LAPORAN AKHIR TAHUN/ TAHUN TERAKHIR*
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)

POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS *IN VITRO* SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA

TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Rr. RETNO WIDYOWATI, SSi., MPharm., Ph.D., Apt.	**0005017701**
Dr. WIWIED EKASARI, MSi., Apt.	**0022045004**
NENY PURWITASARI, S.Farm., M.Sc., Apt.	**0019048006**

DIBIAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul	: POTENSI TANAMAN JOTANG (SPILANTHES ACMELLA) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA
Peneliti/Pelaksana	
Nama Lengkap	: RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Apt, Ph.D
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
NIDN	: 0005017701
Jabatan Fungsional	: Lektor
Program Studi	: Farmasi
Nomor HP	: 081615886978
Alamat surel (e-mail)	: rr-retno-w@ff.unair.ac.id
Anggota (1)	
Nama Lengkap	: Dr. Dra WIWIED EKASARI Apt, M.Si
NIDN	: 0022016902
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
Anggota (2)	
Nama Lengkap	: NENY PURWITASARI S.Farm, Apt, M.Sc.
NIDN	: 0019048006
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
Institusi Mitra (jika ada)	
Nama Institusi Mitra	: -
Alamat	: -
Penanggung Jawab	: -
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp 99,500,000
Biaya Keseluruhan	: Rp 199,270,000

Mengetahui,
a.n.Dekan, Wakil Dekan II Fak. Farmasi Unair

(Dr. Dwi Setyawan, S.Si., MSi., Apt)
NIP/NIK 197111301997031003

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
Ketua,

(RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Apt, Ph.D)
NIP/NIK 197701052002122002

Menyetujui,
Ketua LPI Unair

(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA

Spilanthes acmella atau biasa yang disebut jotang merupakan tanman yang memiliki efek farmakologi yang bermacam-macam salah satu diantaranya untuk mengatasi osteoporosis. Tanaman ini sangat berpotensi dikembangkan menjadi produk Obat Herbal Terstandar. Agar dapat menjadi produk obat herbal terstandar bahan baku tanaman yaitu simplisia dan ekstrak yang akan digunakan haruslah sudah terstandardisasi. Tetapi nilai parameter standard dari tanaman ini belum ada pada Farmakope Herbal Indonesia. Sehingga diperlukan untuk menetapkan nilai parameter standard dari simplisia dan ekstrak *S. acmella*.

Pada penelitian ini didapatkan nilai parameter standar dari simplisia dan ekstrak etanol 70% dari *S. acmella* yang tumbuh di Purwodadi Jawa Timur Indonesia. Parameter standar yang dilakukan pada penelitian ini adalah kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol yang masing-masing dilakukan dengan metode gravimetri. Selain itu juga dilakukan pengamatan mikroskopik baik pada tumbuhan segar maupun serbuk simplisia, penetapan kadar air yang dilakukan dengan metode destilasi toluen, dan penetapan kadar steroid total dihitung sebagai stigmasterol menggunakan KLT-densitometer. Seluruh metode yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan buku Farmakope Herbal Indonesia. Pada pengamatan serbuk simplisia ditemukan fragmen berkas pengangkutan dengan penebalan tangga, trikoma multiseluler, jaringan mesofil, stomata tipe anisositik, corolla dengan papilla, polen, fragmen kult biji, dan sel parenkin dengan butir aleurone. Didapatkan hasil beberapa parameter dari simplisia berupa kadar sari larut air 15,62 ± 0,55%, kadar sari larut etanol 3,33 ± 0,24 %, kadar steroid total 0,0131 ± 0,0029 %, kadar abu total 13,42 ± 0,08 %, kadar abu tidak larut asam 2,56 ± 0,21 %, susut pengeringan 15,20 ± 0,30 %, dan kadar air 13,64 ± 0,57 %. Kemudian untuk parameter standar dari ekstrak etanol 70% dari tanaman herba jotang berupa kadar sari larut air 65,24 ± 1,38 %, kadar sari larut etanol 27,92 ± 1,18 %, kadar steroid total 0,077 ± 0,025 %, kadar abu total 20,95 ± 2,27 %, kadar abu tidak larut asam 5,04 ± 2,46 %, susut pengeringan 25,81 ± 0,52 %, dan kadar air 16,59 ± 1,14 %. Tanaman ini juga tidak toksik setelah dilakukan pengujian toksisitas akut dengan LD50 21.000 dan toksisitas sub kronik baik pada tikus jantan ataupun betina.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan Penelitian Unggulan Fakultas yang berjudul **"POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA".**

Penelitian ini dapat diseelngarakan karena bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Ketua Lembaga Penelitia dan Inovasi Universitas Airlangga, beserta staff administrasi yang telah memberikan kesempatan, bantuan, dan fasilitas selama melakukan penelitian ini.
- Dekan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Semua yang sudah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca, baik sebagai bahan kajian maupun sebagai sumber informasi untuk mengembangkan ilmu pengetahuan, khususnya dibidang Farmasi.

Surabaya, 8 November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
BAB IV. METODE PENELITIAN	16
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Hasil pengamatan makroskopis tanaman segar dari herba jotang 22
Tabel 5.2 Hasil penetapan kadar abu total simplisia herba jotang 27
Tabel 5.3 Hasil penetapan kadar abu total ekstrak herba jotang 27
Tabel 5.4 Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam simplisia herba jotang 28
Tabel 5.5 Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam ekstrak herba jotang 28
Tabel 5.6 Hasil penetapan kadar air simplisia herba jotang 29
Tabel 5.7 Hasil penetapan kadar air ekstrak herba jotang..... 29
Tabel 5.8 Hasil penetapan kadar sari larut air simplisia herba jotang 29
Tabel 5.9 Hasil penetapan kadar sari larut air ekstrak herba jotang 30
Tabel 5.10 Hasil penetapan kadar sari larut etanol simplisia herba jotang 30
Tabel 5.11 Hasil penetapan kadar sari larut etanol ekstrak herba jotang 30
Tabel 5.12 Hasil penetapan susut pengeringan simplisia herba jotang 31
Tabel 5.13 Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba jotang 31
Tabel 5.14 Hasil perhitungan nilai Rf dengan sinar uv 33
Tabel 5.15 Hasil perhitungan nilai Rf dengan penampak noda anilsaldehide 34
Tabel 5.16 Penentuan persamaan garis lurus standar stigmasterol 35
Tabel 5.17 Hasil penetapan kadar steroid total simplisia herba jotang 35
Tabel 5.18 Hasil penetapan kadar steroid total ekstrak herba jotang 36
Tabel 5.19. Berat badan rata-rata mencit dalam uji toksisitas akut 36
Tabel 5.20. Jumlah mencit yang mati dalam uji toksisitas akut 37
Tabel 5.21. Perilaku dan gejala toksisitas pada mencit 37

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 4.1 Bagan alur penelitian 16
Gambar 4.2 Bagan alur penelitian (tahun ke-2) 17
Gambar 5.1 Mikroskopis daun jotang 23
Gambar 5.2 Irisan melintang batang jotang 24
Gambar 5.3 Mikroskopis bunga jotang 24
Gambar 5.4 Mikroskopis biji jotang 25
Gambar 5.5 Fragmen serbuk herba jotang 26
Gambar 5.6 Organoleptis dari simplisia herba jotang dan ekstrak 27
Gambar 5.7 Hasil pola kromatogram KLT sinar uv 33
Gambar 5.8 Hasil pola kromatogram KLT penampak noda anilsaldehid 34
Gambar 5.9 Profil kromatogram simplisia dan ekstrak herba jotang 35
Gambar 5.10. Grafik profil berat badan mencit pada setiap kelompok uji 37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Artikel ilmiah 42
Lampiran 2. Bukti telah disubmit dan direview 52
Lampiran 3. Draft paten sederhana 57
Lampiran 4. Prototipe antiosteoporosis 62

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Osteoporosis adalah penyakit tulang sistemik yang ditandai oleh penurunan densitas masa tulang dan perburukan mikroarsitektur tulang sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah (Jennifer, 2008). Dengan meningkatnya usia harapan hidup, maka berbagai penyakit degeneratif dan metabolik, termasuk osteoporosis akan menjadi permasalahan muskuloskeletal yang memerlukan perhatian khusus, terutama di negara-negara berkembang. Sejak dicanangkannya *Bone Joint Decade* (BJD) 2000-2010 osteoporosis menjadi penting, karena selain termasuk dalam 5 besar masalah kelainan muskuloskeletal yang harus ditangani, juga kasusnya semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah usia tua (Irwan, 2008). Pada umumnya pengobatan osteoporosis dibagi menjadi 2 bagian yaitu untuk menghambat hilangnya masa tulang (anti-resorpsi) dan meningkatkan masa tulang (formasi tulang) (NIH, 2001). Permasalahan terapi osteoporosis adalah kompleks dan erat hubungannya dengan cakupan penderita yang rendah akibat mahalnya biaya deteksi dini, pemeriksaan lanjutan dan obat-obatan untuk penyakit osteoporosis. Selain itu obat-obatan yang ada pun masih belum ada yang ideal karena masalah efikasi dan toleransi yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut.

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan dengan menggunakan terapi anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan (Fleisch, 1998), tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al*., 2005; Whyte *et al*., 2003; Woo *et al*., 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian obat anti-osteoporosis baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat dipasaran. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari

diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina*, *Graptophyllum pictum*, dan *Spilanthes acmella* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 139%, 128% dan 169% (Retno, 2010). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990). Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Hening *et al*., 2015). Selain itu fraksi butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun fraksi heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Retno *et al*., 2017). Senyawa piroglutamat dengan konsentrasi 25 mM mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17β-estradiol.

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase (Retno, 2010), dan meningkatkan aktivitas sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al*., 2015). Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthes acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya. Oleh karena itu diperlukan standarisasi dalam hal ini yang dapat mempengaruhi baik mutu simplisia maupun mutu ekstrak yang diperoleh berdasarkan metode yang ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI.

Standarisasi merupakan penjaminan terhadap keamanan, efektifitas dan terutama kualitas dari bahan baku yang diperoleh yaitu simplisia dan ekstrak yang nantinya akan dikembangkan menjadi sediaan OHT. Iptek kefarmasian juga berkembang dalam hal ekstraksi, analisis dan teknologi proses sehingga ekstrak dapat diterima sebagai bentuk bahan yang dapat dipertanggungjawabkan mutu dan keajegan kandungan kimianya. Selain itu, iptek kedokteran juga menerima konsep ekstrak terstandar sebagai bentuk obat multi-komponen yang dapat dipertanggungjawabkan dari segi keamanan,

farmakologi dan khasiatnya. Oleh karena itu keajegan kadar senyawa aktif merupakan syarat mutlak ekstrak yang diproduksi sehingga setiap ekstrak harus distandarisasikan demi tegaknya trilogi mutu, keamanan dan manfaat (Depkes RI, 2000).

Untuk menegetahui derajat bahaya sediaan uji dalam waktu singkat (setelah pemberian 24 jam) baik pada pemberian dosis sekali maupun berulang dapat dilakukan uji toksisitas akut. Pada uji ini dilakukan pengamatan terhadap efek toksik dan kematian. Hewan yang mati dan hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas. Dari hasil ini akan ditentukan LD_{50} melalui pengamatan organ sasaran, kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan dan merancang uji toksisitas selanjutnya (BPOM, 2014).

Uji toksisitas selanjutnya adalah tosisitas sub kronik dimana sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Pengamatan dilakukan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan, juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi beberapa organ vital (BPOM, 2014).

1.2. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh dan pengembalian kesegaran tubuh (Pramono, 2007), sehingga pemanfaatan tanaman obat sebagai obat tradisional maupun modern masih terbuka lebar. Kesempatan ini menjadi penting karena akhir-akhir ini kecenderungan masyarakat memilih obat tradisional dari bahan alam "*Back to Nature*". Obat tradisional juga memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat modern jika digunakan dengan tepat. Tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dapat memiliki lebih dari satu efek farmakologi sehingga dalam ramuan obat tradisional dapat terjadi efek komplementer atau sinergisme antar senyawa obat, sehingga penting untuk mengetahui jenis senyawa aktif untuk suatu pengobatan.

Saat ini permasalahan osteoporosis di Indonesia telah mencapai pada tingkat yang perlu diwaspadai karena jumlah penderita osteoporosis ini jauh lebih besar dari data terakhir Depkes yang mematok angka 19,7% dari seluruh penduduk dengan alasan perokok di Indonesia masuk dalam urutan ke-2 dunia setelah Cina. Selain itu jumlah usia lanjut di Indonesia diperkirakan akan naik 14% dalam kurun waktu 1990-2025, sedangkan perempuan menopause pada tahun 2000 diperhitungkan 15,5 juta akan naik menjadi 24 juta pada tahun 2015. Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan hasil bahwa faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Sudoyo & Simadibrta, 2006). Bayangkan betapa besar jumlah penduduk yang dapat terancam penyakit osteoporosis. Terapi penyakit osteoporosis dengan menggunakan anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin memberikan efek samping yang tidak diinginkan dan tidak nyaman, sehingga banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al*., 2005; Whyte *et al*., 2003; Woo *et al*., 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian alternatif obat anti-osteoporosis baru. Salah satu tanaman obat Indonesia yang mempunyai banyak khasiat adalah *Spilanthes acmella*. Kandungan tanaman dari *Asteraceae* ini mampu meningkatkan aktivitas pembentukan tulang (*bone formation*) melalui peningkatan aktivitas enzim alkaline fosfatase baik ekstrak etanol 70% maupun fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air secara *in vitro* (Retno, 2010) dan peningkatan sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur dari mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan penginduksi deksametason *in vivo* (Hening *et al*., 2015). Oleh karena itu perlu dilanjutkan penelitian terhadap aktivitas penghambatan masa tulang (resorpsi tulang) sehingga mekanisme kerja dari dua efek yang berbeda tapi saling mendukung kekuatan dari tulang dapat menjadikan terobosan baru untuk pengobatan penyakit osteoporosis. Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel

osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Hening *et al*., 2015). Selain itu fraksi butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun fraksi heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Retno *et al*., 2017). Senyawa piroglutamat dengan konsentrasi 25 mM mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17*b*-estradiol. Oleh karena itu diperlukan standarisasi dalam hal ini yang dapat mempengaruhi baik mutu simplisia maupun mutu ekstrak yang diperoleh berdasarkan metode yang ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa nilai penting yang akan didapatkan dalam penelitian yang diusulkan ini adalah: (1) menyediakan altematif pengobatan untuk penyakit osteoporosis dengan pemanfaatan sumber daya alam Indonesia dari tanaman *Spilanthes acmella*, (2) menyediakan alternatif fraksi/senyawa bioaktif untuk anti-osteoporosis dari tanaman *Spilanthes acmella,* (3) diperoleh senyawa anti-osteoporosis hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia yang dapat diproduksi dan dipasarkan di Indonesia, (4) meningkatkan derajat kesehatan masyarakat serta mendukung upaya pengobatan penyakit osteoporosis, (5) menunjang payung penelitian tentang ekplorasi bahan aktif anti-osteoporosis dari bahan alam tanaman obat Indonesia di Universitas Airlangga.

Penelitian isolasi bahan aktif anti-osteoporosis dari *Spilanthes acmella* juga relatif baru, mengingat di Indonesia penelitian yang mengungkap tentang senyawa aktif anti-osteoporosis dari bahan alam belum banyak dilaporkan. Dari segi potensi aplikasi, penelitian ini relevan dengan kebutuhan pemerintah dalam mengatasi kelangkaan bahan baku obat dari bahan alam.

Penetapan parameter spesifik dan non spesifik dari simplisia dan ekstrak etanol 70% dari tanaman ini juga dapat menjamin keajegan kandungan yang ada di dalam nya. Selain itu pengujian toksisitas ekstrak juga dapat mengungkap dosis aman yang bisa digunakan dalam terapi anti-osteoporosis. Menjamin keamanan, efektivitas dan keajegan mutu kandungan simplisia pada simplisia dan ekstrak etanol 70% jotang yang akan digunakan dalam pembuatan produk herbal terstandar anti-osteoporosis.

Hasil penelitian ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional yang terindeks scopus (Journal of Natural Medicine). Selain itu, penelitian ini juga telah

terlibat dalam konferensi atau seminar internasional yaitu Bromo Conference, dan akan didaftarkan bentuk paten dari produk yang dihasilkan.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jotang (*Spilanthes acmella*)

Spilanthes acmella Murr**.** termasuk ke dalam famili Asteraceae, juga dikenal sebagai tumbuhan penyembuh sakit gigi, rematik dan demam, disentri, luka gigitan ular, antiseptik, antibakteri, antijamur, influenza, batuk dan stomatitis. Tanaman ini mengandung senyawa yang biasa disebut dengan "spilanthol" dan "acmellonate", yang dapat mengurangi rasa sakit pada gigi dan sebagai anestesi lokal. Selain itu juga mengandung fenol, kumarin dan triterpenoid (Supaluk *et al*., 2009).

Ekstrak etanol 70% tanaman ini menstimulasi aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sebesar 169% (Retno, 2010) dan meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al*., 2015). Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Hening *et al*., 2015). Selain itu fraksi butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun fraksi heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Retno *et al*., 2017).

Pada proses pemisahan fraksi butanol dengan menggunakan kolom kromatografi diperoleh 14 senyawa yaitu 4 senyawa piroglutamat, dendrantemosida A, 2-*C*-metil-D-treono-1,4-lakton, uridina, ikarisida B2, cikoriin, dendrantemosida B, metil piroglutamat, 2–deoksi–D–ribono–1,4 lakton, ampelosisinosida, dan benzil-α-L-arabinopiranosil (1→6)-β-D-glucopiranosida. Senyawa piroglutamat dengan konsentrasi 25 μM mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17β-estradiol (Retno *et al*., 2017).

2.2. Tinjauan tentang osteoporosis

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit serius yang berhubungan dengan usia lanjut, penyakit ini dapat menyebabkan patah tulang yang sering terjadi pada pinggul dan punggung, juga menyebabkan nyeri kronis, kehilangan keseimbangan dan dapat menimbulkan kematian.

Insiden osteoporosis lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki-laki dan merupakan problem pada wanita pascamenopause. Osteoporosis di klinik menjadi penting karena problem fraktur tulang, baik fraktur yang disertai trauma yang jelas maupun fraktur yang terjadi tanpa disertai trauma yang jelas.

Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Irwan, 2008).

Ada 2 penyebab utama osteoporosis, yaitu pembentukan masa puncak tulang yang kurang baik selama masa pertumbuhan dan meningkatnya pengurangan masa tulang setelah menopause. Masa tulang meningkat secara konstan dan mencapai puncak sampai usia 40 tahun, pada wanita lebih muda sekitar 30-35 tahun. Walaupun demikian tulang yang hidup tidak pernah beristirahat dan akan selalu mengadakan remodeling dan memperbaharui cadangan mineralnya sepanjang garis beban mekanik. Faktor pengatur formasi dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui 2 proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang dan disebut *coupling*. Proses *coupling* ini memungkinkan aktivitas formasi tulang sebanding dengan aktivitas resorpsi tulang. Proses ini berlangsung 12 minggu pada orang muda dan 16-20 minggu pada usia menengah atau lanjut. *Remodelling rate* adalah 2-10% masa skelet per tahun (Stevenson & Marsh, 2007).

Proses *remodelling* ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor lokal yang menyebabkan terjadinya satu rangkaian kejadian pada konsep *Activation – Resorption – Formation* (ARF). Proses ini dipengaruhi oleh protein mitogenik yang berasal dari tulang yang merangsang preosteoblas supaya membelah menjadi osteoblas akibat adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi proses pembentukan tulang kembali (remodeling) adalah faktor hormonal. Proses ini akan ditingkatkan oleh hormon paratiroid, hormon pertumbuhan dan 1,25$(OH)_2$ vitamin D. Sedang yang menghambat proses ini adalah kalsitonin, estrogen dan glukokortikoid. Proses-proses yang mengganggu remodeling tulang inilah yang menyebabkan osteoporosis.

Selain gangguan pada proses remodeling tulang faktor lainnya adalah pengaturan metabolisme kalsium dan fosfat. Walaupun terdapat variasi asupan kalsium yang besar, tubuh tetap memelihara konsentrasi kalsium serum pada kadar yang tetap. Pengaturan homeostasis kalsium serum dikontrol oleh organ tulang, ginjal dan usus melalui pengaturan paratiroid hormon (PTH), hormon kalsitonin, kalsitriol (1,25$(OH)_2$ vitamin D) dan penurunan fosfat serum. Faktor lain yang berperan adalah hormon tiroid, glukokortikoid dan insulin, vitamin C dan inhibitor mineralisasi tulang (pirofosfat dan pH darah). Pertukaran kalsium sebesar 1,000 mg/harinya antara tulang dan cairan ekstraseluler dapat bersifat kinetik melalui fase formasi dan resorpsi tulang yang lambat. Absorpsi kalsium dari gastrointestinal yang efisien tergantung pada asupan kalsium harian, status vitamin D dan umur. Didalam darah absorpsi tergantung kadar protein tubuh, yaitu albumin, karena 50% kalsium yang diserap oleh tubuh terikat oleh albumin, 40% dalam bentuk kompleks sitrat dan 10% terikat fosfat.

Pembentukan ulang tulang adalah suatu proses yang terus menerus. Pada osteoporosis, masa tulang berkurang, yang menunjukkan bahwa laju resorpsi tulang pasti melebihi laju pembentukan tulang. Pembentukan tulang lebih banyak terjadi pada korteks (Stevenson & Marsh, 2007).

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan menggunakan terapi antiresorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan, tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al*., 2005; Whyte *et al*., 2003; Woo *et al*., 2006).

Sebaliknya pengobatan osteoporosis menggunakan terapi formasi tulang (anabolik) yang berhubungan langsung dengan proses pembentukan tulang dapat mereduksi terjadinya patah tulang dengan cara meningkatkan kualitas tulang dan masa tulang. Dengan menggunakan terapi ini, densitas dan turnover tulang akan meningkat, mikro-arsitektur tulang juga meningkat dan ukuran tulang akan berubah. Sel osteoblast mempunyai peran yang sangat besar dalam pembentukan tulang melalui proliferasi dan diferensiasinya. Khususnya pada diferensiasi dari sel osteoblas, menunjukkan rigiditas dan kekuatan dari tulang dalam mempertahankan ke-elastisannya. Dewasa ini golongan

anabolik yang menjanjikan adalah paratiroid hormon (PTH). Tapi terapi menggunakan PTH ini harus dilakukan setiap hari secara injeksi, mempersulit pasien untuk melakukannya sendiri.

Terapi pada osteoporosis harus mempertimbangkan 2 hal, yaitu terapi pencegahan yang pada umumnya bertujuan untuk menghambat hilangnya masa tulang. Dengan cara yaitu memperhatikan faktor makanan, latihan fisik (senam pencegahan osteoporosis), pola hidup yang aktif dan paparan sinar ultra violet. Selain itu juga menghindari obat-obatan dan jenis makanan yang merupakan faktor resiko osteoporosis seperti alkohol, kafein, diuretika, sedatif, kortikosteroid. Selain pencegahan, tujuan terapi osteoporosis adalah meningkatkan masa tulang dengan melakukan pemberian obat-obatan antara lain hormon pengganti (estrogen dan progesteron dosis rendah). Kalsitrol, kalsitonin, bifosfat, raloxifene, dan nutrisi seperti kalsium serta senam beban. Pembedahan pada pasien osteoporosis dilakukan bila terjadi fraktur, terutama bila terjadi fraktur panggul.

2.3. Simplisia

Menurut buku Materia Medika Indonesia, definisi dari simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1979). Pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada waktu penerimaan atau pembelian dari pengumpul atau pedagang yang harus memenuhi persyaratan umumnya dalam Farmakope Indonesia dan Materia Medika Indonesia. Pemeriksaan mutu ini dilakukan dengan cara organoleptik, makroskopik dan atau cara kimia. Beberapa jenis simplisia tertentu ada yang perlu diperiksa dengan uji mutu secara biologi (Depkes RI, 1985).

2.4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Penggunaan ekstraksi yang tepat bergantung pada bahan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi.

Berdasarkan proses pelaksanaannya ada dua macam ekstraksi, yaitu: (1) ekstraksi berkesinambungan, pelarut yang sama dipakai secara berulang-ulang sampai proses selesai, contohnya sokhlet, (2) ekstraksi bertahap, selalu dipakai pelarut baru pada setiap tahapnya sampai proses selesai, contohnya maserasi dan perkolasi (Harbome, 1987).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dapat dibedakan menjadi: (1) ekstrak padat-cair, adalah proses ekstraksi yang paling banyak ditemui dalam dunia usaha, digunakan untuk mengisolasi senyawa berkhasiat yang terkandung dalam bahan alam yang berbentuk padat, (2) ekstraksi cair-cair, adalah proses ekstraksi yang berdasarkan pada distribusi solut dalam dua macam pelarut yang tidak saling campur sehingga solut akan terbagi dalam kedua macam pelarut tersebut sampai dicapai suatu keadaan setimbang (Harbome, 1987).

2.5. Parameter non spesifik

Parameter non spesifik merupakan suatu tolak ukur baku yang dapat berlaku untuk setiap simplisia atau ekstrak semua jenis tanaman dan tidak dikhususkan untuk satu jenis simplisia atau ekstrak dari tanaman tertentu. Parameter tersebut meliputi susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.

2.6. Parameter spesifik

Parameter ini merupakan parameter yang dapat dikaitkan dengan tanaman tertentu yang merupakan tanaman asal dari ekstrak. Umumnya yang spesifik adalah komposisi kandungan dari ekstrak dimana dalam hal ini mengacu pada kandungan utamanya. Yang termasuk dalam parameter spesifik adalah identitas, organoleptik, senyawa terlarut dalam pelarut tertentu, dan kadar senyawa kimia tertentu.

2.7. Uji toksisitas

Uji toksisitas merupakan suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberikan informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (BPOM, 2014).

Ada beberapa jenis uji toksisitas, diantaranya toksisitas akut, sub akut, sub kronik dan kronik. Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal atau dosis berulang

yang diberikan dalam waktu 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap efek toksik dan kematian yang pada akhirnya diperoleh nilai LD50 suatu bahan/sediaan uji (BPOM, 2014).

Uji toksisitas subkronik oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umurnya dan tidak lebih dari 10% dari seluruh umurnya. Semua hewan yang mati ataupun hidup diotopsi untuk dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan. Selain itu dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (BPOM, 2014).

2.8. Roadmap penelitian

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan kemampuan asam lemak yaitu asam oleat dan asam mead (*5,8,11-Eicostrienoic acid*, 20:3n-9) terhadap aktivitas sel osteoblas (enzim alkaline fosfatase), bahwa asam mead mampu meningkatkan aktivitas sel osteoblas setelah 6 dan 18 jam inkubasi (1-100 μM), sedangkan asam oleat tidak memberikan aktivitas. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa keberadaan asam lemak ini di *fetal cartilage* penting untuk pencegahan terjadinya proses kalsifikasi dimana proses pembentukan tulang terhambat (Tomohito *et.al*., 2009).

Pada tahun 2007 telah dilaporkan juga bahwa kombinasi latihan fisik pembebanan aksial dan konsumsi daun semanggi dapat menghambat peningkatan kecepatan ketidakseimbangan remodeling tulang pada perempuan pascamenopause dan mencit betina *Mus musculus* (Laswati, 2007).

Telah juga dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella, Graptophyllum pictum*, dan *Barleria lupulina* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 169%, 128% dan 139% (Retno, 2010). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990).

Selain itu juga telah dilakukan proses pemisahan ekstrak etanol 70% *Graptophyllum pictum* dan *Spilanthes acmella* terhadap fraksi non polar (heksana), semi polar (etil asetat) dan polar (butanol dan air). Masing-masing fraksi dilakukan uji

aktivitas terhadap enzim alkaline fosfatase, dan diperoleh hasil bahwa fraksi polar yaitu butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas enzim alkaline fosfatase dengan harga 112% dan 122% untuk *Graptophyllum pictum*, serta 126% dan 127% untuk *Spilanthes acmella* (Retno, 2010). Telah dilaporkan juga bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina* dan kombinasi latihan fisik dari tanaman tersebut mampu meningkatkan kerapatan tulang dengan menggunakan metode pembebanan aksial tulang secara in vivo (Retno, *et al*., 2012).

Ekstrak etanol 70% Spilanthes acmella dikombinasikan dengan latihan fisik meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik. Ini membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella* mempunyai efek additive terhadap efek latihan pembebanan aksial pada kondisi osteoporosis. Fraksi heksana, etil asetat dan air juga meningkatkan secara bermakna jumlah sel osteoblas. Fraksi non-polar merupakan fraksi yang lebih potensial untuk pembentukan tulang karena fraksi tersebut banyak mengandung senyawa turunan amida dan sesquiterpena (Laswati *et al*., 2015).

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase. Ekstrak etanol 70% tanaman ini menstimulasi aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sebesar 169% (Retno, 2010) dan meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al*., 2015). Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Hening *et al*., 2015). Selain itu fraksi butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun fraksi heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Retno *et al*., 2017).

Pada proses pemisahan fraksi butanol dengan menggunakan kolom kromatografi diperoleh 14 senyawa yaitu 4 senyawa piroglutamat, dendrantemosida A, 2-*C*-metil-D-treono-1,4-lakton, uridina, ikarisida B2, cikoriin, dendrantemosida B, metil piroglutamat, 2–deoksi–D–ribono–1,4 lakton, ampelosisinosida, dan benzil-α-L- arabinopiranosil (1→6)-β-D-glucopiranosida. Senyawa piroglutamat dengan konsentrasi 25 μM mampu

meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17β-estradiol (Retno *et al*., 2017).

Sejauh ini belum ada laporan tentang pemeriksaan spesifik dan non spesifik dari simplisia dan ekstrak etanol 70% dari jotang sehingga keajegan kandungan didalamnya belum terlaporkan. Dosis aman yang dapat digunakan pada ekstrak ini, dalam hal ini pemeriksaan tentang toksisitasnya juga belum dilaporkan. Dengan diketahuinya pemeriksaan tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthes acmella* sebagai obat herbal terstandar (OHT) untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya.

BAB III
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1.Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

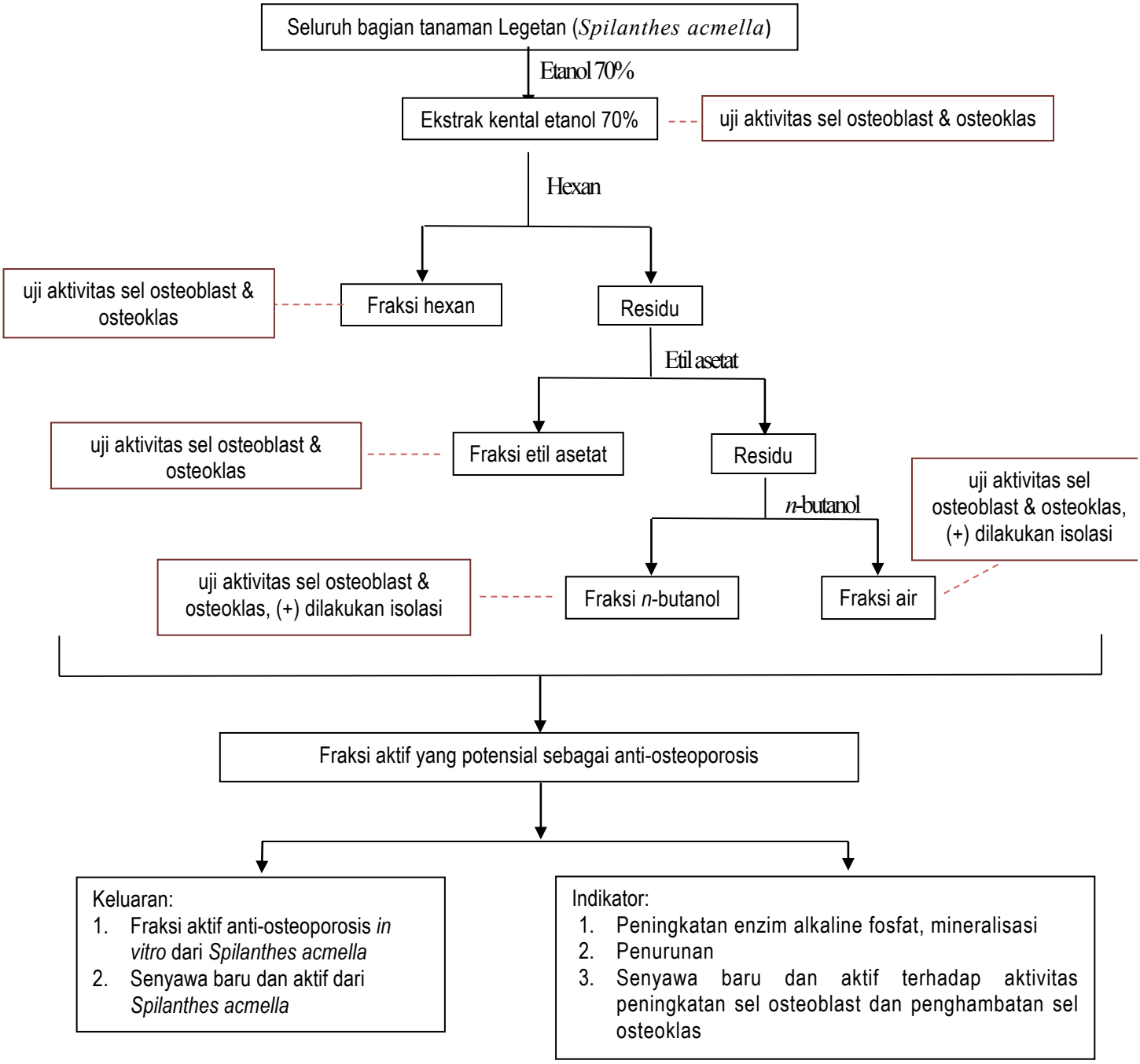
1. Mengetahui nilai parameter spesifik maupun non spesifik simplisia dan ekstrak etanol 70% dari jotang
2. Mengetahui dosis aman ekstrak etanol 70% dari jotang untuk terapi anti-osteoporosis
3. Menjamin keamanan, efektivitas dan keajegan mutu kandungan simplisia pada simplisia dan ekstrak etanol 70% jotang yang akan digunakan dalam pembuatan prototipe/produk herbal terstandar anti-osteoporosis.

3.2.Manfaat penelitian

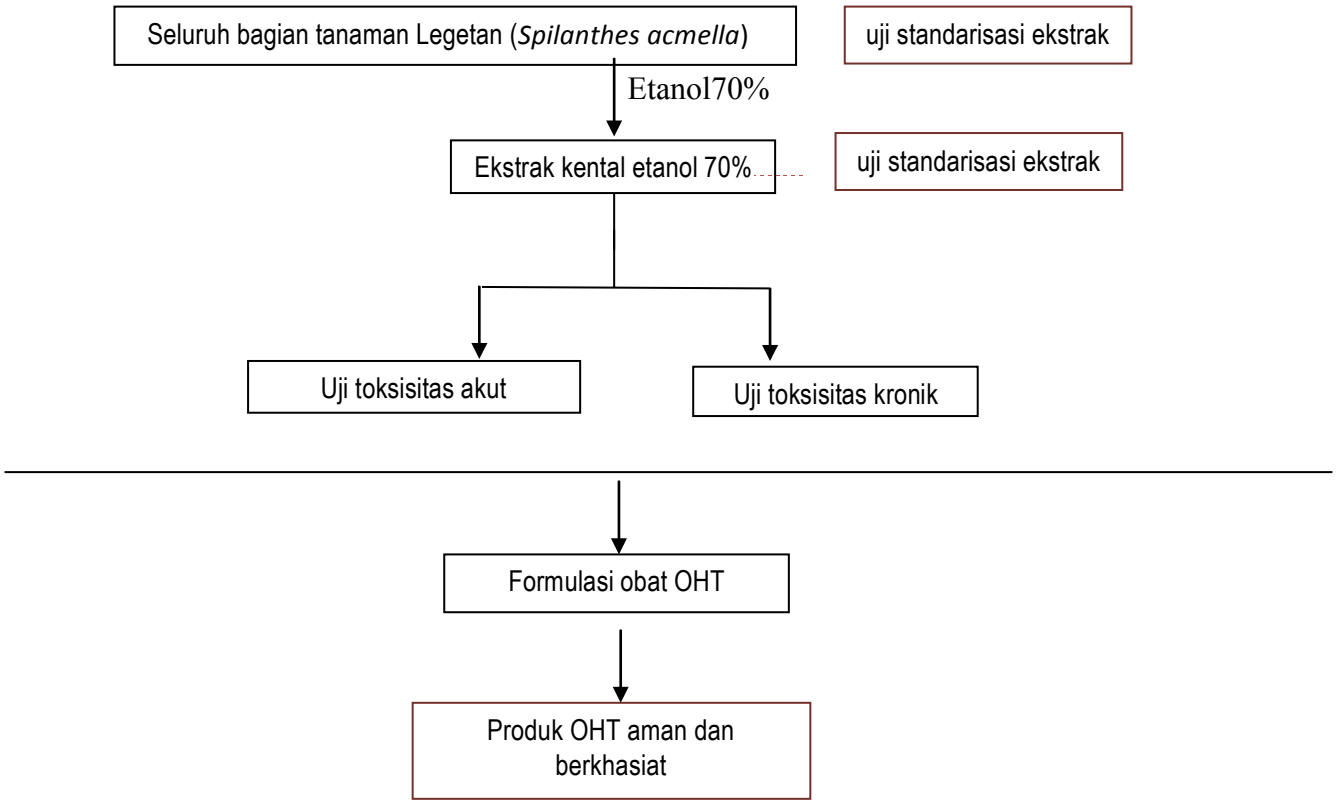
Data parameter spesifik dan non-spesifik simplisia dan ekstrak etanol 70% *S.acmella* dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai data dalam penentuan standar baku dan pengembangan obat herbal terstandar antiosteoporosis.

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1. Alur Penelitian



Gambar 4.1. Bagan alur penelitian



Gambar 4.2. Bagan alur penelitian (tahun ke-2)

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tiga laboratorium, yaitu Laboratoirum Fitokimia Fakultas Farmasi Unair, Laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Unair, dan Lab. Kesehatan Daerah. Dilakukan beberapa pemeriksaan darah seperti SGOT, SGPT, BUN, kreatinin, bilirubin total, dan pemeriksaan darah lengkap pada Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya. Untuk pengambilan darah dari tikus dilakukan pada Laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Unair. Penelitian tahun kedua akan dilakukan selama 10 bulan dari April 2018 sampai awal Desember 2018.

4.3. Bahan Penelitian

Semua tanaman yang digunakan diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia. Pengujian toksisitas akut dan kronik digunakan mencit sebagai hewan coba dan dipelihara pada laboratorium hewan coba Fakultas Farmasi Unair.

4.4. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, beker glass, gelas pengaduk, pinset, vial, corong pisah, corong gelas, *rotary evaporator*, HPLC, dan spektrofotometrik MS.

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Uji makroskopis simplisia *Spilanthes acmella*

Dilakukan penelitian morfologi dengan mengamati simplisia kering yang dilakukan tanpa menggunakan alat. Cara ini digunakan untuk mencari kekhususan morfologi, ukuran dan warna simplisia yang diuji (Depkes RI, 2000).

4.5.2. Uji mikroskopis simplisia *Spilanthes acmella*

Digunakan mikroskop dengan derajat pembesaran yang disesuaikan dengan keperluan untuk mempelajari anatomi dan histologi sediaan herba. Dibuat sediaan herba yang langsung diamati dalam medium air dibawah mikroskop. Selanjutnya dilakukan reaksi warna dalam medium kloralhidrat dengna pewarnaan floroglusin HCl (Depkes RI, 2000).

4.5.3. Identifikasi serbuk *Spilanthes acmella*

Serbuk diidentifikasi berdasarkan fragmen pengenal yaitu fragmen epidermis atas dan bawah dengan litosis, fragmen mesofil daun, rambut kelenjar dari kelopak bunga, rambut penutup dari kelopak bunga, sel batu dari kulit buah, epidermis kulit buah dengan stomata, berkas pembuluh, sistolit yang lepas dari sel, fragmen serabut kulit buah, fragmen endosperm dari biji, fragmen empulur batang, dan hablur kalsium oksalat berbentuk jarum (Depkes RI, 2000).

4.5.4. Penetapan kadar abu simplisia/ekstrak

Lebih kurang 2 – 3 g zat (simplisia/ekstrak) yang telah digerus dan ditimbang seksama. Dimasukkan dalam kurs porselen yang telah dipijarkan dan ditara. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa dan kertas saring dipijarkan dalam kurs yang sama. Dimasukkan filtrat ke dalam kurs, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap, dan ditimbang. Dihitung kadar air yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

4.5.5. Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam simplisia/ekstrak

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer p selama 5 menit, dikumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap, dan ditimbang. Dihitung kadar air yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

4.5.6. Penetapan kadar sari yang larut dalam air simplisia/ekstrak

Serbuk dikeringkan di udara, dimaserasi selama 24 jam sebanyak 5 g serbuk dalam 100 ml air kloroform, menggunakan labu tersumbat sambil berkali- kali dikocock selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Disaring dan diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. DIhitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

4.5.7. Penetapan kadar sari laut dalam etanol simplisia/ekstrak

Serbuk dikeringkan di udara, dimaserasi selama 24 jam sebanyak 5 g serbuk dalam 10 ml etanol, menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol dan diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol (96%), dan dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

4.5.8. Penetapan susut pengeringan simplisia/ekstrak

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan, kecuali dinyatakan, suhu penetapan adalah 105ºC dan serbuk harus dalam bentuk halus no 8 susut pengeringan ditetapkan sebagai berikut: ditimbang seksama 1 – 2 g zat dalam bobot timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara. Jika zat berupa hablur besar, sebelum ditimbang digerus dengan cepat hingga ukuran lebih kurang 2 mm. Zat diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 – 10 mm, dimasukkan ke dalam ruang pengering, dibuka tutupnya, dan dikeringkan

pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, dibiarkan botol dalam keadaan tertutup dan mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Jika suhu lebur zat lebih rendah dari suhu penetapan, pengeringan dilakukan pada suhu antara 5 – 10ºC dan dibawah suhu leburnya selama 1 – 2 jam, kemudian pada suhu penetapan selama waktu yang ditentukan atau hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang (Depkes RI, 2000).

4.5.9. Uji toksisitas akut

Setiap hewan coba dipuasakan dan ditimbang berat badannya setiap hari selama 14 hari perlakuan. Diberikan suspensi campuran ekstrak sesuai dengan dosisnya. Dilakukan pengamatan perilaku dan kondisi hewan coba dari hari ke-1 sampai ke-14. Data hewan coba yang mati setiap kelompok digunakan sebagai data LD_{50}. Hasinya dianalisa menggunakan statistika probit terhadap dosis dan jumlah kematian hewan coba yang lebih besar daro 0% dan lebih kecil dari 100%.

4.5.10. Uji toksisitas sub kronik

Setiap hewan coba dipuasakan dan ditimbang berat badannya setiap hari selama 14 – 18 hari perlakuan. Diberikan suspensi campuran ekstrak sesuai dengan dosisnya. Dilakukan pengamatan perilaku dan kondisi hewan coba dari hari ke-1 sampai ke-18. Setelah 28 hari, dilakukan pembedaha terhadap mencit untuk dilakukan pemeriksaan parameter biokimia (SGOT, SGPT, BUN dan kreatinin), parameter hematologi (jumlah eritrosit, leukosit, diferensial leukosit, hematocrit, jumlah platelet), MVC, MCH dan MCHC serta histopatologi beberapa organ vital. Data tersebut dirata-rata dan dilakukan Analisa Anova One Way.

4.6. Luaran

Luaran yang ditargetkan pada tahun kedua penelitian ini adalah (1) prototipe/produk OHT sebagai anti-osteoporosis untuk peningkatan derajat kesehatan dan penyembuhan penyakit dari tanaman obat Indonesia, (2) publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal nasional terakreditasi dan internasional, (3) paten sederhana.

4.7. Indiktor Capaian yang Terukur

Indikator capaian yang terukur dari penelitian ini adalah (1) parameter spesifik dan non spesifik dari simplisia dan ekstrak etanol 70% jotang, (2) dosis aman yang telah dilakukan pengujian toksisitas akut dan kronik, (3) prototipe/produk OHT anti-osteoporosis dari jotang, (4) publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal nasional terakreditasi dan internasional dan (5) paten sederhana.

BAB V
HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Uji makroskopis simplisia *Spilanthes acmella*

Uji makroskopis ini termasuk kedalam parameter spesifik yang bertujuan untuk memastikan keabsahan dari tanaman tersebut. Uji ini dilakukan dengan mengamati morfologi tanaman dengan panca indra. Hasil pengamatan makroskopik tanaman segar herba jotang ini dapat dilihat pada Table 5.1.

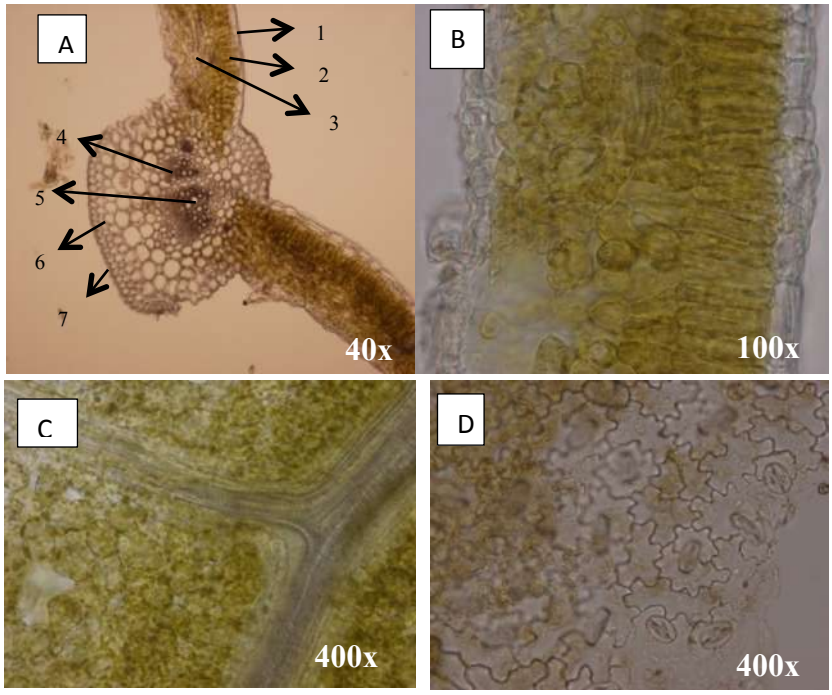
Tabel 5.1. Hasil pengamatan makroskopik tanaman segar dari herba jotang

No.	Uraian	Hasil Pengamatan	Foto
1.	Helaian Daun Bentuk Ujung Daun Pangkal Daun Permukaan Daun Pinggiran Daun Tulang Daun	 Bentuk seperti delta (*Deltoideus*) Meruncing *Retusus* Halus Bertoreh (*Divisus)* Tulang daun menyirip (*Penninervis*)	
	Ukuran Daun Panjang Daun Lebar Daun	 2-4 cm 1-2,8 cm	
2.	Batang Bentuk Percabangan Warna	 Bulat Simpodial Batang hijau ke unguan	
3.	Bunga Jenis bunga Bentuk Warna	 Bunga majemuk Capitula berbentuk oval Bunga tabung berwarna orange sedangkan bunga pita berwarna kuning	
4.	Biji Ukuran Bentuk	 3 mm Ujung berbentuk lonjong Terdapat bulu pada pinggir biji	

5.2. Uji mikroskopis simplisia *Spilanthes acmella*

Uji mikroskopis termasuk kedalam parameter spesifik. Uji mikroskopis ini dilakukan pada tanaman segar dari herba jotang dan juga serbuk simplisia. Pengamatan mikroskopis ini menggunakan perbesaran 40, 100, dan 400 kali perbesaran. Untuk mikroskopis tanaman segar berupa irisan melintang batang dan daun jotang, irisan membujur pada epidermis atas dan epidermis bawah daun jotang, dan mikroskopis simplisia bunga jotang.

Pada Gambar 5.1 merupakan mikroskopis dari daun jotang. Dari irisan melintang daun dengan perbesaran 40x (A) dapat dilihat anatomi dari daun jotang. Pada perbesaran 100x (B) dapat dilihat sel epidermis,jaringan palisade, jaringan spons dan jaringan epidermis bawah. Irisan membujur epidermis atas dengan perbesaran 400x (C) dapat diamati sel mesofil sedangkan pada irisan membujur epidermis bawah dengan perbesaran 400x (D) dapat diamati stomata daun tipe anomositik.

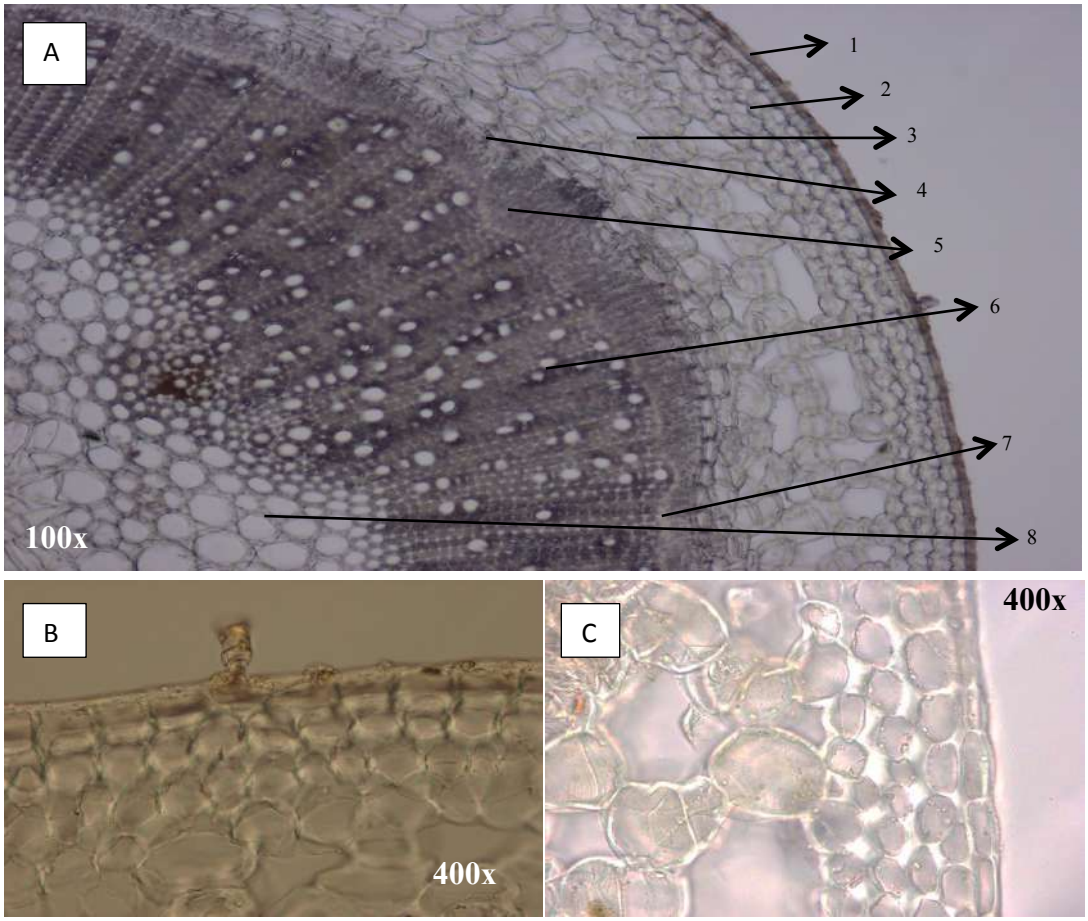


Keterangan :

1. Epidermis atas
2. Palisade
3. Jaringan bunga karang
4. Floem
5. Xylem
6. Kolenkim
7. Epidermis bawah

Gambar 5.1. Mikroskopik daun jotang; irisan melintang daun jotang dengan perbesaran 40x (A) dan perbesaran 100x (B) irisan membujur epidermis atas daun jotang (C) irisan membujur epidermis bawah daun jotang (D)

Pada irisan melintang batang jotang terlihat beberapa jaringan seperti yang telah ditunjukkan pada gambar 5.2 (A) yaitu (1) epidermis, (2) hipodermis, (3) korteks, (4) endodermis, (5) floem, (6) xilem, (7) kambium dan (8) empulur.

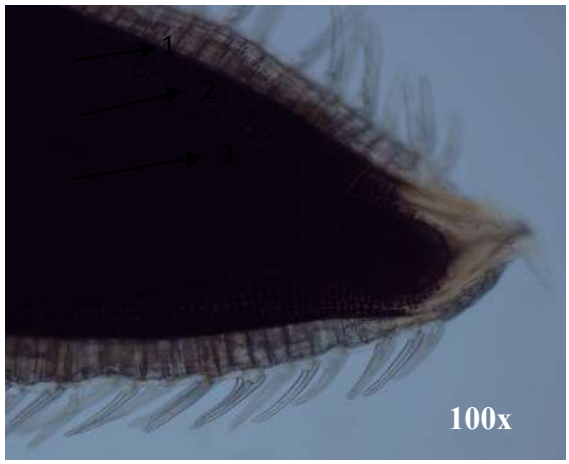


Gambar 5.2. Irisan melintang batang jotang dengan perbesaran 100x (A) rambut penutup (B) Kristal Ca-oksalat pada sel korteks (C).

Pada gambar 5.3 merupakan hasil pengamatan dari bunga jotang menggunakan mikroskop. Bunga jotang ini diamati dengan perbesaran 40x dan 100x. Dari pengamatan tersebut didapatkan bagian-bagian bunga seperti corolla dengan papilla (1), kemudian terlihat antera (2) dengan polen (3) didalamnya dan filamen (4).

Gambar 5.3. Mikroskopik bunga jotang, terlihat bagian corolla dengan papila (1), antera (2), polen (3), dan filamen (4).

Gambar 5.4 merupakan pengamatan mikroskopik dari biji jotang yang diamati dengan perbesaran 100x. Dari biji totang ini dapat diamati bagian rambut penutup (1), sel sklereida (2), dan bagian kulit biji (3).

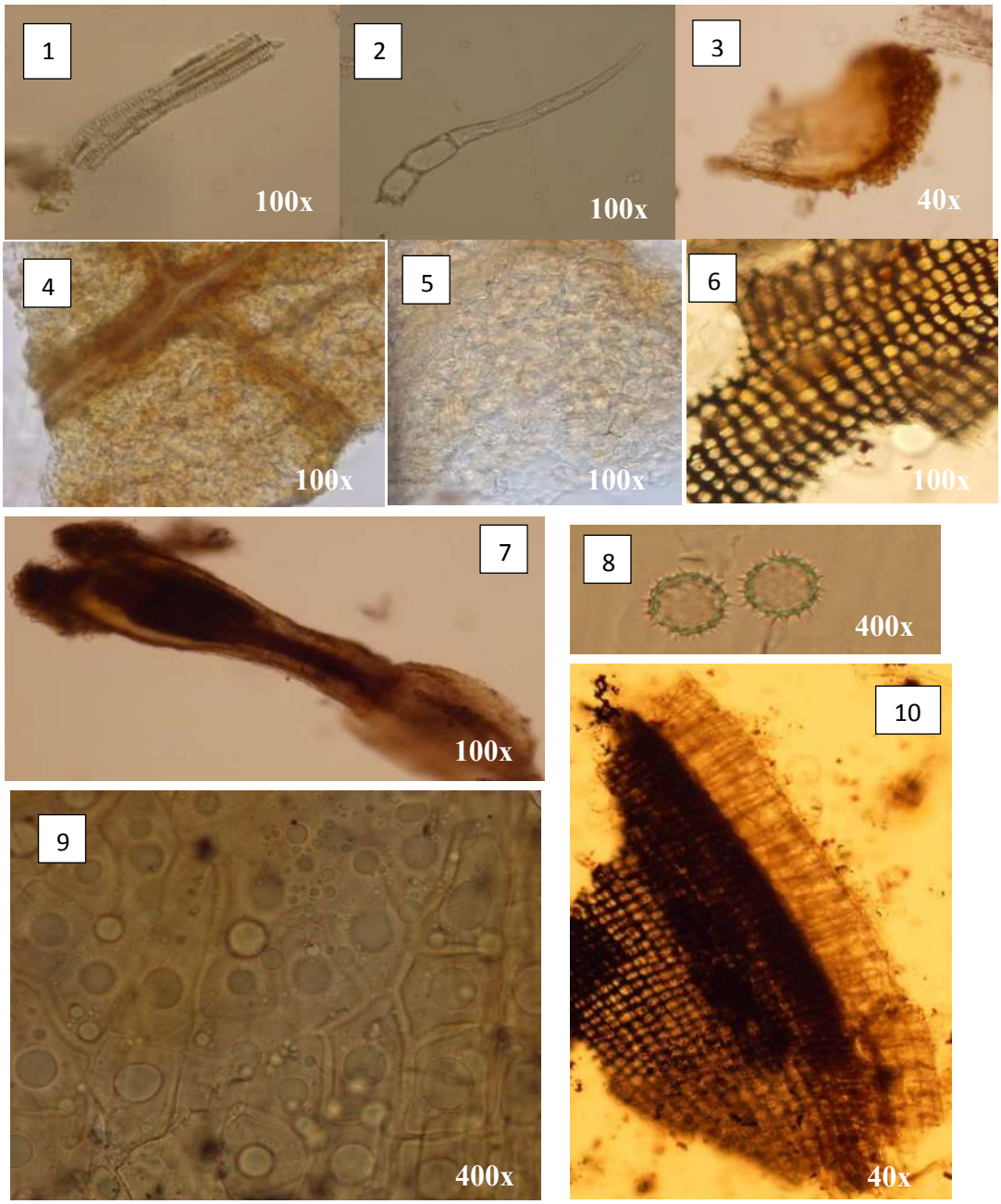


Gambar 5.4. Mikroskopik biji jotang, terlihat bagian rambut penutup (1), sel sklereida (2), dan kult biji (3)

Selain melakukan pengamatan pada tanaman segar, juga telah dilakukan pengamatan pada serbuk simplisia herba jotang. Pada pengamatan serbuk ditemukan fragmen berkas pengangkut dengan penebalan tangga (1), trikoma multi seluler (2). Untuk fragmen yang berasal dari daun dapat diamati jaringan mesofil dan tulang daun (4) dan stomata tipe anisositik (5). Sedangkan fragmen yang berasal dari bunga jotang adalah corola dengan papilla (3), polen (8), dan terkadang ditemukan fragmen bunga lengkap (7). Fragmen dari biji jotang yang dapat ditemukan adalah fragmen kulit biji (6), sel parenkim dengan butir aleurone (9) dan fragmen sel sklerida dan kulit biji (10).

Pengamatan mikroskopik bahan tanaman sangat diperlukan untuk identifikasi bahan yang sudah tidak segar lagi atau dalam bentuk serbuk simplisia. Pemeriksaan mikroskopi saja tidak selalu bisa melengkapi identifikasi, masih dibutuhkan analisis lain seperti analisa kandungan kimia untuk mendukung identifikasi tersebut (WHO, 2011). Pada pengamatan mikroskopi serbuk tanaman jotang digunakan Materia Medika Indonesa sebagai referensi, tetapi pada buku Materia Medika Indonesia hanya menyajikan data mikroskopis dari daun jotang saja sedangkan pada penelitian ini menggunakan seluruh bagian yang ada pada permukaan tanah dari tanaman tersebut. Hasil pengamatan mikroskopis ini ditemukan fragmen Berkas penganggut dengan penebalan tangga, trikoma multi seluler jaringan mesofil dan tulang daun, stomata tipe

anisositik. Fragmen-fragmen tersebut sudah sesuai dengan fragmen yang terdapat pada buku Materia Medika Indonesia. Selain fragmen diatas juga ditemukan fragmen corola dengan papilla dari bunga.



Gambar 5.5. Fragmen serbuk herba jotang; berkas pengangkut dengan penebalan tangga (1), trikoma multi selluer (2), corolla dengan papilla (3), jaringan mesofil dan tulang daun (4), stomata tipe anisositik (5), fragmen kulit biji (6), fragmen bunga (7), polen (8), sel parenkim dengan butir aleurone (9), dan fragmen sel sklerida dan kulit biji (10).

5.3. Identifikasi serbuk *Spilanthes acmella*

Organopleptis ini bertujuan sebagai identifikasi awal dengan mengamati serbuk simplisia dan ekstrak etanol 70% herba jotang menggunakan panca indra untuk mengamati warna, bau, dan rasa. Didapatkan hasil serbuk simplisia herba jotang memiliki ciri serbuk kasar berwarna coklat yang memiliki bau harum yang khas dan rasa hambar. Sedangkan ekstrrak etanol 70% dari herba jotang memiliki ciri-ciri berbau harum yang khas, berwarna hitam.

Gambar 5.6. Organoleptis dari simplisia herba jotang (a) dan organoleptis ekstrak kental etanol 70% herba jotang (b)

5.4. Penetapan kadar abu simplisia/ekstrak

Kadar abu total termasuk kedalam parameter non-spesfik. Kadar abu ini dilakukan dengan metode gravimetri. Perhitungan hasil dari kadar abu total dalam %b/b dilakukan dengan cara berat residu yang didapat dibagi dengan berat penimbangan sampel.

Tabel 5.2. Hasil penetapan kadar abu total simplisia herba jotang

	Berat Simplisia (g)	**Berat Residu (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	2,0006	0,2679	13,40
Replikasi 2	2,0009	0,2702	13,51
Replikasi 3	2,0010	0,2669	13,35
Rata-rata			13,42
Standar Deviasi			0,08
Koefisien Variasi			0,63

Tabel 5.3. Hasil penetapan kadar abu total ekstrak kental herba jotang

	Berat Ekstrak (g)	**Berat Residu (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	2,0009	0,4700	23,50
Replikasi 2	2,0006	0,3828	19,14
Replikasi 3	2,0008	0,4042	20,21
Rata-rata			20,95
Standar Deviasi			2,27
Koefisien Variasi			10,85

5.5. Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam simplisia/ekstrak

Kadar abu tidak larut asam ini didapatkan dengan menggunakan rumus yang sama kadar abu total. Tetapi berat penimbangan sampel pada penetapan kadar abu tidak larut asam ini bukan berat dari residu kadar abu total, melainkan berat sampel pada saat penetapan kadar abu total. Uji ini juga salah satu dari parameter non-spesifik.

Tabel 5.4. Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam simplisia herba jotang

	Berat Simplisia (g)	**Berat Residu (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	2,0006	0,0467	2,34
Replikasi 2	2,0009	0,0551	2,75
Replikasi 3	2,0010	0,0516	2,58
Rata-rata			2,56
Standar Deviasi			0,21
Koefisien Variasi			8,25

Kadar abu total merupakan parameter yang menggambarkan bahan yang tertinggal setelah pemijaran yang dapat dari tanaman itu sendiri (*physiological ash*) seperti kandungan mineral atau bahan yang berasal dari luar tanaman (*non-physiological ash*) seperti pasir atau tanah. Kemudian kadar abu tidak larut asam menggambarkan banyaknya jumlah silika alam seperti pasir atau tanah (WHO, 2011).

Tabel 5.5. Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam ekstrak kental herba jotang

	Berat Ekstrak (g)	**Berat Residu (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	2,0009	0,1570	7,85
Replikasi 2	2,0006	0,0800	4,00
Replikasi 3	2,0008	0,0656	3,28
Rata-rata			5,04
Standar Deviasi			2,46
Koefisien Variasi			48,72

Kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam dari simplisia herba jotang adalah 13,42±0,08% dan 2,56±0,21%. Sedangkan untuk ekstrak kental herba jotang kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam masing-masing adalah 20,95±2,27% dan 5,04±2,46%. Tingginya kadar abu ini dapat disebabkan dari tempat tumbuh dari tanaman jotang ini, karena tanaman jotang ini dapat menyerap logam berat yang berasal dari lingkungan disekitarnya (Lagniku *et al*., 2016). Selain itu tanaman jotang ini juga ditemukan banyak kristal ca-oksalat dan kandungan mineral seperti magnesium, natrium, dan kalium (Uraku and Ogbanhi., 2015). Kemudian faktor dari proses pasca penen seperti pencucian juga dapat mempengaruhi kadar abu ini.

5.6. Kadar air

Pengukuran kadar air ini menggunakan metode destlasi toluen. Air yang telah terkumpul dalam tabung penerima akan diukur menggunakan gelas ukur, kemudian volume air yang didapat dihitung dalam %v/b. Kadar air ini termasuk kedalam parameter non-spesifik.

Tabel 5.6. Hasil penetapan kadar air simplisia

	Berat Simplisia (g)	**Volume Air (mL)**	**Hasil (%v/b)**
Replikasi 1	10,024	1,4	13,97
Replikasi 2	10,021	1,4	13,97
Replikasi 3	10,015	1,3	12,98
Rata-rata			13,64
Standar Deviasi			0,57
Koefisien Variasi			4,18

Tabel 5.7. Hasil penetapan kadar air ekstrak kental herba jotamg

	Berat Ekstrak (g)	**Volume Air (mL)**	**Hasil (%v/b)**
Replikasi 1	5,024	0,8	15,92
Replikasi 2	5,020	0,8	15,94
Replikasi 3	5,028	0,9	17,90
Rata-rata			16,59
Standar Deviasi			1,14
Koefisien Variasi			6,86

5.7. Penetapan kadar sari yang larut dalam air simplisia/ekstrak

Secara garis besar kadar sari larut air sama dengan kadar sari larut etanol, tetapi yang berbeda adalah pelarut yang digunakan. Pada kadar sari larut air pelarut yang digunakan adalah air jenuh klorofom. Uji ini juga termasuk kedalam parameter spesifik.

Tabel 5.8. Hasil penetapan kadar sari larut air simplisia herba jotang

	Berat Simplisia (g)	**Berat Residu (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	5,0007	0,1501	15,01
Replikasi 2	5,0002	0,1608	16,08
Replikasi 3	5,0005	0,1576	15,76
Rata-rata			15,62
Standar Deviasi			0,55
Koefisien Variasi			3,52

Kadar sari air dan kadar sari larut etanol merupakan parameter yang memperkirakan jumlah senyawa-senyawa polar yang dapat larut dalam air dan senyawa-senyawa semi polar hingga non-polar yang dapat larut dalam etanol (Saifudin *et al*., 2011).

Tabel 5.9. Hasil penetapan kadar sari larut air ekstrak kental herba jotang

	Berat Ekstrak (g)	Berat Residu (g)	Hasil (%b/b)
Replikasi 1	5,0002	0,6377	63,77
Replikasi 2	5,0008	0,6650	66,49
Replikasi 3	4,8292	0,6324	65,48
Rata-rata			65,24
Standar Deviasi			1,38
Koefisien Variasi			2,11

5.8. Penetapan kadar sari laut dalam etanol simplisia/ekstrak

Hasil kadar sari etanol ini didapatkan dengan menggunakan metode gravimetri dengan memanaskan 20 mL dari 100 mL larutan yang digunakan. Berat residu yang telah didapat kemudian diubah dalam 100 mL larutan dengan cara berat residu dikali dengan lima. Setelah itu berat residu dalam 100 mL yang telah didapat dibagi dengan berat penimbangan awal simplisia. Perhitungan tersebut bila dibuat menjadi rumus akan menjadi:

$$\%Hasil\ kadar\ sari = \frac{(Berat\ residu\ x\ 5)}{Berat\ Penimbangan\ sampel}\ x\ 100\%$$

Perhitungan diatas berlaku juga pada penetapan kadar sari larut etanol dan kadar sari larut air. Uji kadar sari larut etanol termasuk kedalam parameter spesifik.

Tabel 5.10. Hasil penetapan kadar sari larut etanol dari simplisia herba jotang

	Berat Simplisia (g)	Berat Residu (g)	Hasil (%b/b)
Replikasi 1	5,0002	0,0360	3,60
Replikasi 2	5,0002	0,0313	3,13
Replikasi 3	5,0002	0,0326	3,26
Rata-rata			3,33
Standar Deviasi			0,24
Koefisien Variasi			7,29

Tabel 5.11. Hasil penetapan kadar sari larut etanol ekstrak kental herba jotang

	Berat Ekstrak (g)	Berat Residu (g)	Hasil (%b/b)
Replikasi 1	5,0002	0,2910	29,10
Replikasi 2	5,0012	0,2792	27,91
Replikasi 3	5,0019	0,2675	26,74
Rata-rata			27,92
Standar Deviasi			1,18
Koefisien Variasi			4,22

5.9. Penetapan susut pengeringan simplisia/ekstrak

Susut pengeringan atau juga disebut *loss on drying* merupakan parameter non-spesifik. Susut pengeringan dihitung dengan cara berat residu yang didapatkan setelah pemanasan dikurangi dengan berat penimbangan awal sampel simplisia maupun ekstrak, ini merupakan berat zat yang hilang atau susut pengeringan. Kemudian susut pengeringan ini dihitung dalam %b/b.

Tabel 5.12. Hasil penetapan susut pengeringan simplisia herba jotang

	Berat Simplisia (g)	**Berat Residu (g)**	**Susut Pengeringan (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	1,0008	0,8518	0,1490	14,89
Replikasi 2	1,0004	0,8479	0,1525	15,24
Replikasi 3	1,0013	0,8463	0,1550	15,48
Rata-rata				15,20
Standar Deviasi				0,30
Koefisien Variasi				1,96

Susut pengeringan merupakan parameter yang mengukur sisa zat setalah pengeringan. Jika suatu bahan tanaman tidak mengandung minyak atsiri dan sisa pelarut organik yang dapat menguap maka susut pengeringan dapat juga dinyatakan sebagai kadar air (Depkes, 2000). Sedangkan kadar air sendiri adalah parameter yang bertujuan untuk menetapkan sisa air setelah proses pengentalan ekstrak atau setalah proses pengeringan dari simplisia (Saifudin *et al*., 2011). Hasil pengukuran susut pengeringan dan kadar air dari simplisia herba jotang masing-masing adalah 15,20±0,30% dan 13,64±0,57%. Dari data tersebut terdapat bahan lain yang dapat menguap selain air yaitu minyak atsiri (Maimulyanti and Prihadi, 2015).

Tabel 5.6. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak kental herba jotang

	Berat Ekstrak (g)	**Berat Residu (g)**	**Susut pengeringan (g)**	**Hasil (%b/b)**
Replikasi 1	1,0011	0,7487	0,2524	25,21
Replikasi 2	1,0008	0,7392	0,2616	26,14
Replikasi 3	1,0009	0,7400	0,2609	26,07
Rata-rata				25,81
Standar Deviasi				0,52
Koefisien Variasi				2,00

Sedangkan untuk ekstrak etanol 70% herba jotang memiliki nilai susut pengeringan sebesar 25,81±0,52% dan kadar air dalam ekstrak sebesar 16,59±1,14%. Pada ekstrak herba jotang juga menunjukkan susut pengeringan yang lebih besar

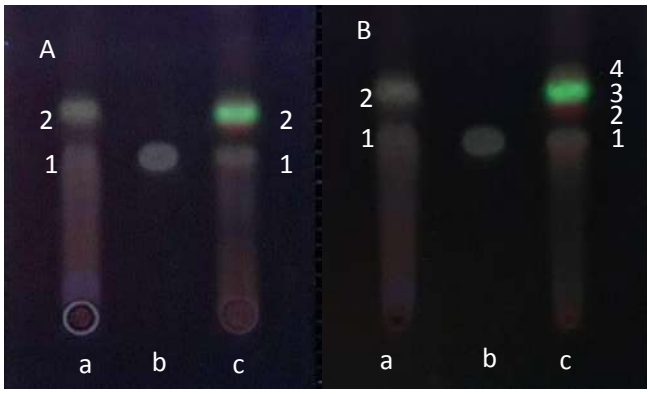
dibandingkan kadar air yang berarti ada senyawa lain yang dapat menguap seperti minyak atsiri dan sisa pelarut organik. Tetapi kadar air ini dapat menurunkan stabilitas dari senyawa dalam simplisia maupun ekstrak karena air dapat menyebabkan reaksi hidrolisis. Selain itu dapat juga meningkatkan kontaminasi dari mikroorganisme seperti jamur dan mikroba (WHO, 2011).

5.10. Pola kromatogram

Pola kromatogram termasuk kedalam parameter spesifik yang bertujuan untuk men-*screening* kandungan kimia yang terdapat pada simplisia dan ekstrak herba jotang. Pada pola kromatografi ini menggunakan 2 pelarut yaitu dengan etanol dan eter. Noda terbentuk diamati dengan penampak noda anisaldehid kemudian diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm.

Pada gambar 5.7 dan gambar 5.8 menunjukkan pola kromatogram KLT dari simplisia (c) dan ekstrak jotang (a) dalam pelarut etanol (A) dan eter (B). Standard yang digunakan pada pola kromatogram ini adalah stigmasterol (b). Dari semua hasil pola kromatogram baik yang menggunakan pelarut etanol dan eter terdapat noda dengan *Rf* yang sama dengan noda standar stigmasterol yang menendakan pada setiap sampel terdapat stigmasterol.

Pada gambar 5.7 merupakan hasil pola kromatogram KLT yang diamati menggunakan sinar UV pada Panjang gelombang 366 nm yang sebelumnya telah diberi penampak noda anisaldehid. Sampel yang menggunakan pelarut etanol terlihat 2 noda baik pada simplisia maupun ekstrak. Kemudian pada sampel yang menggunakan pelarut eter juga terlihat ada 2 noda pada ekstrak dan terlihat adanya 4 noda pada simplisia. Nilai *Rf* dari setiap noda yang muncul pada pola kromatogram yang diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm telah ditampilkan pada tabel 5.15.



Keterangan:
A. Pelarut Etanol
B. Pelarut Eter

a. Ekstrak etanol 70% Jotang
b. Standar stigmasterol
c. Simplisia herba Jotang

Eluen yang digunakan:
N-Heksana : Etil Asetat (7:3)

Penampak noda Anisaldehida H_2SO_4 kemudian diamati pada sinar UV pada λ 366 nm

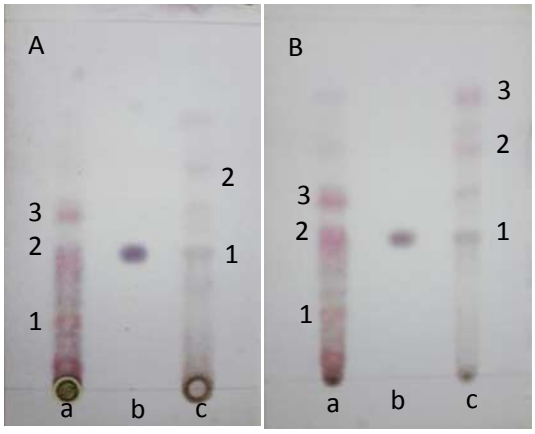
Gambar 5.7. Hasil pola kromatogram KLT dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm menggunakan pelarut etanol (A) dan pelarut eter (B)

Tabel 5.7. Hasil perhitungan nilai *Rf* pada plat yang diamati dengan sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm

Pelarut Etanol				
Track	**Nomor Noda**	***Rf***	**Warna noda**	**Keterangan**
A	1	0,38	Abu-abu	Steroid
	2	0,48	Abu-abu	Steroid
B		0,38	Abu-abu	Steroid
C	1	0,38	Abu-abu	Steroid
	2	0,48	Hijau	flavonoid
Pearut Eter				
Track	**Nomor Noda**	***Rf***	**Warna noda**	**Keterangan**
A	1	0,38	Abu-Abu	Steroid
	2	0,48	Abu-abu	Steroid
B		0,38	Abu-abu	Steroid
C	1	0,38	Abu-abu	Steroid
	2	0,45	Merah	Klorofil
	3	0,48	Hijau	Flavonoid
	4	0,55	Kuning	Flavonoid

Sedangkan pada gambar 5.8 merupakan pola kromatogram KLT yang diamati dengan penampak noda anilasdehid dan tidak menggunakan penyinaran UV. Penampak noda anisaldehid merupakan penampak noda untuk mendeteksi adanya golongan triterpenoid dan steroid yang ditandai dengan muncunya noda yang berwarna ungu. Pada sampel yang menggunakan pelarut etanol terlihat 3 noda pada ekstrak etanol 70% jotang dan 2 noda pada simplisia herba jotang. Sedangkan pada sampel yang menggunakan pelarut eter terlihat 3 noda baik pada ekstrak maupun simplisia herba

jotang. Kemudian nilai *Rf* dari setiap noda yang muncul pada pola kromatogram KLT yang diamati dengan penampak noda anisaldehid ditampilkan pada tabel 5.16.



Keterangan:
A. Pelarut Etanol
B. Pelarut Eter

a. Ekstrak etanol 70% Jotang
b. Standar stigmasterol
c. Simplisia herba Jotang

Eluen yang digunakan:
N-Heksana : Etil Asetat (7:3)

Penampak noda Anisaldehida
H_2SO_4

Gambar 5.8. Hasil pola kromatogram KLT diamati penampak noda Anisaldehid menggunakan pelarut etanol (A) dan pelarut eter (B).

Tabel 5.8. Hasil perhitungan nilai *Rf* pada plat yang diamati dengan penampak noda anisaldehid

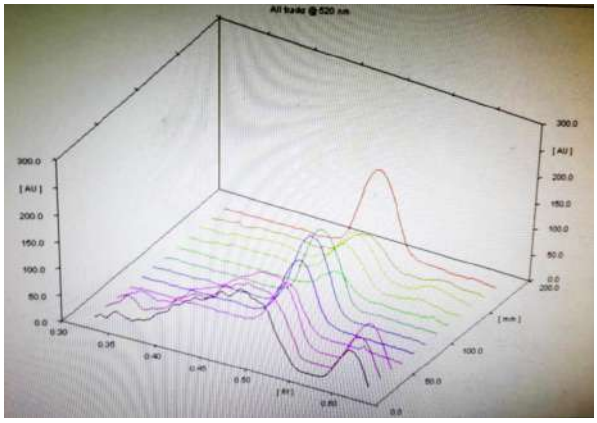
Pelarut Etanol				
Track	**Nomor Noda**	***Rf***	**Warna noda**	**Keterangan**
a	1	0,15	Merah keunguan	Triterpenoid
	2	0,38	Ungu	Steroid
	3	0,48	Merah keunguan	Triterpenoid
b		0,38	Ungu	Steroid
c	1	0,38	Ungu	Steroid
	2	0,65	Merah muda	Triterpene
Pearut Eter				
Track	**Nomor Noda**	***Rf***	**Warna noda**	**Keterangan**
a	1	0,15	Merah keunguan	Triterpenoid
	2	0,38	Ungu	Steroid
	3	0,48	Merah keunguan	Triterpenoid
b		0,38	Ungu	Steroid
c	1	0,38	Ungu	Steroid
	2	0,65	Merah muda	Triterpenoid
	3	0,79	Merah muda	Triterpenoid

5.11. Penetapan kadar steroid total

Kadar total steroid ini dilakukan dengan metode KLT-densitometer dengan penampak noda anisaldehid. Senyawa standar yang digunakan adalah stigmasterol. Penetapan kadar steroid ini merupakan parameter spesifik. Didapatkan hasil standar stigmasterol muncul pada *Rf max* 0,50 dan diamati pada panjang gelombang 520 nm.

Gambar 5.9 merupakan gambar profil kromatogram hasil dari *scan* pada densitometer. Hasil pola kromatogram tersebut mennunjukkan pada sampel simplsia

maupun ekstrak herba jotang memiliki puncak dengan *Rf* yang sama dengan standar stigmasterol. Hal ini menandakan bahwa luas aera yang didapatkan pada densitometer merupakan total steroid yang dihitung sebagai stigmasterol.



Gambar 5.9. Profil Kromatogram simplisia dan ekstrak herba jotang

Dari data diatas kemudian dibuat persamaan garis lurus dengan sumbu Y sebagai Luas area dan sumbu X sebagai kadar. Hasil penetapan kadar steroid total dapat dilihat pada Table 5.17 untuk simplisia herba jotang dan Tabel 5.18 untuk ekstrak jotang.

Tabel 5.9 Penentuan persamaan garis lurus standar stigmasterol

Kadar Standar Stigmasterol (µg)	Luas Area
0,2	1287,7
0,4	3027,4
0,6	4060,0
0,8	5291,9
1,0	5898,3
y= 5742,9x +467,35 r= 0,9742	

Tabel 5.10. Hasil penetapan kadar steroid total simplisia herba jotang

Berat Simplisia (g)	Luas area	Kadar dalam mg/25 mL	Hasil (% b/b)
1,0024	2762,3	0,143	0,014
1,0054	2938,2	0,154	0,015
1,0033	2044,8	0,098	0,010
Rata-rata			0,013
Standar Deviasi			0,003
Koefisien Variasi			22,321

Penetapan kadar golongan senyawa obat bertujuan sebagai parameter mutu ekstrak berkaitan dengan efek farmakologis (Depkes, 2000). Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar steroid total yang dihitung sebagai stigmastrol menggunakan metode KLT-densitometer dan menggunakan penampak noda anisaldehid. Didapatkan

hasil kadar steroid total dalam simplisia herba jotang adalah 0,0131±0,0029% sedangkan ekstrak herba jotang sebesar 0,077±0,025%.

Tabel 5.11. Hasil penetapan kadar steroid total ekstrak jotang

Berat Ekstrak (g)	Luas area	Kadar dalam mg/25 mL	Hasil (% b/b)
1,0025	5186,0	0,514	0,051
1,0005	7773,8	0,795	0,079
1,0068	9832,0	1,019	0,101
Rata-rata			0,077
Standar Deviasi			0,025
Koefisien Variasi			32,430

5.12. Uji toksisitas akut

Hewan coba yang digunakan pada pengujian toksisitas akut adalah mencit dengan diberikan beberapa kelompok dosis sesuai dengan ketentuan BPOM yaitu 21.000, 10.500, 2100, 1050 dan 700 mg/kgBB. Sebelum dan setelah perlakuan selama 7 hari untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh sediaan uji terhadap berat badan mencit.

Tabel 5.19. Berat badan rata-rata mencit dalam uji toksisitas akut

Kelompok uji	Berat badan (gram), hari ke-							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Dosis I (21.000 mg/kgBB)	24,0	22,5	22,5	23,3	24,1	24,5	24,5	24,6
Dosis II (10.500 mg/kgBB)	24,2	21,8	22,3	23,3	24,2	24,5	24,6	24,6
Dosis III (2.100 mg/kgBB)	24,1	24,0	24,0	24,5	24,5	24,7	24,6	24,6
Dosis IV (1.050 mg/kgBB)	24,0	24,3	24,3	24,2	24,3	24,3	24,3	24,3
Dosis V (700 mg/kgBB)	24,2	24.1	24,1	24,3	24,4	24,4	24,4	24,4

Untuk melihat profil pengaruh berat badan mencit, dibuat grafik yang menggambarkan berat badan mencit setiap harinya seperti pada grafik yang menggambarkan berat badan mencit setiap harinya pada gambar 5.10.

Gambar 5.10. Grafik profil berat badan mencit pada setiap kelompok uji

Penentuan LD50 dilakukan dengan mengamati jumlah mencit yang mati selama 7 hari. Terlihat datanya pada tabel 5.20 dan gejala-gejala toksisitas yang terjadi pada mencit ditunjukkan pada table 5.21.

Tabel 5.20. Jumlah mencit yang mati dalam uji toksisitas akut

Kelompok uji	**Jumlah sampel**	**Jumlah mencit yang mati**
I	6	0
II	6	0
III	6	0
IV	6	0
V	6	0

Tabel 5.21. Perilaku dan gejala toksisitas pada mencit

Gejala toksiistas	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Dosis IV	Dosis V
Tremor	-	-	-	-	-
Kejang	-	-	-	-	-
Salivasi	-	-	-	-	-
Letargi	-	-	-	-	-
Koma	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-

Berdasarkan grafik berat badan tersebut, diketahui bahwa berat badan hewan coba mencit selama 7 hari mengalami kenaikan dan penury pada masing-masing kelompok uji tapi penurunan yang terjadi tidak signifikan.

5.13. Luaran

Luaran yang telah didapatkan dari penelitian ini adalah

(1) prototipe/produk OHT sebagai anti-osteoporosis untuk peningkatan derajat kesehatan dan penyembuhan penyakit dari tanaman obat Indonesia

Dalam artian kami sudah mendapatkan data parameter standar dan dosis yang aman untuk membuat suatu produk

(2) publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal internasional,

sebagian data penelitian telah disubmit di Journal of Natural Medicine (JNM) dan diseminarkan pada seminar internasional "Bromo Conferences"

(3) paten sederhana

dalam bentuk paten sederhana dari hasil penetuan parameter standar simplisia dan ekstrak

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian penetapan parameter non-spesifik dan spesifik dari simplisia dan ekstrak etanol 70% herba jotang adalah:

1. Nilai parameter non-spesifik dan spesifik dari simplisia herba jotang:
    - Kadar abu total sebesar 13,42 ± 0,08 %
    - Kadar abu tidak larut asam sebesar 2,56 ± 0,21 %
    - Susut pengeringan sebesar 15,20 ± 0,30 %
    - Kadar air sebesar 13,64 ± 0,57 %
    - Kadar sari larut etanol sebesar 3,33 ± 0,24 %
    - Kadar sari larut air sebesar 15,62 ± 0,55 %
    - Kadar steroid total sebesar 0,0131 ± 0,0029 %
2. Nilai parameter non-spesifik dan spesifik dari ekstrak etanol 70% herba jotang:
    - Kadar abu total sebesar 20,95 ± 2,27 %
    - Kadar abu tidak larut asam sebesar 5,04 ± 2,46 %
    - Susut pengeringan sebesar 25,81 ± 0,52 %
    - Kadar air sebesar 16,59 ± 1,14 %
    - Kadar sari larut etanol sebesar 27,92 ± 1,18 %
    - Kadar sari larut air sebesar 65,24 ± 1,38 %
    - Kadar steroid total sebesar 0,077 ± 0,025 %
3. Nilai LD50 adalah 21.000

7.2. Saran

Diperlukan penetapan parameter dari tanaman jotang yang berasal dari daerah lain agar dapat mendapatkan membandingkan nilai pada parameter yang didapat pada daerah Purwodadi dan dilakukan penetapan kandungan logam berat karena sifat tanaman jotang yang memiliki sifat *bioremediasi*.

DAFTAR PUSTAKA

BPOM RI, 2014. Peraturan Kepala Badn Pengawas Obat dan Makanan RI No. 7 tahun 2014, tentang Pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo, BPOM RI, Jakarta.

Depkes RI, 1979. *Materia Medika Indonesia III*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI

Depkes RI, 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI

Depkes RI, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak*. Cetakan pertama. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Depkes RI, 2011. *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi pertama, Jakarta: Kementerian Kesehatan RI

Fleisch H., 1998. Bisphosphonate: Mechanism of action. *Endrocrine Reviews* 19, 80–100.

Franceschi R.T., Young J., 1990. Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and Ascorbic acid in Bone-derived Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 5, 1157–1167.

Harbome, J.B., 1987. *Metode Fitokimia, Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Terbitan Kedua, ITB, Bandung.

Irwan M., 2008. *Osteoporosis*, Fakultas Kedokteran Universitas Riau, RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.

Jennifer J.W., 2008. *Methods in Molecular Biology: Osteoporosis Methods and Protocol*, Human Press.

Kostenuik P.J., Harris J., Halloran B.P., Turner R.T., Morey-Holton E.R., and Bikle D.D., 1999. Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insuline-like growth factor-I. *J. Bone Miner. Res*., 14, 21–31.

Laswati, H.P., 2007, Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodeling Tulang Perempuan Pascamenopause melalui Peran Reseptor Estrogen a Sel Osteoblas. *Disertasi*, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Laswati H.P, Imam S., Retno W., Mangestuti A., Jahya A.P., 2015. *Spilanthes acmella* and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells in Glucocorticoid Induced Osteoporosis Male Mice. *Bali Medical Journal* 4 (2), 76–81.

Mashiba T., Mori S., Burr D.B., Komatsubara S., Cao Y., Manabe T., 2005. The effects of suppress bone remodeling by bisphophonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *Journal of Bone Mineral and Metabolism* 23, 36–42.

NIH., 2001. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *Journal of American Medical Association* 285, 785–795.

Oshita K., Yamaoka K., Udagawa N., Fukuyo S., Sonomoto K., Maeshima K., 2011. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum*., 63,1658–1667.

Pramono, S., 2007. *Jamu in Indonesian daily life and industry*. Institute of natural medicine, University of Toyama, p 1.

Retno W., Yasuhiro T., Tatsurou M., Suresh A., Shigetoshi K., 2010. Alkaline Phosphatase (ALP) Enhanching Iridoid Glucosides from The Indonesian Medicinal Plant *Barleria lupulina*. *Natural Product Communication* 5 (11), 1711–1716.

Retno W., 2010. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthes acmella* Fractions againts MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. Intern. J. Pharm. & Pharm. Sci. 3 (1), 34–37.

Retno W., Mangestuti A., Laswati H., 2012. Efek Pemberian Ekstrak Etanol 70% *Barleria lupulina* dan Kombinasi Latihan Fisik pada Mencit yang Diinduksi Deksametason. Jurnal Bahan Alam Indonesia 8 (1), 58–61

Retno W., Wiwied E., Neny P., 2017. Potensi tanaman jotang (*Spilanthes acmella*) sebagai antiosteoporosis: uji aktivitas pada sel osteoblas dan osteoklas *in vitro* serta isolasi senyawa kandungan didalamnya. Laporan akhir penelitian PTUPT tahun anggaran 2017

Sudoyo, S.A. dan Simadibrata, S., 2006, Osteoporosis. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Jilid II, Edisi IV, Jakarta, FKUI.

Supaluk P., Saowapa S., Apilak W., Ratana L., Somsak R., and Virapong P., 2009.Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr, *Molecules*, 4 (12), 850–867.

Stevenson, J., and Marsh, M., 2007. *An Atlas of Osteoporosis.* Informa Healthcare, 3rd edition, p 2, 12–13.

Tomohito, H., Nobuo, S., Retno, W., Ttsuro, M., Shigetoshi, K., Horoshi, O., Kei, H., 2009. The Depressive Effects of 5,8,11-Eicosatrienoic Acid (20:3n-9) on Osteoblasts. *Lipid* 44, 97–102.

Whyte M.P., Wenkert D., Clements K.L., McAlister W.H., Mumm S., 2003. Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *The New England Journal of Medicine* 349, 457–463.

Woo S.B., Hellstein J.W., Kalmar J.R., 2006. Systematic review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of Internal Medicine*. 144, 753–761.

LAMPIRAN

I. ARTIKEL ILMIAH

Original Paper

NEW METHYL THREONOLACTONES AND PYROGLUTAMATES OF *SPHILANTHES ACMELLA* MURR. AND THEIR BONE FORMATION ACTIVITIES

Retno Widyowati[*1,2], Sachiko Sugimoto[1], Yoshi Yamano[1], Neny Purwitasari[2], Hideaki Otsuka[3], and Katsuyoshi Matsunami[*1]

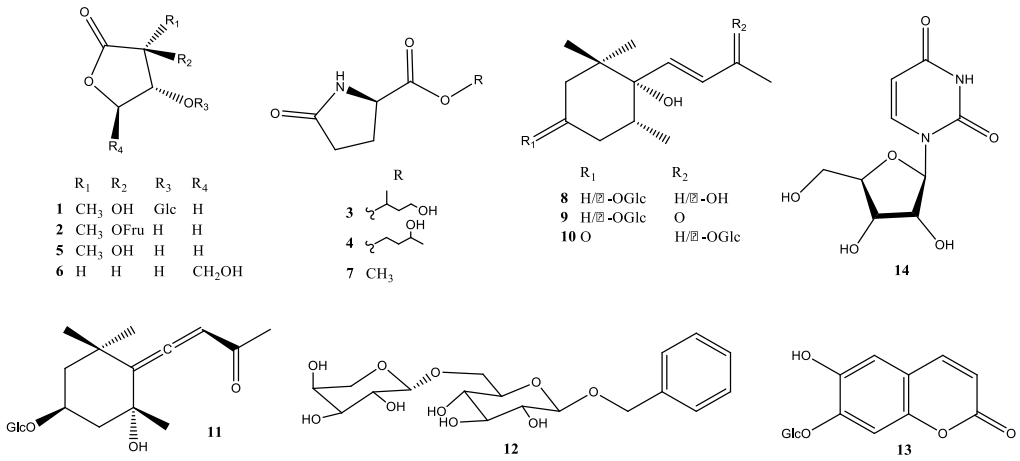
1. Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan
2. Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia
3. Graduate School of Pharmacy, Yasuda Women's University, Hiroshima, Japan

* RW and KM are corresponding equally
* To whom all correspondence should be addressed:
Tel: +81-82-257-5335
E-mail (KM): matunami@hiroshima-u.ac.jp
E-mail (RW): rr-retno-w@ff.unair.ac.id

Abstract

The main constituents from the whole aerial parts, flower heads and roots of *Spilanthes acmella* Murr. (Compositae) yield "spilanthol" and "acmellonate," they are sometimes used to reduce the pain associated with toothaches, induce saliva secretion and is a powerful insecticide and local anesthetic. It also has an important source of highly valuable bioactive compounds such as lactones, fatty acids, phenolics, coumarin, triterpenoids and flavonoids. A new methyl threonolactone glycoside (**1**), a new methyl threonolactone fructofuranoside (**2**), two new pyroglutamates (**3**–**4**), and ten known compounds (**5**–**14**) were isolated from the whole plant of *Spilanthes acmella*. The structures of these compounds were determined using various spectroscopic analyses and were based on various chemical evidences. All of the isolated compounds were evaluated against bone formation parameter, such as ALP (alkaline phosphatase), and mineralization stimulatory activities of MC3T3-E1 cell lines. Therefore, new compounds **1**, **2**, 2-deoxy-D-ribono-1,4 lactone (**6**), methyl pyroglutamate (**7**), dendranthemoside A (**8**), and benzyl-b-L-arabinopyranosyl (1→6)-b-D-glucopyranoside (**12**) stimulated ALP activity. Then dendranthemoside A (**8**) and benzyl-b-L-arabinopyranosyl (1→6)-b-D-glucopyranoside (**12**) stimulated mineralization activity.

Keywords: *Spilanthes acmella*, alkaline phosphatase, mineralization, methyl threonolactone, pyroglutamate



Introduction

Spilanthes is a genus comprising over 60 species that are widely distributed in tropical and subtropical regions of the world, such as Africa, America, Borneo, India, Sri Lanka, and Asia [1,2]. *Spilanthes acmella* Murr. has commonly been used as a folk remedy, e.g. for toothaches and skin disease, sexual deficiencies [3], rheumatism, fever, antioxidant benefits [4], dysentery, snake bite remedies, stammering in children [2], antiseptics, antibacterials, antifungals, antimalarials, influenza, cough, rabies diseases, and tuberculosis [5,6]. It is also known to have been used as panacea (Sumatra, Indonesia), remedy of toothaches (Sudan), stomatitis (Java, Indonesia), and for wound healing (India) [7].

The main constituents from the whole aerial parts, flower heads, and roots of this plant yield "spilanthol" and "acmellonate", which are sometimes used to reduce pain associated with toothaches, to induce saliva secretion [3,5,8], as powerful insecticides [9,10], and as local anesthetics [2]. In addition, it is also an important source of highly valuable bioactive compounds, such as phenolics, coumarin (scopoletin), triterpenoids [11], and flavonoids [12]. In a previous study, the 1-butanol and water layers of a 70% ethanol extract of *Spilanthes acmella* stimulated alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 osteoblast cells (126% and 127%, respectively) [13]. Further investigation of the 1-butanol layers of the same plant demonstrated the presence of a new methyl threonolactone glycoside (**1**), a new methyl threonolactone fructofuranoside (**2**), two new pyroglutamates (**3** and **4**), 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**), 2-deoxy-D-ribono-1,4 lactone (**6**), methyl pyroglutamate (**7**), dendranthemoside A (**8**), dendranthemoside B (**9**), ampelopsisionoside (**10**), icariside B2 (**11**), benzyl-b-L-arabinopyranosyl (1→6)-b-D-glucopyranoside (**12**), chicoriin (**13**), and uridine (**14**) (**Figure 1**). These were isolated using various chromatographic techniques, such as silica gel, octadecyl silylated silica gel (ODS), and HPLC, and were determined by spectrometric analysis using UV, infrared (IR), high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), 1D, and 2D NMR. Here, the isolation and structural elucidation of four new compounds are reported. Two of them were found to be glycosylated with a different disaccharide consisting of D-glucose and L-fructose (**1** and **2**), respectively.

Results and Discussion

The 1-butanol layer of a methanol extract of *Spilanthes acmella* were fractioned using several types of chromatography to give fourteen compounds (**1**–**14**).

New compound **1** (2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone-b-D-glucopyranoside) was obtained as a colorless powder with a molecular formula of $C_{11}H_{18}O_9$ as determined by HR-ESI-MS at a *m/z* of 317.0845 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{11}H_{18}O_9Na$: 317.0843). The presence of a saturated *γ*-lactone moiety was observed in the IR spectrum by the carbonyl signal at 1777 cm^{-1},

and hydroxy groups at 3392 cm^{-1} with ether linkage at 1210 and 1078 cm^{-1} suggesting a glycosidic bond.

The ^{1}H NMR spectrum (**Table 1**) displayed signals due to a methyl proton at δ_H 1.41 (3H, s); four oxygenated methylene protons at δ_H 3.60 (2H, dd, J = 11.6, 7.4 Hz), 3.91 (2H, dd, J = 11.6, 2.5 Hz), 4.10 (2H, dd, J = 9.5, 6.5 Hz), and 4.52 (2H, dd, J = 9.5, 6.5 Hz); five oxygenated methine protons at δ_H 3.24 (1H, dd, J = 9.2, 7.7 Hz), 3.26 (1H, dd, J = 9.8, 8.9 Hz), 3.34 (1H, ddd, J = 9.8, 7.4, 2.5 Hz), 3.36 (1H, t-like, J = 9.2 Hz), and 4.43 (1H, t-like, J = 6.5 Hz); and an anomeric proton at δ_H 4.37 (1H, d, J = 7.7 Hz). A lactone moiety was indicated by the chemical shifts and coupling constants of an AMX system corresponding to H-5a (4.10, dd, J = 9.5, 6.5 Hz), H-5b (4.52, dd, J = 9.5, 6.5 Hz), and H-4 (4.43, t-like, J = 6.5 Hz).

The ^{13}C NMR spectrum (**Table 2**) of **1** showed 11 carbon resonances that were classified by chemical shift values and the HSQC spectrum of a methyl carbon (δ_C 19.2), two oxygenated methylene carbons (δ_C 63.2, 69.6), five oxygenated methine carbons (δ_C 72.2, 74.9, 78.1, 78.2, 83.4), a quaternary carbon (δ_C 75.7), an anomeric carbon (δ_C 104.0), and a carbonyl carbon at δ_C 179.4. The diastereomer of the 2-*C*-methyl group was distinguished by ^{13}C spectroscopy. The chemical shift of the 2-*C*-methyl group of the *cis*-diol *erythrono*-isomer δ_C 19.9 was at a significantly lower field than the *trans*-diol *threono*-isomer δ_C 16.6 [14,15].

The NMR spectroscopic data of **1** closely resembled that of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**) [16], except for some differences in the chemical shift values at C-4. The deshielded proton at δ_H 4.43 and the carbon at δ_C 83.4 of **1** suggested that the glucoside group was attached to C-4. This was confirmed in an HMBC experiment by the correlation between H-4 (δ_H 4.43) and the carbon signal at δ_C 104.0 (**Figure 2a**). While five signals corresponded to C1-C5 of *b*-D-glucopyranose, the anomeric carbon signal, resonating at δ_C 104.0, was indicative of the participation of this carbon in an ester linkage. The highly deshielded chemical shift of an anomeric proton signal (δ_H 4.37) was in accordance with this assumptiom, and its coupling constant (J = 7.7 Hz) recommended the b mode of linkage. The relative configuration of **1** was established using NOESY analysis. The correlations were observed between H-5b/Me-6 and H-4/H-5a, which suggested the orientation of H-5b and Me-6 to be a-oriented, and those of H-4 and H-5a to be b-oriented (**Figure 2b**). The absolute stereochemistry of the lactone moiety of **1** was determined by mild acid hydrolysis of **1** with 1N HCl, which showed initial removal of the D-glucose unit and 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 (**1a**) [17]. The lactone compound (**1a**) showed the same absolute stereochemistry with 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**) by spectroscopic (UV, IR, HR-ESI-MS, 1D NMR) and HPLC analysis. Based on spectrum analysis, the structure of **1** was determined to be 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone-D-glucopyranoside.

New compound **2** was also a 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone. It was obtained as a pale yellow solid whose molecular formula was determined to be $C_{11}H_{18}O_9$ from positive-ion mode HR-ESI-MS data at a *m/z* of 317.0844 $[M+Na]^+$ (calcd. 317.0843). The ^{1}H and ^{13}C NMR spectrums (**Table 1** and **Table 2**) of **2** were very similar to those of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**). The ^{13}C NMR also showed two secondary carbons at δ_C 60.7 and 63.0; three tertiary carbons at δ_C 79.1, 82.7, and 84.8; and a quaternary carbon at δ_C 109.4, indicating a fructofuranose moiety. The diastereomer of the 2-*C* methyl group was distinguished by ^{13}C NMR data of Me-6. Its chemical shift was at δ_C 19, indicating a cis-erythrono. Another chemical shift at δ_C 17 indicated a *trans*-threono [15]. So the compound **2** is threono because it has similar ^{13}C NMR data with compound **5** (d_C 17.7).

The position of the fructofuranose moeity was deduced to be at C-3 by analysis of the HMBC data, showing correlations of H-1′ and H-2′ to carbons at d_C 76.0 (**Figure 3a**). The relative configuration of **2** was established using NOESY analysis. The correlation of H-5b/Me-6 suggested an a orientation. Another correlation was observed between H-5a and H-4, which suggested a b-oriented configuration (**Figure 3b**). Zheng et al. (2009) described that a and b orientations of D-fructofuranose were distinguished by the J value of position 3 and the chemical shift of C-2 of the fructofuranose moeity. The characteristic of a orientation is J = 3–4 Hz and C-2 > 2–4 ppm (d_C 107–109), while the b orientation is J = 7–9 Hz and C-2 < 2–4 ppm (d_C 103–106) [18]. Based on that reference, **2** was a-D-fructofuranose. The acid hydrolysis of **2**

yielded aglycone (2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone-) (**2a**) and D-fructofuranose, thus, the structure of **2** was determined to be 2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone-a-D-fructofuranoside.

The 2-butanol pyroglutamate (**3**) was also a colorless solid and displayed an $[M+Na]^+$ ion peak at a *m/z* of 224.0890 (calcd. 224.0893), corresponding to a molecular formula of $C_9H_{15}O_4$. The IR spectrum showed a strong absorption band for the hydroxy (3331 cm^{-1}) and carbonyl (1735 cm^{-1}). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3** showed signals that were assigned to two methylenes [δ_H 2.24–2.30 (2H, m), δ_C 30.5 (C-3), δ_H 2.09, and 2.40 (each 1H, m), δ_C 26.0 (C-4)], a methine [δ_H 4.22 (1H, t, J = 5 Hz), δ_C 57.1 (C-5)], and a carbonyl [δ_C 181.2 (C-6)] (**Table 1** and **Table 2**). The chemical shift values and coupling patterns of these signals suggested that there was a methyl pyroglutamate moeity in **3** [19]. In addition, the ^1H and ^{13}C NMR spectra also revealed a 2-butanol framework, with a methyl [δ_H 1.13 (3H, d, J = 6 Hz)/d_C 23.9 (Me-10)], a methylene [δ_H 1.67–1.73 (2H, m)/d_C 38.8 (C-8)], an oxygenated methine [δ_H 3.79 (1H, m); δ_C 65.5 (C-9)], and an oxygenated methylene [δ_H 4.19 (2H, dd, J = 6, 3 Hz); δ_C 66.0 (C-7)]. This was confirmed by 2D NMR experiments of **3**.

The ^1H-^1H COSY spectrum displayed correlation between H-3 and H-4 and between H-7 and H-8, which in turn correlated with H-9. The HMBC spectrum demonstrated correlations of C-2 with H-5, H-4, and H-3, and correlations of C-6 with H5 and H-4. Furthermore, the strong correlation of H-7 with C-6 established that the 2-butanol moiety was located at the C-6 (**Figure 4**). Therefore, the structure of **3** was deduced to be 2-butanol pyroglutamate.

The 1-butanol pyroglutamate (**4**) was also a colorless solid. The NMR spectra together with the molecular ion at a *m/z* of 224.0893 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_9H_{15}O_4NNa$: 224.0893) in HR-ESI-MS indicated that **4** was closely related to **3**, except for the position of the methyl group of the butanol. The shielding of H-7 [δ_H 3.57 (1H, m)] and C-7 (δ_C 60.5) and deshielding of H-9 [δ_H 3.82 (1H, m)] and C-9 (δ_C 66.3) suggested that the methyl position of butanol changed from C-9 to C-7 in **4** (**Table 1** and **Table 2**). This was further supported by a correlation between the proton at d_H 1.10 (H-10) and the carbon signal at δ_C 60.5 (C-7) and 42.6 (C-8) (**Figure 5**) in the HMBC spectrum. According to the structure of **5**, **4** was determined to be 1-butanol pyroglutamate.

Osteoblasts are the most important cells in bone tissue and are critical for bone formation through proliferation and differentiation. During osteoblast differentiation, bone morphogenetic protein (BMP) induces the expression of osteoblastic markers, such as ALP. Proliferating osteoblasts show ALP activity, which is greatly enhanced during in vitro bone formation. ALP is a membrane bound enzyme that is often used as a marker for osteogenic differentiation [20].

To evaluate the effects of **1**–**14** on osteoblast function, ALP activity, which is related to the osteosid and initiates the deposition of minerals, was determined. In this study, it was found that **4**, **6**, **10**, and **12** stimulated ALP activity, which markedly increased osteoblast growth and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. At concentrations of 25 mM, **10** and **12** stimulated ALP activity up to 112%, compared to that of the control, and was also stronger than the positive control, 17b-estradiol at 0.02 and 0.01 mM (**Figure 6**). The 17b-estradiol has significant impact on bone mineral metabolisms. It affected osteoblast proliferation presumably through modulating the release of several local regulators of bone turnover from monocytes and enhanced BMP-4 induced osteoblastic marker expression and mineralization.

Osteoblasts can be induced to produce vast extracellular calcium deposits in vitro. This process is called mineralization. Calcium deposits are an indication of successful in vitro bone formation and can specifically be stained bright orange-red using Alizarin Red S. The effects of **1**–**14** were then examined by measuring the calcium deposition by Alizarin Red staining. As was found for the ALP activity study, **4**, **6**, **10**, and **12** showed stimulatory effects on mineralization. Compounds **10** and **12** stimulated the mineralization to 112%, compared with that of the control at a concentration of 25 mM (**Figure 7**).

In bone formation, osteoblasts are key cells in bone matrix formation and calcification. Osteogenesis starts with osteoblasts producing and secreting type I collagen, which makes up about 90% of the organic bone matrix or the osteoid. Osteoblast also become high in alkaline phosphatase, a phosphate-splitting enzyme. Alkaline phosphatase is released into the osteoid to

initiate the deposit of minerals. After mineralization, the complete bone becomes hard and rigid with necessary mechanical properties to withstand the external forces to support the body and protect the internal organs. Our study demonstrated that **4**, **6**, **10**, and **12** stimulated ALP activity and calcium deposition in osteoblastic MC3T3-E1 cell in vitro. These studies suggest that compounds **4**, **6**, **10**, and **12** may be able to stimulate osteoblastic bone formation and play an important role in bone remodeling.

In summary, the chemical investigation of the butanol layer of the methanol extract of *Spilanthes acmella* gave fourteen compounds (**1**–**14**), including two new methyl threono lactones (**1**–**2**) and two new pyroglutamates (**3**–**4**). The isolated compounds evaluated ALP and mineralization stimulatory activity. Our study demonstrated that **4**, **6**, **10**, and **12** stimulated ALP activity and calcium deposition in osteoblastic MC3T3-E1 cell in vitro. These studies suggest that compounds **4**, **6**, **10**, and **12** may be able to stimulate osteoblastic bone formation and play an important role in bone remodeling.

Experimental

General Experimental Procedures. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were taken on a Bruker Ultrashield 600 spectrometer at 600 MHz and 150 MHz, respectively, with TMS as an internal standard. IR and UV spectra were measured on a HORIBA FT-720 and JASCO V-520 UV/Vis spectrophotometer, respectively. Optical rotations and CD spectra were measured on a JASCO P-1030 digital polarimeter and a JASCO J-720 spectropolarimeter, respectively. Positive ion HR-ESI-MS was performed with an Applied Biosystems QSTAR XL NanoSprayTM System. Silica gel open column chromatography (CC) and reversed phase (ODS) CC were performed on silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt, Germany), and Cosmosil 75C18-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; Φ=35 mm, L=350 mm), respectively. HPLC was performed on an ODS column (Inertsil ODS-3, GL Science, Tokyo, Japan; Φ=6 mm, L=250 mm), and the eluate was monitored with a JASCO RI-930 intelligent detector and a JASCO PU-1580 intelligent pump.

Plant Material. Whole plants of *Spilanthes acmella* were collected in late June 2007 in Kebun Raya Purwodadi, Malang, Indonesia, and voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University.

Extraction and Isolation. The air-dried plants (2.0 kg) were extracted with methanol (MeOH, 10.0 l × 3). The methanol solution was concentrated and adjusted to 95% aq. methanol by the addition of water and then partitioned with *n*-hexane (1.0 l × 3, 23.5 g). The remaining aqueous methanol layer was evaporated and resuspended in 0.5 l of water and then partitioned with ethyl acetate (1.0 l × 3, 40.4 g) and 1-butanol (1.0 l × 3, 47.5 g), successively.

The 1-butanol layer (40.0 g) was subjected on silica gel (300 g) CC with increasing amounts of MeOH in $CHCl_3$ [Hexane-$CHCl_3$ (1:1), 4 l, $CHCl_3$-MeOH (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2 l), 500 ml fractions being collected], yielding 19 fractions (Fr. Sab1–Sab12). The fraction Sab11 (2.75 g) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 ml)–100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab11-1–Sab11-10). The residue of fraction Sab11-3 (442 mg) and Sab11-4 (123 mg) were purified by 35% aq. MeOH with HPLC to give **1** (10.1 mg) and **8** (dendranthemoside A, 3.71 mg), respectively. The fraction Sab10 (1.81 g) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 ml)–100% MeOH (400 ml) and lead 7 fractions (Fr. Sab10-1–Sab10-7). The residue of fraction Sab10-1 (770 mg) also was purified by HPLC (100% aqua, YMC column). Three peaks appeared at 5, 18, and 35 minutes and were collected to give **2** (7.62 mg), **5** (2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone, 9.31 mg), and **14** (uridine, 27.5 mg). The remaining residue of fraction Sab10-2 (193 mg) was purified by HPLC (20% aq. MeOH) to give **11** (icariside B2, 6.12 mg) and **13** (cichoriin, 2.99 mg). The residue of fraction Sab10-3 (142 mg) was purified by HPLC (35% aq. MeOH) to give **9** (dendranthemoside B, 4.31 mg). The fraction Sab5 (710 mg) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 ml)–100% MeOH (400 ml) and lead 10 fractions (Fr. Sab5-1–Sab5-10). The residue of fraction Sab5-1 (483 mg) and Sab5-2 (68.3 mg) were purified by HPLC (100% aq., YMC column) to give **3** (7.80 mg), **4** (4.21 mg), and **7** (methyl pyroglutamate, 6.63 mg),

respectively. The mixture of fraction Sab6, Sab7, Sab8, and Sab9 (2.06 g) were subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 ml)–100% MeOH (400 ml) and lead 10 fractions (Fr. Sab6-9-1–Sab6-9-10). The residue of fraction Sab6-9-1 (340 mg) was purified by HPLC (100% aqua, YMC column) to give **6** (2-deoxy-D-ribono-1,4 lactone, 6.01 mg). The other fraction, Sab6-9-4 (114 mg), was purified by HPLC (40% aq. MeOH) to give **10** (ampelosisinoside, 5.43 mg). The fraction Sab12 (5.36 g) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 ml)–100% MeOH (400 ml) and lead 10 fractions (Fr. Sab12-1–Sab12-10). The residue of fraction Sab12-3 (129 mg) was purified by HPLC (35% aq. MeOH) to give **12** (benzyl-a-L-arabinopyranosyl (1→6)-b-D-glucopyranoside, 4.51 mg).

2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone-b-D-glucopyranoside (1). Colorless solid; $[a]_D^{26.7}$ -28.6 (*c* 0.78, MeOH); IR (film) ν_{max} cm^{-1}: 3392, 2924, 1777, 1713, 1650, 1557, 1456, 1391, 1210, 1078, 899, 647; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see **Table 1**; positive HR-ESI-MS *m/z* 317.0845 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{11}H_{18}O_9Na$: 317.0843).

2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone-a-D-fructofuranoside (2). Pale yellow solid; $[a]_D^{26.9}$ -10.4 (*c* 0.74, MeOH); IR (film) ν_{max} cm^{-1}: 3386, 2938, 1774, 1732, 1651, 1540, 1456, 1339, 1206, 1073, 870, 669; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see **Table 1**; positive HR-ESI-MS *m/z* 317.0844 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{11}H_{18}O_9Na$: 317.0843).

2-butanol pyroglutamate (3). Colorless solid; $[a]_D^{27.7}$ -0.86 (*c* 0.42, MeOH); IR (film) ν_{max} cm^{-1}: 3331, 2966, 2926, 1735, 1684, 1557, 1457, 1338, 1207, 1052, 670; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see **Table 1**; positive HR-ESI-MS *m/z* 224.0890 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_9H_{15}O_4NNa$: 224.0893).

1-butanol pyroglutamate (4). Colorless solid; $[a]_D^{27.1}$ +1.40 (*c* 0.41, MeOH); IR (film) ν_{max} cm^{-1}: 3314, 2969, 2931, 1735, 1683, 1557, 1457, 1338, 1229, 1054, 669; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see **Table 1**; positive HR-ESI-MS *m/z* 224.0893 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_9H_{15}O_4NNa$: 224.0893).

2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone (5) [16]. Colorless solid; $[a]_D^{27.1}$ +1.40 (*c* 0.41, MeOH); IRν_{max} (film) cm^{-1}: 3314, 2969, 2931, 1735, 1683, 1557, 1457, 1338, 1229, 1054, 669; ^1H NMR (methanol-d_4) d_H: 1.34 (3H, s, H-6), 3.96 (1H, dd, *J* = 9.3, 4.4 Hz, H-5a), 4.17 (1H, dd, *J* = 5.5, 4.4 Hz, H-4), 4.48 (1H, dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, H-5b) and ^{13}C NMR (methanol-d_4) δ_C: 17.7 (C-6, CH_3), 73.0 (C-5, CH_2), 75.7 (C-3), 76.0 (C-4), 180.2 (C-2); positive HR-ESI-MS *m/z* 155.0310 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_5H_8O_4Na$: 155.0315).

2-deoxy-D-ribono-1,4 lactone (6) [21]. Colorless solid; ^1H NMR (pyridine-d_5, δ_H): 2.86 (1H, dd, *J* = 18.2, 3.3 Hz, H-3a), 3.32 (1H, dd, *J* = 18.2, 6.1 Hz H-3b), 4.03 (1H, dd, *J* = 12.2, 3.3 Hz, H-6a), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.2, 3.3 Hz, H-6b), 4.91 (1H, dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, H5), 5.00 (1H, ddd, *J* = 7.2, 4.3, 2.2 Hz, H-4) and ^{13}C NMR (pyridine-d_5, δ_C): 39.9 (C-3, CH_2), 62.5 (C-6, CH_2), 69.7 (C-4, CH), 90.2 (C-5, CH), 177.5 (C-2).

Methyl pyroglutamate (7) [19]. Colorless solid; $[a]_D^{27.4}$ -3.48 (*c* 0.66, MeOH); IRν_{max} (film) cm^{-1}: 3343, 2958, 2930, 1738, 1697, 1557, 1456, 1338, 1221, 1043, 670; ^1H NMR (methanol-d_4, δ_H): 2.08 (1H, m, H-4a), 2.25 (2H, m, H_2-3), 2.40 (1H, m, H-4b), 3.69 (3H, s, H_3-7), 4.23 (1H, dd, *J* = 12.2, 6.3 Hz, H-5) and ^{13}C NMR (methanol-d_4, δ_C): 26.0 (C-4, CH_2), 30.4 (C-3, CH_2), 53.0 (C-7, CH_3), 57.2 (C-5, CH), 174.6 (C-6), 181.2 (C-2); positive HR-ESI-MS (positive) *m/z* : 166.0474 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_6H_9O_3NNa$: 166.0475)**.**

Dendranthemoside A (8) [22]. Yellow powder; ^1H NMR (methanol-d_4, δ_H): 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-13), 0.88 (3H, s, H_3-12), 0.96 (3H, s, H_3-11), 1.24 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-10), 1.49 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, H-4b), 1.56 (1H, ddd, *J* = 12.0, 5.1, 2.0 Hz, H-2b), 1.67 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, H-2a), 1.82 (1H, m, H-4a), 1.95 (1H, m, H-5), 3.13 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.0 Hz, H-2′), 3.26 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-5′), 3.27 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4′), 3.34 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-3′), 3.65 (1H, m, H-6′a), 3.86 (1H, m, H-6′b), 3.95 (1H, m, H-3), 4.29 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-9), 4.35 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-1′), 5.55 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-7), 5.73 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-8) and ^{13}C NMR (methanol-d_4, δ_C): 16.6 (C-13, CH_3), 24.3 (C-10, CH_3), 25.3 (C-12, CH_3), 26.0 (C-11, CH_3), 35.7 (C-5, CH), 38.3 (C-4, CH_2), 40.6 (C-1), 42.7 (C-2, CH_2), 63.0 (C-6′, CH_2), 69.4 (C-9, CH), 71.9 (C-4′, CH), 75.3 (C-2′, CH), 75.8 (C-3, CH), 78.0 (C-5′, CH), 78.2 (C-3′,

CH), 78.4 (C-6), 102.8 (C-1′, CH), 133.9 (C-7, CH), 135.7 (C-8, CH); positive HR-ESI-MS *m/z* 337.0684 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{17}H_{14}O_6Na$: 337.0683).

Dendranthemoside B (9) [22]. Yellow powder; ^1H NMR (methanol-d_4, δ_H): 0.77 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-13), 0.83 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-11), 1.00 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-12), 1.47 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, H-4b), 1.55 (1H, ddd, *J* = 12.0, 5.1, 2.0 Hz, H-2b), 1.67 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, H-2a), 1.83 (1H, m, H-4a), 2.08 (1H, m, H-5), 2.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_3-10), 3.10 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.0 Hz, H-2′), 3.23 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4′, 5′), 3.30 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-3′), 3.62 (1H, m, H-6′a), 3.83 (1H, m, H-6′b), 3.95 (1H, m, H-3), 4.33 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-1′), 6.31 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-8), 6.85 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-7) and ^{13}C NMR (methanol-d_4, δ_C): 16.6 (C-13, CH_3), 25.2 (C-12, CH_3), 26.1 (C-11, CH_3), 27.5 (C-10, CH_3), 35.5 (C-5, CH), 38.0 (C-4, CH_2), 41.1 (C-1), 42.6 (C-2, CH_2), 63.0 (C-6′, CH_2), 71.9 (C-4′, CH), 75.3 (C-2′, CH), 75.6 (C-3, CH), 78.0 (C-5′, CH), 78.2 (C-3′, CH), 79.2 (C-6), 102.9 (C-1′, CH), 131.7 (C8, CH), 154.4 (C-7, CH), 201.0 (C-9); positive HR-ESI-MS *m/z* : 411.1991 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{19}H_{32}O_6Na$: 411.1989).

Ampelosisinoside (10) [23]. Yellow powder; ^1H NMR (methanol-d_4, δ_H): 0.90 (3H, d, J=6.0 Hz, H_3-13), 0.93 (3H, s, H_3-12), 0.99 (3H, s, H_3-11), 1.32 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H_3-10), 1.82 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-2b), 2.11 (1H, dd, *J* = 13.0, 2.0 Hz, H-4b), 2.28 (1H, m, H-5), 2.44 (1H, t, *J* = 13.0 Hz, H-4a), 2.87 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.0 Hz, H-2a), 3.12 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5′), 3.18 (2H, dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, H-2′), 3.29 (1H, m, H-4′), 3.35 (1H, t, *J* = 4.0 Hz, H-3′), 3.65 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, H-6′a), 3.84 (1H, m, H-6′b), 4.35 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1′), 4.44 (1H, q, H-9), 5.73 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 5.91 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-8) and ^{13}C NMR (methanol-d_4, δ_C): 16.5 (C-13, CH_3), 21.5 (C-10, CH_3), 25.0 (C-11, CH_3), 25.4 (C-12, CH_3), 37.8 (C-5, CH), 43.9 (C-1), 46.4 (C-4, CH_2), 52.5 (C-2, CH_2), 62.7 (C-6′, CH_2), 71.6 (C-4′, CH), 75.4 (C-2′, CH), 77.8 (C-6, C-9), 78.1 (C-5′, CH), 78.2 (C-3′, CH), 102.6 (C-1′, CH), 134.0 (C-7, CH), 134.9 (C-8, CH), 214.9 (C-3); positive HR-ESI-MS *m/z*: 411.1990 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{19}H_{32}O_6Na$: 411.1989).

Icariside B2 (11) [24]. Colorless solid; ^1H NMR (pyridine-d_6, δ_H): 1.10 (3H, s, H_3-12), 1.52 (3H, s, H_3-11), 1.53 (3H, s, H_3-13), 1.67 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.0 Hz, H-4b), 2.21 (3H, s, H-10), 2.39 (1H, ddd, *J* = 12.1, 4.0, 2.0 Hz, H-2a), 2.88 (1H, ddd, *J* = 12.1, 4.0, 2.0 Hz, H-4a), 3.92 (1H, m, H-5′), 4.10 (1H, t, *J*=8.3 Hz, H-2′), 4.28 (1H, t, *J* = 9.2 Hz, H-3′), 4.31 (1H, t, *J* = 9.2 Hz, H-4′), 4.42 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.0 Hz, H-6′b), 4.54 (1H, dd, *J* = 12.1, 5.0 Hz, H-6′a), 4.98 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1′), 5.91 (1H, s, H-8) and ^{13}C NMR (pyridine-d_6, δ_C): 26.9 (C-10, CH_3), 29.6 (C-11, CH_3), 31.5 (C-13, CH_3), 32.4 (C-12, CH_3), 36.7 (C-1), 47.5 (C-4, CH_2), 48.5 (C-2, CH_2), 63.2 (C-6′, CH_2), 71.7 (C-5), 72.2 (C-4′, CH), 72.3 (C-3, CH), 75.8 (C-2′, CH), 78.8 (C-5′, CH), 79.1 (C-3′, CH), 100.9 (C-8, CH), 103.5 (C-1′, CH), 120.3 (C-6, CH), 198.2 (C-7), 210.1 (C-9); positive HR-ESI-MS *m/z* : 409.1836 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{19}H_{30}O_8Na$: 409.1833).

Benzyl-a-L-arabinopyranosyl (1→6)-b-D-glucopyranoside (12) [25]. Colorless solid; ^1H NMR (methanol-d_4, δ_H): 3.24 (1H, dd, *J* = 9.1, 8.0 Hz, H-2′), 3.28 (1H, m, H-3′), 3.29 (2H, m, H-4′, 5′), 3.44 (1H, dd, *J* = 6.0, 3.3 Hz, H-3″), 3.46 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-5″a), 3.52 (1H, dd, *J* = 9.1, 7.0 Hz, H-2″), 3.68 (1H, dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, H-6′a), 3.74 (1H, m, H-4″), 3.79 (1H, dd, *J* = 12.1, 3.3 Hz, H-5″), 4.05 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.0 Hz, H-6′b), 4.28 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1″), 4.35 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1′), 4.66 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-7a), 4.81 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-7b), 7.26 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4), 7.32 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-3, 5), 7.43 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2, 6) and ^{13}C NMR (methanol-d_4, δ_C): 66.8 (C-5″, CH_2), 69.6 (C-4″, CH), 69.7 (C-6′, CH_2), 71.9 (C-4′, CH), 72.1 (C-7, CH_2), 72.6 (C-2″, CH), 74.4 (C-3″, CH), 75.3 (C-2′, CH), 77.2 (C-5′, CH), 78.1 (C-3′, CH), 103.6 (C-1′, CH), 105.4 (C-1″, CH), 128.8 (C-4, CH), 129.3 (C-2, C-6, CH), 129.4 (C-3, C-5, CH), 139.3 (C-1). Positive HR-ESI-MS *m/z*: 425.1414 $[M+Na]^+$(calcd. for $C_{18}H_{26}O_{10}Na$: 425.1418).

Cichoriin (13) [26]. Colorless solid; ^1H NMR (pyridine-d_6, δ_H): 4.13 (1H, ddd, *J* = 7.0, 6.2, 2.0 Hz, H-3′), 4.28 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2′), 4.30 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-4′), 4.36 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-5′), 4.39 (1H, dd, *J* = 11.1, 5.0 Hz, H-6′a), 4.58 (1H, dd, *J* = 11.1, 2.0 Hz, H-6′b), 5.61 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1′), 6.24 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-3), 7.13 (1H, s H-8), 7.60 (1H, br s, H-4),

7.69 (1H, s, H-5) and ^{13}C NMR (pyridine-d$_6$, δ_C): 62.9 (C-6′, CH$_2$), 71.7 (C-4′, CH), 75.4 (C-2′, CH), 78.9 (C-5′, CH), 79.7 (C-3′, CH), 104.7 (C-1′, CH), 104.9 (C-8, CH), 111.9 (C-10), 113.0 (C-3, CH), 116.9 (C-5, CH), 144.6 (C-7), 144.7 (C-7), 152.5 (C-6), 154.3 (C-9), 161.8 (C-2). Positive HR-ESI-MS *m/z*: 363.0686 [M+Na]$^+$(calcd. for $C_{15}H_{16}O_9Na$: 363.0687)**.**

Uridine (14) [27]. Yellow powder; ^{1}H NMR (pyridine-d$_6$, δ_H): 4.20 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-5′b), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-5′a), 4.66 (1H, m, H-4′), 4.92 (2H, d, m, H-2′, 3′), 5.80 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.83 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-1′), 8.54 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6) and ^{13}C NMR (pyridine-d$_6$, δ_C): 62.1 (C-5′, CH$_2$), 71.6 (C-3′, CH), 76.5 (C-2′, CH), 86.7 (C-4′, CH), 90.8 (C-1′, CH), 102.8 (C-5, CH), 141.5 (C-6, CH), 152.7 (C-2), 164.8 (C-4). Positive HR-ESI-MS *m/z*: 267.0587 [M+Na]$^+$(calcd. for $C_9H_{12}O_6N_2Na$: 267.0587)**.**

Acid hydrolysis for identification of sugar moeity 1 and 2. A solution of **1** and **2** (1 mg) in 1 N HCl (0.1 ml) was heated under conditions of reflux for 2 h. The mixture was neutralized by the addition of amberlite IRA400 (OH$^-$ form), and the resin was removed by filtration. Then, the filtrates were extracted with EtOAc. The aqueous layers were subjected to HPLC analysis [column: Shodex Asahipak NH 2P-50 4E, 250 x 4.6 mm i.d.; mobile phase: 75% CH_3CN in water; detection: oprical rotation (JASCO 2090Plus Chiral); flow rate: 1.0 ml/min] to identify D-glucose (**1**) and D-fructose (**2**), which were identified by the comparison of their retention times with those of authentic samples; t_R: 5.11 (D-fructose, positive optical rotation) and t_R: 6.10 (D-glucose, positive optical rotation). They also yielded the aglycon of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone (**1a** and **2a**) [17].

2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone (1a) [16]. Colorless solid; $[a]_D^{27.5}$ -15.0 (*c* 0.12, MeOH); IRν_{max} (film) cm^{-1}: 3286, 2923, 1729, 1649, 1558, 1456, 1339, 1205, 1092, 667; ^{1}H NMR (methanol-d$_4$, δ_H): 1.35 (3H, s, H-6), 3.96 (1H, dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, H-5a), 4.17 (1H, dd, *J* = 5.0, 4.0 Hz, H-4), 4.49 (1H, dd, *J* = 9.0, 5.0 Hz, H-5b); positive HR-ESI-MS *m/z* 155.0312 [M+Na]$^+$(calcd. for $C_5H_8O_4Na$: 155.0315) and tr HPLC of 10.20 (aqueous 100%).

2-*C*-methyl-D-threono-1,4-lactone (2a) [16]. Colorless solid; $[a]_D^{27.9}$ -15.7 (*c* 0.17, MeOH); IRν_{max} (film) cm^{-1}: 3373, 2927, 1717, 1649, 1558, 1455, 1338, 1207, 1098, 668; ^{1}H NMR (methanol-d$_4$, δ_H): 1.35 (3H, s, H-6), 3.96 (1H, dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, H-5a), 4.17 (1H, dd, *J* = 5.0, 4.0 Hz, H-4), 4.49 (1H, dd, *J* =9.0, 5.0 Hz, H-5b); positive HR-ESI-MS *m/z* 155.0319 [M+Na]$^+$(calcd. for $C_5H_8O_4Na$: 155.0315) and tr HPLC of 10.20 (aqueous 100%).

Cell Cuture. Osteoblast−like cell of MC3T3−E1 was purchased from Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan. The cells were cultured in petri dish in a−MEM medium containing 10% FBS in a CO_2 incubator at 37°C and sub cultured every 3 days at a dilution of Trypsin (0.25%). The 5 x 10^4 cells were seeded in 24−well plates and incubated in fresh a−MEM medium containing 10% FBS at 37°C under 5% CO_2 for 3 days. After 3 days incubation, the cells were washed with serum−free of a−MEM medium and then continue to determine the effect of alkaline phosphatase (ALP) activity or mineralization.

Alkaline phosphatase (ALP) activity. The cells were treated at 90% confluence with culture medium containing 10 mM b-glycerophosphate and 50 mg/mL ascorbic acid to initiate *in vitro* proliferation. The medium was changed every 2–3 d. After 6 days, the cells were cultured individually for 3 days with medium containing 0.3% bovine serum and isolated compounds (**1**–**14**). On harvesting, the medium was discharged, and the cell monolayer was gently washed twice with phosphate buffered saline. The cells were lysed with 0.2% triton X-100, with the lysate centrifuged at 14000 x g for 5 min. The clear supernatant was used to measure ALP activity, which was determined using an ALP activity assay kit [28].

Mineralization of MC3T3-E1. The cells were treated, at 90% confluence, with culture medium containing 10 mM b-glycerophosphate and 50 mg/ml ascorbic acid, to initiate *in vitro* mineralization. After 12 days, the cells were cultured individually for 2 days with medium containing 0.3% bovine serum and isolated compounds (**1**–**14**). On harvesting, the cells were fixed with 70% ethanol for 1 hour and then stained with 40 mM Alizarin Red S for 10 min with gentle shaking. To quantify the bound dye, the stain was solubilized with 10% cetylpyridium

chloride by shaking for 15 min. The absorbance of the solubilized stain was measured at 561 nm [28].

Acknowledgments

This work was supported by a PTUPT research grant of the Indonesia Government, JSPS KAKENHI Grant Numbers 17K08336, 16K18896, 17K15465 and 15H04651 and the cosmetology research foundation. The authors are grateful for access to the superconducting NMR instrument, UV, and ESI-MS at the Analytical Center of Molecular Medicine, the Analysis Center of Life Science, and the Natural Science Center for Basic Research and Development of the Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University.

References

1. Sahu J, Jain K, Jain B, Sahu RK (2011) A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. Pharmacologyonline 2:1105–1110
2. Tiwari KL, Jadhav SK, Joshi V (2011) An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. Chin J Integr Med 9:1170–1178
3. Sharma V, Boonen J, Chauhan NS, Thakur M, Spiegeleer BD, Dixit VK (2011) *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. Phytomedicine 18:1161–1169
4. Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Chartchalerm INA, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2008) Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. Int J Mol Sci 9:2724–2744
5. Ramsewak RS, Erickson AJ, Nair MG (1999) Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. Phytochemistry 51:729–732
6. Storey C, Salem JI (1997) Lay use of Amazonian plants for the treatment of tuberculosis. Acta Amazonica 27:175–182
7. Hossan S, Agarwala B, Sarwar S, Karim M, Jahan R, Rahmatullah M (2010) Traditional use of medicinal plants in Bangladesh to treat urinary tract infections and sexually transmitted diseases. Ethnobotany Research and Applications 8:61–74
8. Arora S, Vijay S, Kumar D (2011) Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. J Chem Pharm Res 3:145–150
9. Jondiko IJO (1986) A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. Phytochemistry 25:2289–2290
10. Kadir HA, Zakaria MB, Kechil AA, Azirun MS (1989) Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr. Pestic Sci 25:329–335
11. Prachayasittikul S, Suphapong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2009) Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. Molecules 4:850–867
12. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Devarakonda K (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian J Pharmacol 33:2–16
13. Widyowati R (2011) Alkaline phosphatase activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthes acmella* fractions against MC3T3-E1 cells as marker of osteoblast differentiation cells. Int J Pharm Pharm Sci 3(1): 34–37
14. Hotchkiss DJ, Soengas R, Booth KV, Weymouth-Wilson AC, Eastwick-Field V, Fleet GWJ (2007) Green aldose isomerization: 2-*C*-methyl-1,4-lactones from the reaction of amadori ketoses with calcium hydroxide. Tetrahedron Lett 48:517–520
15. Fellermeier MA, Maier UH, Sagner S, Bacher A, Zenk MH (1998) (–)-2-*C*-Methyl-D-erythrono-1,4-lactone is formed after application of the terpenoid precusor 1-deoxy-D-xylulose. FEBS Lett 437:278–280
16. Uriburu ML, Gil RR, Sosa VE, Fuente JR (2008) Caffeoyl esters of threonic acid and its lactone from *Viguiera pazensis*. J Arg Chem Soc 96:55–61

17. Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, Tomii K, Kouno I (2007) Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. Chem Pharm Bull 55:899–901
18. Zhang Z, Wang D, Zhao Y, Gao H, Hu Y, Hu J (2009) Fructose-derived carbohydrates from *Alisma orientalis*. Nat Prod Res 23:1013–1020
19. Barraclough P, Dieterich P, Spray CA, Young DW (2006) Two separate and distinct syntheses of stereospecifically deuteriated samples of (2*S*)-proline. Org Biomol Chem 4(8):1483–1491
20. Stein GS, Lian JB (1993) Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M (ed). Cellular and molecular biology of bone. Academic Press, Tokyo, pp 47–95
21. Kitajima J, Ishikawa T, Tanaka T, Ida Y (1999) Water-soluble constituents of fennel IX. Glucides and nucleosides. Chem Pharm Bull 47:988–992
22. Otsukahttps://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489 - A373-1 H, Takedahttps://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489 - A373-1 Y, Yamasakihttps://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489 - A373-1 K, Takeda Y (1992) Structural elucidation of Dendranthemosides A and B: Two new *β*-ionone glucosides from *Dendranthema shiwogiku*. Planta Medica 58:373–375
23. Marino SD, Borbone N, Zollo F, Lanaro A, Meglio PD, Lorizzi M (2004) Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. J Agric Food Chem 52:7525–7531
24. Miyase T, Ueno A, Takizawa N, Kobayashi H, Karasawa H (1987) Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I. Chem Pharm Bull 35:1109–1117
25. Rosa S, Giulio A, Tommonaro G (1996) Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of *Lycopersicon esculentum*. Phytochemistry 42:1031–1034
26. Zhou H, Qin M, Hong J, Wu G (2009) Chemical constituents of *Viola yedoensis*. Chin J Nat Med **7**:290–292
27. Chen HX, Geng CA, Cao TW, Zhang XM, Ma YB, Huang XY, Chen JJ (2013) Chemical structure of capsicuoside A from fruits of *Capsium annum*. J Chinese Materia Medica 38(12):1934–1937
28. Cuong NX, Tuan TA, Kiem PV, Kim YH (2008) New cembranoid diterpenes from the Vietnamese soft coral *Sarcophyton mililatensis* stimulate osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Chem Pharm Bull 56:988–992.

Table 2. ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds **1**–**4**.

Position	1	2	3	4
2	179.4	180.2	181.2	181.3
3	75.7	76.0	30.5	30.6
4	83.4	75.7	26.0	26.3
5	69.6	73.0	57.1	57.4
6	19.2	17.8	174.2	176.2
7			66.0	60.5
8			38.8	42.6
9			65.5	66.3
10			23.9	23.9
1′	104.0	60.7		
2′	74.9	109.4		
3′	78.2	82.7		
4′	72.2	79.1		
5′	78.1	84.8		
6′	63.2	63.0		

Recorded at 125 MHz in methanol-d4. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm.

II. BUKTI TELAH DI SUBMIT DAN DIREVIEW

A. Journal of Natural Medicine

rr retno widyowati <rr-retno-w@ff.unair.ac.id>

To:retno_biotek@yahoo.com

Sep 9 at 2:54 PM

Dari: "Journal of Natural Medicines (JONM)" <em@editorialmanager.com>
Tanggal: 8 Juni 2018 08.50.32 WIB
Kepada: "Retno Widyowati" <rr-retno-w@ff.unair.ac.id>
Subjek: JONM-D-18-00285 - Submission Notification to co-author
Balas-Ke: "Journal of Natural Medicines (JONM)" <subbulakshmi.devanathan@springernature.com>

Re: "NEW METHYL THREONOLACTONES AND PYROGLUTAMATES OF SPHILANTHES ACMELLA MURR. AND THEIR BONE FORMATION ACTIVITIES"
Submission ID: JONM-D-18-00285
Full author list: Retno Widyowati; Sachiko Sugimoto; Yoshi Yamano; Neny Purwitasari; Hideaki Otsuka; Katsuyoshi Matsunami

Dear Dr Widyowati,

We have received the submission entitled: "NEW METHYL THREONOLACTONES AND PYROGLUTAMATES OF SPHILANTHES ACMELLA MURR. AND THEIR BONE FORMATION ACTIVITIES" for possible publication in Journal of Natural Medicines, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Katsuyoshi Matsunami who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Journal of Natural Medicines

松浪　勝義 <matunami@hiroshima-u.ac.jp>

To:retno_biotek@yahoo.com

Jul 13 at 5:26 PM

Dear Dr. Retno,

These files are the version of submission.
Please revise according to the minor comments.

Best regards

Katsuyoshi Matsunami, PhD.
Professor
Department of Pharmacognosy
Graduate School of Biomedical & Health Sciences
Hiroshima University
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Japan, 734-8553
E-mail: matunami@hiroshima-u.ac.jp

From: em.jonm.0.5c851e.a1d6ee8d@editorialmanager.com <em.jonm.0.5c851e.a1d6ee8d@editorialmanager.com> on behalf of Journal of Natural Medicines (JONM) <em@editorialmanager.com>
Sent: Friday, July 13, 2018 14:59
To: 松浪　勝義
Subject: J Nat Med: Your manuscript entitled NEW METHYL THREONOLACTONES AND PYROGLUTAMATES OF SPHILANTHES ACMELLA MURR. AND THEIR BONE FORMATION ACTIVITIES

Dear Dr. Matsunami,

Based on the reviewers' comments and together with our evaluation, the referees consider your work to be of interest, but they also have considerable criticisms. I regret to have to inform you that, in its present form, your manuscript is not considered to be acceptable for publication in Journal of Natural Medicines. We feel, however, that you may be able to revise the manuscript in a way that deals satisfactorily with these major criticisms. We hope you will give appropriate consideration to these suggestions and to prepare suitable revisions of the paper.
The final decision will be done on the basis of the confirmation whether compounds 3 and 4 are artifacts or not.
Please find the attachment file for the comments from reviewer 1.

The reviewers' comments can be found at the end of this email or can be accessed by following the provided link.

Besides of the reviewers comments,
Fig. 4 b) is missing. Although the reviewer 1 suggest the change of figure title, the editor suggest the addition of Noisy correlation.
P3, L10 Spilanthes acmella Murr. is species name. "Spilanthes is a genus comprising..." is appropriate.
P7, L48-51 olefinic → oxygenated ?
P8, L25 C-8 → C-9
P8, L25 Is "the hydroxy group" mistake for "the methyl group"?

This is your login information:

Your username is: KMatsunami-557
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at https://jonm.editorialmanager.com/

Please explicitly address the comments raised by the reviewers in your cover letter and also point out the changes and revisions made in the manuscript.

Your revision is due by 11 Sep 2018.

To submit a revision, go to https://jonm.editorialmanager.com/ and log in as an Author. You will see a menu item called 'Submissions Needing Revision'. You will find your submission record there.

Please note: When uploading your revised files, please make sure only to submit your editable source files (i. E. Word, tex).

Yours sincerely,
Editorial Board
Journal of Natural Medicines

==========

B. Bromo Conference

Konfimasi Seminar/Workshop Fee

BA **Bromo Conference Universitas Airlangga <bromo2018@ff.unair.ac.id>**
05/06/2018 12:23

To: ridhotryantono@gmail.com

Dear Mr. Ridho Tryantono,

Kami ingin melakukan konfirmasi mengenai data pembayaran seminar/workshop anda pada program Bromo Conference 2018. Pada sistem kami, Anda belum menyerahkan bukti transfer, kami mohon untuk segera menyerahkan bukti transfer tersebut sampai dengan tanggal 8 Juni 2018.

Atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

best regards,

--
Secretariat of Bromo Conference 2018
Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia
Website: ff.unair.ac.id/conferences/bromo2018
email: bromo2018@ff.unair.ac.id
Phone. + 62 (31) 5033710, Fax. + 62 (31) 5020514
Mobile phone: 085101673547 (Dr. Retno Widyowati)

Quality Standardization of Dry Powder of *Spilanthes acmella* auct. non (L.) Murray Herb

Ridho Tryantono, Neny Purwitasari and Retno Widyowati
Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

Spilanthes acmella auct. non (L.) Murray, is a plant that has various medical values, one of them is to overcome osteoporosis. This plant is very potential to be developed into traditional medicine products. Based on this purpose, the raw materials as crude drug and extract should have been standardized. But the standard parameter value of this plant is not yet available on Indonesia Herbal Pharmacopoeia. It is therefore necessary to set the standard parameter values of crude drug and extract of *Spilanthes acmella* auct. non (L.) Murray. The aim of this study is to determine the standard parameter value of crude drug from *Spilanthes acmella* auct. non (L.) Murray, aerial part which grow in Purwodadi, East Java, Indonesia. The method used in this study is in accordance to the requirement of Indonesian Herbal Pharmacopoeia. The results showed that the water-soluble concentration, ethanol-soluble concentration, the total value of ash and the total value of acid insoluble of crude drug were 15.62%, 3.27%, 13.41% and 2.55%, respectively. This research can provide information for standardization of plant material.

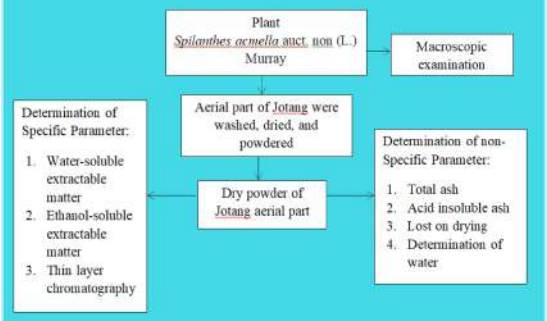
Keywords: Spilanthes acmella, dry powder, standardization.

INTRODUCTION

Spilanthes acmella or commonly called jotang. This plant has been known in the community to overcome toothache [1]. In addition to overcoming toothache, extract jotang aerial part can also cure osteoporosis [2] [3]. This extract of jotang aerial part will be made into Indonesian traditional medicine product. Based on this purpose, the raw materials as crude drug and extract should have been standardized. Standardization means the process of ensuring that the final product (drug, extract or extract product) has a certain constant parameter value [4]. This needs to be done to obtain a crude drug of uniform quality, so that it is also useful and can be used as a raw material traditional medicine product. But the standard parameter value of this plant is not yet available on Indonesia Herbal Pharmacopoeia. It is therefore necessary to set the standard parameter values of crude drug and extract of *Spilanthes acmella* auct. non (L.) Murray. The aim of this study is to determine the standard parameter value of crude drug from Spilanthes acmella auct. non (L.) Murray, aerial part which grow in Purwodadi, East Java, Indonesia.

METHOD

The method used in this study is in accordance to the requirement of Indonesian Herbal Pharmacopoeia



Thin layer chromatography

Weigh 1 g of dry powder of jotang aerial part, maceration with 10 ml ether for 2 hours, strain. Apply filtrate in the vapor plate, add enough ether, to obtain 5 ml of solution. put a 20 µl solution on the TLC plate (GF-254). Eluation with mixture of n-hexane : ethyl acetate (80 : 20) with 8 cm creepage distance. observe with ordinary light and with ultraviolet rays of 366 nm and 254 nm [5].

RESULT

All the results of the standard parameter determination have been summarized in **Table 1**. In **Figure 1** is the result of phytochemical screening using TLC and observed in ultraviolet light with wavelength 254 nm and 366 nm. In UV light with 254 nm visible the presence of 2 thin stains, while the UV with a wavelength of 366 nm visible 3 stains.

Table 1. Standard parameter value of dry powder *Spilanthes acmella* auct. non (L) murray aerial part

Standard Parameter	Value (Mean ± SD)
Water-soluble extractable matter	15,62 ± 0,55 %
Ethanol-soluble extractable matter	3,33 ± 0,24 %
Total Ash	13,42 ± 0,08%
Acid insoluble ash	2,56 ± 0,21 %
Lost on drying	15,20 ± 0,30%
Determination of water	13,67 ± 0,58%

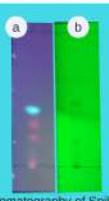


Figure 1. Thin layer chromatography of Spilanthes acmella auct. non (L) murray aerial part. a. observed in UV light 366 nm; b. observed in UV light 254 nm

CONCLUSION

This research can provide information for standardization of dry powder *Spilanthes acmella* auct. non (L) murray aerial part.

REFERENCES

[1] Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S.A., Saha, S., 2013. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of Spilanthes acmella: A Review. Hindawi, 2013. pp. 1-9.
[2] Widyowati R. 2011. Alkaline Phosphatase Activity of Graptophyllum pictum and Sphilanthes acmella Fractions Against MC3T3E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. International Jurnal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3 (1). pp. 34-37.
[3]Laswati, H., Subadi, I., Widyowati, R., Agil, M., Pangkahila, J.A., 2015. Spilanthes acmella and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Male Mice. Bali MedJ., 4 (2), pp. 76-81.
[4] Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta : Kementrian Kasehatan Replublik Indonesia.
[5] Departemen Kesehatan RI. 1995. Materia Medika Indonesia. Jakarta : Kementrian Kesehatan Replublik Indonesia.

III. DRAFT PATEN SEDERHANA

Deskripsi

EKTRAK ETANOL 96% JOTANG *(Spilanthes acmella* Murr.) DAN PENGGUNAANNYA DALAM PEMBENTUKAN MASA TULANG

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan pembuatan ekstrak etanol 96% Jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dari familia Asteraceae. Lebih khusus, ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) digunakan sebagai bahan anti-osteoporosis pada kasus peningkatan masa tulang yang disebabkan oleh pengeroposan tulang.

Latar Belakang Invensi

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit serius yang berhubungan dengan usia lanjut, penyakit ini dapat menyebabkan patah tulang yang sering terjadi pada pinggul dan punggung, juga menyebabkan nyeri kronis, kehilangan keseimbangan dan dapat menimbulkan kematian.

Insiden osteoporosis lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki-laki dan merupakan problem pada wanita pascamenopause. Osteoporosis di klinik menjadi penting karena problem fraktur tulang, baik fraktur yang disertai trauma yang jelas maupun fraktur yang terjadi tanpa disertai trauma yang jelas.

Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Irwan, 2008).

Ada 2 penyebab utama osteoporosis, yaitu pembentukan masa puncak tulang yang kurang baik selama masa pertumbuhan dan meningkatnya pengurangan masa tulang setelah menopause. Masa tulang meningkat secara konstan dan mencapai puncak sampai usia 40 tahun, pada wanita lebih muda sekitar 30-35 tahun. Walaupun demikian tulang yang hidup tidak pernah beristirahat dan akan selalu mengadakan remodeling dan memperbaharui cadangan mineralnya sepanjang garis beban mekanik. Faktor pengatur formasi dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui 2 proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang dan disebut coupling. Proses coupling ini memungkinkan aktivitas formasi tulang sebanding dengan aktivitas resorpsi tulang. Proses ini berlangsung 12 minggu pada orang muda dan 16-20 minggu pada usia menengah atau lanjut. Remodeling rate adalah 2-10% masa skelet per tahun (Stevenson & Marsh, 2007).

Proses remodelling ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor lokal yang menyebabkan terjadinya satu rangkaian kejadian pada konsep Activation – Resorption – Formation (ARF). Proses ini dipengaruhi oleh protein mitogenik yang berasal dari tulang yang merangsang preosteoblas supaya membelah menjadi osteoblas akibat adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi proses pembentukan tulang kembali (remodeling) adalah faktor hormonal. Proses ini akan ditingkatkan oleh hormon paratiroid, hormon pertumbuhan dan 1,25$(OH)_2$ vitamin D. Sedang yang menghambat proses ini adalah kalsitonin, estrogen dan glukokortikoid.

Proses-proses yang mengganggu remodeling tulang inilah yang menyebabkan osteoporosis.

Sediaan farmasi yang digunakan untuk pengobatan osteoporosis adalah golongan bisfosfonat seperti alendronate, namun masalah penyakit ini masih belum teratasi, karena pemicunya yang sangat kompleks. Mekanisme kerja obat osteoporosis kebanyakan menurunkan resorpsi tulang sedangkan permasalahan osteoporosis tidak hanya pada resorpsi tulang saja tapi bagaimana terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang terjadi. Oleh karena itu perlunya ditemukan obat baru yang dapat menjaga keseimbangn remodeling tulang melalui peningkatan pembentukan masa tulang dan penurunan resorpsi tulang. Selain itu penggunaan obat osteoporosis dalam jangka panjang dan melalui oral membuat pasien menjadi bosan dan tidak patuh. Sediaan semisolida yaitu cream atau gel ethosom sangat cocok dan inovatif digunakan untuk pengobatan ini dalam memperbaiki kepatuhannya. Beberapa sediaan dilaporkan mengandung bahan sintetik atau bahan kimia terlarang dan memiliki efek samping yang berbahaya, salah satunya yaitu menimbulkan kanker.

Produk anti-osteoporosis yang menggunakan bahan baku berasal dari alam memiliki efek samping relatif lebih kecil dibandingkan bahan baku sintetis atau semi-sintetis. Dari aspek kualitas, keamanan, dan efektivitas produk, maka pengembangan sediaan anti-osteoporosis dengan bahan alam merupakan suatu peluang yang menjanjikan. Hasil temuan berupa bahan anti-osteoporosis yang berasal dari jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dalam bentuk ekstrak etanol 96% diharapkan memiliki nilai komersial yang tinggi untuk diproduksi di Indonesia.

Jumlah penduduk yang sangat besar sebagai pasar dengan diversitas pengguna yang luas, tersedianya bahan baku jotang di seluruh Indonesia yang selama ini tumbuh liar tanpa tergantung musim dan masih belum memiliki nilai komoditas, merupakan potensi yang menunjang pengembangan jotang sebagai bahan antiosteoporosis.

Invensi ini diajukan berkaitan dengan penggunaan ekstrak etanol 96% jotang sebagai bahan anti-osteoporosis dalam menjaga keseimbangan tulang melalui peningkatan masa tulang dan penurunan resorpsi tulang. Ekstrak ini mengandung flavonoid, triterpenoid dan alkaloid.

Uraian singkat Invensi

Invensi ini berkaitan dengan proses pembuatan ekstrak etanol 96% jotang sebagai bahan anti-osteoporosis dan kandungan flavonoid, triterpenoid, dan alkaloid. Ekstrak dibuat dengan cara merendam 500 g simplisia seluruh bagian tanaman jotang ke dalam wadah maserasi yang berisi 5 liter etanol 96% selama 3 hari sambil diaduk-aduk sesekali, ekstrak diuapkan dengan *rotary evaporator*. Analisis kandungan flavonoid, triterpenoid dan alkaloid dalam ekstrak etanol 96% jotang dilakukan secara kualitatif menggunakan pereaksi warna dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penggunaan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) untuk pembuatan sediaan anti-osteoporosis.

Uraian Lengkap Invensi

Ekstrak etanol 96% jotang diperoleh dari 5 kg seluruh bagian tanaman segar jotang yang dikeringkan dengan cara dianginkan, kemudian diserbuk dan didapat sebanyak 568 g serbuk kering (*mesh* 20). Sebanyak 500 g serbuk diekstraksi dengan 5 liter etanol 96% selama 3 hari, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh 57 g ekstrak kering. Kandungan flavonoids, triterpenoid dan alkaloid dianalisis secara kualitatif dengan pereaksi warna dan dan KLT.

Uji aktivitas anti-osteoporosis ekstrak etanol 96% jotang dilakukan secara in-vitro dalam meningkatkan masa tulang menggunakan sel MC3T3-E1 dan menurunkan resorpsi tulang menggunakan sel RWA 264,7. Tahapan pengujian peningkatan masa tulang dimulai

dari sel MC3T3-E1 yang 90% bergerombol, dikultur dengan menggunakan medium a-MEM yang mengandung 10 mM b-glycerofosfate and 50 mg/ml asam askorbat. Medium diganti setiap 2–3 hari, setelah 6 hari sel dikultur dengan medium yang mengandung 0,3% serum anak sapi and sampel selama 3 hari. Kemudian medium dibuang dan sel dicuci dengan menggunakan buffer fosfat salin sebanyak 3 kali. Sel dilisis dengan 0,2% triton X-100 dan disentrifuse pada 14000 x g selama 5 menit. Supernatan yang jernih digunakan untuk mengukur ALP dengan bantuan ALP assay kit (Retno et. al., 2010).

Sedangkan tahapan uji penurunan resorpsi tulang dilakukan dengan cara sebanyak 5 x 10^5 sel RAW 264,7/sumur dan medium DMEM yang mengandung 10% FBS, 100 units/ml penisilin dan 100 mg/ml streptomisin ditanam dalam 24-well plates untuk menguji sel viabilitas dan proliferasi. Setelah 1 hari inkubasi, dimasukkan sejumlah sampel dengan konsentrasi tertentu (100, dan 10 mg/ml ekstrak etanol 70% maserasi, ekstrak etanol 70% modifikasi dan ekstrak air tanduk rusa) beserta medium baru dan diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37ºC. Setelah inkubasi 1 hari, medium dibuang dan ditambahkan dengan 200 ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) dan diinkubasi selama 4 jam. Untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk setelah inkubasi, ditambahkan 100 ml DMSO dan diukur absorbansinya pada 570 nm dengan menggunakan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Tecan Trading AG, Tecan, Switzerland). Relatif sel viabilitas diukur dalam persen relatif sel yang dibandingkan terhadap kontrol.

Hasil Uji aktivitas anti-osteoporosis menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% jotang mampu meningkatkan pembentukan masa tulang melalui mekanisme peningkatan enzim ALP yang merupakan marker dari sel osteoblas sebesar 63%. Selain itu ekstrak tersebut juga mampu menghambat penurunan resorpsi tulang melalui penghambatan pertumbuhan sel RAW 264,7 sebesar 30%.

Klaim

1. Proses pembuatan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dilakukan dengan tahapan-tahapan berikut: mengeringkan seluruh bagian tanaman segar jotang dengan cara dianginkan, kemudian diserbuk sampai ukuran 20 *mesh*; serbuk tersebut direndam dengan etanol 96% selama 3 hari, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering.

2. Penggunaan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) menurut klain 1 untuk pembuatan sediaan anti-osteoporsis dalam menjaga keseimbangan remodeling tulang melalui peningkatan pembentukan masa tulang dan penghambatan resorpsi tulang

3. Penggunaan menurut klaim 2, dilakukan dengan memberikan sebanyak 5% ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.).

Abstrak

PEMBUATAN EKTRAK ETANOL 96% JOTANG *(Spilanthes acmella* Murr.) DAN PENGGUNAANNYA SEBAGAI BAHAN ANTI OSTEOPOROSIS

Ruang lingkup invensi ini mancakup penggunaan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dari familia Asteraceae sebagai bahan anti-osteoporosis pada kasus jumah sel osteoblas dan osteoklas tidak seimbang di dalam tulang.

Proses pembuatan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dilakukan melalui beberapa tahapan; yaitu pengeringan seluruh bagian tanaman segar jotang, kemudian diserbuk sampai ukuran 20 *mesh*. Selanjutnya direndam dengan menggunakan etanol 96% selama 3 hari sampai diperoleh konsentrasi 5%, selanjutnya dilakukan penguapan cairan yang telah didapat dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering.

Terhadap ekstrak kering jotang ini dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis dengan metode in vitro pada sel osteoblas (MC3T3-E1) dan sel osteoklas (RAW 264,7). Larutan ekstrak kering jotang menunjukkan kemampuan meningkatkan pembentukan masa tulang melalui mekanisme peningkatan enzim ALP yang merupakan marker dari sel osteoblas sebesar 63%. Selain itu ekstrak tersebut juga mampu menghambat penurunan resorpsi tulang melalui penghambatan pertumbuhan sel RAW 264,7 sebesar 30%. Untuk pengembangan formula sediaan topikal anti-osteoporosis dengan bahan aktif ekstrak etanol 96% jotang digunakan konsentrasi 5%.

IV. PROTOTIPE PRODUK