

Analisis Jumlah Sel Osteoblas pada Fraktur Femur Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)

*Analysis of Osteoblast Cell Number on Femur Fractures Provided Red Spinach Extract (*Amaranthus tricolor L.*)*

Ferdian Nugroho¹, Aris Prasetyo², Muhammad Hasan³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No.37, Jember, Indonesia, 68121

e-mail korespondensi: aprasetyo08@gmail.com

Abstrak

Fraktur tulang merupakan cedera muskuloskeletal dengan angka kejadian yang cukup tinggi. Proses penyembuhan fraktur dapat terhambat oleh stres oksidatif, yang terjadi akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang melebihi kapasitas antioksidan dalam tubuh yang menetralkannya. Antioksidan yang dimiliki bayam merah berpotensi menekan tingkat stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol bayam merah terhadap proses penyembuhan fraktur pada tikus wistar jantan melalui jumlah sel osteoblas. Sampel berjumlah 30 ekor tikus wistar jantan dibagi dalam lima kelompok; kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan ekstrak etanol bayam merah dengan dosis 35,4 mg/150gBB, 70,8 mg/150gbb dan 141,6 mg/150g BB diinduksi fraktur, dibidai, lalu diberi perlakuan selama satu minggu. Hasil Uji *One Way Anova* menunjukkan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) di mana terdapat perbedaan bermakna jumlah osteoblas antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Hasil uji LSD antara kelompok P1 dengan kelompok P3 menunjukkan hasil berbeda signifikan dimana peningkatan jumlah sel osteoblas sejalan dengan peningkatan dosis ekstrak etanol bayam merah. Kesimpulannya adalah ekstrak etanol bayam merah memiliki dampak yang positif selama proses penyembuhan fraktur dengan parameter jumlah sel osteoblas.

Kata kunci: Ekstrak etanol bayam merah, proses penyembuhan fraktur, osteoblas, stres oksidatif

Abstract

Bone fracture is a musculoskeletal injury with a high incidence rate. The healing process of the fracture can be inhibited by oxidative stress, which occurs due to Reactive Oxygen Species (ROS) that exceeds the antioxidant capacity in the body that neutralizes it. Antioxidants that have red spinach have the potential to suppress the level of oxidative stress. This study aims to determine the effect of red spinach ethanol extract on the healing process of fracture in male Wistar rats through osteoblast cell count. A sample of 30 male Wistar rats was divided into five groups; negative control group, positive control group, and three groups of red spinach ethanol treatment with doses of 35.4 mg / 150 g body weight (BW), 70.8 mg / 150 gBW, and 141.6 mg / 150gBW induced fracture, splinted, then treated for one week. One Way Anova test results showed a significance of 0.000 ($p < 0.05$) in which there was a significant difference in the osteoblast level between the treatment group and the control group. The result of LSD test between P1 group and P3 group showed significantly different result where the increase of osteoblast cell number was in line with the increase of the dose of red spinach ethanol extract. The conclusion is that red spinach ethanol extract has a positive impact during the fracture healing process with osteoblast cell number parameters.

Keywords: Red spinach ethanolic extract, fracture healing process, osteoblast, oxidative stress

Pendahuluan

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 dapat ditekan oleh suplai antioksidan dari luar tubuh. Bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) berpotensi menjadi sumber terapi antioksidan pada fraktur tulang dengan tingginya kadar antioksidan yang dimilikinya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol bayam merah terhadap proses penyembuhan tulang fraktur pada tikus wistar jantan yang diukur melalui jumlah sel osteoblas.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *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 norvegicus* galur wistar jantan dengan berat 150-200 gram dan umur 2-3 bulan. Sampel dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor; kelompok kontrol negatif (K(-)), kelompok kontrol positif (K(+)), dan tiga kelompok perlakuan ekstrak bayam merah P1 dosis 35,4 mg/150gBB, P2 70,8 mg/150gBB, dan P3 141,6 mg/150gBB. Kelompok kontrol negatif diberi *tween 80* 1%. Kelompok kontrol positif diberi vitamin C 2 mg.

Proses pematangan didahului dengan anestesi kombinasi ketamin dan xylazine. Seluruh sampel dipatahkan tulang femurnya dengan cara induksi manual dan dibidai dengan gips leukodur.

Pengecekan apakah telah terjadi fraktur dengan cara *look, feel, and move* serta adanya *false movement* dan juga krepitasi. Seluruh sampel diberi perlakuan sesuai kelompok masing-masing dengan cara penyondean selama satu minggu. Selanjutnya dilakukan terminasi untuk pengambilan tulang femur tikus yang dijadikan preparat histopatologi untuk pemeriksaan jumlah sel osteoblas.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene's test*. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji komparatif *One-way Anova* dan dilanjutkan dengan *post hoc test* LSD. Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*.

Hasil Penelitian

Rata-rata MDA serum semua kelompok dapat dilihat pada tabel 1. 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 . Kelompok K(-) dengan pemberian *tween 80* 1% memiliki rata-rata sel osteoblas terendah, yaitu 7.83 ± 0.75 . Sedangkan kelompok K(+) dengan pemberian vitamin C 2 mg memiliki rata-rata sel osteoblas tertinggi, yaitu 17.00 ± 1.80 .

Tabel 1. Hasil rata-rata kadar MDA

No.	Perlakuan	Rata-rata \pm Standar Deviasi
1.	Kontrol Negatif	7.83 ± 0.75
2.	Kontrol Positif	17.00 ± 1.80
3.	Kelompok P1	8.83 ± 1.74
4.	Kelompok P2	13.5 ± 1.05
5.	Kelompok P3	16.00 ± 0.89

Hasil rata-rata jumlah sel osteoblas dianalisis persebaran data dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitasnya menggunakan uji *Levene's test*. Hasil kedua analisis tersebut menunjukkan $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil rata-rata jumlah sel osteoblas kemudian dianalisis menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok.

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,000$ ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat minimal dua kelompok yang memiliki rata-rata jumlah sel osteoblas yang berbeda signifikan. Uji lanjutan *Post Hoc LSD* digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji analisis *Post Hoc LSD* berdasarkan Tabel 2 didapatkan data antar kelompok signifikan ($p < 0,05$).

Tabel 2. Hasil Uji *Post Hoc LSD*

	Negatif	Positif	P1	P2	P3
Negatif	0,000*	0,000*	0,059	0,000*	0,000*
Positif	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,059
P1	0,059	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
P2	0,000*	0,000*	0,000*	0,023*	0,023*
P3	0,000*	0,059	0,000*	0,000*	0,000*

Pembahasan

Hasil Uji *One Way ANOVA* jumlah sel osteoblas menunjukkan signifikansi $0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan secara bermakna jumlah sel osteoblas antara kelompok kontrol negatif dan positif dengan kelompok perlakuan.

Pada kelompok kontrol negatif jumlah radikal bebas meningkat melebihi jumlah antioksidan endogen sehingga terjadi stres oksidatif yang dapat memicu peroksidasi lipid, terbukti dengan rendahnya hasil jumlah sel osteoblas. Disisi lain, pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun bayam merah efek radikal bebas dapat ditekan dengan adanya asupan antioksidan yang terdapat dalam ekstrak etanol daun bayam merah sehingga bisa meningkatkan jumlah sel osteoblas.

Berdasarkan uji analisis *LSD* antara kelompok K(-) dengan K(+) didapatkan hasil yang signifikan, yang berarti terdapat perbedaan secara bermakna jumlah sel osteoblas antara K(-) dengan K(+). Perbedaan yang bermakna ini dikarenakan antioksidan pada vitamin C yang diberikan pada kelompok kontrol positif cukup untuk menghambat radikal bebas pada fraktur tulang (Kristoyadi, 2013).

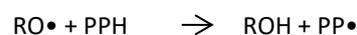
Uji analisis *LSD* antara K(-) dengan P1 didapatkan hasil yang signifikan berarti terdapat perbedaan secara bermakna jumlah sel osteoblas, hal ini disebabkan suplai antioksidan yang tinggi dalam ekstrak bayam merah bisa meningkatkan jumlah sel osteoblas yang tinggi pada kelompok K(-).

Uji analisis *LSD* antara P1 dengan P2 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan, berarti kemampuan dosis ekstrak bayam merah kelompok P2 hampir sama dengan kemampuan dosis ekstrak bayam merah kelompok P1 dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas. Berbeda halnya dengan dosis ekstrak bayam merah kelompok P3, uji analisis *LSD* antara P1 dengan P3 menunjukkan hasil berbeda signifikan yang berarti kelompok P3 sudah bisa meningkatkan jumlah sel osteoblas secara signifikan. Hal ini juga menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel osteoblas sejalan dengan peningkatan dosis ekstrak bayam merah.

Uji analisis *LSD* antara K(+) dengan P3 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan, hal ini disebabkan rata-rata jumlah sel osteoblas kelompok P3 hampir mendekati kelompok (+). Jadi, dosis ekstrak bayam merah pada kelompok P3 sudah hampir menyamai kemampuan vitamin C kelompok K(+) dalam menekan stres oksidatif serta meningkatkan jumlah sel osteoblas pada fraktur tulang.

Adanya peningkatan jumlah sel osteoblas pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun bayam merah dibanding dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan adanya suplai antioksidan dari ekstrak bayam merah yang mampu menekan stres oksidatif yang terjadi pada proses fraktur. Stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan radikal bebas menjadi masalah pada kasus fraktur tulang karena menghambat proses penyembuhan tulang dan menyebabkan kerusakan sel. Kerusakan sel yang terjadi diakibatkan oleh proses peroksidase lipid yang terjadi.

Flavonoid yang terkandung dalam bayam merah berperan dalam mencegah terjadinya proses peroksidasi lipid tersebut. Flavonoid bertindak sebagai *scavenger* radikal peroksil ($ROO\cdot$) yang akan diregenerasi menjadi $ROOH$ yang bersifat lebih stabil.



Flavonoid akan mendonorkan ion hidrogen pada radikal bebas untuk membentuk senyawa yang lebih stabil sedangkan, radikal fenoksil yang

terbentuk (PP•) menjadi kurang reaktif (Astuti, 2008).

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



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 hidropoksida (H_2O_2) dengan ion logam dapat diredam. Logam transisi seperti Fe dan Cu memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dalam mengkatalisis reaksi redoks tubuh. Flavonoid juga mampu menghambat kerja enzim CYP dalam menghasilkan radikal bebas (Kumar dan Pandey, 2013).

Selain itu, Katekin (salah satu jenis flavonoid dalam bayam merah) 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). Katekin juga berperan dalam menstabilkan molekul kolagen sebagai penyusun kartilago pada proses osteogenesis *endochondral* dengan meningkatkan resistensinya terhadap kolagenase (Choi, 2003). Kartilago ini akan mengalami kalsifikasi dan resorpsi menjadi kalus yang akhirnya berubah menjadi lamellar (Mountziaris, 2008).

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 lain 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 H_2O_2 membentuk OH^- yang termasuk dalam radikal bebas yang sangat reaktif.

Kadar kandungan antioksidan flavonoid yang ada dalam bayam merah jauh lebih besar daripada antioksidan yang lainnya. Flavonoid dapat mengoptimalkan proses penyembuhan tulang dengan mengatasi stres oksidatif pada fraktur tulang. Stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan jumlah radikal bebas dapat berasal dari aktivitas fragmen tulang yang bereaksi dengan kolagen dan oksigen, serta aktivitas osteoklas dalam penyembuhan fraktur (Sheweita dan Khosshal, 2007).

Dengan demikian, pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun bayam merah yang berfungsi sebagai antioksidan eksogen dapat mengatasi stres oksidatif dan mengoptimalkan proses penyembuhan tulang. Hal ini dibuktikan dengan hasil pemberian ekstrak bayam merah dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tikus wistar model fraktur.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak bayam merah berpengaruh bermakna terhadap penurunan jumlah sel osteoblas tikus wistar jantan model fraktur. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol bayam merah dengan rentang dosis yang lebih luas.

Daftar Pustaka

- Al-Dosari, M., 2010. The Effectiveness of Ethanolic Extract of *Amaranthus tricolor L.* : a Natural Hepatoprotective Agent. *American Journal of Chinese Medicine*. 38(6): 1051-1064.
- Cadenas, E. dan L, Packer. 2002. *Handbook of antioxidant*. 2nd Ed. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc.
- 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.
- Ghasemzadeh, A., M. Azarifar, O. Soroodi, dan H. Z. E. Jaafar. 2012. Flavonoid Compounds and Their Antioxidant Activity in Extract of Some Tropical Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(13): 2639-2643.

- Gokturk, Turgut, Baycu, Gunai, Saber, Gulbas. 1995. Oxygen-free Radicals Impair Fracture Healing in Rats. *Acta Orthop Scand*. 66(5): 473-475.
- Hsu, C. Y., P. Y. Chao, S. P. Hu, dan C. M. Yang. 2013. The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*. 4:5.
- Katose D. M., S. S. Katyare, M. V. Hedge, dan H. Bae. 2015. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 11(8): 982-991.
- Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoid: an Overview. *Hindawi*. 1-16.
- Mahartha, R.A., Maliawan, S., dan Kawiyan, K.S. 2013. Manajemen Fraktur pada Trauma Muskuloskeletal. Bali: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- McDowell, L. R., N. Wilkinson, R. Madison, dan T. Felix. 2007. Vitamins and Minerals Functioning as Antioxidants with Supplementation Considerations. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 3-5.
- Mueller, L. dan V. Boehm. 2011. Antioxidant Activity of β -carotene Compounds in Different *in vitro* assays. *Molecules*. 16: 1055-1069.
- Noori, M., M. Talebi, dan Z. Nasiri. 2015. Seven *Amaranthus L. (Amaranthaceae)* Taxa Flavonoid Compounds from Tehran Province, Iran. *International Journal of Modern Botany*. 5(1): 9-17.
- Notoatmodjo. 2005. *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta
- Novelandi, R. 2010. Karakteristik Penderita Fraktur Rawat Inap di Rumah Sakit Umum Daerah dr. Pringadi Medan Tahun 2009. *Skripsi*. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara.
- Nugraheni, Ellisma Swandini. 2011. *Extracts Giving of Purple Eggplant (Solanum melongena L.) orally Can Lower Blood Serum Levels of Malondialdehyde of White Rat (Rattus Novergicus) Wistar Diabetes Mellitus Induced by Aloxan*. Final Assignment. Malang: Brawijaya University.
- Nurmasari, P.D. 2013. *Peranan Ekstrak Bangle (zingiber cassumunar roxb.) terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang difeksi Plasmodium berghei*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- 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 Enviromental Science*. 1(2): 105-109.
- Sheweita, SA & K.I. Khoshal. 2007. Calcium Metabolism and Oxidative Stress in Bone Fractures: Role of Antioxidants. Scaffold Mesenchymal Cell (Regenerative of Massive Bone Defect with Bovine Hidroxyapatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells). *JBP*; 13 (3): 519-525.
- Solomon, L., D. Warwick, dan S. Wayagam. 2010. *Apley's System of Orthopaedics and Fractures, Ninth Edition*. United Kingdom: University of Bristol.
- Suhardjono, D. 1994. *Percobaan Hewan Laboratorium*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.