitas fluoresensi seperti pada Gambar 1.

Pada gambar 1, dapat dilihat bahwa kontrol negatif memiliki intensitas fluoresensi tertinggi, dan pada pemberian sampel konsentrasi 62,5 ppm memiliki intensitas fluoresensi terendah. Hal ini diperkuat dari ekspresi ER β bebas sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Intensitas Fluoresensi Er β bebas setelah pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata*, (A) kontrol negatif, (B) 62,5 ppm, (C) 125 ppm, (D) 250 ppm, dan (E) Genistein



Gambar 2. Ekspresi Erβ bebas pada sel hFOB 1.19 setelah pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata*. *Signifikan dengan kontrol negatif, **Signifikan dengan Genistein, pada $p < 0,05$

Gambar 1 merupakan hasil visualisasi ERβ bebas pada sel hFOB 1.19 setelah pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* menggunakan instrument CLSM. Hasil visualisasi dari gambar tersebut memperlihatkan ekspresi ERβ bebas dalam bentuk gambar dan angka dengan satuan *arbitrary unit* (AU). Gambar 2 merupakan hasil perbandingan ekspresi Erβ bebas pada konsentrasi 62,5; 125; 250 ppm dengan kontrol negatif dan genistein. Semua konsentrasi menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$) dengan ketiga konsentrasi memiliki nilai ekspresi lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif. Semua konsentrasi juga menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap genistein ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$). Konsentrasi 62,5 ppm memberikan hasil terbaik dalam menurunkan ekspresi ERβ bebas. Akan tetapi pada penelitian ini, genistein tidak memberikan efek yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian fraksi *n*-butanol dalam menurunkan ekspresi ERβ bebas, hal ini dimungkinkan karena ERβ pada sel hFOB 1.19 berikatan dengan ER lain, dalam hal ini adalah *G-Protein Coupled Estrogen Receptor* (GPER), karena pada beberapa literatur

disebutkan bahwa genistein dapat berikatan secara efektif dan memiliki afinitas tinggi terhadap GPER dibandingkan dengan ER inti [25,26,27].

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa uji aktivitas *in silico*, *in vitro* dan *in vivo* daun *M. crenata* juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-butanol dan fraksi etil asetat memiliki afinitas atau ikatan yang tinggi terhadap ERβ, serta dapat menginduksi proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas, sehingga dapat meningkatkan kepadatan tulang menciit [28]. Hal ini disebabkan karena adanya senyawa fitoestrogen yang terdapat pada daun *M. crenata*.

Pada penelitian ini terbukti dengan pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi ERβ bebas sel hFOB 1.19. Apabila Erβ telah teraktivasi dengan sebuah ligan seperti fitoestrogen dan menjadi teraktivasi, antibodi yang diberikan tidak akan berikatan dengan Erβ dikarenakan afinitas fitoestrogen lebih besar dibandingkan antibodi ERβ. Hal ini menunjukkan bahwa Erβ teraktivasi tidak akan berfluoresensi. Semakin sedikit ERβ bebas artinya semakin banyak yang berikatan dengan senyawa fitoestrogen atau

ER β teraktivasi. Teraktivasinya ER β akan mempengaruhi transkripsional gen pada nukleus yang terjadi di dalam sel, kemudian akan mengaktifkan *transforming growth factor* β (TGF- β) dan akan menstimulasi proses proliferasi dari osteoblas dan juga pada tahap awal proses diferensiasi osteoblas [29]. TGF- β meningkat didalam tubuh karena regulasi dari estrogen dan secara langsung akan menekan aktivitas sitokin-sitokin dalam proses penyerapan tulang diantaranya adalah *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6), *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- α), *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF). Tahap selanjutnya yang dilakukan oleh sel osteoblas adalah yang berkaitan dengan proses pembentukan tulang atau yang bisa disebut dengan osteogenesis [29].

Berdasarkan analisis yang dilakukan pada penelitian ini didapatkan bahwa pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* dapat menurunkan ekspresi ER β bebas yang mengartikan bahwa fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* memiliki kemampuan dalam mempercepat proses diferensiasi sel hFOB 1.19. sehingga dapat menurunkan resiko terjadinya osteoporosis. Konsentrasi optimum yang dapat menurunkan ekspresi ER β bebas adalah konsentrasi 62,5 ppm dengan nilai ekspresi 594.108 AU, karena memiliki nilai ekspresi terendah dibandingkan dengan pemberian sampel fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* pada konsentrasi 125 dan 250 ppm serta memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif dan Genistein. Hal ini juga didukung dengan penelitian, Puspitasari dkk, 2015 [30], bahwa fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* dilaporkan memiliki aktivitas antiosteoporosis dengan meningkatkan kepadatan tulang mencit betina [31].

4 Kesimpulan

Pemberian fraksi *n*-butanol daun *M. crenata*. Mampu menurunkan ekspresi Er β bebas pada sel hFOB,1.19 pada semua konsentrasi, dengan dosis optimum 62,5 ppm dan nilai ekspresi 594.108 AU, hal ini membuktikan fraksi *n*-butanol daun *M. crenata* memiliki manfaat dalam aktivitas antiosteoporosis.

5 Daftar Pustaka

- [1] Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawiroharjo.
- [2] Ramadani, M. 2010. "Faktor-Faktor Resiko Osteoporosis dan Upaya Pencegahannya," *J. Kesehat. Masy. Andalas*, vol. 4, no. 2, pp. 111–115
- [3] Ma'arif, B., Agil, M. and Laswati, H. 2018. "Alkaline phosphatase activity of *Marsilea crenata* Presl. extract and fractions as marker of MC3T3-E1 osteoblast cell differentiation," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 55–59, doi: 10.7324/JAPS.2018.8308.
- [4] Mustofa., Sari, R. D. P. and Prabowo, A. Y. 2019. "Osteoporosis pada Wanita Peri dan Postmenopause," *Medula*, vol. 8, no. 2, pp. 200–204.
- [5] Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G. and Posey, L. M. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach Seventh Edition*. USA: McGraw-Hill.
- [6] Sihombing, I., Wangko, S. and Kalangi, S. J. R. 2012. "Peran Estrogen Pada Remodeling Tulang," *J. Biomedik*, vol. 4, no. 3, pp. S18–S28, doi: 10.35790/jbm.4.3.2012.1210.
- [7] Rachman, I. A., Soewondo, P., Setiati, S., Kusumawijaya, K., Baziad, A., Witjaksono, J., Sukarya, W. S., Silvia. 2004. *Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause*. Indonesia: HTA.
- [8] Zarate, A., Hernandez-Valencia, M., Saucedo, R., Basurto, L. and Manuel-Apolinar, L. 2014. "Current Position About The Use Of Estrogen Therapy In Women During The Menopause Period," *Rev. Med. Inst*, vol. 52, no. 1, pp. 66–69.
- [9] Hartiningsih and Anggraeni, D. 2013. "Kombinasi Calcitriol dan Ethynil Ethyl Estradiol untuk Mencegah Osteoporosis Tikus Ovariectomi". Penelitian pengembangan bagian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- [10] Ososki, A. L. and Kennelly, E. J. 2003. "Phytoestrogens: A review of the present state of research," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 845–869, doi: 10.1002/ptr.1364.
- [11] Constantine, G. D., Pickar, J. H. 2003. "Estrogens in postmenopausal women : recent insights," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 3, no. 6, pp. 626–634, doi: 10.1016/j.coph.2003.07.003.
- [12] T Yang, T-S., Wang, S-Y., Su, C-H., Lee, F-K., Chen S-C., tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang J-P., Huang, K-E. 2012. "Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women," *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 51, no. 2, pp. 229–235, doi: 10.1016/j.tjog.2012.04.011.
- [13] Alldredge, B. K., Corelli, R. L., Ernst, M. E., Guglielmo, B. J., Jacobson, P. A., Kradjan, W. A.,

- Williams, B. R. 2013. *Applied Therapeutics*. PA: Lippincot Williams and Wilkins.
- [14] Trisunuwati, P. 2017. "Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract Againsts Blood Estrogen-Progesterone Balance, Blood Calcium Levels and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Ratus norvegicus*)," *Res. J. Life Sci.*, vol. 4, no. 1.
- [15] Yacoeb, A. M., Nurjannah, Arifin, M., Suistiono, W. and Kristiono, S. S. 2010. "Deskripsi Histologis dan Perubahan Komposisi Kimia Daun dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan," *J. Pengolah. Has. Perikan. Indones.*, vol. 12, no. 2, pp. 81-95, doi: <https://doi.org/10.17844/jphpi.v13i2.5350>.
- [16] Laswati, H. 2011. "Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women," *Folia Medica Indones.*, vol. 47, no. 2, pp. 112-117.
- [17] Ma'arif, B., Mirza, D. M., Hasanah, M., Laswati, H. and Agil, M. 2019. "Antineuroinflammation activity of *n*-butanol fraction of *Marsilea crenata* Presl. In microglia HMC3 cell line," *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, vol. 30, no. 6, pp. 1-6, doi: 10.1515/jbcpp-2019-0255.
- [18] Djati, M. S. 2006. *Teknologi Manipulasi dan Kultur Sel Jaringan Hewan*. Malang: UB Press.
- [19] Kalanjati, W. W. 2006. "Perbedaan Konfluensitas dan Viabilitas Sel Kultur Sel Primer Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) pada Medium TCM 199 dan MEM". [Skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga.
- [20] Ferdiningsih, L. 2012. "Pengaruh Pemberian Vitamin E (α -Tocopherol) dalam Media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) terhadap Proliferasi Sel Ginjal Fetus Hamster Yang Dikultur Primer". [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [21] Muslikh, F. A. 2021. "Efek Antineuroinflamasi Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) Budidaya pada Sel Mikroglia HMC3 secara In Vitro". [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [22] Aditama, A. P. R., Ma'arif, B., Mirza, D. M., Laswati, H. and Agil, M. 2020. "In vitro and in silico analysis on the bone formation activity of *N*-hexane fraction of Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.)," *Syst. Rev. Pharm.*, vol. 11, no. 11, pp. 837-849, doi: 10.31838/srp.2020.11.123.
- [23] Taylor, C. R. and Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako Denmark: IHC Handbook sixth edition.
- [24] Stanciu, S. G., Hristu, R., Boriga, R. and Stanciu, G. A. 2010. "On the suitability of SIFT technique to deal with image modifications specific to focal scanning laser microscopy," *Microsc. Microanal.*, vol. 16, no. 5, pp. 515-530, doi: 10.1017/S1431927610000371.
- [25] Meyer, M. R., Prossnitz, E. R. and Barton, M. 2011. "The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function," *Vascul. Pharmacol.*, vol. 55, no. 1-3, pp. 17-25.
- [26] Lee, R. R. and Phillips, K. P. 2016. "Role of Estrogen Receptors in Male Reproductive Physiology," *Rev. Interdiscip. des Sci. la sant e - Interdiscip. J. Heal. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 40-45, doi: 10.18192/riss-ijhs.v3i1.1452.
- [27] Ma'arif, B. 2020. "Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak dan Fraksi dari Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) terhadap Sel Mikroglia HMC3 In Vitro". [Disertasi]. Surabaya: Universitas Airlangga.
- [28] Ma'arif, B., Agil, M. and Hening, L. 2016. "Phytochemical Assessment on *n*-Butanol ekstrak and fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS," *J. Tradit. Med.*, vol. 21, no. 2.
- [29] Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M. and Stoddart, M. J. 2014. "Role and regulation of runx2 in osteogenesis," *Eur. Cells Mater.*, vol. 28, no. November, pp. 269-286, doi: 10.22203/eCM.v028a19.
- [30] Puspitasari, Y., Suciati. and Agil, M. 2015. "Isolasi Senyawa Terpenoid Dari Fraksi *N*-Heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. pada Hasil Kcv Fraksi No.2," *J. Farm. dan Ilmu Kefarmasian Indones.*, vol. 2, no. 1, pp. 16-18.
- [31] Fernandez, I., Gracia, M. A. A., Pingarron, M. C. and Jerez, L.B. 2006. "Physiological bases of bone regeneration II. The Remodeling Process," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, no. 2, pp. E151-E157.