

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Kadar Malondialdehida Tikus Wistar Jantan Model Fraktur Tulang

*(The Effect of Cocoa Ethanolic Extract (*Theobroma cacao*) on Malondialdehyde of Male *Rattus novergicus* Bone Fracture Model)*

Anas Bakhtiar Diyansah, Erma Sulistyaningsih, Muhammad Hasan
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: anas_bd@ymail.com

Abstract

Fracture is a serious musculoskeletal trauma. The healing process of fracture is disturbed by the oxidative stress, because of imbalance quantity of Reactive Oxygen Species (ROS) and an antioxidant. An antioxidant such as polyphenol, that can be found in cocoa, is needed to suppress oxidative stress. The study aimed to investigate the effect of cocoa ethanolic extract on decreasing oxidative stress by measuring malondialdehyde (MDA) concentration in fracture healing process. Trial test were conducted in eleven rats to determine appropriate plaster technique. The study used thirty rats and divided into five groups; the normal group without fracture, the negative control group and three treatment groups with manually fractured on left tibia under anaesthesia and immobilized by leucodur plaster. Each treatment group was treated with cocoa ethanolic extract in a dose of 125 mg/kgBW, 250 mg/kgBW, or 500 mg/kgBW orally, respectively for 21 days. The result showed that there was a significant effect of cocoa ethanolic extract on serum and bone MDA concentration in which MDA concentration decreased after cocoa ethanolic extract treatment. The study concluded that cocoa ethanolic extract had a positive effect on supression of oxidative stress in fracture healing process.

Keywords: *Cocoa ethanolic extract, polyphenol, fracture healing process, MDA, ROS*

Abstrak

Fraktur tulang merupakan cedera muskuloskeletal dengan prevalensi yang cukup tinggi. Proses penyembuhan fraktur dapat terhambat oleh stres oksidatif, yang terjadi akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang melebihi kapasitas antioksidan yang menetralsirkannya. Antioksidan seperti polifenol yang dapat ditemukan pada kakao berpotensi menekan tingkat stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh ekstrak etanol kakao terhadap tingkat stres oksidatif yang diukur melalui kadar malondialdehida (MDA) selama proses penyembuhan fraktur pada tikus wistar jantan. Uji pendahuluan dengan 11 ekor tikus dilakukan untuk menentukan teknik bidai yang tepat. Selanjutnya uji perlakuan dengan 30 ekor tikus yang dibagi dalam lima kelompok; kelompok non-fraktur dan empat kelompok fraktur dengan bidai leucodur yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif dan tiga kelompok perlakuan ekstrak etanol kakao dengan terapi dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB selama 21 hari. Hasil penelitian menunjukkan pengaruh yang bermakna pemberian ekstrak etanol kakao terhadap kadar MDA serum dan tulang, di mana terjadi penurunan kadar MDA pada kelompok yang telah diberi ekstrak selama perlakuan. Kesimpulannya adalah ekstrak etanol kakao memiliki dampak yang positif selama proses penyembuhan fraktur dengan menekan stres oksidatif.

Kata kunci: Ekstrak etanol kakao, polifenol, proses penyembuhan fraktur, MDA, ROS

Pendahuluan

Fraktur tulang merupakan cedera muskuloskeletal dengan prevalensi cukup tinggi. Penyebab tersering dari fraktur tulang adalah kecelakaan lalu lintas dan perubahan densitas mineral tulang (DMT) [1,2]. Mekanisme penyembuhan fraktur terdiri dari lima tahap, yaitu fase hematoma, proliferasi, pembentukan kalus, konsolidasi, dan remodeling [3]. Namun tahapan tersebut dapat terhambat oleh adanya stres oksidatif. Kapasitas antioksidan yang lebih rendah dalam mengatasi ROS mampu memicu stres oksidatif. Kerusakan akibat ROS terjadi akibat peroksidasi lipid [4]. Tingkat peroksidasi lipid diketahui dengan mengukur produk yang paling banyak dihasilkan, yaitu *malondialdehyde* (MDA) [5]. Oleh karena itu, perubahan kadar MDA menunjukkan adanya perubahan aktivitas ROS.

Dalam mengatasi stres oksidatif, tambahan antioksidan diperlukan untuk mendukung keberlangsungan proses penyembuhan fraktur. Polifenol merupakan salah satu antioksidan yang dapat mensupresi stres oksidatif [6]. Kakao (*Theobroma cacao*) menjadi sumber polifenol yang cukup tinggi [7]. Dalam hal ketersediaan kakao, Indonesia menjadi penghasil kakao peringkat ketiga terbesar dunia [8].

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh ekstrak etanol kakao terhadap tingkat stres oksidatif yang diukur melalui kadar malondialdehid (MDA) serum dan tulang selama proses penyembuhan fraktur pada tikus wistar jantan.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental laboratoric* menggunakan *pre and post test control group design*. Pengelompokan sampel penelitian menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan jumlah 41 ekor tikus *Ratus norvegicus* galur Wistar jantan dengan berat rata-rata sekitar 100 gram dan umur 2-3 bulan. Penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu uji pendahuluan dan perlakuan. Uji pendahuluan dengan 11 ekor tikus bertujuan untuk menentukan teknik bidai yang tepat. Selanjutnya uji perlakuan dengan 30 ekor tikus yang dibagi ke dalam lima kelompok yang terdiri dari tiga kelompok perlakuan (K1, K2, dan K3), satu kelompok non-fraktur (K(NF)), serta satu kelompok kontrol (K(-)). Kelompok kontrol dan

seluruh kelompok perlakuan diinduksi fraktur pada tibia sinistra tungkai posterior. Induksi fraktur didahului dengan anestesi general. Setelah itu, pembidaian dilakukan pada regio tungkai yang fraktur. Kelompok non-fraktur tidak diinduksi apapun. Tahapan selanjutnya ialah pengambilan serum dan jaringan tulang yang digunakan untuk pemeriksaan kadar MDA sebagai data sebelum perlakuan.

Kelompok non-fraktur (K(NF)) dieutanasia sesudah pengambilan jaringan tulangnya. Sedangkan kelompok K(-), K1, K2, dan K3 menjalani pemeliharaan selama 21 hari. Kelompok (-) tidak diberi ekstrak. Sedangkan kelompok perlakuan diberi ekstrak dengan dosis 125 mg/kgBB untuk K1, 250 mg/kgBB untuk K2, dan 500 mg/kgBB untuk K3. Pada akhir penelitian, kadar MDA serum dan jaringan tulang diperiksa sebagai data sesudah perlakuan.

Analisis data dilakukan secara komputerisasi dengan SPSS 21 PS dengan taraf signifikan $p < 0,05$. Kadar MDA serum dan tulang dianalisis dengan uji normalitas data, korelasi bivariat *Pearson*, dan regresi fungsi logaritmik. Data hasil analisis disajikan dalam bentuk mean \pm SD.

Hasil Penelitian

Hasil uji pendahuluan berupa teknik bidai yang tepat yaitu leucodur. Teknik ini dapat meminimalisir terjadinya oedema pada tungkai yang fraktur sehingga mencegah sindrom kompartemen. Hasil uji perlakuan berupa kadar MDA serum dan tulang. Terdapat peningkatan rata-rata kadar MDA serum kelompok fraktur dibandingkan dengan kelompok non-fraktur pada data sebelum perlakuan.

Tabel 1. Rata-rata MDA serum sebelum perlakuan

Kelompok	MDA serum (ng/100 μ l)
K(NF)	0,0389 \pm 0,0077
K(-)	0,0729 \pm 0,0220
K1	0,0681 \pm 0,0117
K2	0,0641 \pm 0,0111
K3	0,0751 \pm 0,0205

Uji korelasi bivariat *Pearson* menunjukkan $p=0,000$ ($<0,05$) dan kekuatan korelasi (r)=0,64. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan bermakna antara fraktur tulang dan kadar MDA serum.

Berdasarkan uji regresi fungsi logaritmik menunjukkan $p=0,000$ yang berarti terdapat pengaruh fraktur terhadap kadar peningkatan MDA serum.

Sementara itu, pada data sesudah perlakuan menunjukkan penurunan MDA serum antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Tabel 2. Rata-rata MDA serum sesudah perlakuan

Kelompok	MDA serum (ng/100 μ l)
K(-)	0,1117 \pm 0,0248
K1	0,0895 \pm 0,0246
K2	0,0631 \pm 0,0136
K3	0,0534 \pm 0,0093

Uji korelasi bivariat *Pearson* menunjukkan $p=0,000$ dan kekuatan korelasi $(r)=-0,68$. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan bermakna antara dosis ekstrak etanol kakao dan kadar MDA serum. Berdasarkan uji regresi fungsi logaritmik menunjukkan $p=0,000$ yang berarti terdapat pengaruh yang bermakna pemberian ekstrak etanol kakao terhadap penurunan kadar MDA serum sesudah perlakuan.

Di sisi lain, pengukuran MDA jaringan tulang sesudah perlakuan menunjukkan penurunan kadar MDA jaringan tulang.

Tabel 3. Rata-rata MDA tulang sesudah perlakuan

Kelompo k	MDA tulang (ng/100 mg)
K(-)	0,1331 \pm 0,0131
K1	0,0881 \pm 0,0310
K2	0,0496 \pm 0,0107
K3	0,0556 \pm 0,0170

Uji korelasi bivariat *Pearson* menunjukkan $p<0,05$ dan kekuatan korelasi $(r)=-0,81$. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan bermakna antara dosis ekstrak etanol kakao dan kadar MDA tulang. Berdasarkan uji regresi fungsi logaritmik menunjukkan $p=0,000$ yang berarti terdapat pengaruh bermakna pemberian ekstrak etanol kakao terhadap penurunan kadar MDA tulang.

Pembahasan

Dari hasil uji normalitas data dan korelasi bivariat *Pearson*, terdapat hubungan yang kuat dan bermakna ($p=0,000$) antara fraktur tulang

dan kadar MDA serum. Selain itu, uji regresi logartimik juga menunjukkan pengaruh yang bermakna ($p=0,000$) fraktur tulang terhadap kadar MDA serum. Rata-rata kadar MDA serum kelompok fraktur lebih tinggi daripada kelompok non-fraktur. Hal ini menunjukkan bahwa kadar ROS mengalami peningkatan saat terjadi fraktur tulang. Dari hasil uji regresi tersebut diketahui bahwa presentase pengaruh fraktur tulang terhadap peningkatan kadar ROS yaitu sebesar 41,5%.

Peningkatan ROS saat fraktur tulang ini dapat menggambarkan aktivitas osteoklastik yang meningkat dalam proses penyembuhan tulang fraktur. ROS menginduksi reaksi berantai sehingga secara terus-menerus mampu memperbanyak diri. Hal inilah yang berpotensi menyebabkan fungsi osteoklastik menjadi tidak terkontrol sehingga penyembuhan tulang dapat terhambat. Di sisi lain, ROS pada dasarnya bermanfaat dalam proses penyembuhan apabila berada dalam kadar yang normal. Oleh karena itu, peran antioksidan sangat menentukan tingkat supresi ROS. Apabila kadar ROS melebihi kapasitas antioksidan dalam menyupresi, maka efek merusak dari ROS akan terjadi dalam bentuk stres oksidatif [4].

Kemungkinan stres oksidatif terjadi saat fraktur tulang dapat tercermin dari kadar MDA serum kelompok K(-) pada hari ke-21 pasca fraktur yang lebih tinggi daripada kadar MDA kelompok K(-) pada hari pertama fraktur. Kadar MDA yang tinggi tersebut bahkan jauh lebih tinggi lagi dibandingkan kadar MDA serum saat tidak terjadi patah tulang. Dengan demikian, supresi ROS oleh antioksidan endogen belum berperan optimal. Oleh karena itu, efek antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol kakao diharapkan mampu meminimalisir stres oksidatif saat penyembuhan tulang.

Pemeriksaan MDA serum sesudah perlakuan menunjukkan penurunan rata-rata kadar MDA pada kelompok yang diberi ekstrak etanol kakao. Kelompok K(-) memiliki rata-rata kadar MDA serum yang tertinggi, yaitu 0,1117 ng/100 μ l. Kemudian penurunan mencapai rata-rata terendah pada kelompok K3 dengan dosis pemberian ekstrak sebanyak 500 mg/kgBB, yaitu 0,0534 ng/100 μ l.

Interpretasi hasil tersebut diperkuat oleh uji analisis korelasi bivariat *Pearson* yang menjelaskan hubungan yang sangat kuat dan bermakna ($p=0,000$) antara dosis ekstrak etanol kakao dan kadar MDA serum sesudah perlakuan.

Hasil analisis regresi fungsi logaritmik juga menunjukkan pengaruh bermakna pada pemberian ekstrak etanol kakao terhadap kadar MDA serum sesudah perlakuan. Pengaruh pemberian dosis ekstrak terhadap kadar ROS berdasarkan analisis regresi tersebut yaitu sebesar 46,6%. Dengan demikian, ekstrak etanol kakao mampu menurunkan ROS secara bermakna saat proses penyembuhan fraktur. Kemudian pembahasan berlanjut pada kadar MDA tulang.

Rata-rata kadar MDA jaringan tulang yang fraktur juga diukur dan diperlukan sebagai pembandingan kadar MDA serum. Nilai MDA tulang bermanfaat untuk mengetahui level ROS yang juga berlangsung di jaringan tulang yang fraktur. Pengukuran MDA tulang sesudah perlakuan menunjukkan kondisi kelompok K(-) memiliki rata-rata kadar MDA tulang yang tertinggi, yaitu 0,1331 ng/100 mg. Sedangkan pemberian ekstrak pada kelompok K1, K2, dan K3 terbukti menjadikan kadar MDA tulang lebih rendah daripada kelompok K(-) yang tanpa ekstrak. K2 memiliki kadar MDA tulang terendah, yaitu 0,0496 ng/100 mg.

Dari hasil uji analisis korelasi bivariat *Spearman* diketahui bahwa terdapat hubungan yang sangat kuat antara dosis ekstrak dan kadar MDA tulang. Di samping itu, uji regresi fungsi logaritmik juga menjelaskan bahwa pemberian ekstrak berpengaruh signifikan terhadap kadar MDA tulang yaitu dengan cara menurunkan kadarnya. Hal ini menandakan bahwa kadar ROS tulang mampu disupresi oleh pemberian ekstrak etanol kakao. Berdasarkan analisis regresi tersebut, persentase pengaruh ekstrak terhadap kadar ROS yaitu sebesar 66,3%. Persentase pengaruh ekstrak terhadap kadar ROS tulang ternyata lebih tinggi daripada pengaruhnya terhadap kadar ROS serum.

Dengan demikian, ekstrak etanol kakao semakin terbukti mampu menurunkan ROS secara signifikan saat proses penyembuhan fraktur. Selain itu, ekstrak etanol kakao diinterpretasikan lebih berpengaruh menurunkan kadar ROS tulang daripada ROS serum. Hal ini menjadi bukti bahwa efek ekstrak lebih terfokus pada penurunan kadar ROS di objek yang mengalami fraktur yaitu tulang.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao*)

terbukti berpengaruh secara bermakna dalam menurunkan kadar MDA serum dan jaringan tulang pada wistar jantan model fraktur tulang. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol kakao dengan rentang dosis yang lebih luas.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Dikti melalui Program Kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian (PKM-P) didanai tahun 2014 dan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

Daftar Pustaka

- [1] Novelandi R. Karakteristik Penderita Fraktur Rawat Inap di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Pirngadi Medan Tahun 2009. *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatera Utara, 2010.
- [2] Trihapsari E. Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Densitas Mineral Tulang Wanita ≥ 45 Tahun di Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia, 2009.
- [3] Apley AG, Solomon L. Apley's System of Orthopaedics and Fractures, Ninth edition. United Kingdom: University of Bristol, 2010.
- [4] Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium Metabolism and Oxidative Stress in Bone Fractures: Role of Antioxidants. *Current Drug Metabolism*, 2007, 8,519-525.
- [5] Nurmasari PD. Peranan Ekstrak Bangle (*zingiber cassumunar roxb.*) terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember, 2013.
- [6] Jalil AMM, Ismail A. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?. *Molecules* 2008, 13, 2190-2219.
- [7] Hii CL, Law CL, Suzannah S, Misnawi, Cloke M. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao*L.). *As. J. Food Ag-Ind.* 2009, 2(04), 702-722.
- [8] Zakia Z, Pramesti OL. 2014, Indonesia Targetkan jadi Penghasil Kakao Terbesar di Dunia. National Geographic Indonesia [Internet]. 2012 July [cited 2014 October 20]. Available from:

<http://nationalgeographic.co.id/berita/2012/0>

[7/2014-indonesia-targetkan-jadi-penghasil-kakao-terbesar-di-dunia.](#)