



**PERBEDAAN JUMLAH SEL OSTEOLAS PADA FRAKTUR
FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIBERI EKSTRAK
ETANOL DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*)**

SKRIPSI

Oleh

**Ferdian Nugroho
NIM 142010101001**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**PERBEDAAN JUMLAH SEL OSTEOBLAS PADA FRAKTUR
FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIBERI EKSTRAK
ETANOL DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*)**

SKRIPSI

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

Oleh

Ferdian Nugroho
NIM 142010101001

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018
PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan limpah berkat -Nya sehingga saya dapat menuntut ilmu;
2. Kedua orang tua saya, Mama Kristina Rinobaningsih dan Papa Bambang Wahyu Widodo yang telah memberikan doa, cinta, nasehat, kasih sayang, dan pengorbanan dalam mendidik dan membesarkan saya;
3. Saudaraku Oktavianus Kriswidanto dan Dhea Widanti yang telah memberikan motivasi dan semangat;
4. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Science is the poetry of reality.

-Richard Dawkins



^{*}) Dawkins, Richard. 2006. The God Delusion. Bantam Press, A Division of Transworld Publishers. London.

PERNYATAAN

Saya yang tertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ferdian Nugroho

NIM : 142010101001

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah berjudul “Perbedaan Jumlah Sel Osteoblas pada Fraktur Femur Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)” adalah benar-benar 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Maret 2018

Yang menyatakan,

(Ferdian Nugroho)

NIM 142010101001

SKRIPSI

**PERBEDAAN JUMLAH SEL OSTEOLAS PADA FRAKTUR
FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIBERI EKSTRAK
ETANOL DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*)**

Oleh

Ferdian Nugroho

NIM 142010101001

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama

: Dr.dr. Aris Prasetyo, M.Kes.

Dosen Pembimbing Anggota

: dr. Muhammad Hasan, M.Kes, Sp

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Perbedaan Jumlah Sel Osteoblas pad Fraktur Femur Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : 20 Maret 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP 19740604 200112 2 002

dr. Laksmi Indreswari, Sp.B.
NIP 19830901 200801 2 012

Dosen Penguji III

Dosen Penguji IV

Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes.
19690203 199903 1 001

dr. M. Hasan, M.Kes, Sp.OT.
19690411 199903 1 001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

Dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Perbedaan Jumlah Sel Osteoblas pada Fraktur Femur Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*); Ferdian Nugroho, 142010101001; 2017: 60; Program Studi 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. Tujuan dari proses tersebut 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 meningkatkan jumlah sel osteoblas sebagai indikator proses penyembuhan tulang 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, P2 dan 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 tulang femur untuk mengukur jumlah sel osteoblas pada pemeriksaan histopatologis.

Hasil rata-rata dan standar deviasi sel osteoblas masing-masing kelompok didapatkan untuk kelompok K(-) sebesar 7.83 ± 0.75 , kelompok K(+) sebesar 17.00 ± 1.80 , kelompok P1 sebesar 8.83 ± 1.74 , kelompok P2 sebesar 13.5 ± 1.05 , kelompok P3 sebesar 16.00 ± 0.89 . Data hasil rata-rata jumlah sel osteoblas 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 jumlah sel osteoblas dianalisis dengan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dan didapatkan nilai signifikansi $p < 0,000$. Uji lanjutan LSD digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan.

Pada kelompok P3 didapatkan jumlah sel osteoblas terbanyak dibandingkan dengan kelompok K-, P1, dan P2. Hasil LSD kelompok P3 tidak berbeda bermakna dengan kelompok K+ karena jumlah rata-rata sel osteoblas keduanya hampir sama. Hal ini menunjukkan semakin besar dosis ekstrak etanol bayam merah yang diberikan semakin meningkatkan hasil rata-rata jumlah sel osteoblas tikus wistar jantan model fraktur.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Tuhan YME atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbedaan Jumlah Sel Osteoblas pada Fraktur Femur Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi 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. M. Hasan, M.Kes., Sp.OT., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes. selaku Dosen Penguji I dan dr. Laksmi Indreswari, Sp.B selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini;
4. Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
5. Mama Kristina Rinobaningsih dan Papa Bambang Wahyu Widodo tercinta yang telah memberikan dukungan moral, materi, doa, dan curahan kasih sayang yang tak akan pernah putus;
6. Kakakku Oktavianus Kriswidanto dan adikku Dhea Widanti yang selalu memberi motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini;
7. Saudaraku Ahmad Baihaqi yang tidak lelah membantu setiap langkah pembuatan skripsi ini;
8. Tema-temanku I Nyoman Kurniawan Agratama, Sri Weli Teguh Pujo Sakti, Azka Darajat, Akbar Maulida Arisadewa, Achmad Ma'ruf Fauzi, Samuel Hobarto Sampe, Ahmad Syahrian Noer, Ifranus Ade, Lutfi Hasbullah, Ryan

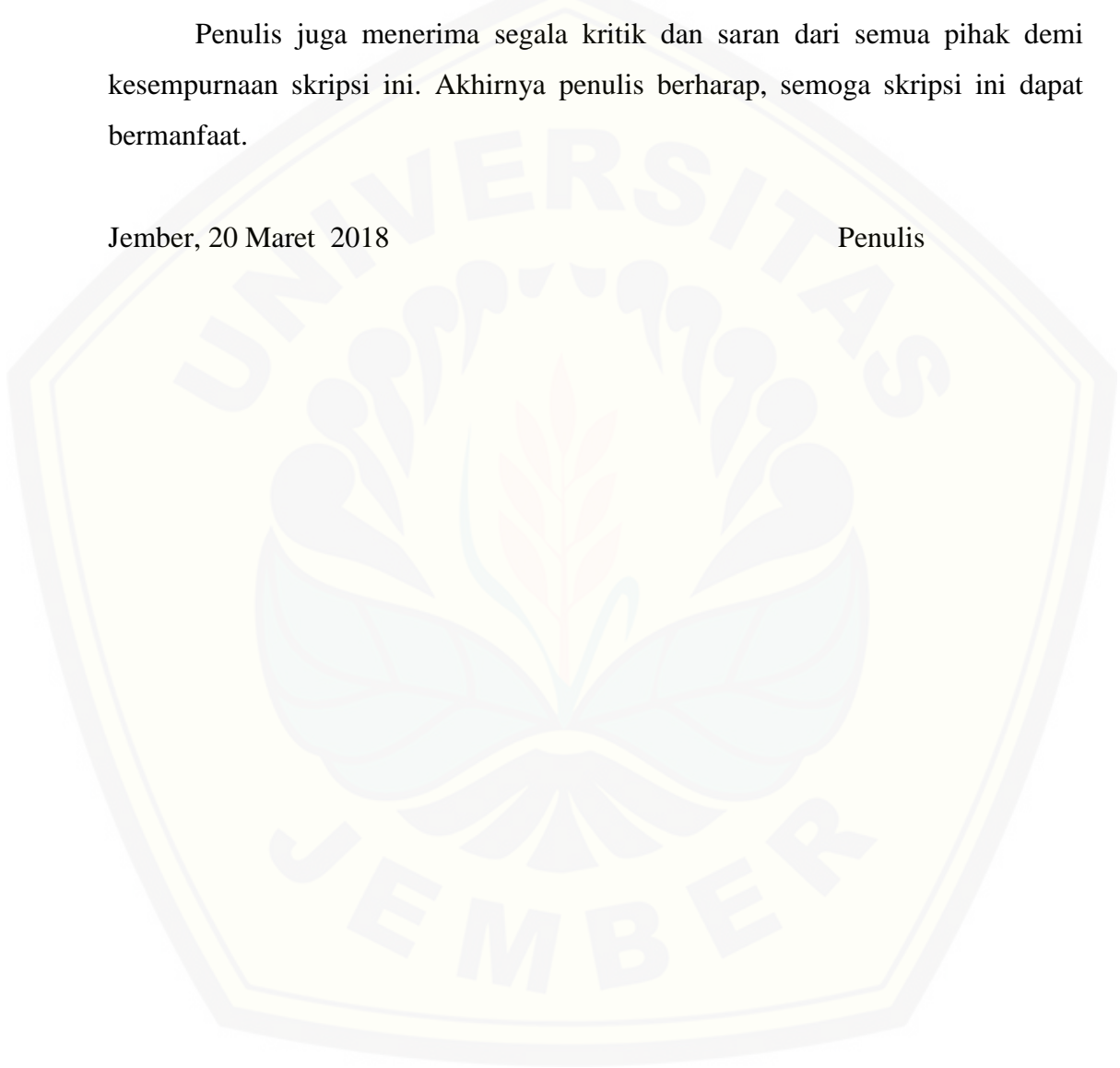
Ravi, Chiesa Ridwan, Rifqi Rahadian dan teman-temanku Elixir yang telah memberi dorongan dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini;

8. Kakak-kakak dan adik-adik angkatan lain yang telah hadir di seminar proposal dan atas dukungannya dalam persiapan sidang;
9. 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, 20 Maret 2018

Penulis



DAFTAR ISI

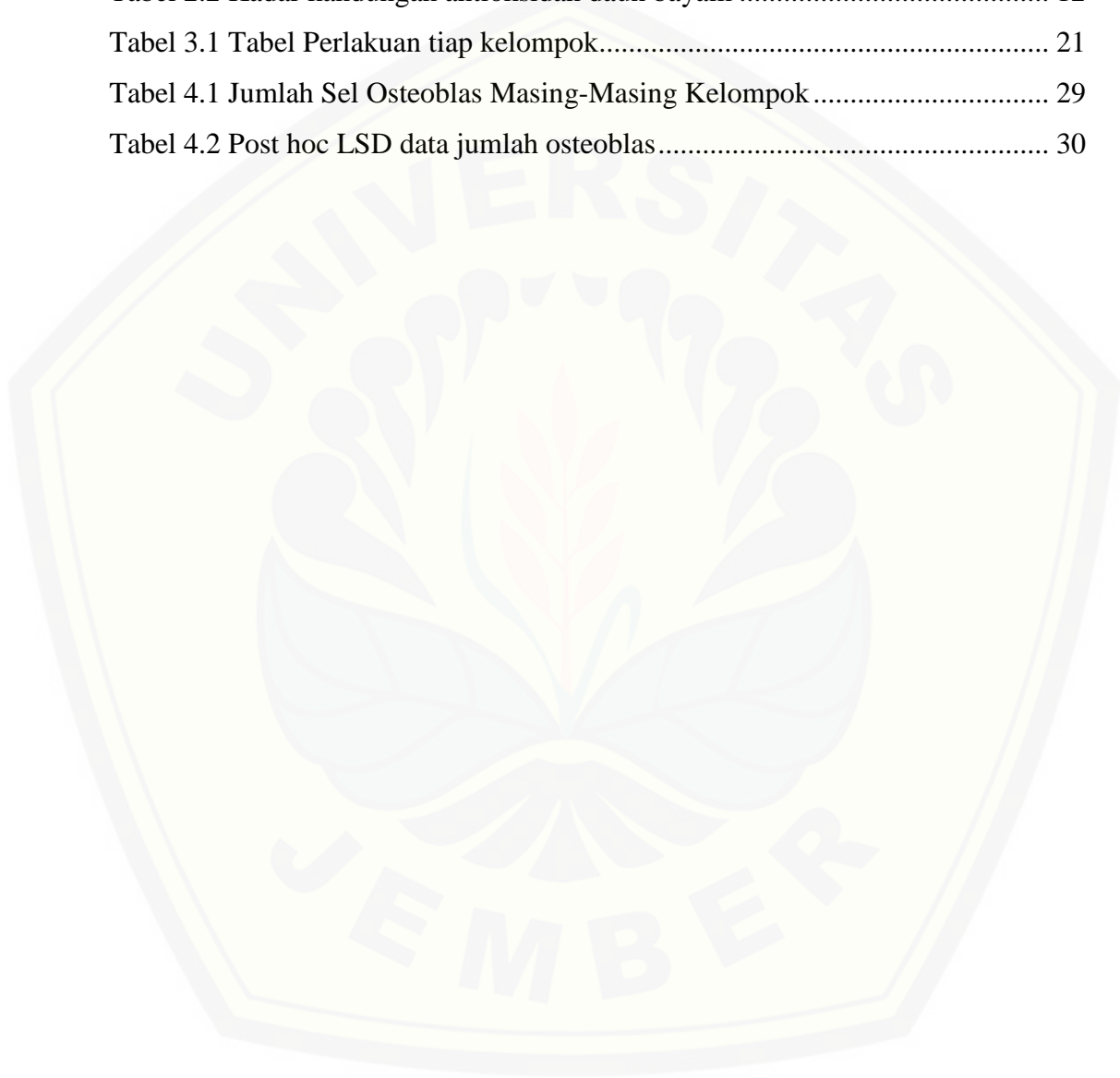
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Praktis	3
1.4.2 Manfaat Ilmiah.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Fraktur Tulang.....	4
2.1.1 Penyebab.....	4
2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur.....	5
2.1.4 Stres Oksidatif pada fraktur	9
2.2 Bayam Merah	11
2.2.1 Taksonomi Bayam Merah (<i>Amaranthus Tricolor L.</i>).....	12
2.2.2 Kandungan Bayam Merah	13
2.2.3 Antioksidan Bayam Merah	13
2.2.4 Flavonoid sebagai antioksidan.....	13
2.4 Kerangka Konseptual Penelitian	16
2.5 Hipotesis Penelitian	18
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2.1 Tempat Penelitian	19
3.2.2 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 Variabel Penelitian	21
3.4.1 Variabel Bebas.....	21
3.4.2 Variabel Terikat	21
3.4.3 Variabel Terkendali	21

3.5 Definisi Operasional	22
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	23
3.6.1 Alat Penelitian.....	23
3.6.2 Bahan Penelitian	23
3.7 Prosedur Penelitian	23
3.7.1 Persiapan Sampel Penelitian.....	23
3.7.2 Randomisasi Sampel Penelitian.....	23
3.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba.....	24
3.7.4 Induksi Fraktur Tulang	24
3.7.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Bayam Merah	24
3.7.6 Perlakuan Hewan Coba.....	25
3.7.7 Koleksi Sampel Femur.....	25
3.7.8 Pemeriksaan Histopatologis Jaringan Tulang.....	25
3.8 Analisis Data	26
3.9 Uji Kelayakan Etik	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hasil dan Analisis Data	28
4.2 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34

DAFTAR TABEL

Halaman

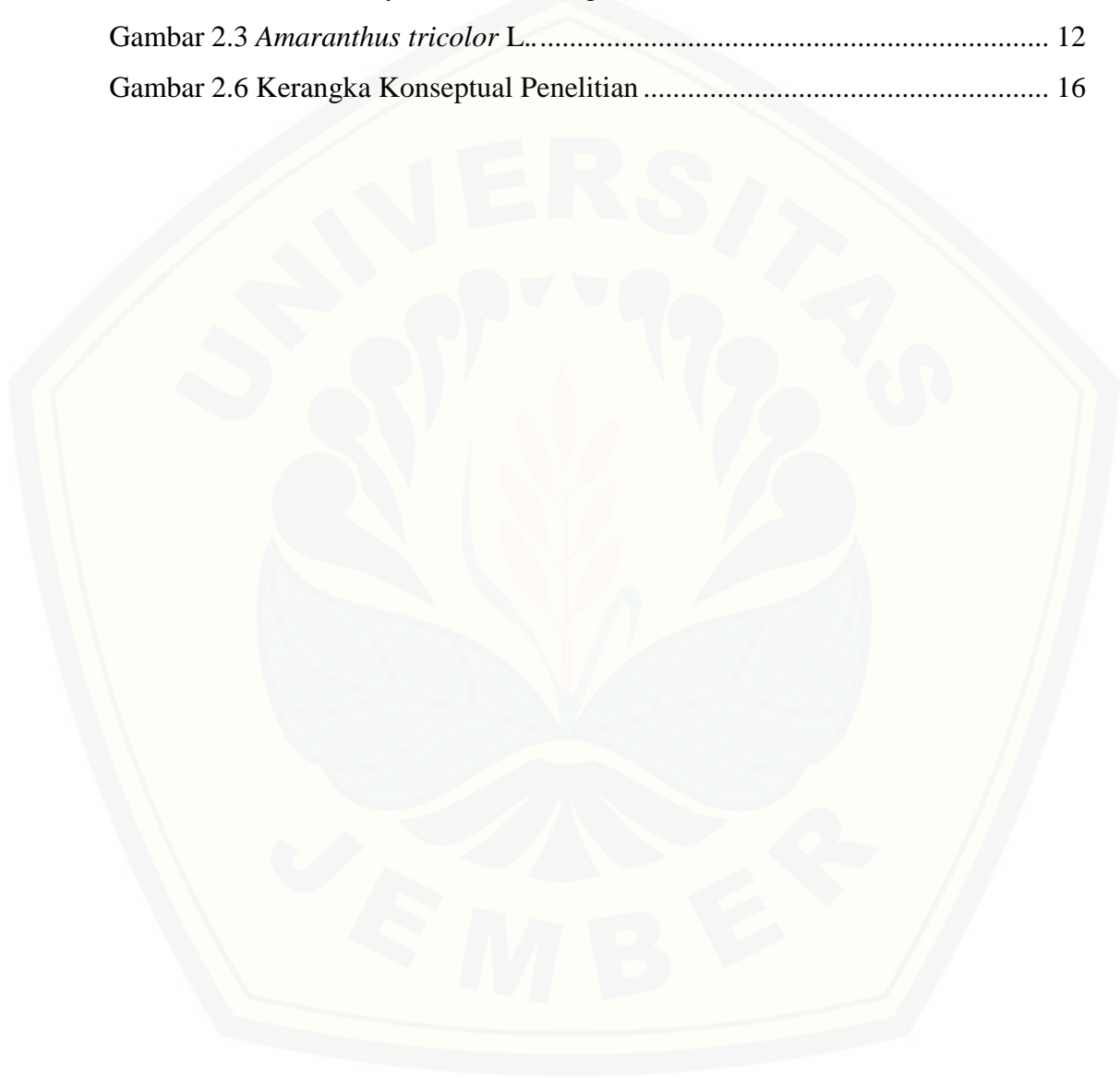
Tabel 2.1 Kandungan Nutrisi Bayam Merah	13
Tabel 2.2 Kadar kandungan antioksidan daun bayam	12
Tabel 3.1 Tabel Perlakuan tiap kelompok.....	21
Tabel 4.1 Jumlah Sel Osteoblas Masing-Masing Kelompok.....	29
Tabel 4.2 Post hoc LSD data jumlah osteoblas.....	30



DAFTAR GAMBAR

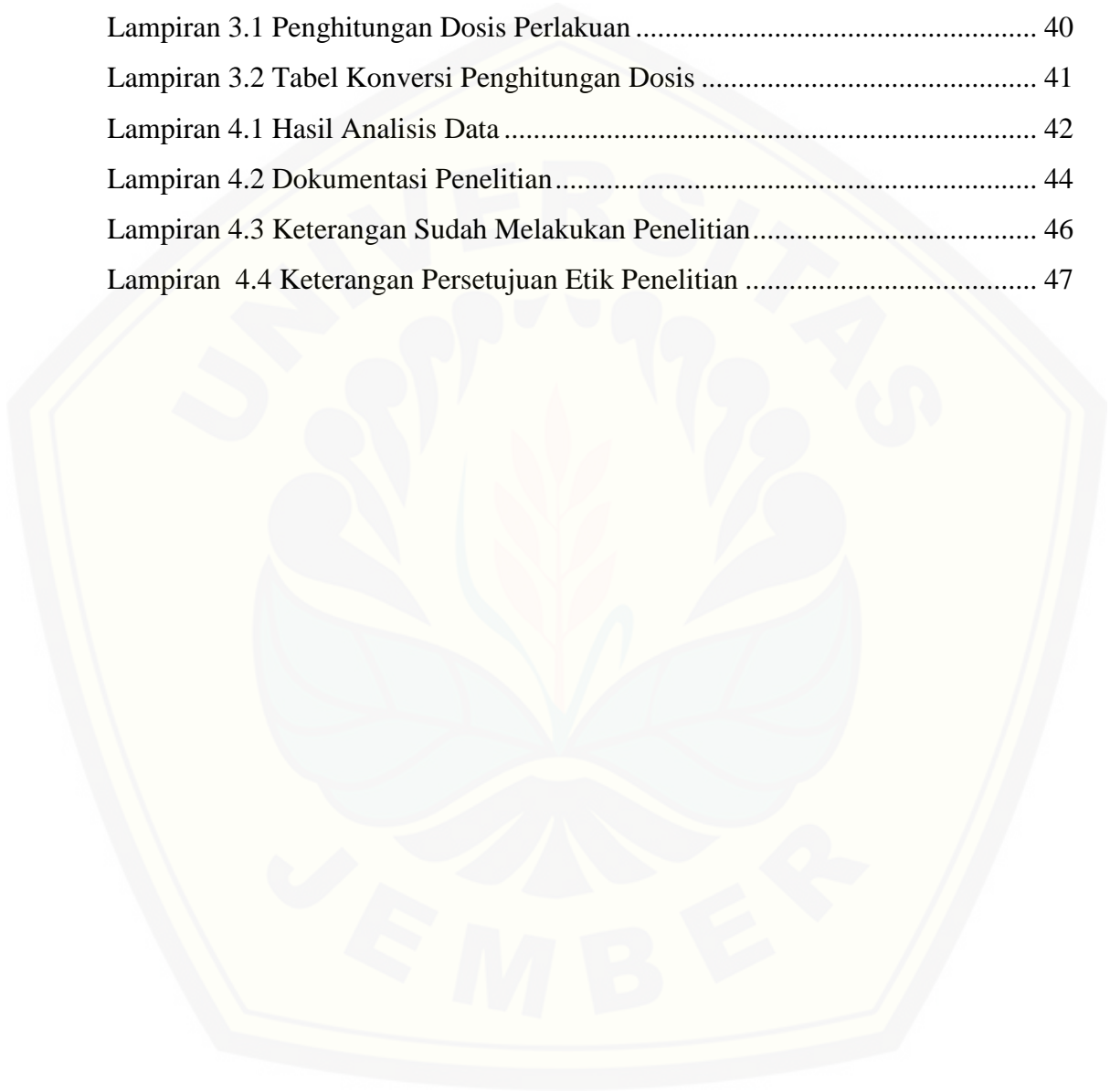
Halaman

Gambar 2.2 Proses Penyembuhan Tulang	6
Gambar 2.3 <i>Amaranthus tricolor</i> L.....	12
Gambar 2.6 Kerangka Konseptual Penelitian	16



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Penghitungan Dosis Perlakuan	40
Lampiran 3.2 Tabel Konversi Penghitungan Dosis	41
Lampiran 4.1 Hasil Analisis Data	42
Lampiran 4.2 Dokumentasi Penelitian	44
Lampiran 4.3 Keterangan Sudah Melakukan Penelitian.....	46
Lampiran 4.4 Keterangan Persetujuan Etik Penelitian	47





BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Fraktur adalah suatu patahan pada kontinuitas struktur tulang. Umumnya fraktur disebabkan oleh trauma atau aktivitas fisik ketika tulang mendapat tekanan yang berlebihan (Apley, 2010). Fraktur dapat disebabkan karena trauma, yaitu kondisi terdapat tekanan yang berlebihan pada tulang, baik berupa langsung maupun tidak langsung (Sjamsuhidajat dan Jong, 2010).

World Health Organization (WHO) menyatakan pada tahun 2008 telah terjadi sekitar 13 juta kasus fraktur di dunia dengan prevalensi 2,7 % dan meningkat pada tahun 2009 menjadi 18 juta orang dengan prevalensi 4,2 %. Tahun 2010 meningkat menjadi 21 juta orang dengan prevalensi 3,5 %. Fraktur tersebut di dalamnya termasuk insiden kecelakaan, cedera olahraga dan lain-lain (Aghnia, 2015). Di Indonesia prevalensi terjadinya cedera terus mengalami peningkatan. Dari 7,5 persen pada Riskesdas 2007 menjadi 8,2 persen pada Riskesdas 2013. Bila ditinjau dari penyebab cederanya, cedera karena kecelakaan sepeda motor menempati peringkat kedua tertinggi setelah cedera karena jatuh yaitu sebesar 46 % (Depkes RI, 2013).

Fraktur tulang memiliki mekanisme penyembuhan alami yang meliputi lima tahapan yaitu fase hematoma, inflamasi dan proliferasi seluler, pembentukan kalus, konsolidasi dan remodelling (Solomon *et al.*, 2010). Dalam proses penyembuhan fraktur terjadi pembentukan suatu radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan *Reactive Nitrogen Species (RNS)* yang disebabkan hasil degradasi fragmen tulang berupa kolagen yang bereaksi dengan oksigen. Jika peningkatan radikal bebas tidak diimbangi dengan antioksidan endogen akan terjadi stres oksidatif. Proses tersebut menyebabkan terhambatnya fase kedua dalam proses penyembuhan fraktur yaitu inflamasi dan proliferasi seluler yang terjadi delapan jam setelah fraktur sehingga jumlah sel-sel osteogenik menurun dan terjadi supresi fungsi sel osteoklas untuk degenerasi sel yang mati, serta mempengaruhi regenerasi sel melalui kerusakan DNA dan membran sel. Salah satu sel osteogenik dapat dijadikan parameter utama dalam penyembuhan fraktur

adalah sel osteoblas. Kadar radikal bebas yang tinggi menyebabkan inhibisi dari proliferasi sel osteoblas dan penurunan jumlah sel osteoblas yang dapat diperiksa melalui pemeriksaan histopatologi jaringan tulang (Cadenas dan Packer, 2002).

Stres oksidatif dapat dicegah dengan senyawa antioksidan. 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 (Wulandari *et al.*, 2012). Oleh karena itu, sejalan dengan program Universitas Jember untuk memanfaatkan sumber daya di bidang hayati, penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) terhadap jumlah sel osteoblas pada fraktur femur tikus wistar jantan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut: “Adakah perbedaan ekstrak etanol daun bayam merah terhadap jumlah sel osteoblas pada fraktur tulang femur tikus wistar jantan?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan proses penyembuhan fraktur femur pada tikus wistar jantan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah berbagai dosis.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah,

- (i) menghitung jumlah sel osteoblas pada fraktur femur tikus wistar jantan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah berbagai dosis
- (ii) membandingkan jumlah sel osteoblas pada fraktur femur tikus wistar jantan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah berbagai dosis

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Manfaat ilmiah dari penelitian ini adalah sebagai data dasar pengembangan inovasi penelitian selanjutnya di bidang kesehatan terutama sebagai upaya optimalisasi penyembuhan fraktur dengan ekstrak etanol daun bayam merah.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah sebagai bahan informasi penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak etanol daun bayam merah sebagai antioksidan dan sumber kalsium yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan fraktur tulang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fraktur Tulang

2.1.1. Definisi

Fraktur tulang atau patah tulang adalah kondisi jaringan tulang yang kehilangan kontinuitas (Rasjad, 2006). Jenis fraktur tulang berdasarkan bentuk patahannya dapat dikelompokkan menjadi fraktur inkomplit dan komplit. Fraktur inkomplit meliputi sebagian retakan yang terjadi hanya pada sebelah sisi tulang. Sementara fraktur komplit mempunyai gambaran berupa garis fraktur yang memotong seluruh tulang. Berdasarkan tempat terjadinya, fraktur dapat terjadi pada area proksimal, medial maupun distal tulang (Mahartha *et al.*, 2013).

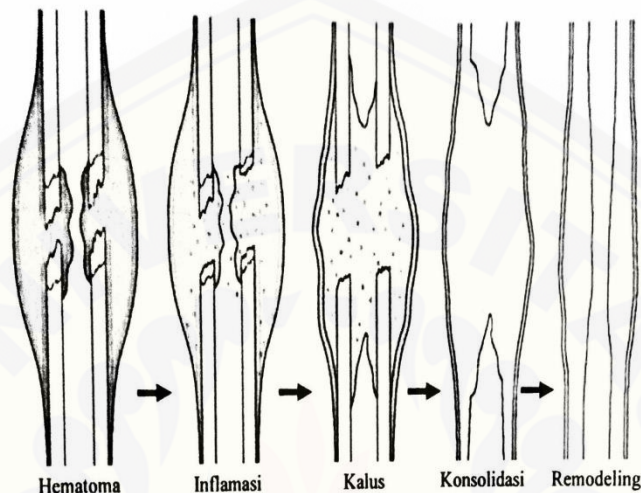
2.1.2 Penyebab

Fraktur tulang terjadi ketika tulang terkena tekanan, gaya, atau kekuatan yang lebih besar dari kepadatan tulang sendiri. Gaya atau kekuatan ini biasanya datang dan terjadi secara tiba-tiba atau sangat intens sehingga tulang tidak cukup kuat menahan kontinuitasnya. Kekuatan sangat mempengaruhi tingkat keparahan fraktur. Beberapa peristiwa yang menyebabkan fraktur antara lain jatuh dari ketinggian, kecelakaan lalu lintas dan cedera olahraga (Giorgi, 2016). Jaringan di sekitar tulang yang fraktur akan terpengaruh sehingga mengakibatkan edema jaringan lunak, perdarahan ke otot dan sendi, ruptur tendon, dislokasi sendi, serta kerusakan saraf dan pembuluh darah (Solomon *et al.*, 2010).

Fraktur yang disebabkan oleh trauma, bisa berupa trauma langsung maupun tidak langsung. Trauma langsung contohnya benturan pada femur yang menyebabkan fraktur femur sementara fraktur tidak langsung contohnya jatuh pada keadaan badan menumpu pada tulang femur. Selain itu, dapat juga disebabkan karena proses penyakit misalnya osteoporosis, yaitu ketika tulang-tulangnya mengalami kekurangan kalsium dan rapuh, luka ringan atau bahkan gravitasi dapat menciptakan kekuatan yang cukup untuk menyebabkan fraktur kompresi vertebra pada punggung atau patah tulang pinggul, fraktur jenis ini disebut sebagai fraktur patologis (Apley, 2010).

2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur

Proses penyembuhan fraktur secara garis besar terdiri dari lima fase yaitu fase hematoma, inflamasi dan proliferasi seluler, pembentukan kalus, konsolidasi dan remodelling (Solomon *et al.*, 2010).



Gambar 1.1 Proses Penyembuhan Tulang (Solomon *et al.*, 2010)

Fase hematoma terjadi selama satu gokyur hingga tiga hari, terjadi pembekuan darah dan hematoma di sekitar fraktur, 1-2 mm ujung fragmen tulang mati karena kehilangan suplai darah. Fase selanjutnya yaitu inflamasi dan proliferasi seluler yang terjadi delapan jam setelah fraktur. Fase ini terjadi reaksi inflamasi akut dengan migrasi sel-sel inflamasi dan proliferasi dari *mesenchymal stem cell* (MSC) di bawah periosteum dan di dalam medula. Ujung fragmen dikelilingi jaringan selular yang menjembatani patahan tulang. Hematoma perlahan diserap dan tumbuh kapiler baru. Fase selanjutnya yaitu pembentukan kalus, pada fase ini sel yang berproliferasi bersifat osteogenik dan kondrogenik. Terdapat juga sel osteoblas yang akan meresorpsi tulang mati. Pada fase ini terbentuk *woven bone* atau *immature fibre bone* pada permukaan *perisoteal* dan *endosteal*. Fase ini terjadi selama empat minggu. Fase pembentukan kalus merupakan fase union atau penyembuhan secara klinis. Setelah itu terjadi fase konsolidasi. Bahan kalus yang terdiri dari *immature fibre bone* atau *woven bone*

berubah menjadi *lamellar bone* karena pengaruh aktivitas osteoklastik dan osteoblastik. Kalus yang menetap menjadikan tulang kaku karena adanya penumpukan garam kalsium. Fase konsolidasi ini masih belum memungkinkan tulang untuk menumpu berat badan secara normal. Selanjutnya yaitu fase remodelling yang terjadi selama berbulan-bulan hingga bertahun-tahun. Proses remodelling ini bertujuan untuk memperoleh bentuk tulang kembali seperti semula atau kembali pada bentuk anatomisnya (Solomon *et al.*, 2010).

2.2 Stres Oksidatif

2.2.1 Definisi

Stres oksidatif adalah keadaan dimana produksi radikal bebas melebihi sistem pertahanan tubuh atau antioksidan (Agarwal *et al.*, 2005). Jika produksi radikal bebas melebihi kemampuan antioksidan intrasel untuk menetralkannya maka sangat potensial menyebabkan kerusakan biomolekul penyusun sel (Valko *et al.*, 2007)

2.2.2 Radikal Bebas

Pada kondisi stres oksidatif terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan. Radikal bebas adalah atom atau elektron yang tidak berpasangan sehingga tidak stabil dan cenderung menarik elektron dari molekul lainnya untuk melengkapi konfigurasi elektronnya (Suwandi, 2012). Keadaan ini menyebabkan molekul tersebut bersifat reaktif dan tidak stabil sehingga cenderung berikatan dengan senyawa lain untuk membentuk molekul yang stabil yang berakibat terjadi kerusakan terhadap sel dan jaringan karena interaksi antara oksigen bebas dengan DNA (Reda, 2001)

Secara umum, sumber radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua, yaitu endogen (dari dalam tubuh) dan eksogen (dari luar tubuh). Adapun sumber radikal bebas endogen yaitu berasal dari aktivitas enzimatik dan non enzimatik. Aktivitas enzimatik terjadi pada proses metabolisme yang menghasilkan radikal bebas sebagai produk sampingan. Selain itu terdapat juga reaksi non-enzimatik. Reaksi ini merupakan reaksi oksigen dengan senyawa lain dalam tubuh akibat proses radiasi dan ionisasi, seperti yang terjadi pada proses infeksi. Adapun sumber

radikal bebas eksogen berasal dari polutan, merokok, asap rokok bagi perokok pasif, asap kendaraan bermotor (Suwandi, 2012). Produksi radikal bebas yang berlebihan menyebabkan kemampuan sistem pertahanan tubuh alami untuk mengeliminasi mengalami gangguan sehingga mengganggu rantai reduksi oksidasi normal yang akan menyebabkan kerusakan oksidatif jaringan (Winarsi, 2007).

2.2.3 Stres Oksidatif pada Fraktur

Stres oksidatif pada fraktur tulang berasal dari mekanisme fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta dari aktivitas osteoklas dalam proses penyembuhan fraktur. Selain itu stres oksidatif pada fraktur terjadi akibat inflamasi pada fase kedua proses penyembuhan fraktur tulang. Apabila jumlah radikal bebas ini tidak diimbangi dengan jumlah antioksidan akan mempengaruhi mekanisme penyembuhan fraktur tulang dalam tubuh (Sheweita dan Khoshal, 2007).

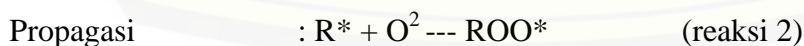
Produk stres oksidatif pada fraktur tulang diantaranya adalah *RNS* yaitu jenis *nitrite oxide (NO)* yang dalam jumlah normalnya berperan dalam memediasi vasodilatasi dan proliferasi vaskuler pada pembentukan kalus. Namun, jika terjadi peningkatan aktivitas *NO* menyebabkan hambatan proliferasi dan diferensiasi osteoblas, menginduksi terjadinya apoptosis osteoblas, dan supresi fungsi osteoklas untuk mendegenerasi sel yang mati (Corbett, 1999). Jenis radikal bebas lainnya yang dapat mempengaruhi penyembuhan fraktur yakni *ROS* yang berperan dalam regenerasi sel. *ROS* akan memediasi proses lipid peroksidase, 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. Jumlah *ROS* yang meningkat akan menjadi penghambat dari regenerasi sel dalam proses penyembuhan fraktur (Cadenas dan Packer, 2002).

2.2.4 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan molekulnya kepada molekul radikal bebas. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. (Halliwell *et al.*, 2000)

Sumber – sumber antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga yaitu pertama, antioksidan yang sudah ada di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan enzim antioksidan yang sudah ada di dalam tubuh manusia yang dikenal sebagai enzim antioksidan (SOD, GPx, dan CAT). Kedua, antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan seperti BHA, BHT, PG, dan TBHQ. Ketiga, antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kayu, akar, daun, buah, bunga, biji, dan serbuk sari. Jenis antioksidan yang banyak didapatkan dari bahan alami berupa vitamin C dan E, beta karoten, pigmen seperti antosianin, klorofil, flavonoid dan polifenol (Ardiansyah, 2007)

Mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri atas tiga tahap utama yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen (reaksi 1). Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (reaksi 2). Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru (reaksi 3).



Hidroperoksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi lebih lanjut menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton yang bertanggung jawab atas flavor makanan berlemak. Tanpa

adanya antioksidan , reaksi oksidasi lemak akan mengalami terminasi melalui reaksi antar radikal bebas membentuk kompleks bukan radikal (reaksi 4).

Terminasi : $ROO^* + ROO$ -----non radikal (reaksi 4)

$R^* + ROO^*$ ---- non radikal

$R^* + R^*$ --- non radikal

Antioksidan yang baik akan bereaksi dengan asam lemak segera setelah senyawa tersebut terbentuk. Dari berbagai antioksidan yang ada, mekanisme kerja serta kemampuannya sebagai antioksidan sangat bervariasi. Seringkali, kombinasi beberapa jenis antioksidan memberikan perlindungan yang lebih baik (sinergisme) terhadap oksidasi dibanding dengan satu jenis antioksidan saja (Medikasari, 2000).

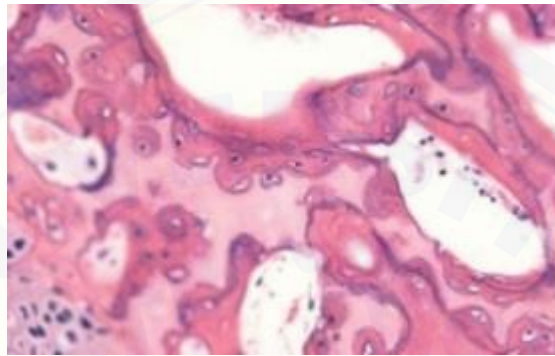
Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif (Sofia, 2013). Tubuh manusia menghasilkan senyawa antioksidan, namun jumlahnya tidak mencukupi untuk menetralkan radikal bebas yang cukup tinggi sehingga diperlukan antioksidan dari luar tubuh yang bisa didapatkan melalui antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan. (Hernani, 2006)

2.3 Gambaran Histopatologi Tulang

Histopatologi merupakan salah satu cabang ilmu kedokteran yang mempelajari mengenai sel dan jaringan. Pemeriksaan histopatologi dapat dilakukan untuk menegakkan diagnosis dan menentukan terapi yang tepat. Pemeriksaan ini dilakukan dengan pembuatan preparat dari jaringan tubuh (Hastuti, 2010).

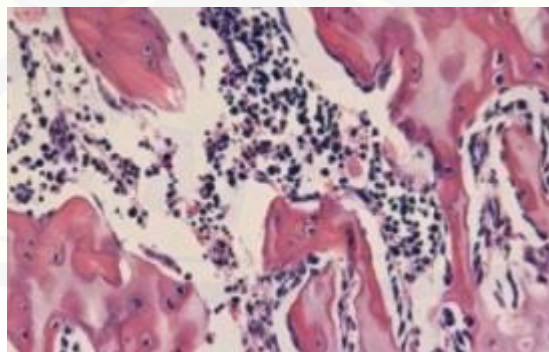
Dalam pemeriksaan histopatologis tulang maka akan terlihat sel osteoblas dan sel osteoklas yang biasanya dijadikan parameter keparahan atau kesembuhan suatu penyakit. Jika terjadi fraktur tulang, maka jumlah sel osteoblas akan meningkat, peningkatan ini menunjukkan proses *remodelling* yang sedang terjadi pada tulang fraktur (Sabri, 2013). Sel osteoblas merupakan sel basofilik dan mononuklear dengan inti yang besar , yang berperan dalam proses pembentukan tulang maupun regenerasi tulang dengan cara memproduksi, mensekresi,

mendeposisi dan mem mineralisasi matriks tulang (Jayakumar dan Silvio, 2010). Jumlah sel osteoblas pada tikus normal adalah $26,40 \pm 6,89$ (Suarsana *et al*, 2014). Pada fase pembentukan kalus jumlah sel osteoblas belum mencapai nilai normal karena sel osteoblas terus berproliferasi hingga mencapai nilai puncaknya pada fase *remodelling*. Jumlah sel osteoblas akan kembali ke nilai normal setelah proses *remodeling* selesai dan proses penyembuhan telah berakhir.



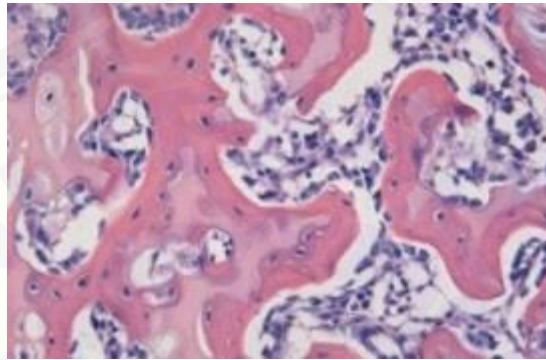
Gambar 2.2 Gambaran Histopatologis Tulang Fraktur Fase Inflamasi (Haffner-Luntzer *et al*, 2017)

Pada fase ini terjadi reaksi inflamasi akut dengan migrasi sel-sel inflamasi dan proliferasi dari *mesenchymal stem cell* (MSC) di bawah periosteum dan di dalam medula. Jumlah dan susunan osteoblas belum banyak berubah dari normal tetapi mulai terlihat netrofil dan limfosit sebagai pemicu inflamasi seperti yang terlihat pada gambar 2.2 (Solomon *et al.*, 2010).



Gambar 2.3 Gambaran Histopatologis Tulang Fraktur Fase Pembentukan Kalus (Haffner-Luntzer *et al*, 2017)

Pada fase kalus sel osteoblas sudah banyak terbentuk dan tersusun rapi di sepanjang tepi korteks tulang diikuti aktivitas sel osteoklas yang mendegenerasi fragmen tulang seperti pada gambar 2.3. Pada fase *remodelling* jumlah sel osteoblas mencapai puncaknya diikuti kembalinya fungsi vaskuler dan tersambunginya kembali tulang yang fraktur seperti pada gambar 2.4 (Solomon *et al.*, 2010).



Gambar 2.4 Gambaran Histopatologis Tulang Fraktur Fase *Remodelling* (Haffner-Luntzer *et al.*, 2017)

2.4 Bayam Merah

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). Daun bayam merah berciri ujungnya tajam, dengan morfologi daun lebar dan lunak. Konsistensi batang lunak dan berwarna kemerah-merahan. Biji dari buahnya banyak, kecil, bulat, dan mudah hancur. Tanaman ini berakar tunggang dan bagian sampingnya kuat. 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 2.2.



Gambar 2.2 *Amaranthus tricolor* L. (Amornrit & Santiyanont, 2015).

2.2.1 Taksonomi Bayam Merah (*Amaranthus Tricolor* L.)

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Hamamelidae
Ordo	: Caryphyllales
Famili	: Amaranthaceae
Genus	: <i>Amaranthus</i>
Spesies	: <i>Amaranthus tricolor</i> L. (Saparinto, 2013).

2.2.2 Kandungan Bayam Merah

Kandungan zat nutrisi pada daun tanaman bayam merah dalam per 100 gram porsi bayam adalah :

Tabel 2.1 Kandungan Nutrisi Bayam Merah

No	Kandungan Bayam	Berat
1	Zat Besi	2,2 g
2	Energi	51 kcal
3	Protein	4,6 g
4	Total lemak	0,5 g
5	Karbohidrat	10 g
6	Kalsium	368 g
7	Fosfor	111 g
8	Vitamin A (UI)	5.800
9	Vitamin B (mg)	0,08
10	Vitamin C (mg)	80
11	Air (gr)	82

Sumber : Direktorat Gizi (Depkes, 1992)

2.2.3 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 adalah 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 oksidan 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.

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)

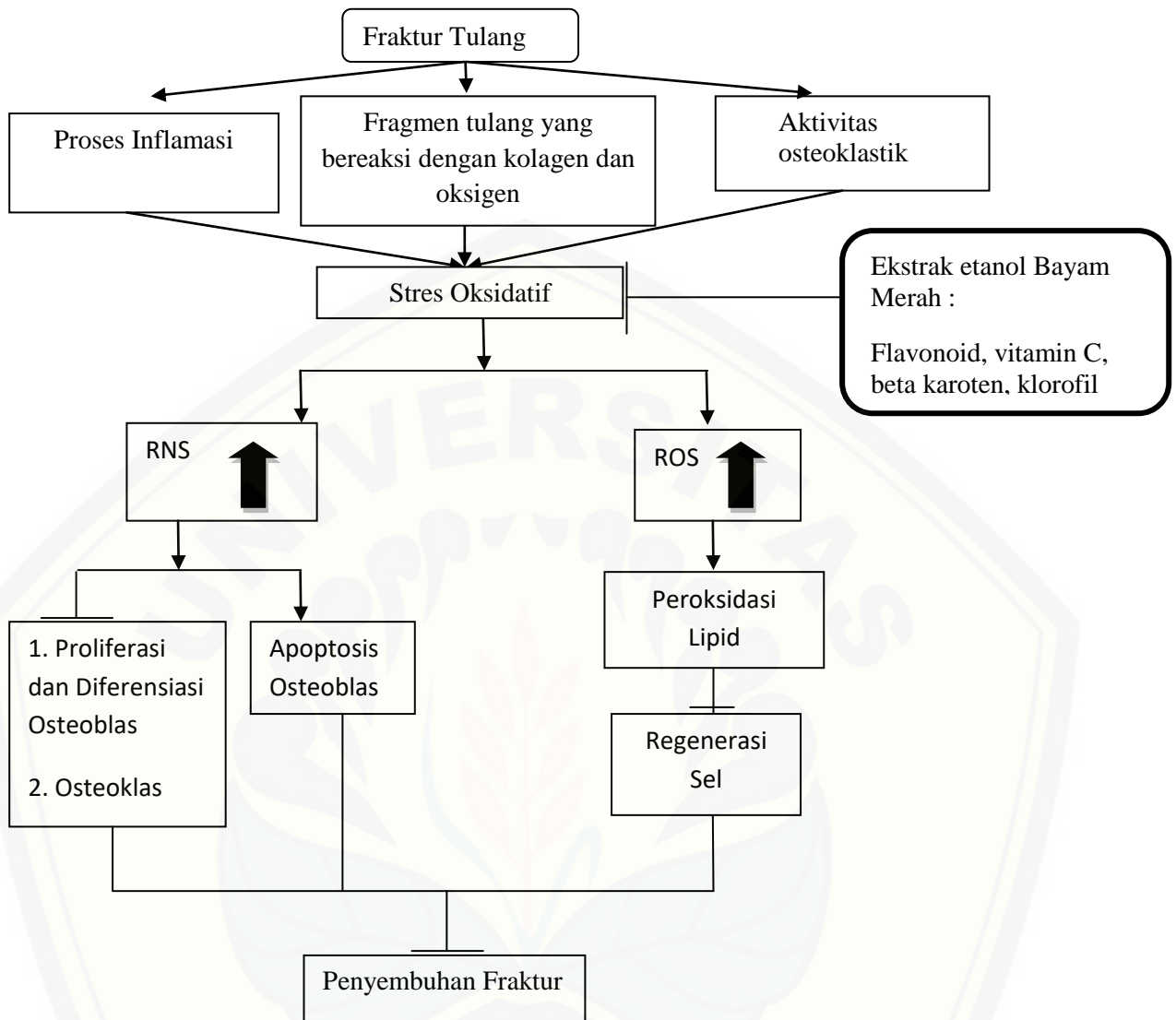
Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) mengandung vitamin A, vitamin B6, vitamin C, klorofil, β -karoten, dan riboflavin (Rajalakshmi *et al.*, 2011). Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) juga mengandung alkaloid, glikosida, flavonoid, tannin, antrakuinon, saponin, minyak volatile, kumarin, 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 (Rahmatullah *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 (H₂O₂) 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 glutathion (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 (Noori *et al.*, 2015). Kuersetin khususnya dikenal sebagai *chelating ion* Fe dengan menstabilkan Fe agar tidak berikatan dengan H₂O₂ 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 IC₅₀ 43,4 ppm sebagai antioksidan sangat kuat begitu juga dengan tanaman brokoli (*Brassica oleracea*) sebagai pembanding dengan nilai IC₅₀ 48,7 ppm yang dikategorikan juga dalam antioksidan sangat kuat. Suatu zat dikategorikan sebagai antioksidan kuat apabila mempunyai nilai IC₅₀ <50,0 ppm (Molyneux, 2004). 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 (Dyahariesti, 2016).

2.4 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.3 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:

- = memicu
- | = menghambat
- ▭ = diteliti

Tubuh memiliki mekanisme penyembuhan fraktur tulang secara alami untuk mengembalikan kondisi tulang yang diskontinyu. Ketika terjadi fraktur, terjadi perdarahan yang akan memicu reaksi inflamasi yang ditandai dengan hangat dan pembengkakan. Inflamasi meliputi pemanggilan sel inflamasi yang mensekresikan enzim lisosom untuk mencerna jaringan mati dan memanggil sel pluripoten serta fibroblast oleh mekanisme prostaglandin dan pembekuan darah di lokasi fraktur yang bernama hematoma. Aktivitas osteoklas dan fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen berjalan mengikuti proses inflamasi yang terjadi.

Ketiga proses ini memicu stres oksidatif pada tubuh. Stres oksidatif menstimulasi radikal bebas berupa *ROS* dan *RNS*. *RNS* dalam jumlah besar yang menyebabkan terhambatnya proliferasi osteoblas dan memicu apoptosis osteoblas. Sebagai akibat dari peningkatan *ROS* terjadi peroksidasi lipid yang menghambat regenerasi sel.

Dalam menangani fraktur, dibutuhkan antioksidan untuk membantu stimulasi osteoblas. Antioksidan ini dapat berasal dari flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun 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 hidropersida (H_2O_2) dengan ion logam dapat diredam. Selain itu monomer dari flavonoid yaitu *catechin* dapat meningkatkan diferensiasi dan proliferasi osteoblas (Choi dan Hwang, 2003).

Jumlah osteoblas dapat dijadikan salah satu indikator dalam penilaian proses penyembuhan fraktur tulang. Jumlah sel osteoblas juga mencerminkan proses *remodelling* tulang. Oleh karena itu, adanya terapi nutrisi yang berbasis ekstrak etanol daun bayam merah ini diharapkan mampu mengoptimalkan proses penyembuhan fraktur tulang yang ditinjau dari jumlah sel osteoblas.

2.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

Terdapat perbedaan jumlah sel osteoblas pada fraktur femur tikus wistar jantan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) berbagai dosis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan 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 (Pratiknya, 2003 dan Notoatmodjo, 2005).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat, yaitu di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan tikus, penyondean ekstrak daun bayam merah, dan pembedahan tikus, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pengeringan daun bayam merah, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) dan Laboratorium Patologi Anatomi RS dr. Soebandi Jember untuk pemeriksaan histopatologis.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai 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 *drop out* dari sampel penelitian ini adalah tikus mati pada saat penelitian.

3.3.2 Jumlah dan Pengelompokan 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 = standard 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 (Wuri, 2016) . Sehingga didapat penghitungan sebagai berikut

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

Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 6 sampel tulang femur kanan tikus wistar jantan setiap kelompok, dengan tujuan agar diperoleh sampel penelitian yang banyak dari hewan coba seminimal mungkin serta untuk menghindari terjadinya *drop out* pada sampel. 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), kelompok perlakuan 3 (P3). (Tabel 3.1).

Tabel 2.1 Tabel Perlakuan tiap kelompok

Kelompok Kontrol Negatif	Kelompok Kontrol Positif	Kelompok Perlakuan 1 (P1)	Kelompok Perlakuan 2 (P2)	Kelompok Perlakuan 3 (P3)
Sampel dibuat fraktur, diberi pakan , dan sonde tween 1%.	Sampel dibuat fraktur, diberi pakan , dan 2mg vitamin C	Sampel dibuat fraktur, diberi pakan , dan konsumsi bayam merah dengan dosis 35,4 mg/150g BB	Sampel dibuat fraktur, diberi pakan , dan konsumsi bayam merah dengan dosis 70,8 mg/150g BB	Sampel dibuat fraktur, diberi pakan , dan konsumsi bayam merah dengan dosis 141,6 mg/150g BB

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol bayam merah pada kelompok P1 dengan dosis 35,4 mg/150g BB, pada kelompok P2 dengan dosis 70,8 mg/150g BB, pada kelompok P3 dengan dosis 141,6 mg/150g BB. Dosis tersebut didapatkan dari penelitian sebelumnya tentang ekstrak etanol daun bayam merah terhadap mencit. Untuk penghitungan dosis dapat dilihat di Lampiran 3.1.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel osteoblas dari gambaran histopatologi penyembuhan tulang femur tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah umur, berat badan, jenis kelamin, galur, lama perlakuan, makanan, minuman, tempat, cara pemeliharaan hewan coba, prosedur pemberian ekstrak etanol daun bayam merah, induksi fraktur dan pembidaian hewan coba, prosedur pengambilan preparat, prosedur pengamatan histopatologi dan radiologi.

3.5 Definisi Operasional

a. Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)

Ekstrak etanol daun bayam merah adalah simplisia *Amaranthus tricolor L.* dengan cara mengekstraksi daun bayam merah dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi dan evaporasi dengan dosis sebesar 35,4 mg/150gBB ; 70,8 mg/150gBB ; dan 141,6 mg/150gBB. Metode penentuan dosis dapat dilihat di lampiran A. Tabel konversi perhitungan dosis menurut Ngatidjan, 1991 dapat dilihat di Lampiran C.

b. Sel Osteoblas

Sel osteoblas merupakan sel basofilik dan mononuklear dengan inti yang besar dan terletak di tepi trabekula (Jayakumar dan Silvio, 2010). Pengamatan osteoblas melalui mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada tiga lapang pandang.

c. Induksi fraktur tulang femur

Induksi fraktur tulang adalah pematangan tulang femur dekstra bagian diafisis dengan kompresi manual. Sebelum dilakukan pematangan tulang, tikus wistar jantan dianastesi general menggunakan ketamin.

d. Kelompok Kontrol Positif

Kelompok kontrol positif pada penelitian ini diberi perlakuan sonde berisi vitamin C 2mg yang telah dilarutkan pada 1ml aquadest selama 7 hari.

e. Kelompok Kontrol Negatif

Kelompok kontrol negatif pada penelitian ini diberi perlakuan sonde 1% *tween* sebanyak 1ml selama 7 hari.

f. Jumlah Sel Osteoblas

Jumlah sel osteoblas didapatkan dengan pemeriksaan sediaan histopatologis perbesaran 400x pada 3 lapang pandang kemudian dihitung dengan rumus, $N = \frac{N1 + N2 + N3}{3}$

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan coba : kandang yang terbuat dari plastik, tempat makan, tempat minum,, timbangan analitik, sarung tangan dan masker, sonde lambung dan *syringe*, *tissue* serta spidol.
- b. Alat untuk membuat sediaan ekstrak etanol bayam merah : mortar, gelas sebagai wadah, vaporator dan vortex.
- c. Alat untuk terminasi dan pengambilan sampel : toples kedap udara, gunting, gunting bedah, pinset surgis, skalpel, mata pisau skalpel, masker dan sarung tangan.
- d. Alat untuk membuat preparat dan menghitung sel osteoblas : mikrotom, pewarna Hematoksilin-Eosin dan mikroskop.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan dengan berat badan 150-200 gram, ekstrak etanol daun bayam merah, akuades, anestesi ketamin, pakan standar tikus, dan sekam kayu.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 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 6 ekor dalam satu kandang, tikus diadaptasi dengan diberikan pakan standar dan minum akuades *ad libitum* selama 7 hari. Berat badan tikus ditimbang setiap hari untuk memantau perkembangan tikus sebelum dilakukan penelitian. Setelah dilakukan adaptasi selama 7 hari, lalu tikus dilakukan penimbangan lagi dan dilakukan randomisasi.

3.7.2 Randomisasi Sampel Penelitian

Randomisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Simple Random Sampling* (Nasution, 2003). 30 ekor tikus dikelompokkan berdasarkan rentang

berat badan yaitu 150-175, 176-180, dan 181-200. Dari masing-masing kelompok rentang diambil secara acak dan dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif (K+), kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).

3.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Ada lima kelompok yang dibagi sesuai perlakuan masing-masing, antara lain kelompok kontrol positif yang diberi sonde vitamin C 2mg/hari, kelompok kontrol negative yang diberi sone 1,5ml 1% tween, 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. Penghitungan dosis berdasarkan dosis efektif daun bayam merah pada penelitian sebelumnya, penghitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 3.1 (Wuri, 2016).

3.7.4 Induksi Fraktur Tulang

Anastesi dilakukan terlebih dahulu sebelum tulang dipatahkan. Ketamin merupakan bahan anastesi yang diinjeksikan secara intramuskular ke hewan coba. 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 dengan tenaga keras namun juga tidak lemah. Pengecekan apakah telah terjadi fraktur dengan cara *look, feel, and move* serta adanya *false movement* (Diyansah, 2015).

3.7.5 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. Serbuk halus yang didapatkan 161,35 gram. 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 (Wuri, 2016)

3.7.6 Perlakuan Hewan Coba

Setelah penginduksian fraktur dan dikonfirmasi dengan pemeriksaan radiologis lalu dibidai menggunakan leukodur. Pada hewan coba dilakukan penyondean ekstrak etanol daun bayam merah. Penyondean ini diberikan berdasarkan dosis yang telah ditentukan setiap kelompoknya sehari sekali, setiap hari selama 7 hari. Kemudian pada hari kedelapan dilakukan terminasi eutanasia yang dilanjutkan dengan pembedahan untuk mengambil tulang femur dekstra yang sudah dipatahkan.

3.7.7 Koleksi Sampel Femur

Setelah 7 hari tikus diberi perlakuan, tikus pada seluruh kelompok penelitian diterminasi menggunakan anestesi ketamin yang diteteskan pada lembaran kapas yang kemudian dimasukkan ke dalam sebuah toples kedap udara. Setelah kapas mengandung kloroform dimasukkan dalam toples, kemudian tikus dimasukkan dan ditunggu beberapa menit hingga vital pada tikus tidak terdeteksi (denyut jantung, pernapasan). Apabila tikus telah benar-benar mati, maka dilakukan pengambilan sampel tulang femur kanan yang diambil secara posisi anatomis.

3.7.8 Pemeriksaan Histopatologis Jaringan Tulang

Pembuatan preparat histopatologis menggunakan blok jaringan di sekitar area fraktur dan menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Sampel tulang untuk pembuatan preparat histopatologi adalah tulang pada *fracture site*. Jaringan tulang yang diambil dilakukan dekalsifikasi menggunakan asam format 10% selama 3 hari. Pemeriksaan histopatologi jaringan tulang menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x untuk menghitung jumlah sel osteoblas pada tiga lapang pandang sebagai parameter proses penyembuhan tulang. Rata-rata jumlah sel osteoblas dari ketiga lapang pandang tersebut adalah

hasil yang diambil sebagai jumlah sel osteoblas tiap sampel. Untuk menghindari bias, penghitungan dilakukan oleh 2 orang yang berbeda kemudian diambil rata-ratanya (Yudaniyanti, 2008).

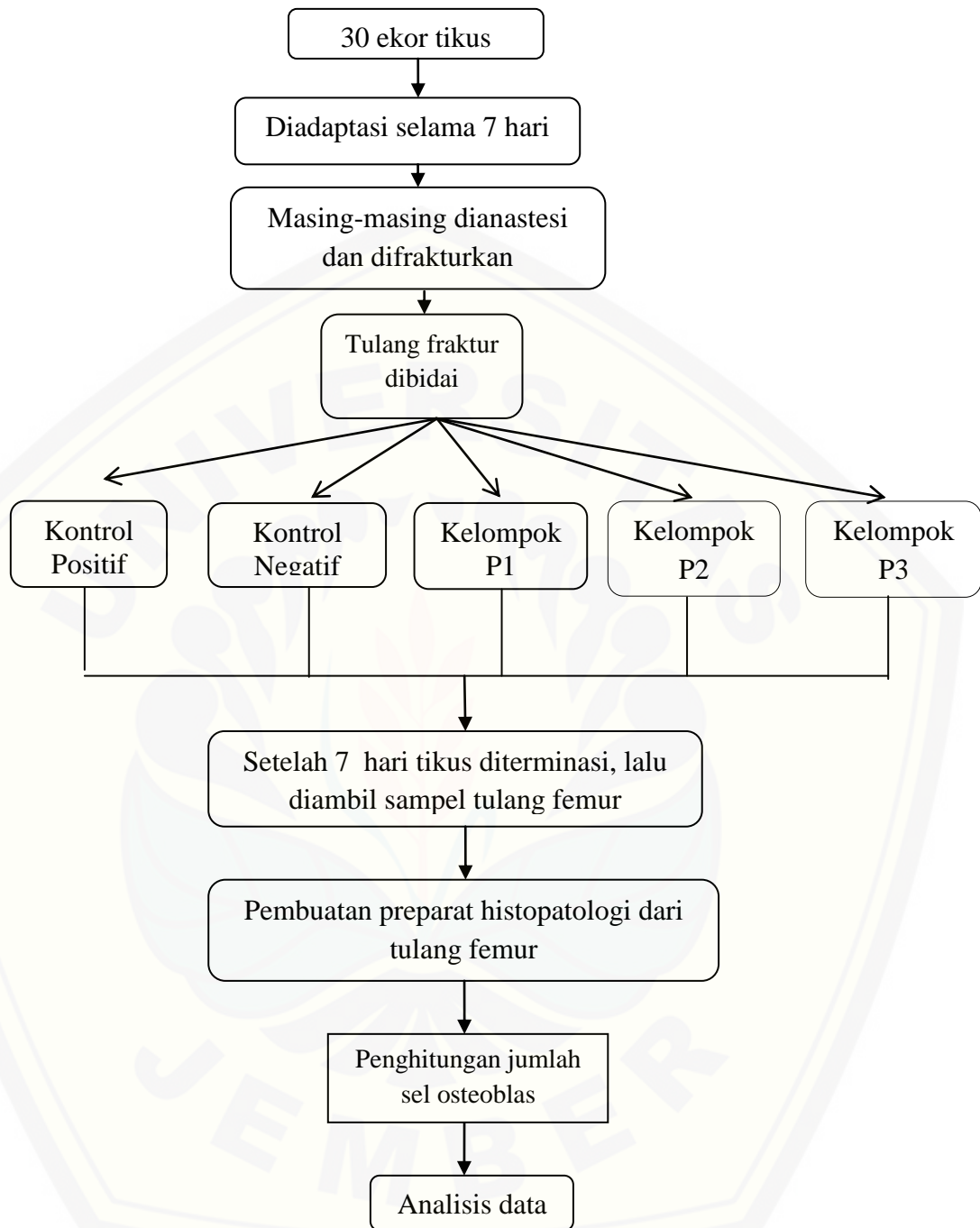
3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ini berupa jumlah sel osteoblas dari gambaran histopatologi fraktur femur tikus wistar jantan. Data hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene's test*. Setelah data telah memenuhi syarat uji parametrik, kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* lalu *Post Hoc LSD* untuk membandingkan makna jumlah sel osteoblas antar kelompok.

3.9 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik dengan nomor surat 1.235/H25.1.11/KE/2017 pada tanggal 29 Desember 2017

3.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan terhadap jumlah sel osteoblas pada fraktur femur tikus wistar jantan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah berbagai dosis.

5.2 Saran

Adapun saran dari penulis sebagai berikut.

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun bayam merah terhadap jumlah osteoklas pada tikus wistar jantan yang diinduksi fraktur femur berdasarkan gambaran histopatologis jaringan tulang.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif ekstrak etanol daun bayam merah terhadap fraktur tulang.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol daun bayam merah berdasarkan uji klinis.
- d. Perlu dilakukan penelitian mengenai hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun bayam merah terhadap fraktur tulang berdasarkan periode waktu.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A. Dan Prabakaran S. A. 2005. Oxidative Stress in Male Fertility and Antioxidants in a Difficult Balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. Vol 2(1(3): 1-8
- 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.
- Aghnia, R. 2015. Perbandingan Lama Rawat Inap Attara Pasien Fraktur Terbuka Grade III dalam Fase Golden Period Dengan Over Golden Period. *Skripsi*. Surakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Apley, A.G dan Solomon. 2010. *Orthopedi dan Fraktur Sistem Apley*. Jakarta: Widya Medika.
- Ardiansyah. 2007. *Antioksidan dan Perannya Bagi Kesehatan*.
www.ardiansyah.multiply.com/journal/item/14 (29 Januari 2018, 12.00WIB).
- Balitbang Kemenkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI
- Cadenas E. dan Packer L. 2002. *Handbook of Antioxidant*. 2ndEd. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc.
- Choi, E.M dan Hwang, J.K. 2003. Effects of (1)-Catechin on the Function of Osteoblastic Cells. *Biol. 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.
- Depkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Diyansah, A. B. 2015. "Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Kadar Malondialdehida Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Dyahariesti, N. 2016. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Bayam (*Amaranthus tricolor L.*) sebagai Antioksidan dan Penurun Kadar Gula Darah. *Jurnal Farmasi Indonesia*.

- Giorgi, K. 2016. *Fracture : From A to Z*. San Fransisco: Lighting Press
- 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, Seber, Gulbas. 2007. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 66 (5): 473-475
- Haffner-Luntzer M., Fischer V, dan Prystaz K. 2017. The inflammatory phase of fracture healing is influenced by oestrogen status in mice. *European Journal of Medical Research* (6):211-214
- Halliwell, B & J. M. C. Gutteridge. 2000. Free radicals in biology and medicine. 4th Ed. Oxford University Press, New York. Master thesis. Pretoria (South Africa) : University of Pretoria.
- Hastuti, Nina. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Flavonoid Daun Bayam Merah Sebagai Senyawa Penghambat Pertumbuhan Bakteri. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Hernani & Rahardjo, R. 2006. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Swadaya.
- Higgins, J.E & Klinbaum, A.P. 1985. *Design Methodology for Randomized Clinical Trial's, Part II of The Basic of Randomized Clinical Trial's with a Emphasis on Contraceptive Research*, New York: Family Health International, pp 24-25
- Hii, C.L., Law, C.L., Suzannah, S., Misnawi., dan Cloke, M. 2009. Polyphenols in *Amaranthus tricolor* L. *As. J. Food Ag-Ind* 2(04): 702-722.
- 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.
- Jayakumar P. dan Silvio L.D., 2010. Osteoblast in bone tissue engineering, *Journal Engineering in Medicine*. 224:1415
- 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.
-

Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoid: an Overview. *Hindawi*. 1-16.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Pedoman Gizi Seimbang*. Jakarta: Peraturan Menkes RI.

Kristoyadi, S.A., Napitupulu, O., dan Soemantri, B. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Jumlah Osteoblas pada Tulang Tibia Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) Pasca Ovarioektomi. *Skripsi*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas

Mahartha, R.A., Maliawan, S., dan Kawiyana, K.S. 2013. Manajemen Fraktur pada Trauma Muskuloskeletal. Bali: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

Medikasari. 2000. Bahan Makanan Tambahan, Fungsi, dan Penggunaannya. www.indomedia.com [Diakses pada 26 Desember 2017]

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.

Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Techn*, 26 (2), 211-219.

Mueller, L. dan V. Boehm. 2011. Antioxidant Activity of β -carotene Compounds in Different *in vitro* assays. *Molecules*. 16: 1055-1069.

Nasution. 2003. Metode Research (Penelitian Ilmiah). Jakarta : Bumi Aksara.

Notoatmodjo, S. 2007. *Metodologi penelitian kesehatan*. Jakarta : PT Rineka Cipta

Noori, M., Talebi M., dan nasiri Z. 2015. Seven *Amaranthus L.* (*Amaranthaceae*)

Taxa Flavonoid Compounds from Tehran Province, Iran. *International Journal of Modern Botany*. 5(1): 9-17.

Nurmasari, P.D. 2013. *Peranan Ekstrak Bangle (zingiber cassumunar roxb.)*

terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang terinfeksi Plasmodium berghei. Skripsi. Jember: Universitas Jember.

Pratiknya A.W. 2003. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Ed.1, Cet.5. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada

- 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.
- 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.
- Rasjad, C. 2006. *Pengantar Ilmu Bedah Orthopedi*. Jakarta : Yarsif Watampone
- Rukmana, H. R. 1994. *Bayam, Bertanam dan Pengolahan Pasca Panen*. Kanisius. Yogyakarta.
- Reda, I. 2001. "The effect OF Sport Training with All of Enviroment High & Low Pollution on The Free Radicals Level nd The effeciency Of The Physical Work at The Football Players.'. Disertasi. Faucal Physic Educ, El-Menia Univ.
- Sabri, M. 2013. Administration's Effe ct of Ethanol Extract of *Cissus quadrangularis* Salisb on Growth of Lumbal Bone in Ovariectomized Rats. *Jurnal Natural*. Vol 13(2): 48-54.
- Saparinto, C. 2013. *Grown Your Own Vegetables Panduan Praktis Menanam Sayuran Konsumsi Populer di Pekarangan*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Sjamsuhidajat, R dan Wim, de Jong (ed). 2010. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Jakarta: EGC
- Sheweita, SA & K.I. Khoshal. 2011. Calcium Metabolism and Oxidative Stress in Bone Fractures: Role of Antioxidants. Scaffold Mesenchymal Cell (Regenerative of Massive Bone Defect with Bovine Hidroxyapatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells). *JBP*; 13 (3): 519-525.
- Sofia, D. 2013. *Antioksidan dan Radikal Bebas*. <http://www.chem-is-try/sect=artikel&ext=81> [Diakses pada 29 Desember 2017]
- Solomon, L., D. Warwick, dan S. Wayagam. 2010. *Apley's System of Orthopaedics and Fractures, Ninth Edition*. United Kingdom: University of Bristol.
- Sunarjono, H. 2013. *Bertanam 36 Jenis Sayur*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Suryohudoyo, P. 2000. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Ilmu Kedokteran Molekuler*. Kapita Seleкта, Jakarta

- Suwandi, T. 2012. "Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela menurunkan Malondialdehid pada Tikus yang Diberi Minyak Jelantah." Tidak Diterbitkan. Tesis. Denpasar: Universitas Udayana.
- Utami, P. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol 39: 44-84.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius. Hal. 189-90
- 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.
- Wulandari, P. 2012. Antibacterial Effect of Ethanol Extract Red Spinach (*Amaranthus tricolor L.*) on growth in vitro by shigella dysenteriae. *Jurnal Medika Planta*. 1(5). 67-75)
- Wuri, S. M. 2016. "Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah sebagai Hepatoprotektor terhadap Kadar ALP Serum Mencit yang Diinduksi Isoniazid". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Yudaniayanti, I. S. 2008. *Gambaran Histopatologi Kesembuhan Patah Tulang Femur Dengan Terapi Kalsium Karbonat Dosis Tinggi Pada Tikus Jantan*. *Jurnal Veteriner* Desember 2008 Vol. 9 No. 4 : 182-187
- Zhubika, Z. V. 2014. "Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao*) Terhadap Jumlah Sel Osteoblas Pada Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Tulang Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang". Skripsi. Jember: Universitas Jember.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 3.1 PENGHITUNGAN 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). $6,75 \times 7 = 47,25$ mg/200grBB D dicari dosis untuk 150gr (kriteria inklusi terendah) $X = 47,25 \times \frac{3}{4} = 35,4$ 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 $90 \text{ mg/hr} \times 0,018 = 1,62 \sim 2$ 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 PENGHITUNGAN DOSIS

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

(Suhardjono, 1994)

LAMPIRAN 4.1 HASIL ANALISIS DATA

ANOVA

JumlahSelOsteoblas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	411,800	4	102,950	134,283	,000
Within Groups	19,167	25	,767		
Total	430,967	29			

Post Hoc Tests

Dependent Variable: JumlahSelOsteoblas

LSD

(I) NamaKelompok	(J) NamaKelompok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KontrolNegatif	KelompokPositif	-1,00000	,50553	,059	-2,0411	,0411
	KelompokSatu	-5,66667*	,50553	,000	-6,7078	-4,6255
	KelompokDua	-8,16667*	,50553	,000	-9,2078	-7,1255
	KelompokTiga	-9,16667*	,50553	,000	-10,2078	-8,1255
KelompokPositif	KontrolNegatif	1,00000	,50553	,059	-,0411	2,0411
	KelompokSatu	-4,66667*	,50553	,000	-5,7078	-3,6255
	KelompokDua	-7,16667*	,50553	,000	-8,2078	-6,1255
	KelompokTiga	-8,16667*	,50553	,000	-9,2078	-7,1255
KelompokSatu	KontrolNegatif	5,66667*	,50553	,000	4,6255	6,7078
	KelompokPositif	4,66667*	,50553	,000	3,6255	5,7078

	KelompokDua	-2,50000*	,50553	,000	-3,5411	-1,4589
	KelompokTiga	-3,50000*	,50553	,000	-4,5411	-2,4589
KelompokDua	KontrolNegatif	8,16667*	,50553	,000	7,1255	9,2078
	KelompokPositif	7,16667*	,50553	,000	6,1255	8,2078
	KelompokSatu	2,50000*	,50553	,000	1,4589	3,5411
	KelompokTiga	-1,00000	,50553	,059	-2,0411	,0411
KelompokTiga	KontrolNegatif	9,16667*	,50553	,000	8,1255	10,2078
	KelompokPositif	8,16667*	,50553	,000	7,1255	9,2078
	KelompokSatu	3,50000*	,50553	,000	2,4589	4,5411
	KelompokDua	1,00000	,50553	,059	-,0411	2,0411

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

Hasil Uji Normalitas Saphiro-Wilk

NamaKelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
JumlahSelOsteoblas KontrolNegatif	,866	6	,212
KelompokPositif	,866	6	,212
KelompokSatu	,960	6	,820
KelompokDua	,853	6	,167
KelompokTiga	,202	6	,200*

Hasil Uji Lavene's Test

Test of Homogeneity of Variances

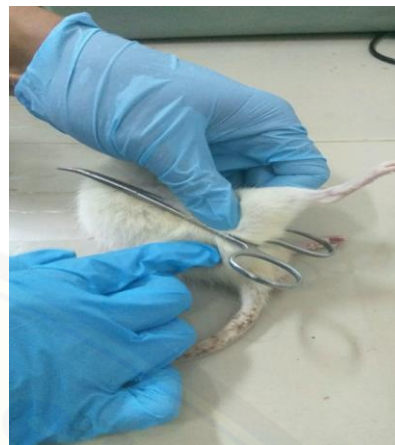
JumlahSelOsteoblas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,326	4	25	,858

LAMPIRAN 4.2 DOKUMENTASI PENELITIAN



Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah



Pemfrakturasi Tulang Femur



Proses Pembidaian



Pembidaian dengan Leukodur



Sonde Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah



Pengambilan Tulang Femur
Setelah Terminasi



Penyimpanan Sampel Tulang Femur



LAMPIRAN 4.3 KETERANGAN SUDAH MELAKUKAN PENELITIAN



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl Kalimantan No 37 – Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121 ☐

SURAT KETERANGAN
No. 010/ Biomedik /UJ/2018

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : drg. Amandia Dewi Permata Shita, M.Biomed
NIP : 198006032006042002
Jabatan : Ketua Bagian Biomedik
Inststitusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Ferdian Nugroho
NIM : 142010101001
Fakultas/Prodi : Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran
Universitas : Universitas Jember

Yang bersangkutan telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Fisiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, terhitung bulan 15 Nopember 2017-29 Desember 2017 guna penulisan tugas akhir dengan judul: **"PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH (AMARANTHUS TRICOLOR L) TERHADAP PROSES PENYEMBUHAN FRAKTUR FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN"**.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 7 Maret 2018
Ketua Bagian Biomedik



(drg. Amandia Dewi) P.S., M.Biomed
NIP. 198006032006042002

LAMPIRAN 4.4 KETERANGAN 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. 235 /H25.1.11/KE/2017**

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 EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP PROSES PENYEMBUHAN FRAKTUR FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN

Nama Peneliti Utama : Ferdian Nugroho.
Name of the principal investigator

NIM : 142010101001

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 29 Desember 2017
Komisi Etik Penelitian



Riyanti, Sp.PK

