

Hubungan antara Kadar Malondialdehyde (MDA) dengan Histopatologi Jaringan Tulang pada Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang

The Relation between Malondialdehyde (MDA) and Histopathological Appearance in male Wistar Rats Model

Febrina Sylva Fridayanti¹, Erma Sulistyarningsih¹, Elly Nurus Sakinah¹
¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

²Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

³Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia, Telp./Fax. (+62331) 337877
e-mail korespondensi: febrinasylvafridayanti@gmail.com

Abstrak

Fraktur tulang merupakan masalah kesehatan yang serius di Indonesia karena jumlah penderitanya yang cukup tinggi. Proses penyembuhan fraktur dapat dihambat oleh keadaan stres oksidatif yang disebabkan ketidakseimbangan kadar radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh. Antioksidan, seperti polifenol yang terkandung dalam kakao dapat membantu mengatasi stress oksidatif. Tujuan umum penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol kakao terhadap kadar MDA dan histopatologi jaringan tulang tikus wistar jantan model fraktur tulang. Penelitian ini merupakan studi eksperimental secara in vivo dengan rancangan *post-test only controlled group*. 30 ekor tikus dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan yang diinduksi fraktur diberikan terapi ekstrak etanol kakao dengan dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB secara peroral selama 21 hari. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna kadar MDA dan jumlah osteoblas pada histopatologi tulang antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Selain itu, terdapat hubungan yang kuat antara kadar MDA dengan jumlah osteoblas dengan arah negatif ($R = -0,771$). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol kakao memiliki dampak positif dalam mengatasi stres oksidatif dan meningkatkan jumlah osteoblas pada penyembuhan fraktur.

Kata kunci: ekstrak etanol kakao, polifenol, proses penyembuhan fraktur, stres oksidatif

Abstract

Fractures are a serious health problem in Indonesia due to increasing prevalence. The healing process of fracture is disturbed by the oxidative stress that caused by imbalance quantity of free radical and antioxidant. An antioxidant such as polyphenol, which can be found in cocoa, is needed to suppress oxidative stress. The study aimed to investigate the effect of the ethanolic extract of cacao on fracture healing process in a rat model through MDA concentration and histopathological appearance. This study is in vivo experimental study with post-test only controlled group design. 30 male Wistar rats were randomized and divided into 5 groups. 1 group was rats without fractured. The negative control and three treatment groups were rats with fractured manually on left tibia under anesthesia and immobilized by bandage. The treatment groups treated with cocoa ethanolic extract in a dose of 125 mg/kgBW, 250 mg/kgBW, and 500 mg/kgBW orally for 21 days. The result showed that there was a significant different between the treatment groups and the negative control group on MDA concentration and histopathological appearance ($p > 0,05$). The correlation between them were strong and had negative direction ($R = -0,771$). The study concluded that cocoa ethanolic extract had a positive effect to suppress oxidation stress and increases the number of osteoblast on fracture healing process.

Key words: cocoa ethanolic extract, polyphenol, fracture healing process, oxidative stress

Pendahuluan

Fraktur tulang merupakan permasalahan kesehatan di bidang ortopedi yang cukup serius karena jumlah penderita cukup tinggi di Indonesia. Penyebab tersering dari kasus ini adalah kecelakaan lalu lintas dan perubahan densitas mineral tulang (DMT) (Riyadina W *et al.*, 2009; Trihapsari E, 2009]. Penanganan awal pada fraktur tulang adalah reposisi, yang bertujuan untuk mengurangi nyeri, mengembalikan pada posisi yang tepat (anatomis), dan membantu mengembalikan fungsi untuk bergerak sedini mungkin (Solomon *et al.*, 2010]. Setelah tulang posisi anatomis, tubuh memiliki proses penyembuhan fraktur tulang secara alami, yang meliputi lima tahapan, yaitu fase hematoma, inflamasi dan proliferasi, pembentukan kalus, konsolidasi, dan remodeling yang dapat dipantau dengan histopatologi maupun rontgen (Solomon *et al.*, 2010]. Namun, dalam proses tersebut dapat dihambat oleh keadaan stress 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 Paker, 2002].

Kadar radikal bebas yang meningkat pada fraktur tulang akan diikuti dengan peningkatan kadar MDA, baik pada MDA serum maupun MDA jaringan tulang. Perubahan kadar MDA menunjukkan adanya perubahan aktivitas radikal bebas (Nurmasari P, 2013]. Selain itu, kadar radikal bebas yang tinggi menyebabkan inhibisi dari proliferasi sel osteoblas dan penurunan jumlah sel osteoblas yang dapat diperiksa melalui pemeriksaan histopatologi jaringan tulang. Namun, belum dibuktikan secara ilmiah tentang hubungan antara kenaikan kadar MDA pada fraktur tulang dengan penurunan jumlah osteoblas. Pada penelitian ini, penulis tertarik untuk membuktikan hipotesis bahwa apabila kadar radikal bebas yang meningkat yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA akan menyebabkan penurunan jumlah sel osteoblas, sehingga mengganggu proses penyembuhan fraktur tulang secara alami.

Stres oksidatif yang terjadi pada fraktur tulang tersebut dapat diatasi dengan suplai antioksidan dari luar tubuh, yaitu polifenol. Polifenol merupakan suatu zat yang memiliki efek antioksidan untuk menurunkan stres oksidatif pada

sel (Maleyki A *et al.*, 2008]. Kadar polifenol cukup tinggi dapat ditemukan pada kakao (*Theobroma cacao*), yaitu sebesar 12-18% dari berat kering biji kakao. Kadar polifenol yang terkandung dalam kakao ini lebih besar dari kadar polifenol dalam teh dan anggur merah (Hii CL *et al.*, 2009]. Dalam hal ketersediaan kakao, Indonesia menduduki peringkat ketiga dunia sebagai penghasil kakao (Deptan RI., 2014]. Dengan demikian, polifenol dalam ekstrak etanol kakao berpotensi dalam mengoptimalkan proses penyembuhan fraktur tulang. Tujuan umum penelitian ini adalah terkandung dalam kakao dapat membantu mengatasi stress oksidatif. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol kakao terhadap kadar MDA jaringan tulang dan histopatologi jaringan tulang tikus wistar jantan model fraktur tulang.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu

Pelaksanaan penelitian berlangsung pada bulan Desember 2013-April 2014 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pemeriksaan MDA dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, tempat minum, neraca ohaus, neraca statistik, blender, oven, pres hidrolik, evaporator, vakum, sonde, spuit, vorteks, inkubator, spektrofotometri, gunting, tabung heparin, gunting bedah, pinset, dan jarum pentul. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pakan ternak, air, sekam, biji kakao, larutan hexan, larutan etanol, gips leukodur, fragmen tulang cruris tikus yang mengalami fraktur, mikrotom, larutan TCA 20%, dan larutan TBA 0,67%.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental laboratoric* secara *in vivo* menggunakan *post test only controlled group design*. Pengelompokan sampel penelitian menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan jumlah 30 ekor tikus *Ratus norvegicus* galur Wistar jantan dengan berat rata-rata sekitar 100-200 gram dan umur 2-3 bulan.

Prosedur Penelitian

Sampel dibagi ke dalam lima kelompok yang terdiri dari kelompok tanpa induksi fraktur (K1), kelompok

kontrol negatif (K2), dan tiga kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5), satu. Kelompok kontrol negatif dan seluruh kelompok perlakuan diinduksi fraktur pada tibia sinistra tungkai posterior secara kompresi manual. Induksi fraktur didahului dengan anestesi general dan dikonfirmasi dengan pemeriksaan radiologi. Setelah itu, pembidaian dilakukan pada regio tungkai yang fraktur menggunakan gips *Leukodur*.

Masa perlakuan pada semua kelompok adalah selama 21 hari. K1 dan K2 diberikan aquadest peroral 1x/hari. Sedangkan K3, K4, dan K5 diberikan terapi ekstrak etanol kakao peroral 1x/hari dengan dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500mg/kgBB (9). Pada akhir penelitian, semua tikus dieutanasia menggunakan eter dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan jaringan tulang.

Sampel pemeriksaan MDA jaringan tulang menggunakan tulang bagian *epiphyseal* dan dilakukan pemeriksaan dengan metode uji asam tiobarbiturat (TBA) (Shohag *et al.*, 2012). Pembacaan hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum (λ) 532 nm. Sedangkan sampel pemeriksaan histopatologi menggunakan tulang bagian *diaphyseal* digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Jaringan tulang tersebut didekalsifikasi 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 fraktur tulang (Sabri M, 2013).

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara komputerisasi dengan SPSS 21 PS dengan taraf signifikan $p < 0,05$. Kadar MDA jaringan tulang dan histopatologi jaringan tulang dianalisis dengan uji *One-Way ANOVA* yang dilanjutkan analisis *Post Hoc* metode *LSD (Least Significance Difference)*. Sedangkan hubungan kadar MDA jaringan tulang dengan histopatologi jaringan tulang dianalisis dengan uji *Bivariate Correlation* dengan koefisien *Pearson*. Data hasil analisis disajikan dalam bentuk mean \pm SD.

Hasil Penelitian

Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dimaksudkan untuk menentukan teknik pembidaian yang efektif. Pembidaian sebagai penatalaksanaan fraktur bertujuan untuk

reposisi tulang dan mencegah komplikasi akibat fraktur tulang pada hewan coba, seperti malunion dan sindroma kompartemen.

Seluruh hewan coba dilakukan induksi fraktur tulang dan kemudian dikonfirmasi dengan pemeriksaan radiologis (foto rontgen) pada tulang tibia sinistra tikus. Hasil pemeriksaan foto rontgen dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1 . Foto rontgen tulang tibia sinistra tikus wistar jantan setelah induksi fraktur tulang. Tanda bulat merah menunjukkan fraktur komplisit pada tulang tibia sinistra bagian *diaphyseal*

Setelah tikus diinduksi fraktur tulang, tikus diberikan perawatan pasca trauma yaitu pembidaian. Berdasarkan hasil uji pendahuluan, teknik pembidaian menggunakan gips *leukodur* akhirnya dipilih sebagai metode bidai yang efektif untuk uji perlakuan. Hal ini dikarenakan gips *leukodur* (Gambar 2) dapat mereposisi fragmen tulang yang mengalami fraktur tulang serta tidak menimbulkan komplikasi berupa sindroma kompartemen.



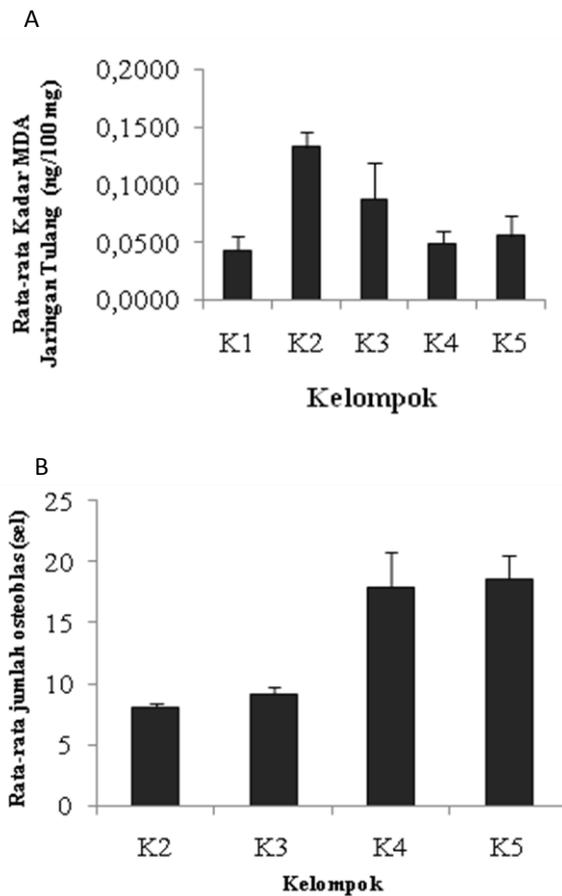
Gambar 2. Teknik pembidaian dengan gips *Leukodur*

Uji Perlakuan

MDA Jaringan Tulang

MDA jaringan tulang merupakan salah satu biomarker radikal bebas yang dalam hal ini terjadi pada jaringan tulang. Kadar MDA jaringan tulang juga menjadi penanda terjadinya stres oksidatif pada fraktur tulang. Rata-rata kadar MDA jaringan

tulang pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 3A berikut.



Gambar 3 A. Histogram rata-rata kadar MDA jaringan tulang pada setiap kelompok
 K1 Kelompok tanpa induksi fraktur dan pemberian aquadest peroral K2 Kelompok kontrol negatif dengan induksi fraktur tulang dan pemberian aquadest peroral K3 Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 125 mg/kgBB per oral K4 Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 250 mg/kgBB per oral K5 Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 500 mg/kgBB per oral
 B. Histogram rata-rata jumlah osteoblas jaringan tulang yang difraktur tiap kelompok

Pada kelompok perlakuan (K3, K4, K5) terjadi penurunan kadar MDA jaringan tulang dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K2). Selain itu, kadar MDA juga menurun mendekati nilai normal, seperti pada K1. K4 yang

mendapatkan terapi ekstrak etanol kakao sebesar 250 mg/kgBB memiliki rata-rata kadar MDA jaringan tulang paling rendah, yaitu 0,0496 ng/100 mg. Sedangkan K 5 yang mendapatkan terapi ekstrak etanol kakao terbesar (500 mg/kgBB) memiliki rata-rata kadar MDA jaringan tulang yang lebih tinggi dari kelompok 4, namun peningkatan tidak signifikan.

Data penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Pada uji normalitas (uji *Shapiro-Wilk*) didapatkan nilai signifikansi $p=0,350$ ($p>0,05$), yang berarti H_0 diterima dan sampel berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Sedangkan untuk uji homogenitas didapatkan nilai *Levene Test* dengan signifikansi $p=0,245$ ($p>0,05$), yang berarti H_0 diterima dan varian setiap sampel sama atau homogen.

Pada uji *One Way Anova* didapatkan hasil signifikansi sebesar $p=0,000$ ($p<0,05$), yang berarti terdapat perbedaan kadar MDA jaringan tulang secara bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Uji hipotesis kemudian dilanjutkan dengan uji analisis *Post Hoc* dengan metode *LSD*. Uji analisis ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pada setiap kelompok perlakuan. Secara singkat, hasil uji analisis *LSD* dapat dilihat pada Tabel 1A.

Tabel 1 A. Hasil uji analisis *post hoc LSD* kadar MDA jaringan tulang

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,000	0,000	0,544	0,246
K2	0,000		0,000	0,000	0,000
K3	0,000	0,000		0,001	0,005
K4	0,544	0,000	0,001		0,572
K5	0,246	0,000	0,005	0,572	

B. Hasil uji analisis *post hoc LSD* histopatologi jaringan tulang

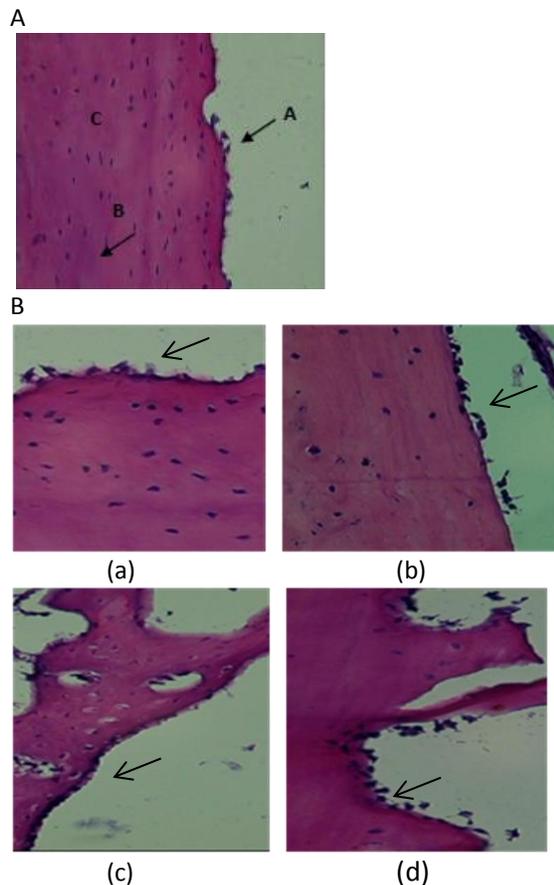
	K2	K3	K4	K5
K2		0,307	0,000	0,000
K3	0,307		0,001	0,005
K4	0,000	0,000		0,483
K5	0,000	0,005	0,483	

Keterangan:
 $p < 0,05$ = terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok
 $p > 0,05$ = tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok

Histopatologi Jaringan Tulang

Pemeriksaan histopatologi tulang bertujuan untuk mengetahui proses penyembuhan tulang secara

mikroskopik. Jumlah osteoblas yang meningkat menunjukkan terjadinya proses *remodelling* pada jaringan tulang (Sabri M, 2013]. Adapun gambaran morfologi penyusun jaringan tulang dapat dilihat pada Gambar 4A berikut.



Gambar 4 A. Gambaran morfologi penyusun tulang pada perbesaran 400x dengan pewarnaan HE

A Sel osteoblas merupakan sel yang memiliki bentuk kuboid hingga piramid dengan sitoplasma basofilik dan berderet epitelial di tepi trabekula, B Sel osteosit merupakan sel osteoblas yang terbenam dalam lacuna, C Matriks tulang

B. Gambaran histopatologi jaringan tulang fraktur dengan pewarnaan HE dan diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x.

(a) Kelompok kontrol negatif dengan induksi fraktur tulang dan pemberian aquadest peroral (K2), (b) Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 125 mg/kgBB per oral (K3), (c) Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 250 mg/kgBB per oral (K4), (d) Kelompok perlakuan dengan induksi fraktur tulang dan pemberian ekstrak etanol kakao 500 mg/kgBB per oral (K5). Tampak sel osteoblas dengan sitoplasma basofilik, berinti besar, dan berjajar di sepanjang trabekulae (ditunjuk tanda panah).

Jumlah sel osteoblas bertambah dari kelompok kontrol negatif terhadap kelompok perlakuan

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 memineralisasi matriks tulang (Jayakumar dan Silvio, 2010]. Adapun perwakilan gambaran histopatologi osteoblas tiap kelompok dapat dilihat pada Gambar 4B diatas.

Sedangkan rata-rata jumlah osteoblas pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 3B.

Pada kelompok perlakuan (K3, K4, K5) terjadi peningkatan jumlah osteoblas dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K2). Sedangkan, data jumlah osteoblas pada kelompok 1 tidak bisa dilakukan penilaian akibat kesalahan pada proses dekalsifikasi tulang.

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Uji normalitas (uji *Shapiro-Wilk*) didapatkan nilai signifikansi $p=0,212$ ($p>0,05$), yang berarti H_0 diterima dan sampel berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Sedangkan untuk uji homogenitas didapatkan nilai *Levene Test* dengan signifikansi $p=0,080$ ($p>0,05$), yang berarti H_0 diterima dan varian setiap sampel sama atau homogen.

Pada uji *One Way Anova* didapatkan hasil signifikansi sebesar $p=0,000$ ($p<0,05$), yang berarti terdapat perbedaan jumlah osteoblas secara bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Uji hipotesis kemudian dilanjutkan dengan uji analisis *Post Hoc* dengan metode *LSD*. Uji analisis ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pada setiap kelompok perlakuan. Secara singkat, hasil uji analisis *LSD* dapat dilihat pada Tabel 1B.

Hubungan antara Kadar MDA Jaringan Tulang dengan Histopatologi Jaringan Tulang

Data kadar MDA jaringan tulang dengan jumlah osteoblas jaringan tulang yang difraktur dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data kadar MDA jaringan tulang dengan jumlah osteoblas jaringan tulang yang difraktur

Kelompok	Kadar MDA Jaringan Tulang ($\bar{X} \pm SD$) ng/100 mg	Jumlah sel osteoblas ($\bar{X} \pm SD$)
K2	0,1331 ± 0,0131	8,06 ± 0,25
K3	0,0881 ± 0,0310	9,07 ± 0,60
K4	0,0496 ± 0,0107	17,89 ± 2,81
K5	0,0556 ± 0,0310	18,61 ± 1,95

Untuk mengetahui hubungan antara kadar MDA jaringan tulang dengan histopatologi jaringan tulang maka dilakukan uji hipotesis. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Bivariate Correlation* dengan koefisien *Pearson*. Pada uji tersebut didapatkan hasil $R = -0,771$.

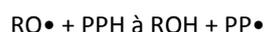
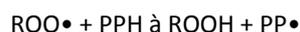
Pembahasan

Hasil penelitian untuk kadar MDA jaringan tulang menunjukkan terdapat penurunan kadar MDA jaringan tulang pada kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K2). Namun, kadar MDA tikus pada K3 yang diberikan terapi ekstrak etanol kakao dosis 125 mg/kgBB belum terjadi penurunan kadar MDA jaringan tulang hingga mendekati nilai normal. Hal ini diduga karena dosis yang diberikan terlalu kecil atau berada di bawah dosis minimal.

Pada dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB, terjadi penurunan kadar MDA jaringan tulang hingga mendekati nilai normal. Selain itu, kadar MDA jaringan tulang menunjukkan perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok perlakuan tersebut dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian terapi nutrisi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kakao dengan dosis 250 dan 500 mg/kgBB dapat mengatasi stres oksidatif yang terjadi pada fraktur tulang.

Stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan radikal bebas dapat menghambat proses penyembuhan tulang dan menyebabkan kerusakan sel melalui proses peroksidase lipid. MDA merupakan aldehyd yang dihasilkan melalui proses peroksidase lipid.

Polifenol memiliki sifat antioksidan berperan dalam mencegah terjadinya proses peroksidase lipid tersebut. Polifenol bertindak sebagai *scavenger* radikal peroksil ($ROO\cdot$) yang akan diregenerasi menjadi $ROOH$ yang bersifat lebih stabil.



Polifenol akan mendonorkan ion hidrogen pada radikal bebas untuk membentuk senyawa yang lebih stabil. Sedangkan, radikal fenoksil yang terbentuk ($PP\cdot$) menjadi kurang reaktif.

Radikal fenoksil ($PP\cdot$) juga berperan dalam proses terminasi dari peroksidase lipid. Radikal fenoksil akan berinteraksi dengan senyawa radikal bebas lainnya.



Dengan demikian, polifenol akan menghambat peroksida lipid yang menghasilkan radikal bebas (Hii CL *et al.*, 2009).

Stres oksidatif yang dapat menghambat proses penyembuhan tulang, ditunjukkan dengan penurunan jumlah sel osteoblas pada jaringan tulang yang difraktur. OsteoOsteoblas sebagai marker dari proses remodelling dalam proses penyembuhan tulang, karena perannya dalam memproduksi, mensekresi, mendeposisi, dan memineralisasi matriks tulang untuk regenerasi dari tulang tersebut.

Hasil penelitian untuk histopatologi jaringan tulang menunjukkan terdapat peningkatan jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan (K4 dan K5). Namun, pada K3 yang diberikan terapi ekstrak etanol kakao dosis 125 mg/kgBB belum terjadi peningkatan jumlah osteoblas pada tikus, dimana keadaan ini sama dengan kadar MDA jaringan tulang yang belum mengalami penurunan. Jadi, pada penelitian ini ekstrak etanol kakao dengan dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB dapat mengoptimalkan proses *remodelling* dalam penyembuhan fraktur tulang.

Polifenol dalam ekstrak etanol kakao mengoptimalkan proses *remodelling* jaringan tulang dengan mengoptimalkan proses penyembuhan tulang dengan mengatasi stres oksidatif pada fraktur tulang. Peningkatan jumlah radikal bebas yang terjadi dapat berasal dari aktivitas fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta aktivitas osteoklas dalam penyembuhan fraktur (Sheweita dan Khoshhal, 2011]. Kedua proses tersebut menyebabkan inhibisi dari proliferasi dan diferensiasi osteoblas, menginduksi terjadinya apoptosis osteoblas, dan supresi fungsi osteoklas untuk mendegenerasi sel yang mati (Cadenas E *et al.*, 2002]. Selain itu, berdasarkan penelitian *in vitro*, *catechin* sebagai monomer flavonoid (salah

satu jenis polifenol dalam kakao) memiliki pengaruh langsung dalam stimulasi proliferasi dan differensiasi osteoblas. *Catechin* juga berperan dalam menstabilkan molekul kolagen sebagai penyusun kartilago pada proses osteogenesis *endochondral* dengan meningkatkan resistensinya terhadap kolagenase (Choi *et al.*, 2003]. Kartilago ini akan mengalami kalsifikasi dan resorpsi menjadi kalus yang akhirnya berubah menjadi lamellar (Mountziaris *et al.*, 2008].

Hasil uji korelasi didapatkan $R = -0,771$, yang berarti kadar MDA jaringan tulang berkorelasi kuat dengan jumlah osteoblas, sebesar 77,1%. Nilai negatif pada R menunjukkan arah korelasi negatif yang menunjukkan semakin rendah kadar MDA jaringan tulang, maka jumlah osteoblas pada jaringan tulang semakin meningkat.

Dengan demikian, pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kakao yang berfungsi sebagai antioksidan eksogen dapat mengatasi stres oksidatif dan mengoptimalkan proses penyembuhan tulang dibandingkan dengan kelompok dengan fraktur tulang tanpa pemberian terapi ekstrak etanol kakao. Hal ini dibuktikan dengan pemberian terapi ekstrak etanol kakao dapat menurunkan kadar MDA jaringan tulang dan meningkatkan jumlah osteoblas pada jaringan tulang. Selain itu, terdapat hubungan yang kuat antara keduanya dimana semakin rendah kadar MDA jaringan tulang, semakin tinggi jumlah osteoblas yang terbentuk pada jaringan tulang yang difraktur.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisa data dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kadar MDA jaringan tulang dan jumlah osteoblas jaringan tulang yang difraktur setelah pemberian terapi ekstrak etanol kakao pada tikus wistar jantan model fraktur tulang. Selain itu, terdapat hubungan yang kuat antara kadar MDA jaringan tulang dengan jumlah osteoblas dengan arah korelasi negatif, dimana semakin rendah kadar MDA jaringan tulang, semakin banyak jumlah osteoblas jaringan tulang yang difraktur.

Beberapa saran yang penulis ajukan terkait dengan hasil penelitian dan analisis data antara lain perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol kakao terhadap fraktur tulang untuk mendapatkan dosis efektif dan penelitian dengan masa perlakuan yang berbeda-beda pada masing-masing kelompok, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari untuk mengetahui efek ekstrak etanol kakao

terhadap akselerasi penyembuhan fraktur tulang.

Analisis lebih lanjut juga perlu dilakukan uji klinis mengenai efek ekstrak etanol kakao sebagai terapi nutrisi pada fraktur tulang.

Ucapan Terima Kasih

Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan
Indonesia Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi;
Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

Daftar Pustaka

- Cadenas E, Packer L. 2002. *Handbook of Antioxidant*. 2ndEd. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc
- Choi, Eun-Mi and Jae-Kwan Hwang. 2003. *Effect (+)- Catechin On The Function Of Osteoblastic Cell*. *Bio.Pharm.Bull.* 26(4): 523-526.
- Deptan RI. 2014. *Indonesia Targetkan jadi Penghasil Kakao Terbesar di Dunia*. (28 Oktober 2013]. Available from: <http://perkebunan.litbang.deptan.go.id/?p=3247>
- Hii CL, *et al.* 2009. *Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.)*. *As. J. Food Ag-Ind.* 2(04): 702-722.
- Jayakumar and Silvio LD. 2010. *Osteoblast in bone tissue engineering*. *Journal Engineering in Medicine*. 224: 1415.
- Kristyoadi SA. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Tibia Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca-ovariektomi*. Malang: Universitas Brawijaya
- Maleyki A, Jalil, Ismail A. 2008. *Polyphenols In Cocoa And Cocoa Products: Is There A Link Between Antioxidant Properties And Health*. *Molecules Journal*. 13(9): 2190-2219
- Mountziaris, *et al.* 2008. *Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration*. *Tissue Engineering: Part B*. 14(2): 179-184.
- Nurmasari P. 2013. *Peranan Ekstrak Bangle (zingiber cassumunar roxb.) terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang*

- Diinfeksi Plasmodium berghei*. Jember: Universitas Jember
- Riyadina W, Suhardi, Permana. 2009. *Pola dan Determinan Sosiodemografi Cedera Akibat Kecelakaan Lalu Lintas di Indonesia*. Majalah Kedokteran Indonesia 59: 1
- Sabri M. 2013. *Administration's Effect of Ethanol Extract of Cissus quadrangularis Salisb on Growth of Lumbar Bone in Ovariectomized Rats*. Jurnal Natural. 13(2): 48-54.
- Sheweita SA and KI Khoshhal. 2011. *Calcium Metabolism and Oxidative Stress in Bone Fractures: Role of Antioxidants. Scaffold Mesenchymal Stem Cell (Regeneration of Massive Bone Defect with Bovine Hydroxyapatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells)*. JBP. 13(3): 519-525.
- Shohag, *et al.*, editors. 2012. *Serum Antioxidant Vitamins and Malondialdehyde Levels in Patients with Obsessive-Compulsive Disorder*. German Journal of Psychiatry. 15(1): 10-14.
- Solomon, *et al.* 2010. *Apley's System of Orthopaedics and Fractures*. Ninth edition. United Kingdom: University of Bristol
- Trihapsari E. 2009. *Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Densitas Mineral Tulang Wanita \geq 45 Tahun di Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta*. Jakarta: Universitas Indonesia