



**PENGARUH EKSTRAK BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor*
L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA SERUM
TIKUS WISTAR JANTAN MODEL FRAKTUR**

SKRIPSI

Oleh

Ahmad Baihaqi
NIM 142010101030

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018



**PENGARUH EKSTRAK BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor*
L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA SERUM
TIKUS WISTAR JANTAN MODEL FRAKTUR**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Ahmad Baihaqi
NIM 142010101030

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat, hidayah, anugerah, dan kesempatan yang diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan dan tauladan;
3. Orang tua saya tercinta, Abi Hilal dan Bunda Siti Cholisoh yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan doa tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
4. Kakak saya Chadli Hakim beserta Adik saya Mahir Habib dan Hasbi Ash Shidieqy yang selalu memberikan saya semangat yang memotivasi saya;
5. Para guru dan ustadz/ah sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan manusia yang berilmu dan bertakwa;
6. Keluarga besar angkatan 2014 Elixir Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Keluarga besar Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
8. Keluarga besar UKMO Sporiatrika Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
9. Keluarga besar UKMK Arteri Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
10. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

((Sampaikan mereka bara dan suara; berlalu, lalu kini kau menunggu; serap seram di pundakmu; lambat laun kan menari, kan berlari.)*)



*Barasuara. 2015. *Album Taifun*. Jakarta: Juni Suara Kreasi.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Ahmad Baihaqi

NIM :142010101030

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus Wistar Jantan Model Fraktur” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Januari 2018

Yang menyatakan,

Ahmad Baihaqi
NIM 142010101030

SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor*
L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA SERUM
TIKUS WISTAR JANTAN MODEL FRAKTUR**

Oleh

Ahmad Baihaqi
NIM 142010101030

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr. Aris Prasetyo M.Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Laksmi Indreswari Sp.B.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Pengaruh Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus Wistar Jantan Model Fraktur" karya Ahmad Baihaqi telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 29 Januari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. M. Hasan, M.Kes., Sp.OT.
NIP 196904111999031001

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.
NIP 198409162008012003

Anggota II,

Anggota III,

Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes.
NIP 196902031999031001

dr. Laksmi Indreswari, Sp.B.
NIP 198309012008012012

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes.
NIP197002141999032001

RINGKASAN

Pengaruh Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus Wistar Jantan Model Fraktur; Ahmad Baihaqi, 142010101030; 2018: 37 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Fraktur tulang merupakan salah satu jenis trauma di bidang ortopedi. Trauma ini termasuk dalam kategori permasalahan kesehatan dengan prevalensi cukup tinggi di Indonesia. Tulang yang fraktur akan mengalami mekanisme proses penyembuhan secara alami melalui lima tahapan, yaitu fase hematoma, proliferasi, pembentukan kalus, konsolidasi, dan remodeling. Pada saat fase inflamasi, komponen inflamasi seperti sitokin, leukosit terutama neutrofil, dan komponen lainnya akan bermigrasi ke area fraktur. Tujuannya adalah menstimulasi diferensiasi dan proliferasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) menjadi sel osteogenik seperti osteoblas dan osteoklas. Di sisi lain, komponen inflamasi ini juga dapat menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) di area fraktur. Radikal bebas dalam tubuh dihasilkan dari aktivitas fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta aktivitas osteoklas dalam penyembuhan fraktur. Stres oksidatif bisa terjadi bila jumlah radikal bebas tidak diimbangi dengan jumlah antioksidan yang mengurangi radikal bebas tersebut. Ketika antioksidan endogen tidak mampu menekan stres oksidatif, perlu adanya asupan antioksidan dari luar tubuh yang dapat diperoleh dari flavonoid yang terkandung dalam bayam merah. Tingginya kadar flavonoid dalam bayam merah berpotensi menjadi sumber terapi antioksidan pada fraktur tulang. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bayam merah mampu menurunkan kadar malondialdehida (MDA) sebagai indikator ROS pada tikus wistar jantan model fraktur tulang.

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratories* dengan rancangan *post test only control group design*. Penentuan sampel penelitian menggunakan metode *Simple Random Sampling* dengan jumlah 30 ekor tikus *Rattus novergicus* galur wistar jantan dengan berat 150-200 gram dan umur 2-

3 bulan. Sampel dibagi menjadi lima kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok P1, kelompok P2, dan kelompok P3. Pembuatan tikus model fraktur dilakukan dengan pematahan pada bagian corpus femoris tulang femur dekstra dengan induksi manual dan diberi perlakuan sesuai masing-masing kelompok dengan cara penyondean. Kelompok kontrol positif diberi vitamin C 2mg, kelompok kontrol negatif diberi pelarut *tween 80* 1% sebagai pembanding kelompok perlakuan, dan kelompok perlakuan P1 sampai P3 diberi ekstrak etanol bayam merah dengan dosis berturut-turut 35,4 mg/150gBB, 70,8 mg/150gBB, 141,6 mg/150gBB. Pasca perlakuan selama satu minggu, dilanjutkan dengan terminasi dan pengambilan serum darah untuk mengukur kadar malondialdehida.

Hasil rata-rata dan standar deviasi MDA masing-masing kelompok didapatkan untuk kelompok K(-) sebesar 5.96 ± 0.17 , kelompok K(+) sebesar 3.65 ± 0.35 , kelompok P1 sebesar 4.34 ± 0.18 , kelompok P2 sebesar 4.06 ± 0.28 , kelompok P3 sebesar 3.73 ± 0.11 .

Data hasil rata-rata kadar MDA serum dianalisis persebaran data dan homogenitasnya menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan *Levene's test*. Hasil kedua analisis tersebut menunjukkan bahwa $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil rata-rata kadar MDA serum dianalisis dengan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok dan didapatkan nilai signifikansi $p < 0,001$. Uji lanjutan LSD digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan. Semua kelompok menunjukkan berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif. Kelompok P2 dengan kelompok P1 tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Kelompok P3 dengan kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan signifikan.

Fraktur tulang pada penelitian ini meningkatkan kadar ROS sehingga terjadi stres oksidatif yang ditandai oleh tingginya kadar MDA kelompok kontrol negatif. Uji analisis LSD antara K(-) dengan P1 didapatkan hasil yang signifikan berarti terdapat perbedaan secara bermakna kadar MDA serum, hal ini disebabkan suplai antioksidan yang tinggi dalam ekstrak bayam merah bisa menurunkan kadar MDA

serum yang tinggi pada kelompok K(-). Uji analisis LSD antara P1 dengan P2 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan, berarti kemampuan dosis ekstrak bayam merah kelompok P2 hampir sama dengan kemampuan dosis ekstrak bayam merah kelompok P1 dalam menurunkan kadar MDA serum. Berbeda halnya dengan dosis ekstrak bayam merah kelompok P3, uji analisis LSD antara P1 dengan P3 menunjukkan hasil berbeda signifikan yang berarti kelompok P3 bisa menurunkan kadar MDA serum secara signifikan. Hal ini juga menunjukkan semakin besar dosis ekstrak etanol bayam merah yang diberikan semakin menurunkan hasil rata-rata kadar MDA serum tikus wistar jantan model fraktur.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus Wistar Jantan Model Fraktur". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dr. dr. Aris Prasetyo M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Laksmi Indreswari Sp.B., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. dr. M. Hasan, M.Kes., Sp.OT. selaku penguji I dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si. selaku penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
4. dr. Erfan Efendi Sp.An. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
5. Orang tua saya tercinta, Abi Hilal dan Bunda Siti Cholisoh yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan doa tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
6. Kakak saya Chadli Hakim beserta Adik saya Mahir Habib dan Hasbi Ash Shidieqy atas dukungan, semangat dan motivasinya;
7. Keluarga Niaspala 18 yang tak lekang oleh waktu, Agung Hadiwijaya, Alan Nuri, Angga Kurniawan, Fajar CB, Galang FH, Gamal, Imam Baladin, Jerry GL, Kharisma, Alfath NR, Prasetianto, Ryan DJ, Yoki Yawandi dan Teguh Budiarto.
8. Desi Fitri, Nilna Zaqiatul Ilmi, Farizkya N.K.N., Agatha Ega, Luki Mardianto dan sahabat *Dream Catcher* lainnya, keluarga *Success Story*, keluarga

sepercangkirkopian, keluarga sependakian, 007 Nanas Monik Hooligans, Band Eustachius, dan keluarga NIM 30.

9. Analis Laboratorium Biokimia FK UNEJ dan Laboratorium Biomedik FKG UNEJ.
10. Keluarga besar Ormawa antara lain BEM, UKMO SPARKA, UKMK ARTERI, dan Futsal Universitas Jember.
11. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
12. Keluarga besar angkatan 2014 ELIXIR FK UNEJ.
13. Beberapa teman baik saya Fuad Setiawan, Pratiti Westi, Reni Amalia, Monika Rosyidah, Nastiti Bakti, Fadiah Ulfa.
14. Keluarga Besar Ontong KKN 72 Desa Badean Kecamatan Bangsalsari Jember.
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 29 Januari 2017

Penulis

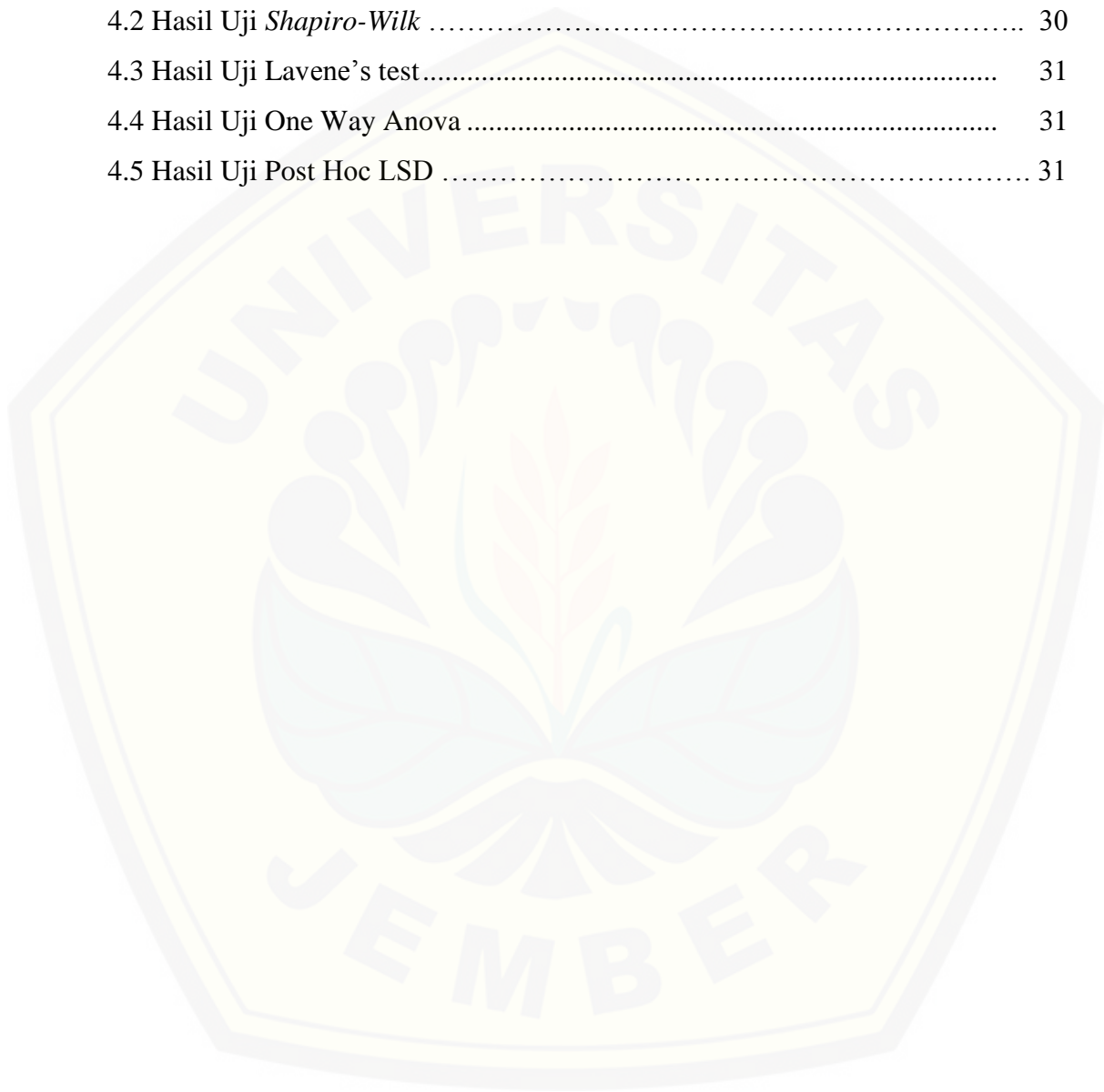
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah... ..	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Fraktur Tulang	4
2.1.1 Diagnosis Fraktur.....	4
2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur.....	5
2.1.3 Prinsip Penanganan Fraktur	6
2.2 Reactive Oxygen Species (ROS)	7
2.2.1 Keterkaitan ROS dalam Fraktur Tulang	9
2.2.2 Malondialdehida (MDA) sebagai Biomarker ROS	10
2.3 Bayam Merah (<i>Amaranthus tricolor L.</i>).....	11
2.3.1 Karakteristik Bayam	11
2.3.2 Antioksidan Bayam Merah	12
2.4 Kerangka Konseptual Penelitian.....	16
2.5 Hipotesis Penelitian.....	18
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19

3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3 Sampel Penelitian	19
3.3.1 Kriteria Sampel Penelitian	19
3.3.2 Jumlah dan Pengelompokan Sampel Penelitian	20
3.4 Rancangan Penelitian	21
3.5 Variabel Penelitian	22
3.5.1 Variabel Bebas	22
3.5.2 Variabel Terikat	22
3.5.3 Variabel Terkendali	22
3.6 Definisi Operasional	22
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	24
3.7.1 Alat Penelitian.....	24
3.7.2 Bahan Penelitian	24
3.8 Prosedur Penelitian	24
3.8.1 Persiapan Sampel Penelitian	24
3.8.2 Randomisasi Sampel Penelitian.....	24
3.8.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba	25
3.8.4 Induksi Fraktur Tulang dan Teknik Pembidaian	25
3.8.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Bayam Merah	25
3.8.6 Perlakuan Hewan Coba.....	25
3.8.7 Prosedur Pemeriksaan MDA	25
3.9 Analisis Data	26
3.10 Alur Penelitian	27
3.11 Uji Kelayakan Etik	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil dan Analisis Data	29
4.2 Pembahasan	33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1 Kesimpulan	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

2.1 Kadar kandungan antioksidan bayam	13
4.1 Rata-rata dan standar deviasi MDA tiap kelompok	29
4.2 Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	30
4.3 Hasil Uji Lavene's test	31
4.4 Hasil Uji One Way Anova	31
4.5 Hasil Uji Post Hoc LSD	31

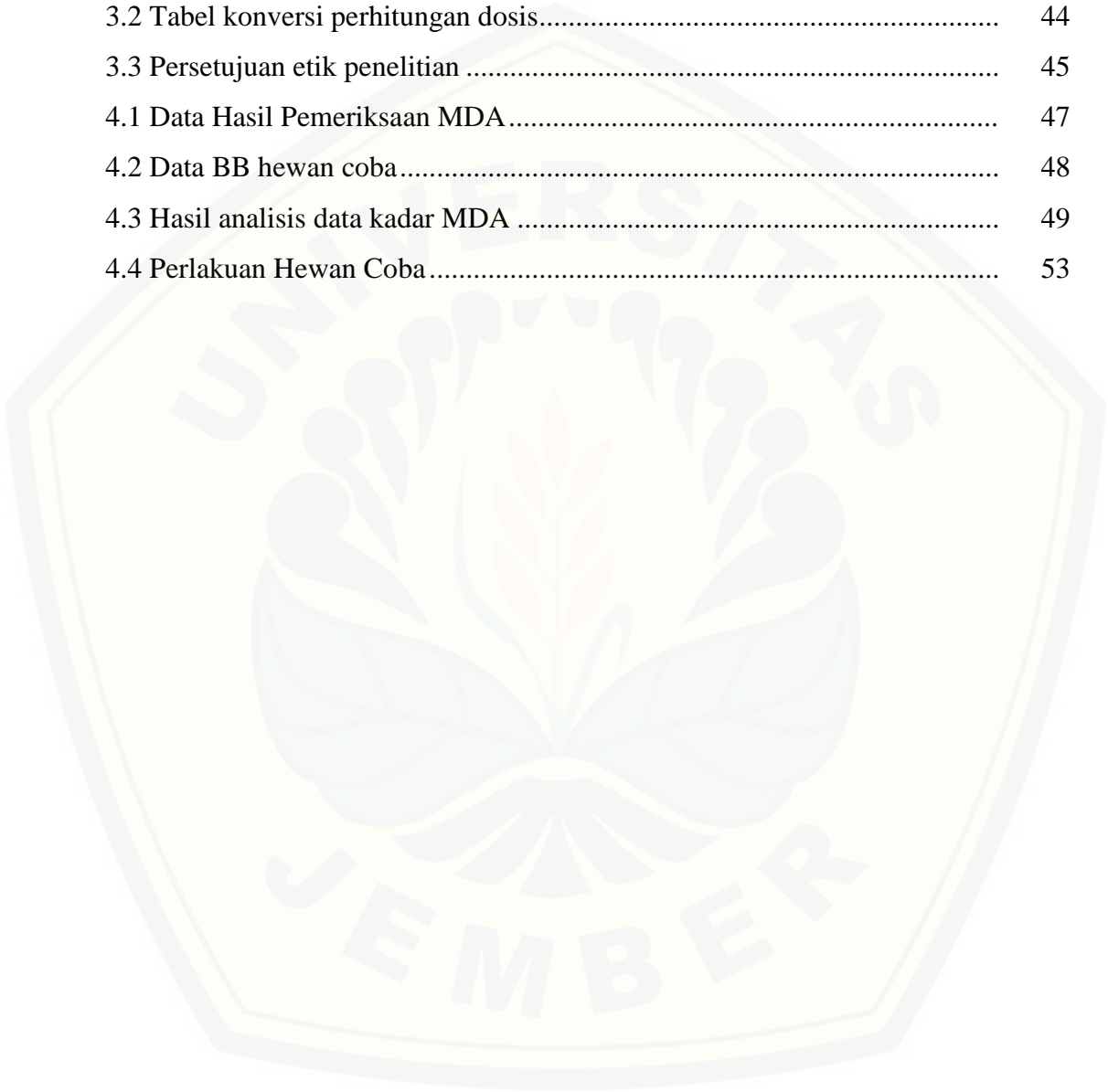


DAFTAR GAMBAR

2.1 Proses Penyembuhan Fraktur.....	6
2.2 Pembidaian cara plaster/ pembalut.....	7
2.3 Struktur elektron dan rumus kimia ROS.....	8
2.4 <i>Amaranthus tricolor L.</i>	12
2.5 Kerangka Konseptual Penelitian.....	15
3.1 Rancangan Penelitian.....	20
3.2 Diagram Alur Penelitian.....	26
4.1 Hasil rontgen tikus yang difraktur.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

3.1 Perhitungan dosis perlakuan	42
3.2 Tabel konversi perhitungan dosis.....	44
3.3 Persetujuan etik penelitian	45
4.1 Data Hasil Pemeriksaan MDA.....	47
4.2 Data BB hewan coba.....	48
4.3 Hasil analisis data kadar MDA	49
4.4 Perlakuan Hewan Coba.....	53



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fraktur tulang merupakan cedera muskuloskeletal dengan angka kejadian cukup tinggi. Kecelakaan lalu lintas menjadi penyebab terbanyak fraktur tulang. Sekitar 46,2% dari kejadian kecelakaan lalu lintas menyebabkan fraktur tulang ekstremitas inferior. Fraktur tulang ekstremitas inferior merupakan jenis fraktur yang paling banyak terjadi (Novelandi, 2010). Penyebab lain dari fraktur tulang ialah kelainan densitas mineral tulang (DMT). DMT tidak normal diperkirakan menimpa sekitar 200 juta orang di berbagai Negara. DMT tidak normal ini meliputi osteoporosis dan osteopenia. Prevalensi penderita osteoporosis dan osteopenia di Indonesia mencapai 10,3% dan 41,8% (Trihapsari, 2009).

Pada fraktur tulang, tulang akan mengalami mekanisme penyembuhan fraktur secara alami. Mekanisme ini meliputi lima tahapan, yaitu fase hematoma, proliferasi sel-sel osteogenik, pembentukan kalus, konsolidasi, dan remodeling (Solomon *et al*, 2010).

Dalam proses penyembuhan fraktur tersebut terdapat beberapa hal yang menghambat, yaitu peningkatan radikal bebas, baik *reactive oxygen species* (ROS) maupun *reactive nitrogen species* (RNS) pada jaringan tulang yang rusak. Kadar ROS yang meningkat pada jaringan tulang yang fraktur dapat menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif ini terjadi akibat jumlah antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh tidak mampu menekan kadar radikal bebas yang terbentuk secara masif. Hal ini akan menyebabkan inhibisi dari proliferasi sel osteoblas, supresi fungsi sel osteoklas untuk degenerasi sel yang mati, dan mempengaruhi regenerasi sel melalui kerusakan DNA dan membran sel, sehingga, stres oksidatif dapat menghambat proses penyembuhan fraktur tulang (Cadenas dan Packer, 2002). Proses yang berlangsung saat kerusakan akibat ROS terjadi ialah peroksidasi lipid (Sheweita dan Khoshhal, 2007). Tingkat peroksidasi lipid diketahui dengan mengukur produk yang paling banyak dihasilkan, yaitu

malondialdehida (MDA) (Nurmasari, 2013). Oleh karena itu, perubahan kadar MDA dapat menunjukkan adanya perubahan aktivitas ROS.

Stres oksidatif yang terjadi pada fraktur tulang tersebut dapat diatasi dengan suplai antioksidan dari luar tubuh, salah satunya dengan antioksidan alami. Antioksidan alami dapat diperoleh dari hasil ekstraksi bahan alam yang diisolasi dari tumbuhan. Indonesia sebagai Negara yang beriklim tropis kaya akan tanaman yang berkhasiat bagi kesehatan manusia. Bayam merah atau *Amaranthus tricolor L.* memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi. Dalam 100 g bayam merah terkandung 0,485 mg flavonoid (Rajalakshmi *et al.*, 2011). Flavonoid sebagai antioksidan tidak hanya berperan sebagai *radical scavenger*, namun juga berperan sebagai *chelating ion* logam sehingga kerusakan sel akibat radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi hidropersida (H_2O_2) dengan ion logam dapat diredam (Mc Dowell *et al.*, 2007). Potensi antioksidan bayam merah diketahui telah jauh melampaui seledri dan daun rosella (Wiyasihati *et al.*, 2016). Bagian dari bayam merah yang paling banyak mengandung flavonoid adalah daun. Daun bayam merah diproses lebih lanjut melalui ekstraksi menggunakan pelarut etanol yang membuat flavonoid lebih mudah larut di dalamnya.

Dari hasil penelitian Diyansah (2014), pemberian ekstrak etanol kakao berpengaruh terhadap kadar MDA serum maupun tulang saat proses penyembuhan fraktur pada tikus wistar jantan model fraktur tulang. Kadar MDA serum dan tulang menurun setelah pemberian ekstrak etanol kakao. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Fridayanti (2014), pemberian ekstrak etanol kakao yang mengandung antioksidan polifenol pada tikus wistar jantan model fraktur menunjukkan bahwa terdapat penurunan kadar MDA jaringan tulang dan peningkatan jumlah osteoblas. Pada penelitian tersebut terdapat hubungan yang kuat antara kadar MDA jaringan tulang dengan jumlah osteoblas, dimana semakin rendah kadar MDA jaringan tulang, semakin tinggi jumlah osteoblas yang terbentuk pada jaringan tulang yang difraktur.

Hingga saat ini belum ada penelitian tentang potensi efek antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol bayam merah terhadap kadar malondialdehida (MDA) saat proses penyembuhan fraktur tulang. Berdasarkan pemaparan diatas

peneliti tertarik untuk meneliti tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) terhadap proses penyembuhan fraktur tulang dengan meningkatkan kadar antioksidan dengan mengukur kadar MDA pada tikus wistar jantan model fraktur tulang.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang didapat yaitu apakah terdapat efek pemberian ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus Tricolor L.*) terhadap kadar malondialdehida serum tikus wistar jantan model fraktur?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus Tricolor L.*) terhadap penurunan kadar MDA serum pada tikus wistar jantan model fraktur tulang.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi berbagai pihak antara lain:

- a. Sebagai data acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai potensi ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus Tricolor L.*) dalam mempercepat penyembuhan fraktur tulang.
- b. Memberikan pengetahuan baru bagi perkembangan penelitian selanjutnya terutama dalam bidang ortopedi atau ilmu di bidang lainnya khususnya yang berhubungan dengan peran ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus Tricolor L.*) sebagai terapi nutrisi maupun pendukung penyembuhan fraktur tulang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fraktur Tulang

Fraktur merupakan pemecahan suatu bagian, pecah, atau ruptur khususnya pada tulang (Dorland, 2008). Secara garis besar, fraktur disebabkan oleh tiga hal, yakni cedera, stress yang berulang, dan penyakit seperti menurunnya densitas tulang (Solomon *et al.*, 2010).

Jenis fraktur tulang berdasarkan bentuk patahannya dapat dibedakan menjadi fraktur komplit dan inkomplit. Fraktur inkomplit meliputi sebagian retakan yang hanya terjadi pada sebelah sisi tulang. Sedangkan fraktur komplit memiliki gambaran berupa garis fraktur yang memotong seluruh tulang. Berdasarkan lokasinya, fraktur tulang dapat terjadi di area proksimal, medial, maupun distal tulang (Mahartha, 2013).

2.1.1 Diagnosis Fraktur

Anamnesis dan pemeriksaan fisik merupakan prosedur vital untuk menegakkan diagnosis fraktur tulang. Anamnesis berguna untuk menggali riwayat trauma yang dapat menjelaskan mekanisme fraktur, ada atau tidaknya kejadian fraktur sebelumnya, riwayat pekerjaan, obat-obatan yang pernah dikonsumsi, dan kondisi sosial ekonomi dari pasien (Mahartha, 2013).

Selain itu, pemeriksaan fisik juga harus dilakukan dengan mengacu pada tiga hal penting, yakni inspeksi adanya bengkak dan deformitas (angulasi, rotasi, pemendekan, dan pemanjangan). Hal kedua yang penting dilakukan adalah palpasi untuk menentukan derajat dan lokasi nyeri tekan dan krepitasi. Palpasi juga berguna untuk menguji sensasi dan pulsasi bagian distal dari fraktur. Hal ini mengingatkan bahwa struktur di sekitar tulang terdiri dari struktur neuromuskulovaskular (Mahartha, 2013).

Pemeriksaan kemampuan gerak menjadi poin penting ketiga untuk menilai apakah terdapat keterbatasan gerak sendi yang berdekatan dengan lokasi fraktur

(Mahartha,2013). Selain itu, pemeriksaan pergerakan juga untuk menilai adanya *false movement* yang berupa pergerakan antara dua sisi fragmen tulang yang patah dan hal ini menjadi ciri khas fraktur.

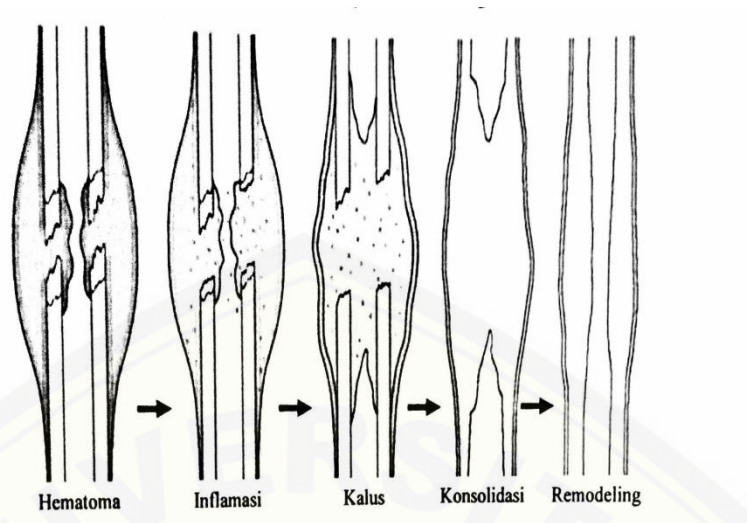
Pemeriksaan fisik juga harus melingkupi vaskularitas dari ekstremitas termasuk warna, suhu, perfusi, perabaan denyut nadi, *capillary return* (normalnya < 3 detik) dan *pulse oximetry*. Pemeriksaan neurologi yang detail juga harus merepresentasikan fungsio sensoris dan motoris (Buckley R., 2017).

2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur

Tulang yang fraktur mampu mengalami mekanisme penyembuhan secara alami. Uraian tersebut antara lain fase hematoma, proliferasi sel-sel osteogenik, pembentukan kalus, konsolidasi, dan remodeling (Solomon *et al.*, 2010).

Pada fase hematoma terjadi perdarahan dan kerusakan jaringan tulang di area fraktur. Selanjutnya dalam waktu 8 jam pertama pasca fraktur terjadi reaksi inflamasi akut dengan migrasi sel-sel inflamasi. Pada fase inflamasi juga berlangsung tahap awal proses proliferasi dan diferensiasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) dari periosteum. MSCs selanjutnya berubah menjadi sel-sel osteogenik seperti osteoblas dan osteoklas pada awal fase kalus. Sel-sel osteogenik ini mulai memformasi tulang baru dan meresorpsi fragmen-fragmen fraktur hingga membentuk tulang imatur (*woven bone*). Dalam waktu beberapa minggu, *woven bone* mengisi celah di area fraktur sehingga tulang kembali menyatu.

Tahapan dilanjutkan pada fase konsolidasi. *Woven bone* berubah menjadi tulang *lamellar* sehingga area fraktur semakin menyatu secara rigid. Akhirnya pada fase remodeling, tulang yang solid ini diubah mendekati bentuk normal kembali melalui keberlanjutan proses resorpsi dan formasi (Solomon *et al.*, 2010).

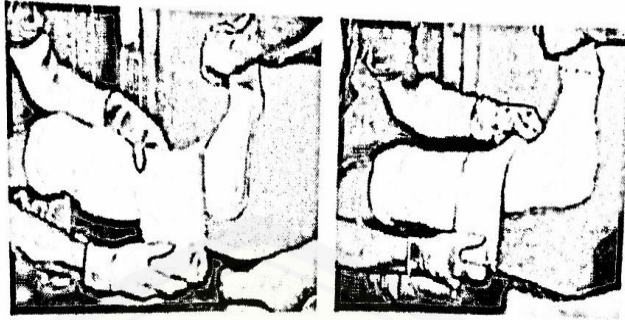


Gambar 2.1 Proses Penyembuhan Tulang (Solomon *et al.*, 2010)

2.1.3 Prinsip Penanganan Fraktur

Prinsip penanganan pada manajemen fraktur tertutup meliputi prinsip reduksi, mempertahankan reduksi (*holding reduction*), dan latihan. Mekanisme reduksi yaitu mengembalikan posisi patahan tulang sebisa mungkin seperti posisi semula. Metode reduksi ada dua macam, yaitu reduksi secara tertutup dan terbuka. Reduksi tertutup mempunyai tiga macam manuver yaitu penarikan segmen distal fraktur hingga sejajar dengan garis normal tulang, disimpaksi, dan menekan (*pressing*) fragmen fraktur ke posisi tereduksi. Selain itu, tipe reduksi terbuka dilakukan melalui cara operatif. Metode reduksi terbuka dilaksanakan apabila manajemen reduksi tertutup gagal atau terdapat fragmen articular yang membutuhkan pengaturan posisi yang akurat (Solomon *et al.*, 2010).

Setelah reduksi, penanganan dapat berlanjut pada *holding reduction* untuk mempertahankan posisi reduksi selama waktu penyembuhan. Metode *holding reduction* dapat dilakukan secara tertutup ataupun terbuka melalui cara operasi. Teknik ini meliputi traksi, bidai balut, dan fiksasi eksternal maupun internal.



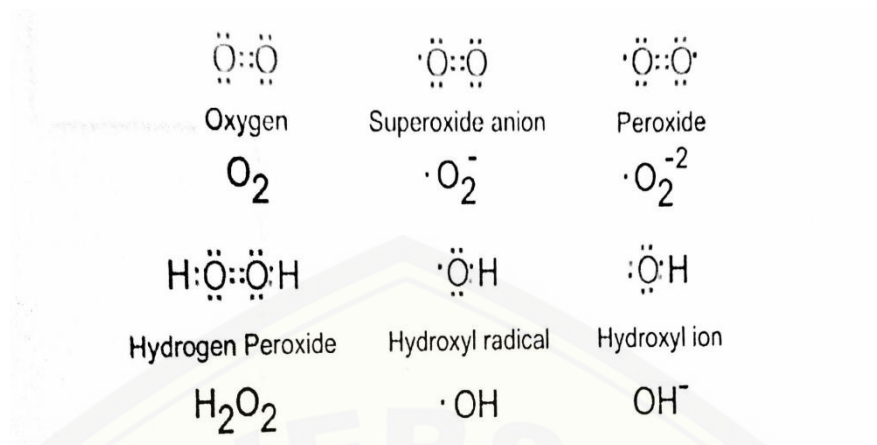
Gambar 2.2 Pembidaian cara plaster/ pembalut (Solomon *et al.*, 2010)

Prinsip terakhir ialah latihan atau *exercise*. Tujuan dari latihan adalah mencegah oedema yang hampir tidak bisa terelakkan terjadi setelah fraktur. Selain itu, latihan berguna untuk memelihara pergerakan persendian, menjaga kekuatan otot, dan memandu pasien agar mampu kembali melakukan aktivitas normal. Latihan ini meliputi evaluasi tungkai yang fraktur, latihan aktif, hingga pelatihan untuk melakukan aktivitas fungsional seperti berjalan, mandi, berpakaian, dan memegang peralatan makanan (Solomon *et al.*, 2010).

2.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species(ROS) secara sederhana mengacu pada molekul reaktif yang berasal dari oksigen. ROS memiliki beberapa macam bentuk, antara lain ion radikal bebas dan non-radikal bebas. Tipe radikal bebas terdiri dari anion superoksida dan radikal hidroksil. Sedangkan tipe non-radikal bebas ialah hidrogen peroksida (Bolisetty dan Jaimes, 2013).

Anion superoksida bersifat tidak terlalu merusak, tetapi dapat membentuk hidrogen peroksida yang berperan dalam pembentukan radikal hidroksil. Radikal hidroksil merupakan ion radikal bebas yang paling reaktif dan bertanggung jawab besar dalam efek sitotoksik ROS (Bolisetty dan Jaimes, 2013). Radikal hidroksil juga dapat bereaksi dengan hampir seluruh struktur biomolekuler. Hidrogen peroksida dapat menjadi sumber pembentuk radikal hidroksil (Nurmasari, 2013).



Gambar 2.3 Struktur elektron dan rumus kimia ROS (Nurmasari, 2103)

ROS memiliki peran penting dalam fungsi biologis apabila diproduksi dalam jumlah normal. Fungsi ROS antara lain membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur setelah ROS yang berupa H_2O_2 tersebut dihasilkan oleh leukosit. Fungsi lainnya ialah mengatur pertumbuhan sel. Di sisi lain, ROS yang terus bertambah di atas normal dapat menimbulkan kerusakan DNA ataupun sel.

Efek destruktif dari ROS tersebut dikenal sebagai stres oksidatif. Stres oksidatif yang terjadi pada DNA bisa menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga bisa terjadi mutasi dan sitotoksitas (Daulay, 2011).

Sedangkan stres oksidatif yang menyerang sel dapat menimbulkan kerusakan membran sel. Salah satu cara ROS merusak membran sel ialah menginisiasi peroksidasi lipid pada membran sel. Peroksidasi lipid yang terus berlangsung secara berantai akan mempengaruhi struktur dan fungsi membran sel (Daulay, 2011).

2.2.1 Keterkaitan ROS dalam Fraktur Tulang

Ketika fraktur tulang terjadi, maka timbul proses mekanisme penyembuhan tulang. Saat fase inflamasi, komponen inflamasi seperti sitokin, leukosit terutama neutrofil, dan komponen lainnya akan bermigrasi ke area fraktur. Tujuannya adalah menstimulasi diferensiasi dan proliferasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) menjadi sel osteogenik seperti osteoblas dan osteoklas. Di sisi lain, komponen

inflamasi ini juga dapat menginduksi peningkatan ROS di area fraktur. Jika ROS meningkat melebihi kemampuan antioksidan dalam menangkalnya, maka kondisi ini berpotensi menyebabkan aktivitas sel pembentuk tulang baru menjadi terhambat (Corbett, 1999). Hal ini juga dapat berkaitan dengan pengaruh ROS yang menjadikan aktivitas osteoklas meningkat (Sheweita dan Khosshal, 2007).

Stres oksidatif dapat terjadi pada kondisi fraktur. Radikal bebas dalam tubuh dihasilkan dari aktivitas fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta aktivitas osteoklas dalam penyembuhan fraktur. Stres oksidatif ini terjadi bila jumlah radikal bebas tidak diimbangi dengan jumlah antioksidan yang mengurangi radikal bebas tersebut (Sheweita dan Khosshal, 2007).

“Apabila stres oksidatif tidak dapat ditangani, radikal bebas akan mempengaruhi mekanisme penyembuhan fraktur tulang dalam tubuh. Radikal bebas yang terkandung dalam RNS, memiliki beberapa jenis, salah satunya adalah NO yang dalam jumlah normal berperan dalam penyembuhan fraktur karena memediasi terjadinya vasodilatasi dan proliferasi vaskuler dalam pembentukan kalus. Selain NO, peningkatan aktivitas dari iNOS menyebabkan peningkatan dalam jumlah NO. Hal ini menyebabkan inhibisi dari proliferasi dan diferensiasi osteoblas, menginduksi terjadinya apoptosis osteoblas. Selain itu, iNOS dan eNOS juga dapat menyebabkan supresi fungsi osteoklas untuk mendegenerasi sel yang mati” (Fridayanti, 2014).

Sedangkan radikal bebas yang lainnya, yakni senyawa yang terkandung dalam ROS dapat mempengaruhi proses penyembuhan fraktur, khususnya dalam regenerasi sel. Selain itu, ROS juga memediasi proses peroksidasi lipid, yang apabila terjadi ketidakseimbangan dalam proses terminasi, dapat menginisiasi terbentuknya senyawa radikal yang reaktif dan toksik. Hal ini akan mengaktifkan mediator inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan pada lipoprotein dan berakhir pada disfungsi atau kerusakan sel. Oleh karena itu, jumlah ROS yang meningkat akan menjadi penghambat dari regenerasi sel dalam proses penyembuhan fraktur (Cadenas dan Packer, 2002).

Akibat dari peningkatan aktivitas osteoklas ialah gangguan mekanisme penyembuhan tulang. Ketidakseimbangan antara penguraian yang lebih intensif daripada pembentukan tulang baru ini dapat memperlama waktu penyembuhan.

2.2.2 Malondialdehida (MDA) sebagai Biomarker ROS

Malondialdehida (MDA) adalah salah satu hasil pemecahan tidak sempurna hidroperoksidase selama peroksidasi lemak tidak jenuh melalui reaksi enzimatik. Dalam proses peroksidasi lemak, peroksida lipid akan dipecah menjadi epoksida, hidrokarbon dan aldehyd. Salah satu aldehyd yang dihasilkan adalah malondialdehida (MDA) (Gurdol, 2008).

MDA digunakan secara luas sebagai salah satu biomarker radikal bebas. Salah satu alasan MDA menjadi indikator radikal bebas sebagai penanda terjadinya stres oksidatif pada fraktur adalah proporsi hasil MDA terhadap proses peroksidasi lipid relatif konstan sehingga dapat digunakan sebagai indikator pengukuran peroksidasi lipid secara *in vivo* (Nugraheni, 2011).

Aktivitas osteoklastik yang meningkat saat fraktur tulang dapat diinterpretasikan dengan tingkat peroksidasi lipid yang terjadi akibat ROS. Oleh karena itu, malondialdehida (MDA) sebagai produk akhir peroksidasi lipid dapat digunakan sebagai biomarker level ROS saat terjadi fraktur tulang. Perubahan kadar MDA menunjukkan adanya perubahan aktivitas radikal bebas (Sheweita dan Khosshal, 2007). Kadar MDA ini meningkat pada hari ke-7 dan hari ke-14 setelah proses fraktur (Gokturk, 1995).

2.3 Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)

2.3.1 Karakteristik Bayam

Bayam merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Asia, khususnya Asia Selatan dan Asia Tenggara (Grubben dan Denton, 2006). Bayam tersebar luas di pulau Jawa dan Pulau Maluku. Bayam *Amaranthus tricolor L.* Dikenal dengan nama yang berbeda-beda di setiap daerah seperti bayam glatik, bayam putih, bayam merah (Jakarta), bayam abrit, bayam sekul, bayam siti (Jawa), jawa lufife, tona ma gaahu, baya roriha, loda kohori (Maluku). Nama lain dari tanaman

ini adalah *Amaranthus genticus* dan *Amaranthus tristis*. Terdapat tiga varietas bayam yang termasuk *Amaranthus tricolor L.* Yaitu bayam hijau biasa, bayam merah (*Blitum rubrum*) yang memiliki batang dan daun berwarna merah, serta bayam putih (*Blitum album*) yang berwarna hijau keputih-putihan. Bayam ini dijual di pasaran dikenal sebagai bayam cabutan atau bayam sekul (Dalimartha, 2005).

Dalam taksonomi, bayam ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub Kelas : Hamamelidae
Ordo : Caryophyllales
Famili : Amaranthaceae
Genus : *Amaranthus*
Spesies : *Amaranthus tricolor L.* (Saparinto, 2013).

Bayam merah berasal dari India (*Indian spinach*). Biasanya tumbuh di ladang, pekarangan rumah, pinggir jalan dan tanah tandus. Dapat tumbuh di ketinggian 1-700 mdpl (Utami, 2008). Tanaman bayam merah memiliki ciri berdaun tunggal, ujungnya meruncing, lunak dan lebar. Batangnya lunak dan berwarna putih kemerah-merahan. Buahnya tidak berdaging, tetapi bijinya banyak, sangat kecil, bulat, dan mudah pecah. Tanaman ini memiliki akar tunggang dan berakar samping. Akar sampingnya kuat dan agak dalam. Tanaman ini berbentuk perdu atau semak. Bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) atau yang biasa disebut bayam cabut atau bayam sekul ada yang berwarna kemerahan (bayam merah) dan ada juga yang berwarna hijau keputih-putihan (bayam putih). Bayam ini berbunga pada ketiak daun (Sunarjono, 2013). Adapun gambar bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 *Amaranthus tricolor L.* (Amornrit & Santiyanont, 2015).

2.3.2 Antioksidan Bayam Merah

Antioksidan adalah substansi yang penting dalam sistem pertahanan tubuh untuk melawan efek merusak dari ROS. Mekanisme antioksidan tubuh menetralkan ROS berlebihan tersebut yaitu melalui cara pemindahan elektronnya pada molekul ROS (Nurmasari, 2013). Berkaitan dengan proses penyembuhan fraktur tulang, keterlibatan ROS dalam jumlah abnormal yang menghambat proses penyembuhan juga memerlukan intervensi berupa antioksidan.

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dikelompokkan menjadi antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen dihasilkan oleh tubuh dan bekerja secara enzimatik melalui proses metabolisme sel. Contoh antioksidan ini ialah *superoxide dismutase* dan *glutathione peroxidase* (Nurmasari, 2013).

Apabila antioksidan endogen tidak dapat mengatasi efek merusak dari ROS, maka penyembuhan fraktur tulang berkadar ROS tinggi memerlukan antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen merupakan antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh (Nurmasari, 2013). Contoh senyawa antioksidan ini yakni flavonoid. Zat ini banyak terkandung pada bayam merah.

Antioksidan merupakan lini pertama sistem pertahanan tubuh terhadap bahaya radikal bebas dengan menyumbangkan elektron dan reduktan. Bayam merupakan sayuran berwarna yang tinggi antioksidan sehingga sangat berpotensi dalam melawan oksidasi terutama radikal bebas yang dapat menurunkan kondisi

kesehatan tubuh (Kemenkes, 2014). Senyawa fotokimia pada daun bayam yang berfungsi sebagai antioksidan adalah flavonoid, vitamin c, beta karoten, dan klorofil. Kadar kandungan antioksidan daun bayam dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kadar kandungan antioksidan daun bayam

Antioksidan	Kandungan per 100g
Flavonoid	485 mg
Vitamin C	80 mg
Beta karoten	11,9 µg
Klorofil	8,8 µg

Sumber: Rajalakshmi *et al.* (2011)

Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) mengandung vitamin A, vitamin B6, vitamin C, klorofil, β -karoten, dan riboflavin (Rajalakshmi *et al.*, 2011). Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) juga mengandung alkaloid, glikosida, flavonoid, tannin, antrakuinon, saponin, minyak volatile, kumarin, sterol, dan triterpen (Al-Dosari, 2010). Studi lain menyebutkan bahwa kandungan dalam daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) terdapat karbohidrat, flavonoid seperti betasianin A dan B, amaranthin, isoamaranthin, quercetin dan beberapa senyawa sterol seperti spinasterol, kolesterol, kampesterol, 24-metilen kolesterol, stigmasterol, sitosterol, fukosterol, dan isofukosterol (Rahamatullah *et al.*, 2013).

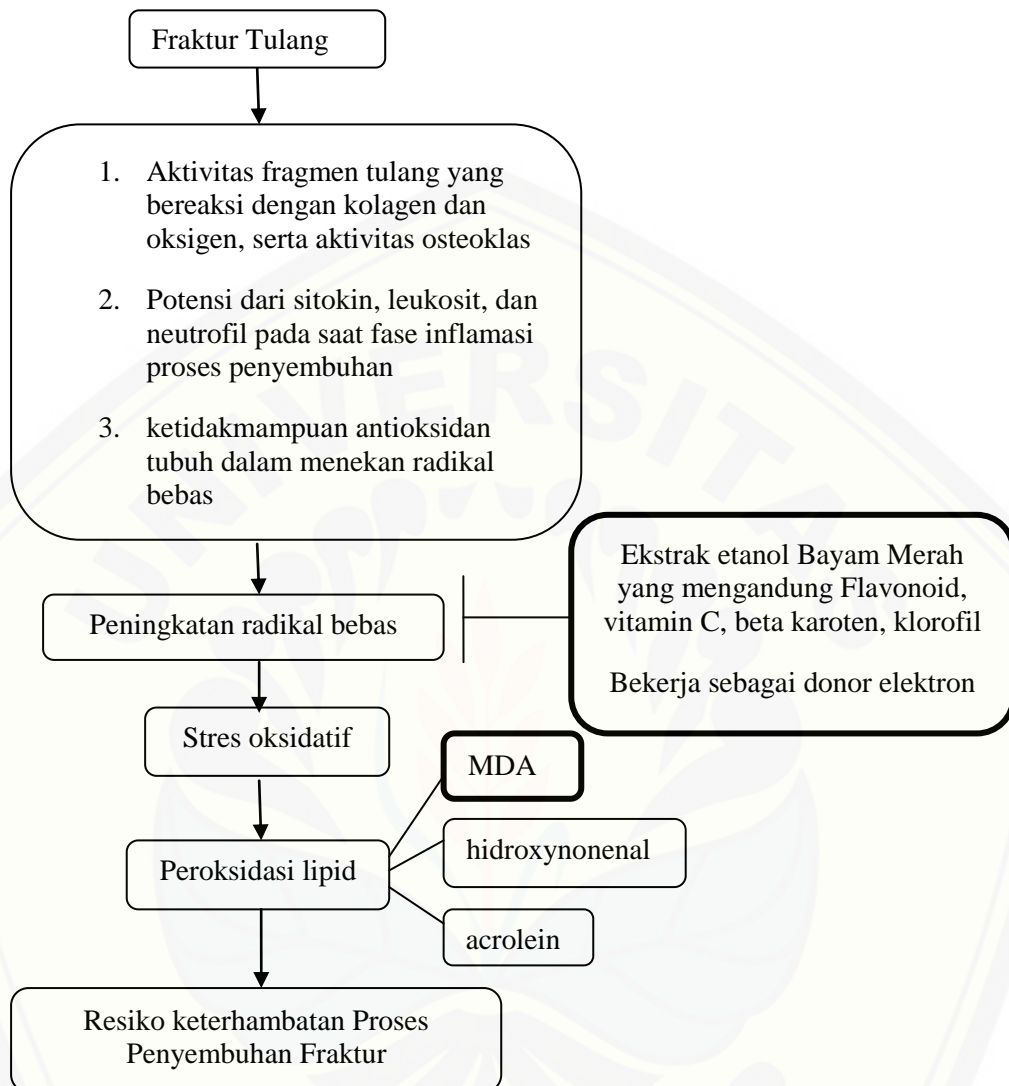
Antioksidan daun bayam merah berperan sebagai penangkap radikal bebas (*radical scavenger*) dengan mendonorkan elektronnya. Flavonoid sebagai antioksidan tidak hanya berperan sebagai *radical scavenger*, namun juga berperan sebagai *chelating ion* logam sehingga kerusakan sel akibat radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi hidroperoksida (H_2O_2) dengan ion logam dapat diredam. Logam transisi seperti Fe dan Cu memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dalam mengkatalisis reaksi redoks tubuh. Flavonoid juga mampu menghambat kerja enzim CYP dalam menghasilkan radikal bebas (Kumar dan Pandey, 2013). Vitamin C sebagai *radical scavenger* mampu menyumbangkan dua elektronnya sehingga terbentuk radikal askorbil yang akan

teroksidasi dan menghasilkan asam dehidroaskorbat (McDowell *et al.*, 2007). Vitamin C dan flavonoid dapat meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), dan glutation (GSH) (Katose *et al.*, 2015). Beta karoten dan klorofil berperan sebagai pemberi pigmen yang kaya akan antioksidan sebagai *radical scavenger*. Beta karoten termasuk dalam vitamin antioksidan yang larut dalam lemak sehingga mampu melindungi membran sel (Mueller dan Boehm, 2011). Klorofil sebagai antioksidan sama halnya dengan flavonoid, tidak hanya berperan sebagai *radical scavenger*, namun juga berperan sebagai *chelating ion* logam (Hsu *et al.*, 2013).

Jenis flavonoid yang terdapat pada daun bayam *Amaranthus tricolor L.* adalah kuersetin dan rutin (Noori *et al.*, 2015). Kuersetin khususnya dikenal sebagai *chelating ion* Fe dengan menstabilkan Fe agar tidak berikatan dengan H_2O_2 membentuk OH^- yang termasuk dalam radikal bebas yang sangat reaktif. Jenis flavonoid lain yang ditemukan pada daun bayam *Amaranthus tricolor L.* adalah katekin (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). Katekin dan rutin memiliki sifat *radical scavenger* yang sangat kuat karena cincin B flavonoid mempunyai gugus katekol dengan radikal *ortho semiquinon* yang stabil untuk mengikat radikal bebas (Kumar dan Pandey, 2013).

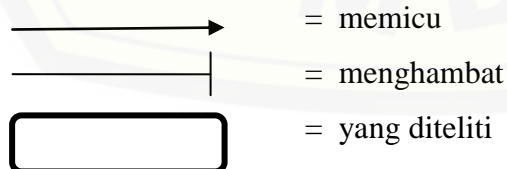
Berdasarkan penelitian Dyahariesti (2016), ekstrak etanol daun bayam merah memiliki nilai IC_{50} 43,4 ppm yang dikategorikan ke dalam antioksidan sangat kuat begitu juga dengan vitamin C sebagai pembanding dengan nilai IC_{50} 6,47 ppm yang dikategorikan juga dalam antioksidan sangat kuat. Hal ini disebabkan oleh kandungan yang terdapat pada tumbuhan daun bayam merah yang terdiri dari flavonoid kuersetin dan vitamin C sebagai antioksidan. Vitamin C merupakan senyawa murni yang memiliki potensi kuat sebagai antioksidan sehingga nilai IC_{50} nya lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak etanol daun bayam merah, sedangkan ekstrak etanol daun bayam merah merupakan campuran dari beberapa macam senyawa. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam daun bayam merah (*Amaranthus Tricolor L.*) dapat sebagai antioksidan kuat, dengan mekanisme menangkap dan menetralkan radikal bebas.

2.4 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.5 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:



Tubuh memiliki mekanisme penyembuhan fraktur tulang secara alami untuk mengembalikan kondisi tulang yang diskontinu. Proses penyembuhan ini bisa dihambat oleh suatu senyawa radikal bebas yang beredar dalam tubuh. Pada kasus

fraktur tulang, radikal bebas dibentuk oleh jaringan tulang yang rusak dan aktivitas fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta aktivitas osteoklas. Hal ini menyebabkan kadar radikal bebas dalam tubuh meningkat secara masif. Peningkatan radikal bebas yang tinggi tidak diimbangi dengan peningkatan jumlah antioksidan endogen dalam tubuh berdampak pada terjadinya stres oksidatif. Hal ini berpotensi mengganggu mekanisme penyembuhan tulang karena sifat radikal bebas yang mampu menghambat kerja sel-sel tulang muda untuk membentuk bakal tulang baru (kalus).

Dalam menangani stres oksidatif, dibutuhkan antioksidan eksogen untuk membantu supresi radikal bebas yang beredar dalam tubuh. Antioksidan ini dapat berasal dari antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol bayam merah.

Flavonoid sebagai antioksidan tidak hanya berperan sebagai penangkap radikal bebas (*radical scavenger*), namun juga berperan sebagai *chelating ion* logam sehingga kerusakan sel akibat radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi hidroperoksida (H_2O_2) dengan ion logam dapat diredam. Logam transisi seperti Fe dan Cu memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dalam mengkatalisis reaksi redoks tubuh. Flavonoid juga mampu menghambat kerja enzim CYP dalam menghasilkan radikal bebas. Vitamin C sebagai *radical scavenger* mampu menyumbangkan dua elektronnya sehingga terbentuk radikal askorbil yang akan teroksidasi dan menghasilkan asam dehidroaskorbat. Vitamin C dan flavonoid dapat meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), dan glutathione (GSH). Beta karoten dan klorofil berperan sebagai pemberi pigmen yang kaya akan antioksidan sebagai *radical scavenger*. Beta karoten termasuk dalam vitamin antioksidan yang larut dalam lemak sehingga mampu melindungi membrane sel. Klorofil sebagai antioksidan sama halnya dengan flavonoid, tidak hanya berperan sebagai *radical scavenger*, namun juga berperan sebagai *chelating ion* logam.

Biomarker yang ditinjau sebagai parameter penilaian tingkat radikal bebas adalah MDA. Peningkatan radikal bebas yang menstimulasi peningkatan kadar MDA ini yang berpeluang besar menyebabkan hambatan proses penyembuhan fraktur. Oleh karena itu, adanya terapi nutrisi yang berbasis ekstrak etanol bayam

merah ini diharapkan mampu mensupresi radikal bebas ditinjau dari kadar MDA supaya bisa membantu proses penyembuhan fraktur tulang.

2.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini ialah pemberian ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) berpengaruh dalam menurunkan kadar MDA serum tikus wistar jantan model fraktur tulang.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni (*true experimental laboratories*) dan rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* yaitu dengan melakukan pengukuran sesudah perlakuan diberikan dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat, yaitu di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan tikus, penyondean ekstrak etanol bayam merah, pengambilan sampel darah, dan pembedahan tikus. Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeriksaan MDA serum. Waktu pelaksanaan penelitian ini adalah Desember 2017.

3.3 Sampel Penelitian

3.3.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Kriteria inklusi dari sampel penelitian ini adalah tikus jantan, berat badan 150-200 gram, usia 2-3 bulan, dan sehat.
- b. Kriteria eksklusi dari sampel penelitian ini adalah tikus yang sakit dan mati pada saat penelitian.

3.3.2 Penentuan Jumlah Sampel Penelitian

Rumus yang digunakan pada penelitian ini untuk menghitung besar sampel minimal adalah :

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{\alpha^2}$$

Keterangan :

n = besar sampel minimum

Z = nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu (α) ; jika $\alpha = 0,05$ maka nilai Z = 1,96 (2-tailed) dan Z = 1,64 (1-tailed)

σ = standar deviasi penelitian sejenis

α = kesalahan yang masih ditoleransi

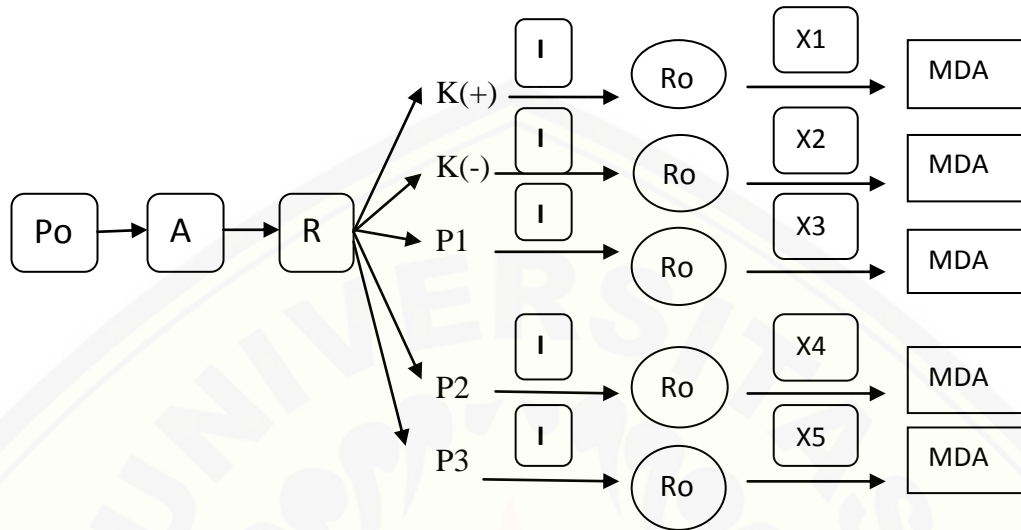
(Higgins, 1985)

Pada rumus besar sampel minimal nilai σ atau standar deviasi penelitian sejenis adalah 1,96. Sehingga didapat penghitungan sebagai berikut

$$\begin{aligned} n &= \frac{(1,96)^2(1,96)^2}{(0,05)^2} \\ &= 5,898 \sim 6 \end{aligned}$$

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah sampel minimal adalah 6 sampel tulang femur tikus wistar jantan. Maka total sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 sampel tulang femur tikus wistar jantan yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok penelitian, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).

3.4 Rancangan Penelitian



Keterangan:

Po : populasi tikus

A : adaptasi tikus

R : randomisasi

K(+): kelompok kontrol positif

K(-): kelompok kontrol negatif

P1 : kelompok perlakuan 1

P2 : kelompok perlakuan 2

P3 : kelompok perlakuan 3

I : induksi fraktur tulang

X1 : perlakuan dengan pemberian aquadest peroral

X2 : perlakuan dengan pemberian aquadest peroral

X3 : perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah (dosis 35,4 mg/150gBB) peroral

X4 : perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah (dosis 70,8 mg/150gBB) peroral

- X5 : perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah (dosis 141,6 mg/150gBB) peroral
- Ro : Foto Rontgen
- MDA : pengukuran malondialdehida serum

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol bayam merah pada kelompok P1 dengan dosis 35,4mg/150gBB, pada kelompok P2 dengan dosis 70,8mg/150gBB, pada kelompok P3 dengan dosis 141,6mg/150gBB.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar malondialdehida serum tikus wistar jantan.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini meliputi umur hewan coba, berat badan hewan coba, jenis kelamin dan galur hewan coba, waktu dan lama perlakuan hewan coba, pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba, dan induksi fraktur dan pembidaian tulang pada wistar.

3.6 Definisi Operasional

- a. Bayam merah yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari petani Dusun Manggis Desa Sukorambi Kecamatan Sukorambi Kabupaten Jember. Bayam merah yang dibeli sebanyak 3,2 kg. Bayam merah segar tersebut dipisahkan daun dan batangnya. Selanjutnya daun bayam merah dijemur di bawah sinar matahari selama 3 hari atau sampai kering, kemudian setelah daun bayam merah benar-benar kering dihaluskan menggunakan selep hingga menjadi serbuk halus. Kemudian serbuk daun bayam merah diekstrak

menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Maserasi ekstrak etanol daun bayam merah dilakukan selama 72 jam, selanjutnya filtrat dipisahkan dengan ampasnya dengan disaring menggunakan kertas saring. Ampas disimpan dan dapat digunakan ulang maksimal tiga kali. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai pelarut etanol 96% menguap dan diperoleh ekstrak semi kental. Ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) diberikan kepada tikus wistar jantan selama 7 hari dengan dosis sebesar 35,4 mg/150gBB ; 70,8 mg/150gBB ; dan 141,6 mg/150gBB dilarutkan ke 1% *tween* 80 lalu disondekan secara peroral dengan volume sesuai berat badan per tikus.

Perhitungan dosis dan volume pemberian ekstra etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) disesuaikan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Wuri (2016) tentang penelitian sejenis yang mengatakan bahwa dosis efektif ekstrak daun bayam merah untuk mencit (*Mus musculus*) adalah 6,75 mg/20grBB lalu dikonversikan ke tikus wistar dan disesuaikan dengan berat badan tikus dan dengan volume maksimal pemberian per oral tikus menurut Suhardjono (1994). Skala pengukuran ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) termasuk skala nominal. Sebelum diekstraksi, bayam merah dilakukan identifikasi tanaman.

- b. Malondialdehida (MDA) merupakan nilai biomarker ROS. MDA diukur dari sampel serum darah wistar. Analisis MDA dapat dilakukan dengan uji TBA (*thiobarbituric acid*). Prinsip uji TBA yaitu MDA bereaksi dengan TBA pada kondisi asam (pH 2-3) dan suhu 97-100°C, sehingga membentuk kromofor merah muda dengan absorbansi maksimal pada panjang gelombang λ 532 nm (Permatasari *et al*, 2012).
- c. Jenis fraktur tulang dalam penelitian ini adalah fraktur tertutup. Induksi fraktur tulang dilakukan dengan cara pematahan tulang femur dekstra wistar. Pematahan dilakukan setelah diawali dengan proses anestesi wistar dengan menggunakan kombinasi ketamin dan xylazine dosis 75-100 mg/kgBB dan 5-10 mg/kgBB secara intramuskular. Pematahan dilakukan secara terukur dengan kompresi manual pada semua sampel penelitian.

- d. Bidai yang digunakan adalah leukodur. Prosedur pembidaianya diawali dengan membasahi leukodur dengan air, kemudian dilanjutkan dengan membalutkannya pada tulang femur tikus wistar jantan.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, *freezer*, neraca ohaus, neraca statistik, evaporator, klem anatomis, sonde lambung, spuit sonde, gunting, pinset, mortal, vorteks, waterbath, sentrifuge, pipet, tip, dan spektrofotometer.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain pakan wistar, air, sekam, daun bayam merah, larutan hexan, larutan etanol, ketamin, xylazine, gips leukodur, plester, tabung darah, mikrotube, pipet, mikropipet, TCA 10%, HCl, dan TBA 0,67%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Sampel Penelitian

Pada awal penelitian dilakukan pemilihan tikus putih wistar jantan sebanyak 30 ekor, lalu disiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 30 cm dengan jumlah tikus sebanyak 3 ekor dalam satu kandang, tikus diadaptasi dengan diberikan pakan standar dan minum akuades *ad libitum* selama 7 hari. Berat badan tikus ditimbang untuk memantau perkembangan tikus sebelum dilakukan penelitian. Setelah dilakukan adaptasi selama 7 hari, lalu tikus dilakukan penimbangan lagi dan dilakukan randomisasi.

3.8.2 Randomisasi Sampel Penelitian

Randomisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Simple Random Sampling*. 30 ekor tikus ditambah 6 ekor tikus cadangan dibuatkan nomor undian dari 1 sampai 30. Selanjutnya nomor undian tersebut dimasukkan ke dalam kotak

lalu dikocok. Kemudian nomor undian diambil satu per satu untuk diberikan ke setiap tikus tanpa mengembalikannya ke dalam kotak lagi. Setelah berakhir pada nomor 30 maka undian telah selesai. Sesuai dengan kelipatan enam, sampel yang didapatkan dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol positif (+), kelompok kontrol negatif (-), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).

3.8.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Ada lima kelompok yang dibagi sesuai perlakuan masing-masing, antara lain kelompok kontrol positif dengan pemberian vitamin C dosis 2 mg, kelompok kontrol negatif dengan pemberian *tween 80* 1%, kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah 35,4 mg/150g BB, kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah 70,8 mg/150g BB, dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol bayam merah 141,6 mg/150g BB.

3.8.4 Induksi Fraktur Tulang dan Teknik Pembidaian

Proses pematihan diawali dengan anestesi menggunakan kombinasi ketamin dan xylazine dosis 75-100 mg/kgBB dan 5-10 mg/kgBB secara intramuskular. Proses pematihan dilakukan pada bagian corpus femoris tulang femur dekstra wistar dengan cara paha tikus dipasang klem anatomis dahulu di dekat proksimal femur. Setelah itu dipatahkan dengan induksi manual menggunakan dua tangan. Pengecekan apakah telah terjadi fraktur dengan cara *look, feel, and move* serta adanya *false movement*. Pembidaian tulang yang fraktur dilakukan dengan gips leukodur.

3.8.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Bayam Merah

Daun bayam merah dijemur di bawah sinar matahari selama 3 hari atau sampai kering, kemudian setelah daun bayam merah benar-benar kering dihaluskan menggunakan selep hingga menjadi serbuk halus. Kemudian serbuk daun bayam merah diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Maserasi ekstrak etanol daun bayam merah dilakukan selama 72 jam,

selanjutnya filtrat dipisahkan dengan ampasnya dengan disaring menggunakan kertas saring. Ampas disimpan dan dapat digunakan ulang maksimal tiga kali. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai pelarut etanol 96% menguap dan diperoleh ekstrak semi kental.

3.8.6 Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan sampel penelitian dimulai setelah tikus diadaptasi selama 7 hari. 30 tikus yang sudah diadaptasi, kemudian ditimbang berat badannya (150-200 gram). Kemudian 30 tikus tersebut dibagi menjadi 5 kelompok (K(+), K(-), P1, P2, dan P3). Setelah dilakukan pengelompokan, sampel penelitian diberi tanda menggunakan spidol untuk membedakan tikus pada masing-masing kelompok. Setiap tikus pada masing-masing kelompok dihitung berat badannya setiap hari sebagai panduan pemberian dosis sediaan ekstrak etanol bayam merah dan untuk membandingkan berat badan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Masing-masing kelompok diberi perlakuan selama 7 hari dengan harapan telah terjadi proses remodeling tulang yang ditandai dengan proses resorpsi telah selesai, kemudian digantikan dengan proses pembentukan tulang. Pemberian sediaan ekstrak etanol bayam merah untuk kelompok perlakuan, pemberian vitamin C 2mg untuk kelompok kontrol positif, dan pemberian *tween* 80 1% untuk kelompok kontrol negatif, masing-masing diberikan satu kali sehari secara peroral dengan sonde lambung agar perlakuan antar kelompok sama.

3.8.7 Prosedur pemeriksaan MDA

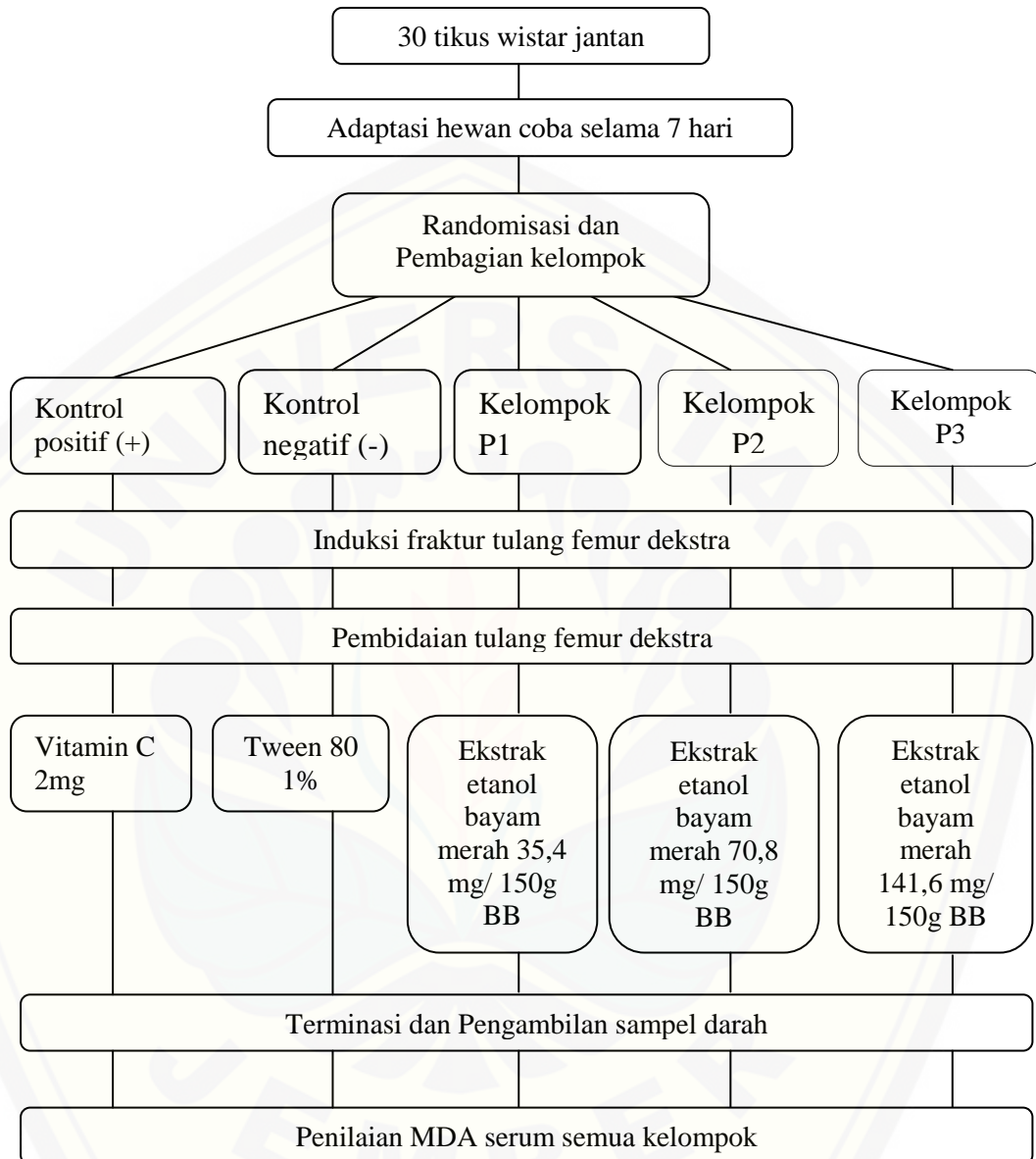
Seluruh sampel diterminasi pada hari ke 7 dan diambil darah intrakardial 3 ml. Selanjutnya darah dimasukkan tabung EDTA dan disimpan dalam *ice box*. Seluruh sampel darah disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Lalu diambil serum 100 μ dan ditambahkan TCA 10% sejumlah 200 μ . Kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* 5 menit, lalu disentrifuge dingin dengan suhu kamar selama 5 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Setelah itu diambil supernatan 200 μ dari setiap sampel, ditambahkan TBA 0,67% sejumlah 200 μ . Semua larutan campuran dari awal ditaruh dalam mikrotube dan direbus selama 60 menit suhu

100° C. Kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 535nm. Hasil absorbansi dikonversikan ke skala MDA melalui rumus yang diperoleh dari kurva standar.

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene's test*. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji komparatif *One-way Anova* dan dilanjutkan dengan *post hoc test* yaitu dengan *Least Significance Difference* (LSD). Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan homogeny, dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Seluruh teknis pengolahan data dianalisis secara komputerisasi dan juga dibantu perangkat lunak berupa Software Statistical Product and Service Solution 17 PS (SPSS 17 PS).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Diagram alur penelitian

3.11 Uji Kelayakan Etik

Pada pelaksanaan penelitian ini sudah mendapatkan sertifikat kelayakan etik yang bertujuan untuk menjamin keamanan peneliti dan hewan coba serta memperjelas tujuan serta kewajiban peneliti di dalam pelaksanaannya. Penelitian

ini telah disetujui oleh Komisi Etik dengan nomor surat 1.146/H25.1.11/KE/2018 pada tanggal 26 Januari 2018.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol bayam merah terhadap penurunan kadar MDA serum tikus wistar jantan model fraktur.

5.2 Saran

Adapun saran dari penulis sebagai berikut.

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol bayam merah terhadap akselerasi penyembuhan fraktur tulang dengan masa perlakuan yang berbeda-beda pada masing-masing kelompok, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari dengan indikator kadar MDA serum dan jaringan tulang.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol bayam merah sebagai terapi nutrisi pada fraktur tulang berdasarkan uji klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Dosari, M., 2010. The Effectiveness of Ethanolic Extract of *Amaranthus tricolor L.* : a Natural Hepatoprotective Agent. *American Journal of Chinese Medicine*. 38(6): 1051-1064.
- Amornrit, W., dan R. Santiyanont. 2015. Effect of Amaranthus on Advanced Glycation End-products Induced Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Gene Expression in SH-SY5Y Cells. *Molecules* 20: 17288-17308.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Journal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2): 126-136.
- Bolisetty, S. dan Jaimes, E.A. 2013. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci*; 14: 6306-6344.
- Buckley, R. General Principle of Fracture Workup. <http://emedicine.medscape.com/article/1270717-workup> [Diakses pada 11 Oktober 2017].
- Cadenas, E. dan L. Packer. 2002. *Handbook of antioxidant*. 2nd Ed. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc.
- Choi, Eun-Mi dan Jae-Kwan Hwang. 2003. Effect (+)- Catechin on The Function of Osteoblastic Cell. *Bio Pharm Bull*. 26(4): 523-526.
- Corbett, S.A. 1999. Nitric Oxide in Fracture Repair Differential Localisation, Expression And Activity Of Nitric Oxide Synthases. *The Jurnal Of Bone And Joint Surgery*. 81 (3): 531-537.
- Dalimartha, S. 2005. *Tanaman Obat di Lingkungan Sekitar*. Jakarta: Puspa Sehat.
- Daulay, M. 2011. Pengaruh Pemberian Vitamin E terhadap Jumlah, Morfologi, dan Motilitas Sperma serta Kadar Malondialdehyde (MDA) Testis Mencit Jantan Dewasa (Mus musculus L) yang mendapat Latihan Fisik Maksimal. *Tesis*. Medan: Fakultas Kedokteran Univesitas Sumatera Utara.
- Diyansah, A.B. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao*) Terhadap Kadar Malondialdehida Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Dyahariesti, N. 2016. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Bayam (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai Antioksidan dan Penurun Kadar Gula Darah. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4.

- Fadlani, Y.W. 2013. Efektivitas Terapi Perilaku Kognitif Distraksi terhadap Intensitas Nyeri Pasien dengan Fraktur Femur yang Terpasang Traksi di Rumah Sakit Putri Hijau Tingkat II Medan Tahun 2012. *Skripsi*. Medan: Fakultas Keperawatan Universitas Sumatra Utara.
- Fahrurrozi, L. A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Petai Cina (*Leucaenaglauca(L.) Benth.*) dengan Metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). *Katalog Perpustakaan Repository NWU*. 4-7.
- Fridayanti, F.S. 2014. Hubungan antara Kadar Malondialdehida (MDA) dengan Histopatologi Jaringan Tulang pada Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang (Studi Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao*)). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Ghasemzadeh, A., M. Azarifar, O. Soroodi, dan H. Z. E. Jaafar. 2012. Flavonoid Compounds and Their Antioxidant Activity in Extract of Some Tropical Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(13): 2639-2643.
- Gokturk, Turgut, Baycu, Gunai, Saber, Gulbas. 1995. Oxygen-free Radicals Impair Fracture Healing in Rats. *Acta Orthop Scand*. 66(5): 473-475.
- Grubben, G. J. H. dan O. A. Denton. 2006. *Vegetables*. Netherland: Prota.
- Gurdol, Cimsit, Oner-iyidogan, Korpinar, Yalcinkaya dan Kocak. 2008. Early and Late Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Oxidative Stress Parameters in Diabetic Patients. *Physiol Res*. 57(1): 41-47.
- Hsu, C. Y., P. Y. Chao, S. P. Hu, dan C. M. Yang. 2013. The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*. 4:5.
- Katose D. M., S. S. Katyare, M. V. Hedge, dan H. Bae. 2015. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 11(8): 982-991.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Pedoman Gizi Seimbang*. Jakarta: Peraturan Menkes RI.
- Kristyoadi, SA., Napitupulu, O., dan Soemantri, B. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kakao (*Theobroma cacaoL.*) terhadap Jumlah Osteoblas pada Tulang Tibia Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Pasca Ovariektomi. *Skripsi*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoid: an Overview. *Hindawi*. 1-16.

- Mahartha, R.A., Maliawan, S., dan Kawiyaana, K.S. 2013. Manajemen Fraktur pada Trauma Muskuloskeletal. Bali: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- McDowell, L. R., N. Wilkinson, R. Madison, dan T. Felix. 2007. Vitamins and Minerals Functioning as Antioxidants with Supplementation Considerations. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 3-5.
- Mountziaris, Paschalia M, B.S., dan Antonius G. Mikos, Ph.D. 2008. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering: Part B*. 14(2): 179-184.
- Mueller, L. dan V. Boehm. 2011. Antioxidant Activity of β -carotene Compounds in Different *in vitro* assays. *Molecules*. 16: 1055-1069.
- Noori, M., M. Talebi, dan Z. Nasiri. 2015. Seven *Amaranthus L.* (Amaranthaceae) Taxa Flavonoid Compounds from Tehran Province, Iran. *International Journal of Modern Botany*. 5(1): 9-17.
- Notoatmodjo. 2005. *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta
- Novelandi, R. 2010. Karakteristik Penderita Fraktur Rawat Inap di Rumah Sakit Umum Daerah dr. Pringadi Medan Tahun 2009. *Skripsi*. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara.
- Nugraheni, Ellisma Swandini. 2011. *Extracts Giving of Purple Eggplant (Solanum melongena L.) orally Can Lower Blood Serum Levels of Malondialdehyde of White Rat (Rattus Novergicus) Wistar Diabetes Mellitus Induced by Aloxan*. Final Assignment. Malang: Brawijaya University.
- Nurmasari, P.D. 2013. *Peranan Ekstrak Bangle (zingiber cassumunar roxb.) terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang difeksi Plasmodium berghei*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Permatasari, N., Nugrahenny, D., Ferrida. 2012. Analisis Radikal Bebas dan Antioksidan. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Rahmatullah, M., M. Hosain, S. Rahman, M. Akter, F. Rahman, F. Rehana, M. Munmun, M. A. Kalpana. 2013. Antihyperglycaemic and Antinociceptive Activity Evaluation of Methanolic Extract of Whole Plant of *Amaranthus tricolor L.* (Amaranthaceae). *Rahmatullah et al., Afr J Tradit Complement Altern Med*. 10(5): 408-411.
- Rajalakshmi, K., T. Haribabu, dan P. Sudha. 2011. Toxicokinetic Studies of Antioxidant of *Amaranthus tricolor* and Marigold (*Calendula officinalis L.*)

- Plants Exposed to Heavy Metal Lead. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Science*. 1(2): 105-109.
- Saparinto, C. 2013. *Grown Your Own Vegetables Panduan Praktis Menanam Sayuran Konsumsi Populer di Pekarangan*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Sheweita, SA & K.I. Khoshal. 2007. Calcium Metabolism and Oxidative Stress in Bone Fractures: Role of Antioxidants. Scaffold Mesenchymal Cell (Regenerative of Massive Bone Defect with Bovine Hydroxypatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells). *JBP*; 13 (3): 519-525.
- Solomon, L., D. Warwick, dan S. Wayagam. 2010. *Apley's System of Orthopaedics and Fractures, Ninth Edition*. United Kingdom: University of Bristol.
- Suhardjono, D. 1994. *Percobaan Hewan Laboratorium*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sunarjono, H. 2013. *Bertanam 36 Jenis Sayur*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Trihapsari, Enita. 2009. *Faktor-faktor Yang Berhubungan dengan Densitas Mineral Tulang Wanita > 45 tahun di Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta*. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Utami, P. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Wiyasihati, S.I. dan K.W. Wigati. 2016. Potensi Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai Antioksidan pada Toksisitas Timbal yang Diinduksi pada Mencit. *Jurnal FK UNPAD*.48(2): 64.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 3.1 PERHITUNGAN DOSIS PERLAKUAN

1. Ekstrak Bayam Merah

Perhitungan dosis dan volume pemberian ekstra etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) disesuaikan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Wuri (2016) tentang penelitian sejenis yang mengatakan bahwa dosis efektif ekstrak daun bayam merah untuk mencit (*Mus musculus*) adalah 6,75 mg/20grBB lalu dikonversikan ke tikus wistar dan disesuaikan dengan berat badan tikus dan dengan volume maksimal pemberian per oral tikus menurut Suhardjono (1994), yaitu 5 ml. Skala konversi dari mencit 20gr ke tikus 200gr adalah dikali 7 menurut Ngatidjan (1991).

$$6,75 \times 7 = 47,25 \text{ mg/200grBB}$$

Dicari dosis untuk 150gr (kriteria inklusi terendah)

$$X = 47,25 \times \frac{3}{4}$$

$$= 35,4 \text{ mg/150grBB}$$

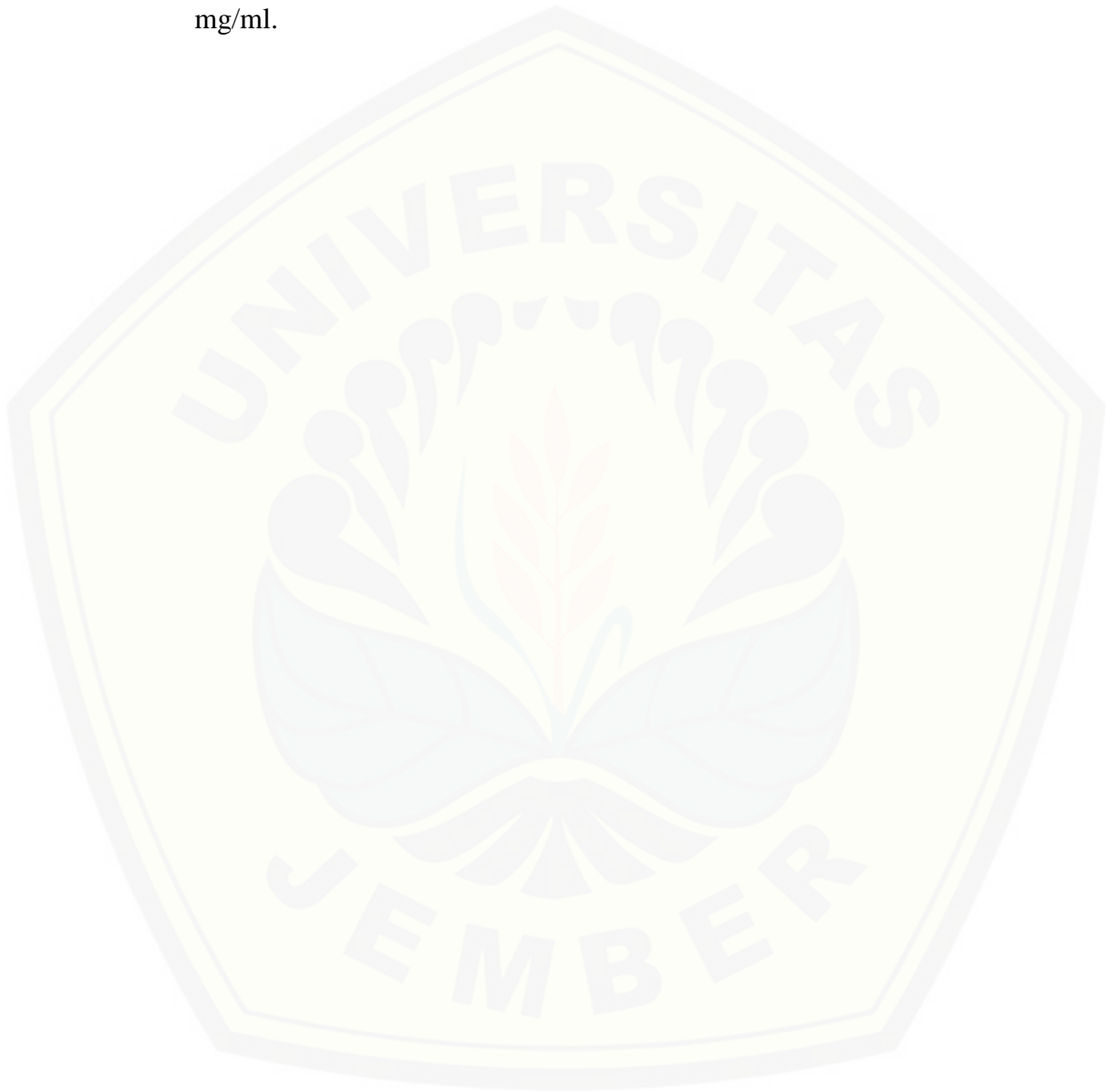
Lalu dikalikan kelipatan 2 untuk dosis kedua dan ketiga, hasilnya 70,8 mg/150grBB dan 141,6 mg/150grBB.

Pembuatan *tween 80* 1% untuk pelarut ekstrak dengan cara 1 ml *tween 80* dilarutkan dalam 100 ml aquades lalu diencerkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Sebelum penyondean pada tikus, dosis ekstrak setiap kelompok ditimbang terlebih dahulu dikali 6 (jumlah tikus per kelompok) lalu dimasukkan ke dalam *becker glass*. Kemudian ditambahkan *tween 80* 1% sejumlah 1,5 ml (volume penyondean pada tikus) dikali 6 (jumlah tikus per kelompok).

2. Vitamin C

Kebutuhan vitamin C manusia sehari sebesar 90 mg/hr (AKG, 2012). Angka konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018. Maka dosis pada tikus

adalah $90 \text{ mg/hr} \times 0,018 = 1,62 \sim 2 \text{ mg/hr}$. Vitamin C yang digunakan adalah IPI 50mg, satu tablet IPI mengandung vitamin C 50 mg. Jadi, satu tablet dilarutkan dalam 25 ml aquades untuk mendapatkan 2 mg vitamin C dalam 1 ml aquades. Dosis dan volume penyondean pada tikus sebesar 2 mg/ml.



LAMPIRAN 3.2 TABEL KONVERSI PERHITUNGAN DOSIS

Diketahui Dicari	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,43	0,1	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	1,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Sumber: Ngatidjan (1991)

LAMPIRAN 3.3 PERSETUJUAN ETIK PENELITIAN

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : 1 146 /H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP PROSES PENYEMBUHAN FRAKTUR FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN MELALUI KADAR MALONDIALDEHIDA

Nama Peneliti Utama : Ahmad Baihaqi
Name of the principal investigator

NIM : 142010101030

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 26 Januari 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK


Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

Review Proposal :

- Pengajuan etik dilakukan sebelum penelitian dilaksanakan. Pada proposal tertulis waktu pelaksanaan penelitian adalah Oktober–Desember 2017, pengajuan permohonan persetujuan etik dilakukan 28 November 2017
- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak daun bayam merah agar didapatkan kadar yang diinginkan.
- Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas reagen pada pemeriksaan MDA serum tikus.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Jember, 26 Januari 2018

Reviewer



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

LAMPIRAN 4.1 DATA HASIL PEMERIKSAAN MDA

Kelompok	Abs	Kadar MDA (nmol/ml)
K(-) A	0.323	5,91
K(-) B	0.344	6,24
K(-) C	0.318	5,83
K(-) D	0.33	6,02
K(-) E	0.329	6,00
K(-) F	0.313	5,75
K(+) A	0.192	3,86
K(+) B	0.217	4,25
K(+) C	0.174	3,57
K(+) D	0.165	3,43
K(+) E	0.155	3,28
K(+) F	0.169	3,5
P1 A	0.219	4,28
P1 B	0.239	4,59
P1 C	0.222	4,33
P1 D	0.209	4,12
P1 E	0.212	4,17
P1 F	0.235	4,53
P2 A	0.189	3,81
P2 B	0.199	3,97
P2 C	0.211	4,15
P2 D	0.228	4,42
P2 E	0.221	4,31
P2 F	0.183	3,71
P3 A	0.189	3,81
P3 B	0.175	3,59
P3 C	0.193	3,87
P3 D	0.188	3,79
P3 E	0.176	3,60
P3 F	0.183	3,71

LAMPIRAN 4.2 DATA BERAT BADAN HEWAN COBA

kelompok	Sampel	berat badan (gram)
K (+)	A	151,5
	B	157,6
	C	154
	D	158,3
	E	159,6
	F	153
K (-)	A	160
	B	152,4
	C	151,8
	D	153,7
	E	157
	F	156,3
P1	A	152,8
	B	161,2
	C	160,5
	D	157
	E	155,3
	F	150,7
P2	A	150,3
	B	151,8
	C	153,4
	D	156
	E	159,1
	F	152
P3	A	158
	B	163,2
	C	156,3
	D	154,6
	E	155
	F	155,8

LAMPIRAN 4.3 HASIL ANALISIS DATA KADAR MDA

Case Processing Summary

	KELOMPOK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
MDA	NEGATIF	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	POSITIF	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	PERLAKUAN 1	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	PERLAKUAN 2	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	PERLAKUAN 3	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Tests of Normality

	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	NEGATIF	.196	6	.200*	.961	6	.829
	POSITIF	.249	6	.200*	.914	6	.462
	PERLAKUAN 1	.189	6	.200*	.923	6	.524
	PERLAKUAN 2	.151	6	.200*	.951	6	.751
	PERLAKUAN 3	.208	6	.200*	.916	6	.474

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.311	4	25	.086

Descriptives

KELOMPOK		Statistic	Std. Error
NEGATIF	Mean	5.9634	.06956
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	5.7846 6.1422
	5% Trimmed Mean	5.9594	
	Median	5.9608	
	Variance	.029	
	Std. Deviation	.17038	
	Minimum	5.76	
	Maximum	6.24	
	Range	.49	
	Interquartile Range	.26	
	Skewness	.675	.845
	Kurtosis	.569	1.741
	Mean	3.6515	.14335
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	3.2830 4.0200
	5% Trimmed Mean	3.6387	
POSITIF	Median	3.5392	
	Variance	.123	
	Std. Deviation	.35113	
	Minimum	3.28	
	Maximum	4.25	
	Range	.97	
	Interquartile Range	.56	
	Skewness	1.118	.845
	Kurtosis	.833	1.741
	Mean	4.3412	.07749
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	4.1420 4.5404
	5% Trimmed Mean	4.3388	
	Median	4.3072	
	Variance	.036	
	PERLAKUAN 1	Std. Deviation	.18982
Minimum		4.13	
Maximum		4.60	
Range		.47	
Interquartile Range		.39	
Skewness		.408	.845
Kurtosis		-1.619	1.741
Mean		4.0669	.11435
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	3.7729
PERLAKUAN 2			

PERLAKUAN 3	Mean	Upper Bound	4.3608	
	5% Trimmed Mean		4.0663	
	Median		4.0643	
	Variance		.078	
	Std. Deviation		.28011	
	Minimum		3.72	
	Maximum		4.42	
	Range		.71	
	Interquartile Range		.55	
	Skewness		.038	.845
	Kurtosis		-1.809	1.741
	Mean		3.7351	.04685
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.6147	
		Upper Bound	3.8555	
	5% Trimmed Mean		3.7351	
	Median		3.7586	
	Variance		.013	
	Std. Deviation		.11475	
	Minimum		3.59	
	Maximum		3.88	
Range		.28		
Interquartile Range		.22		
Skewness		-.248	.845	
Kurtosis		-1.840	1.741	

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.296	4	5.324	95.076	.000
Within Groups	1.400	25	.056		
Total	22.696	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
NEGATIF	POSITIF	2.31191*	.13662	.000	2.0305	2.5933
	PERLAKUAN 1	1.62226*	.13662	.000	1.3409	1.9036
	PERLAKUAN 2	1.89655*	.13662	.000	1.6152	2.1779
	PERLAKUAN 3	2.22832*	.13662	.000	1.9469	2.5097
	NEGATIF	-2.31191*	.13662	.000	-2.5933	-2.0305
	PERLAKUAN 1	-.68966*	.13662	.000	-.9710	-.4083
POSITIF	PERLAKUAN 2	-.41536*	.13662	.005	-.6967	-.1340
	PERLAKUAN 3	-.08359	.13662	.546	-.3650	.1978
	NEGATIF	-1.62226*	.13662	.000	-1.9036	-1.3409
PERLAKUAN 1	POSITIF	.68966*	.13662	.000	.4083	.9710
	PERLAKUAN 2	.27429	.13662	.056	-.0071	.5557
	PERLAKUAN 3	.60606*	.13662	.000	.3247	.8874
	NEGATIF	-1.89655*	.13662	.000	-2.1779	-1.6152
PERLAKUAN 2	POSITIF	.41536*	.13662	.005	.1340	.6967
	PERLAKUAN 1	-.27429	.13662	.056	-.5557	.0071
	PERLAKUAN 3	.33177*	.13662	.023	.0504	.6131
	NEGATIF	-2.22832*	.13662	.000	-2.5097	-1.9469
PERLAKUAN 3	POSITIF	.08359	.13662	.546	-.1978	.3650
	PERLAKUAN 1	-.60606*	.13662	.000	-.8874	-.3247
	PERLAKUAN 2	-.33177*	.13662	.023	-.6131	-.0504

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 4.4 DOKUMENTASI PENELITIAN



Pembuatan Ekstrak Bayam Merah



Adaptasi hewan coba



Penimbangan BB Hewan Coba



Penyondean perlakuan



Proses pematihan femur



Pembidaian Hewan Coba



Pengambilan darah intrakardial



Malondialdehida



Pemeriksaan Kadar MDA



Pembacaan absorbansi MDA