

# PENGARUH FREKUENSI STRES FISIK PADA KADAR LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) TOTAL DAN JUMLAH NEUROMUSCULAR JUNCTION (NMJ) OTOT PAHA TIKUS BETINA DENGAN DIET ATHEROGENIK

Hikmah Nur Pangesti\*, Lutfi Rachman\*, Rahma Triliana\*

\*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

E mail: [hikmahnp13@gmail.com](mailto:hikmahnp13@gmail.com)

## ABSTRACT

**Introduction:** Atherogenic diet increased serum lactate dehydrogenase (LDH) levels and altered muscle structure so does physical stress. However, study on the effect of various frequency of physical stress with atherogenic diet on serum LDH and muscles structure especially on the number of neuromuscular junction (NMJ) have not been conducted.

**Methods:** Female Wistar rats (5 weeks old) were divided into control and treatment groups. Control groups consist of Pre-Treatment (KPP, n=5), Positive (KP, n=5) and Negative control groups (KN, n=5) which were given atherogenic diet for 6 weeks (KPP) or 10 weeks (KP) and standard diet for 10 weeks (KN). Treatment groups were given atherogenic diet and 4 weeks of physical stress in form of forced swimming for 5 minutes daily (KSH, n = 5), alternate (KDH, n = 5) and twice a week (KSK, n = 5). At 15 weeks of age, KN, KP, KSH, KDH and KSK groups were euthanized and samples were collected. LDH levels were measured using spectrophotometry while thigh muscles histology were assessed using HE staining and analyzed using Image J.

**Results:** Atherogenic diet does not affect the number of NMJ ( $49.98 \pm 15.10$ ) KN and ( $34.77 \pm 2.58$ ) KP but significantly increases total LDH levels ( $407.40 \pm 174.38$ ) KN and ( $1523.40 \pm 613.17$ ) KP. Various frequencies of physical stress did not significantly affect serum LDH levels. However, in number of NMJ, KSK group were significantly different from KP suggesting that physical activity changes the muscle histological structure. Correlation analysis showed non-significant negative relationship between NMJ and serum LDH level suggesting that physical stress during atherogenic diet must be carried out at the right frequency to obtain the best results.

**Conclusion:** The atherogenic diet affects serum LDH levels but not NMJ number while physical stress affect number of NMJ but not serum LDH levels.

**Keywords:** Atherogenic diet, frequency of physical stress, total LDH, NMJ

## PENDAHULUAN

Hiperlipidemia adalah peningkatan kadar salah satu atau semua lipid dalam darah, baik berupa hipertrigliseridemia, hiperkolesterolemia, atau yang lainnya<sup>1</sup>. Prevalensi hiperlipidemia di Indonesia di tahun 2008 tercatat sebesar 35,1% yang meningkat menjadi 35,9% pada tahun 2013<sup>2</sup>. Menurut RISKESDAS tahun 2013, penduduk Indonesia usia >15 tahun dengan kadar kolesterol abnormal (kolesterol  $\geq 200$ mg/dL) sebanyak 35.9% dengan prevalensi pada wanita lebih tinggi daripada pria<sup>2</sup>. Hiperlipidemia merupakan faktor risiko terjadinya berbagai kelainan tubuh salah satunya gangguan pada muskuloskeletal yang dapat meningkatkan risiko kematian<sup>3</sup>. Oleh karena itu, etiopatogenesis hiperlipidemia perlu diketahui<sup>4</sup>.

Salah satu penyebab hiperlipidemia adalah asupan tinggi lemak yang dapat diinduksi dengan pemberian diet atherogenik<sup>5</sup>. Diet atherogenik merupakan diet dengan komposisi tertentu pada hewan coba yang dapat menginduksi penurunan kadar High Density Lipoprotein (HDL), peningkatan kadar Low Density Lipoprotein (LDL)<sup>5</sup> dan kadar

trigliserida dalam darah<sup>6</sup>. Hipertrigliseridemi dapat mengakibatkan peningkatan Free Fatty Acid (FFA) dalam darah dan otot<sup>7</sup>. Peningkatan FFA dalam otot dapat menyebabkan peningkatan aktivitas oksidasi asam lemak di otot dan menimbulkan stres mitokondria<sup>8</sup>. Stres mitokondria akan merusak sel otot dan berdampak pada penurunan jumlah neuromuscular junction<sup>9</sup> serta peningkatan kadar serum lactate dehydrogenase (LDH) total<sup>10</sup>.

LDH adalah enzim tetramerik yang berfungsi pada metabolisme laktat dan piruvat yang banyak terdapat pada otot rangka<sup>11</sup>. Pada pemeriksaan mikroskopis, hampir semua otot rangka memiliki neuromuscular junction (NMJ)<sup>12</sup>. Neuromuscular junction berperan pada proses kontraksi otot, yang dapat menurun/melemah jika jumlah dan struktur NMJ berubah<sup>9</sup>. Salah satu penyebab penurunan jumlah neuromuscular junction (NMJ) adalah aktivitas fisik berlebihan dan stres fisik<sup>13</sup>.

Stres fisik adalah suatu aktivitas yang menyebabkan keterpaksaan pada kondisi fisik, salah satunya dengan renang paksa<sup>14</sup>. Stres fisik akan menstimulasi hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis untuk mengeluarkan corticotropin releasing

hormone (CRH) sehingga terjadi peningkatan kadar adrenocorticotrophic hormone (ACTH)<sup>15</sup>. ACTH yang meningkat akan menyebabkan peningkatan kadar kortisol<sup>16</sup> dan lipolisis<sup>17</sup>. Hal ini akan memperburuk proses beta oksidasi, stres mitokondria dan kerusakan sel otot pada individu dengan diet atherogenik<sup>18</sup>.

Penelitian Supriyono (2008) membuktikan peningkatan frekuensi stres fisik dapat menurunkan kadar kolesterol, LDL, dan trigliserida disertai peningkatan HDL. Devaki et al (2012) menunjukkan bahwa stres fisik yang terlalu lama akan mengakibatkan kadar lipid dalam darah akan meningkat. Hal ini diduga berhubungan durasi dan frekuensi stres fisik yang dapat memperburuk dan atau memperbaiki kondisi individu dengan diet atherogenik. Namun hal tersebut belum pernah diteliti pada perubahan kadar serum LDH total dan jumlah neuromuscular junction. Perempuan banyak mengalami hiperlipidemia yang berhubungan dengan peran estrogen yang memodulasi metabolisme lipid dan lipoprotein<sup>19</sup>. Kombinasi dari efek frekuensi dan durasi stres fisik pada tikus betina dengan diet atherogenik belum pernah ada sehingga perlu dilakukan.

## M E T O D E

Penelitian ini dilaksanakan di *Animal House* dan Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. Laboratorium Patologi Anatomi dan Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dimulai dari bulan Januari 2018 sampai dengan Mei 2018. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *control group post test only* secara *invivo* diberikan diet atherogenik selama 10 minggu dan perlakuan stres fisik selama 4 minggu menggunakan hewan coba tikus Wistar betina.

### Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar, dengan kriteria inklusinya adalah tikus sehat, berusia 11 minggu, tikus betina dan berat badan antara 100 – 200 gram. Jumlah sampel yang digunakan 30 ekor sesuai rumus Federer. Pembagian kelompok perlakuan dilakukan secara acak (*random sampling*). Tikus dibagi dalam 6 kelompok yaitu Kelompok Pra Perlakuan (KPP, n=5), Kontrol Negatif (KN, n=5), Kontrol Positif (KP, n=5), Kelompok Senin Kamis (KSK, (n=5), Kelompok Dua Hari (KDH, n=5), dan Kelompok Setiap Hari (KSH, n=5).

### Pemberian Diet

Diet normal dibuat dengan mencampur konsentrat pakan ayam (PARS) 20g/ekor, tepung terigu 10g/ekor dan air secukupnya. Diet ini diberikan pada Kelompok Negatif (KN). Sedangkan, diet atherogenik dibuat dari komposisi diet normal

dengan menambahkan kolesterol 0.2 g/ekor, asam kolat 0.02 g/ekor, dan minyak babi 1 ml/ekor<sup>5</sup>. Diet atherogenik diberikan pada KPP, KP, dan kelompok perlakuan (KSH, KDH, dan KSK).

### Perlakuan Stres Fisik

Perlakuan stres fisik dimulai saat tikus berumur 11 minggu menempati *single cage*. Tikus diberi perlakuan stres fisik berenang dalam akuarium dengan suhu air 32°C dan kedalaman sekitar 40 cm<sup>21</sup>. Waktu perlakuan selama 5 menit antara pukul 16.00-18.00 WIB. Tikus kemudian dikeringkan dengan handuk dan *hairdryer*. Perlakuan ini diberikan selama 4 minggu dengan frekuensi stres fisik yang berbeda, yaitu setiap hari pada KSH, setiap dua hari sekali untuk KDH, dan tiap hari Senin dan Kamis pada KSK.

### Pemeriksaan Kadar LDH

Kadar LDH diuji dengan metode spektrofotometri dengan prinsip pengukuran menggunakan absorbansi cahaya bi-kromatik dengan panjang gelombang dari 340 hingga 700 nm. Penelitian ini, menggunakan kit Pentra C.200 dengan *monoreagent* yaitu 1000 µl R1 (Tris, L-aspartat, LDH) dicampur dengan 250 µl R2 (2-oxoglutarate, NADH). Prinsip metode pengukuran LDH ini didasarkan pada piruvat dan NADH dengan adanya enzim LDH bereaksi menjadi laktat dan NAD. Aktivitas LDH ditentukan dengan cara mengukur penurunan konsentrasi NADH<sup>20</sup>.

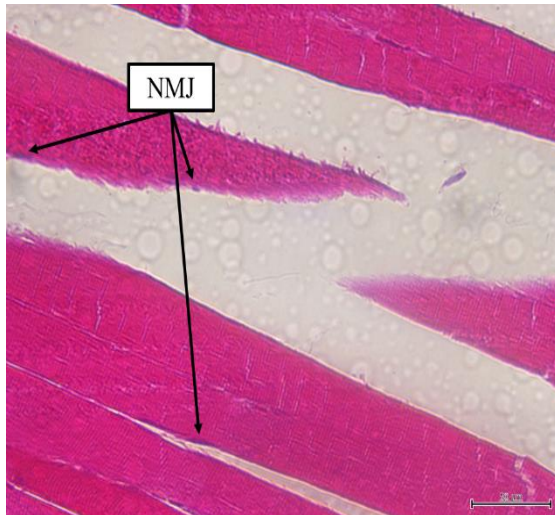
Prosedur kerja berdasarkan protocol kit Pentra C.200 dimulai dari pembuatan reagen. Selanjutnya sampel darah yang sudah di *sentrifuge* diambil serum sebanyak 10 µl. Pembuatan larutan sampel dengan 10 µl serum darah dicampur dengan 1000 µl R1 kemudian diinkubasikan selama 1 menit. Larutan sampel tersebut kemudian dimasukkan kedalam *test drive*. Mesin Pentra C. 200 *reader* kemudian dapat membaca kadar LDH total<sup>20</sup>.

### Pemeriksaan Struktur Histologis Otot Paha

Pemeriksaan struktur histologis menggunakan sampel otot paha dan difiksasi dalam larutan Bouin (Formaldehid 25%, asam pikrat) selama 24 jam. Tahapan selanjutnya dilakukan proses dehidrasi, penjernihan, *embedding* dan *sectioning*. Pewarnaan preparat otot menggunakan *Haematoxylin and eosin* (HE) kemudian ditutup dengan *cover glass*.

Preparat selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 40x dan 400x. Perbesaran 400x diperlukan untuk pengamatan lebih jelas terhadap perhitungan NMJ dengan perbandingan pada perbesaran 40x NMJ

belum terlihat jelas. Pada perbesaran 400x dilakukan perhitungan jumlah *neuromuscular junction* (NMJ) dengan 20 lapang pandang. Perhitungan ini menggunakan aplikasi *Image J*.



Pada aplikasi tersebut kita menggambar luas area pink dan menghitung jumlah NMJ. Perhitungan hasil didapatkan dari pembagian jumlah sel / lapang pandang, hasil dengan satuan  $\text{sel}/\pi\text{m}^2$ .

### Teknik Analisa Data

Data yang didapatkan kemudian diuji statistik menggunakan *Independent Sample t-test* dan *One Way ANOVA* ( $p < 0.05$ ). Uji *Post Hoc LSD* ( $p < 0.05$ ) dilakukan jika *One Way ANOVA* signifikan, untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dan kelompok yang berpengaruh. Jika data tidak homogen, diuji menggunakan *Tamhane* ( $p < 0.05$ ). Hubungan kadar LDH dan jumlah NMJ di evaluasi dengan uji *Pearson Correlation* ( $p < 0.05$ ). Jika data tidak normal maka dapat di uji dengan *Kruskal Wallis*.

## HASIL DAN ANALISA DATA

**Keterangan :** Tabel 1 menunjukkan data dalam mean  $\pm$  standar deviasi (SD). BB: berat badan, M 1-6: minggu 1-6,  $\Delta$ BB Pra Perlakuan: selisih BB Akhir dikurangi BB-M 1. Data tidak diuji statistik karena, pada kelompok pra

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah tikus Wistar betina dengan usia 5 minggu yang dibagi dalam dua kelompok besar, yaitu kelompok pra perlakuan dan kelompok perlakuan. Adapun data mengenai karakteristik sampel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada **tabel 1** dan **tabel 2** di bawah ini:

**Tabel 1 Karakteristik Sampel Kelompok Pra Perlakuan (KPP)**

| Kelompok Pra Perlakuan (n=5)            |                    |
|-----------------------------------------|--------------------|
| Perlakuan                               | Diet atherogenic   |
| U s i a A w a l (m i n g g u)           | 5                  |
| L a m a P e r l a k u a n (m i n g g u) | 6                  |
| U s i a A k h i r (m i n g g u)         | 11                 |
| B B (g r a m)                           |                    |
| B B A w a l                             | $34.40 \pm 6.95$   |
| B B - M 1                               | $47.80 \pm 11.01$  |
| B B - M 2                               | $62.60 \pm 17.17$  |
| B B - M 3                               | $83.80 \pm 20.77$  |
| B B - M 4                               | $102.40 \pm 19.48$ |
| B B - M 5                               | $117.00 \pm 20.74$ |
| B B - M 6                               | $130.00 \pm 19.43$ |
| B B A k h i r                           | $132.80 \pm 19.42$ |
| $\Delta$ B B p r a p e r l a k u a n    | $85.0 \pm 12.75$   |

Pada kelompok pra perlakuan terjadi penambahan BB disetiap minggunya dilihat dari rerata dan standar deviasinya. BB awal sebesar ( $34.40 \pm 6.95$ ), BB-M 1 ( $47.80 \pm 11.01$ ), BB-M 2 ( $62.60 \pm 17.17$ ), BB-M 3 ( $83.80 \pm 20.77$ ), BB-M 4 ( $102.40 \pm 19.48$ ), BB-M 5 ( $117.00 \pm 20.74$ ), BB-M 6 ( $130.00 \pm 19.43$ ) BB Akhir ( $132.80 \pm 19.42$ ). Hal ini terkait pemberian diet atherogenic yang dapat menambah BB dilihat dari delta pra perlakuan  $85.00 \pm 12.75$ .

perlakuan tidak dilakukan perlakuan fisik dan hanya digunakan sebagai perbandingan dengan kelompok perlakuan dilihat dari lama pemberian diet atherogenic.

**Tabel 2 Karakteristik Sampel Kelompok Pasca Perlakuan**

|                             | K N<br>(n=5)           | K P<br>(n=5)                   | K S K<br>(n=5)                                                                                         | K D H<br>(n=5)                                                                                  | K S H<br>(n=5)                                                                       |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Perlakuan                   | Diet normal<br>10 m gg | Diet<br>Atherogenic<br>10 m gg | Diet A T H 10<br>m gg, perlakuan<br>stres fisik setiap<br>Senin dan<br>K a m i s s e l a m a 4<br>m gg | Diet A T H 10<br>m gg, perlakuan<br>stres fisik setiap<br>dua hari sekali<br>s e l a m a 4 m gg | Diet A T H 10<br>m gg, perlakuan<br>stres fisik setiap<br>hari s e l a m a 4<br>m gg |
| U s i a a w a l<br>(m gg)   | 5                      | 5                              | 5                                                                                                      | 5                                                                                               | 5                                                                                    |
| U s i a a k h i r<br>(m gg) | 15                     | 15                             | 15                                                                                                     | 15                                                                                              | 15                                                                                   |
| B B A w a l (g)             | $135.60 \pm 46.06$     | $113.20 \pm 18.46^d$           | $145.20 \pm 11.56$                                                                                     | $177.80 \pm 6.42^{a,b}$                                                                         | $152.00 \pm 21.95^b$                                                                 |
| B B P M 1 (g)               | $143.20 \pm 36.38$     | $125.80 \pm 19.08^{c,d,e}$     | $156.40 \pm 8.02^b$                                                                                    | $184.20 \pm 5.93^{a,b}$                                                                         | $161.80 \pm 24.25^b$                                                                 |
| B B P M 2 (g)               | $153.00 \pm 29.90$     | $130.40 \pm 16.88^{c,d,e}$     | $156.20 \pm 4.92^{b,d}$                                                                                | $197.20 \pm 11.45^{a,b,c,e}$                                                                    | $163.40 \pm 21.66$                                                                   |

|                        |                |                                 |                             |                                   |                               |
|------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| BBPM 3 (g)             | 158.40 ± 25.72 | 140.20 ± 19.33 <sup>d,e</sup>   | 158.00 ± 5.34 <sup>d</sup>  | 220.80 ± 14.55 <sup>a,b,c,e</sup> | 168.40 ± 22.79 <sup>b,d</sup> |
| BB Akhir (g)           | 169.20 ± 8.61  | 145.60 ± 17.49 <sup>a,d,e</sup> | 155.80 ± 14.57 <sup>d</sup> | 207.20 ± 18.16 <sup>a,b,c,e</sup> | 169.60 ± 21.20 <sup>b,d</sup> |
| ΔBB (g)                | 26.00 ± 38.31  | 19.80 ± 9.98                    | -0.60 ± 18.35               | 23.00 ± 18.37                     | 7.80 ± 38.69                  |
| APM 1 (g)              | 23.76 ± 15.95  | -                               | 29.21 ± 11.53 <sup>b</sup>  | 34.66 ± 20.35                     | 25.44 ± 4.78 <sup>b</sup>     |
| APM 2 (g)              | 23.38 ± 3.44   | 23.51 ± 3.37                    | 26.09 ± 11.57               | 27.66 ± 8.17                      | 23.31 ± 1.61                  |
| APM 3 (g)              | 27.37 ± 4.99   | 21.17 ± 1.97 <sup>e</sup>       | 19.03 ± 2.03                | 28.94 ± 8.92                      | 28.72 ± 2.84 <sup>b</sup>     |
| APM 4 (g)              | 24.54 ± 3.03   | 21.77 ± 3.31                    | 20.71 ± 4.25                | 28.40 ± 9.64                      | 29.03 ± 6.10                  |
| Rata-rata A P/hari (g) | 24.76 ± 5.94   | 16.61 ± 0.92 <sup>e</sup>       | 23.76 ± 6.69                | 29.92 ± 11.55                     | 26.62 ± 2.27 <sup>b</sup>     |

**Keterangan:**

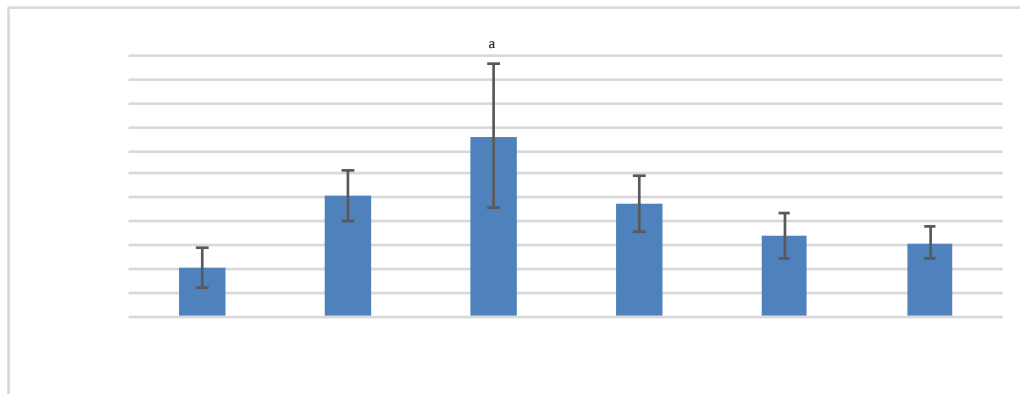
Tabel 2 menunjukkan data dalam mean ± standar deviasi (SD). Uji statistik menggunakan *Independent Sample T-Test*, *One Way ANOVA*, *Kruskal-Wallis*, *Post Hoc LSD* dan *Tamhane*. BBPM 1-3: Berat Badan Perlakuan Minggu 1-3, ΔBB: selisih BB Akhir dengan BBPM 1, ATH: Atherogenik, AMM 1-4: Asupan Makan Minggu 1-4, KN: Kontrol Negatif, KP: Kontrol Positif, KSK: Kelompok Senin Kamis, KDH: Kelompok Dua Hari, KSH: Kelompok Setiap Hari. (a)  $p < 0.05$  dengan KN, (b)  $p < 0.05$  dengan KP, (c)  $p < 0.05$  dengan KSK, (d)  $p < 0.05$  dengan KDH, (e)  $p < 0.05$  dengan KSH.

Pada karakteristik sampel pasca penelitian terdapat hasil yang signifikan antara kelompok KP dengan KSH pada BB awal. Pada BBPM 1 dan BBPM 2 KP signifikan dengan kelompok perlakuan. BBPM 3 dan BB akhir KP signifikan dengan KDH

dan KSH. Pada delta BB tidak ada perbedaan yang bermakna antara beberapa kelompok penelitian. Sedangkan, asupan pakan /hari hanya kelompok KP yang signifikan dengan kelompok KSH

## Kadar Serum LDH

Rata-rata kadar serum LDH kelompok penelitian dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini.



**Gambar 1 Rata-rata Kadar LDH total**

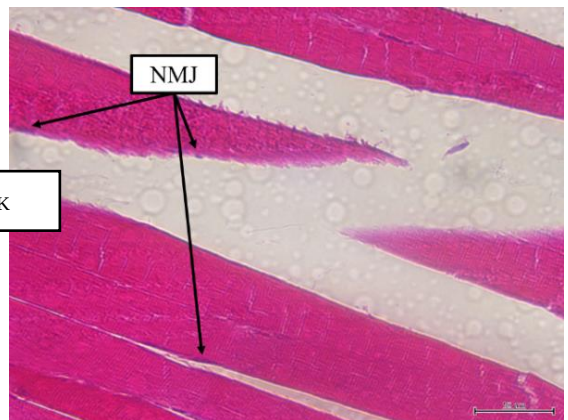
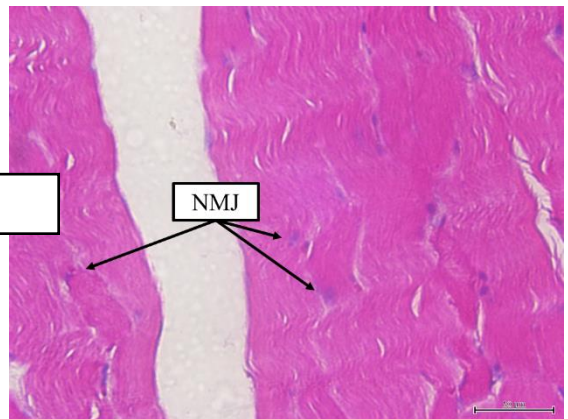
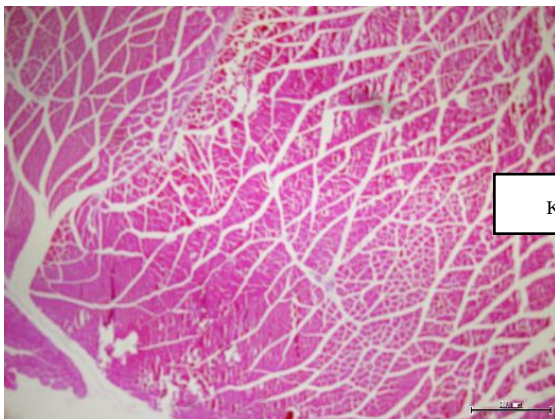
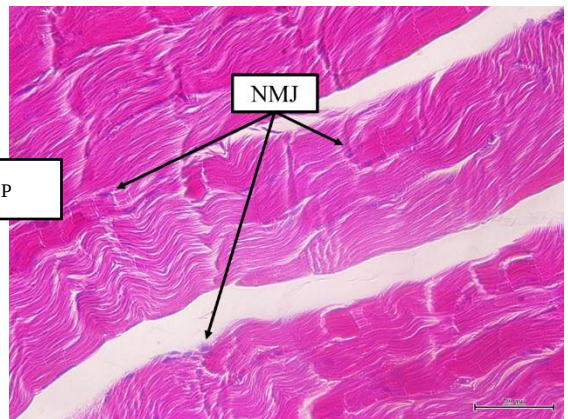
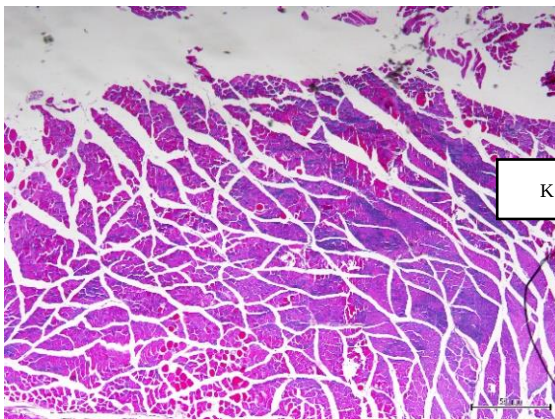
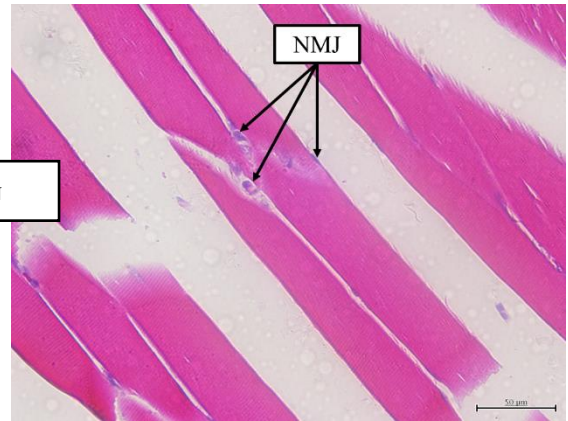
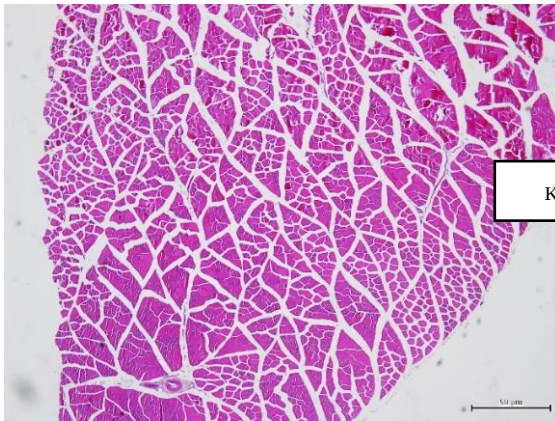
**Keterangan:** Gambar 1 menunjukkan rata-rata kadar LDH total tikus pada Kontrol Negatif (KN,  $407.4 \pm 174.385$ ), kelompok Pra Perlakuan (KPP,  $1019.8 \pm 217.781$ ), Kontrol Positif (KP,  $1523.4 \pm 613.172$ ), Kelompok Senin Kamis (KSK,  $950 \pm 241.36$ ), Kelompok Dua Hari (KDH,  $681 \pm 182.993$ ), dan Kelompok Setiap Hari (KSH,  $623.4 \pm 127.284$ ). Data diuji statistik menggunakan *Independent Sample T-test* untuk perbandingan KP dengan KN dan KP dengan KPP; *Post Hoc Tamhane* untuk perbandingan kelompok perlakuan dengan KP. (a)  $p < 0.05$ , dengan KN.

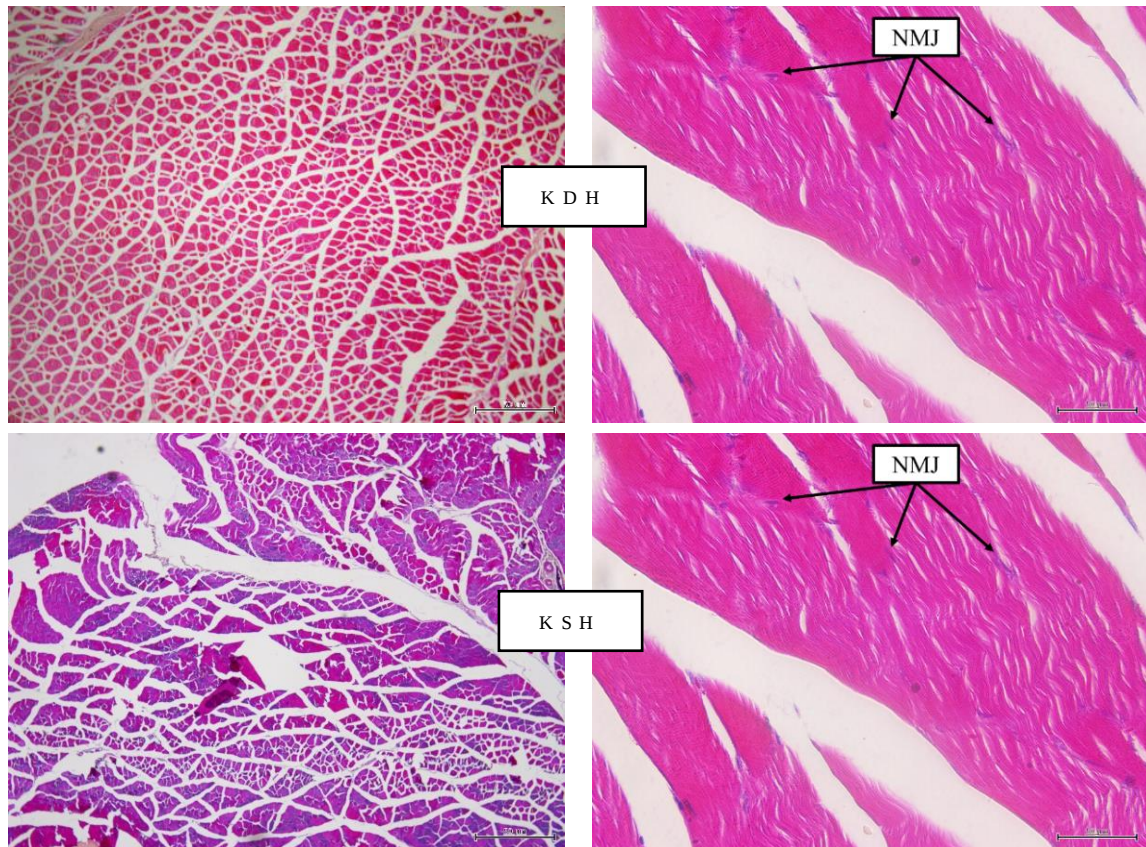
Berdasarkan uji *Independent Sample T-test* kadar LDH signifikan antara KP dengan KN tetapi tidak signifikan antara KP dengan KPP. Rerata kadar LDH pada KP lebih tinggi daripada KN dan KPP. Uji *Post Hoc Tamhane* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara KP dan kelompok perlakuan. Rata-rata kadar LDH kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan KP. Adapun urutan rerata kadar LDH secara berturut-turut dari

rendah ke tinggi adalah KSH, KDH, KSK, dan KP dengan nilai tertinggi.

## Jumlah NMJ Otot Paha

Gambaran histologis *neuromuscular junction* (NMJ) otot paha kelompok penelitian dapat dilihat pada gambar 2 di bawah ini.





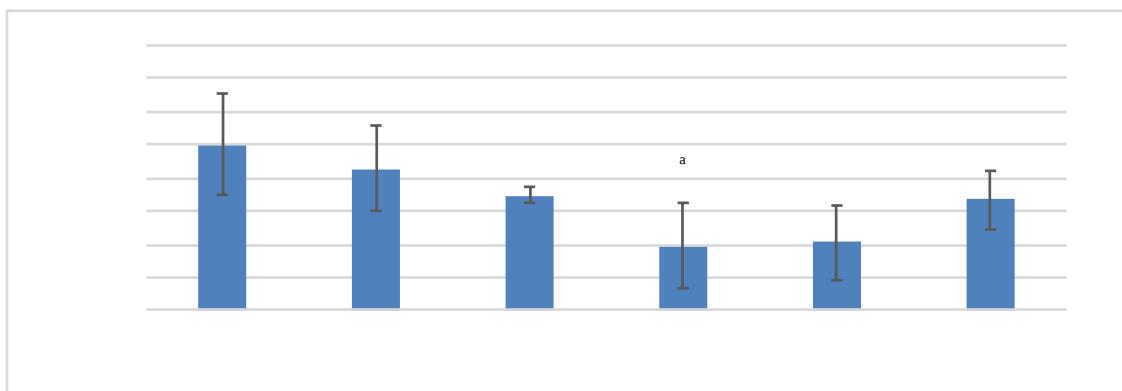
**G a m b a r 2 N M J O t o t P a h a**

G a m b a r 2 m e n u n j u k k a n g a m b a r a n h i s t o l o g i s n e u r o m u s c u l a r j u n c t i o n ( N M J ) o t o t p a d a k o n t r o l n e g a t i f ( K N ) , k e l o m p o k p r a p e r l a k u a n ( K P P ) , k o n t r o l p o s i t i f ( K P ) , K e l o m p o k S e n i n K a m i s ( K S K ) , K e l o m p o k D u a H a r i ( K D H ) , d a n K e l o m p o k S e t i a p H a r i ( K S H ) . N M J , n e u r o m u s c u l a r j u n c t i o n . G a m b a r a n d i a t s d i u k u r d e n g a n a p l i k a s i i m a g e J , p a d a g a m b a r k i r i ( p e r b e s a r a n 40x ) d e n g a n j e n i s p o t o n g a n o t o t s e c a r a t r a n s v e r s a l d a n g a m b a r k a n a n ( p e r b e s a r a n 400x ) d e n g a n j e n i s p o t o n g a n o t o t s e c a r a l o n g i t u d i n a l . P e r h i t u n g a n N M J d i l a k u k a n p a d a p e r b e s a r a n 400x k a r e n a t e r l i h a t l e b i h j e l a s .

P e r u b a h a n y a n g t e r j a d i p a d a g a m b a r a n h i s t o l o g i s a k a n m e m p e n g a r u h i p a d a p e r h i t u n g a n j u m l a h N M J . K u a l i t a s g a m b a r a n h i s t o l o g i s y a n g j e l e k a k a n m e n g a l a m i p e n u r u n a n p a d a j u m l a h N M J . H a s i l p e r h i t u n g a n N M J m e n u n j u k k a n n i l a i t e r t i n g g i k e t e r e n d a h b e r t u r u t - t u r u t i a l a h k e l o m p o k K N , K P P ,

K P , K S H , K D H d a n K S K . P e r b e s a r a n 400x d i p i l i h u n t u k p e r h i t u n g a n N M J k a r e n a p a d a p e r b e s a r a n t e r s e b u t N M J l e b i h j e l a s t e r l i h a t d i b a n d i n g p e r b e s a r a n 40x .

R a t a - r a t a j u m l a h N M J k e l o m p o k p e n e l i t i a n d a p a t d i l i h a t p a d a **g a m b a r 3** d i b a w a h i n i .



**G a m b a r 3 R a t a - r a t a J u m l a h N M J**

**Keterangan:** Gambar 3 menunjukkan rata-rata jumlah NMJ tikus pada Kontrol Negatif (KN,  $49.98 \pm 15.10$ ), kelompok Pra Perlakuan (KPP,  $42.47 \pm 12.80$ ), Kontrol Positif (KP,  $34.77 \pm 02.58$ ), Kelompok Senin Kamis (KSK,  $19.37 \pm 12.84$ ), Kelompok Dua Hari (KDH,  $20.48 \pm 11.32$ ), dan Kelompok Setiap Hari (KSH,  $33.26 \pm 08.69$ ). Data diuji statistik menggunakan *Independent Sample T-test* untuk perbandingan KP dengan KN dan KP dengan KPP; *Post Hoc Tamhane* untuk perbandingan kelompok perlakuan dengan KP. (a)  $p < 0.05$ , dengan KP.

Berdasarkan uji *Independent T-test*,  $\Sigma$  NMJ tidak berbeda signifikan antara KP dengan KN maupun KPP. Rerata  $\Sigma$  NMJ pada KN memiliki nilai yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan KP. Selanjutnya, pada uji *One Way ANOVA*, NMJ menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan KP ( $p < 0.05$ ). Uji *Post Hoc LSD* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara KP dengan KSK.

### Hasil Uji Korelasi Kadar LDH Total dengan Jumlah NMJ

Kadar LDH total dan struktur histologis otot dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan keduanya. Adapun hasil uji korelasi dapat dilihat pada tabel 3 di bawah ini.

|     |                     | $\Sigma$ NMJ       |
|-----|---------------------|--------------------|
| LDH | Pearson Correlation | -.047 <sup>*</sup> |
|     | Sig. (2-tailed)     | .806               |
|     | N                   | 30                 |

Berdasarkan uji korelasi *Pearson* antara kadar LDH dengan NMJ, didapatkan nilai korelasi sebesar -0.47 dan tidak signifikan.

## PEMBAHASAN

### Peran Karakteristik Sampel Penelitian Pada Hasil

Berat badan tikus mengalami peningkatan. Berat badan tikus mengalami peningkatan selama perlakuan. Hal ini dapat juga dilihat dari BB akhir adanya perbedaan yang signifikan KP dengan KN. Jika dilihat rerata delta berat badan, KN memiliki selisih berat badan yang lebih tinggi daripada KP yang menunjukkan bahwa diet atherogenik tidak dapat dapat memodulasi berat badan. Hal ini bertolak belakang dengan teori bahwa diet atherogenik dapat meningkatkan berat badan. Diet atherogenik akan menstimulus hipotalamus mengaktifkan leptin dimana insulin akan meningkat. Selanjutnya, akan menekan pusat kenyang dan mengaktifkan pusat lapar sehingga nafsu makan akan meningkat disertai deposit makanan dari lemak hal ini akan menaikkan BB<sup>21</sup>.

Namun hasil penelitian ini selaras dengan teori bahwa, diet atherogenik menurunkan BB dengan mekanisme ketika insulin mulai resisten maka akan meningkatkan lipolisis sehingga, BB akan turun<sup>22</sup>.

Rerata BB akhir KDH lebih tinggi dibandingkan kelompok KSK dan KSH. Terdapat hasil yang signifikan dari BB akhir kelompok KP dengan KDH dan KSK. Sedangkan, hasil signifikan terlihat dari rata-rata asupan pakan / hari bahwa KP signifikan dengan KSH. Hal ini diduga pengaruh diet karena semakin tinggi asupan makan maka asupan lemak meningkat sehingga akumulasi lemak tubuh akan meningkat<sup>17</sup>.

Asupan makan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui berapa jumlah pakan yang dikonsumsi dalam satu hari. Peningkatan asupan diet atherogenik yang tinggi lemak akan meningkatkan kadar Free Fatty Acid dalam darah<sup>4</sup>. Apabila asupan energi tersebut tidak sebanding dengan pengeluarannya maka asam lemak akan disimpan di jaringan adiposa sehingga meningkatkan berat badan<sup>23</sup>. Urutan rata-rata jumlah asupan perminggu dari tertinggi ke terendah secara berurutan adalah KDH-KSH-KN-KSK-KP. Kelompok KP memiliki rata-rata asupan makanan perminggu yang lebih rendah daripada KN diduga karena perbedaan jenis diet. Kandungan minyak babi pada diet atherogenik menimbulkan bau yang kurang sedap sehingga mengurangi nafsu makan<sup>24</sup>. Selain itu, diet atherogenik yang tinggi lemak juga memperlambat proses pengosongan lambung sehingga dilihat dari segi diet mengalami penurunan<sup>23</sup>. Oleh karena itu, hasil penelitian ini pada kelompok positif memiliki asupan pakan yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok negatif. Leptin yang mempengaruhi nafsu makan juga tidak bermakna signifikan pada hasil penelitian Illiyin, antara KN dengan KP (Unpublished data). Leptin yang resisten jika diinduksi oleh diet atherogenik secara terus menerus, akan meningkatkan nafsu makan hal ini makan sudah pada tahap obesitas. Pada kelompok positif dan perlakuan belum terjadi obesitas sehingga, selaras jika hasil penelitian kelompok diet atherogenik mengalami penurunan BB karena rendahnya nafsu makan<sup>22</sup>.

### Pengaruh Diet Atherogenik Terhadap Kadar LDH Total Tikus Wistar Betina

Analisa statistik kadar LDH Kontrol Positif (KP) dengan Kontrol Negatif (KN) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan sehingga kadar LDH tikus dengan diet atherogenik dan diet normal terdapat perbedaan. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Anandhi et al. (2013) dan Venkadeswaran et al. (2016), yang menyatakan bahwa diet kaya akan lemak akan meningkatkan kadar LDH karena kondisi hiperkolesterolemia<sup>25</sup>. Pada kondisi tersebut terjadi mekanisme adanya diet atherogenik akan

mengakibatkan resistensi insulin menyebabkan lipolisis di jaringan otot dan mengeluarkan mediator inflamasi. Inflamasi akan menyebabkan kerusakan sel otot rangka, diduga sel mengalami nekrosis sehingga LDH meningkat<sup>9</sup>.

Pada penelitian ini, uji statistik kadar LDH Kontrol Positif (KP) dengan Kelompok Pra Perlakuan (KPP) menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kadar LDH total pada tikus diet atherogenik selama 6 minggu maupun 10 minggu tidak ada perbedaan. Jika dilihat reratanya, kadar LDH pada KP lebih tinggi dibandingkan KPP. Hal ini diduga karena pengaruh kadar kolesterol total dan trigliserida. Kadar LDH serum akan semakin meningkat seiring dengan peningkatan kadar kolesterol total dan trigliserida<sup>26</sup>. Pada penelitian ini, kadar kolesterol total KP lebih tinggi daripada KPP (Unpublished data).

#### **Pengaruh Frekuensi Stres Fisik Terhadap Kadar LDH Tikus Wistar Betina Dengan Diet Atherogenik**

Uji statistik kadar LDH Kontrol Positif (KP) dengan kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Rerata kadar LDH kelompok perlakuan lebih rendah daripada KP. Hal ini didukung dengan teori perlakuan stres fisik selama 4 minggu mampu menurunkan kadar LDH. Hasil ini diperkuat dengan penelitian Nie et al., 2018, yang menyatakan bahwa forced swimming dapat menurunkan LDH secara signifikan. Hasil LDH yang rendah pada kelompok perlakuan terjadi karena mekanisme olahraga yang cukup dapat memperbaiki kinerja insulin mengakibatkan lipolisis tidak terjadi di jaringan otot sehingga LDH akan turun<sup>27</sup>.

Namun menurut Sinaga (2016) adanya aktivitas fisik dapat menyebabkan kerusakan sel yang berdampak pada peningkatan LDH. Kadar LDH akan meningkat seiring peningkatan kadar kolesterol total dan trigliserida. Mekanisme LDH meningkat jika, olahraga secara kuat yang membutuhkan ATP dan oksigen lebih banyak sehingga dapat terjadi kematian sel atau nekrosis<sup>28</sup>.

Efek dari meningkatnya kadar serum LDH total dapat menyebabkan penyakit antara lain: infark miokard, emboli, pneumonia, gagal jantung kongestif, hepatitis, sirosis aktif, neoplasma, anemia hemolitik, anemia megaloblastik, distrofi otot, aktivitas / latihan berat, trauma otot, infark glomerulonefritis, nekrosis tubular akut, intestinal ischemia, intestinal infarction, heatstroke, dan shock<sup>28</sup>.

Hal ini diperkuat dengan peran LDHA pada penyakit kanker yang memainkan bagian penting dalam perkembangan tumor, tetapi hubungan antara perkembangan tumor invasif dan glikolisis kurang dipahami. Peran LDHB dalam perkembangan tumor kurang dikarakterisasi dengan baik<sup>29</sup>.

#### **Pengaruh Diet Atherogenik Terhadap Jumlah NMJ Otot Paha Tikus Wistar Betina**

Hasil analisis statistik jumlah NMJ Kontrol Positif (KP) dengan Kontrol Negatif (KN) maupun KPP menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Hasil ini kurang mendukung salah satunya karena, pengamatan yang dilakukan hanya melihat dari perhitungan jumlah NMJ. Mekanisme diet atherogenik yang menyebabkan lepasnya mediator inflamasi yang menyebabkan sel nekrosis diduga kuat mempengaruhi pada jumlah NMJ yang rendah<sup>13</sup>. Kekurangan lain pada penelitian ini bahwa, marker mediator inflamasi tidak dilakukan.

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilihat dari segi kualitas pewarnaan sediaan preparat, bahan dan alat yang digunakan serta pemeriksaan mediator inflamasi perlu diteliti. Selain itu, pilihan reagen yang kurang tepat, kesalahan mekanik pada alat, dapat mempengaruhi hasil pengamatan terkait dengan kualitas preparat<sup>30</sup>. Mengingat hasil penelitian ini mempunyai kendala pada kualitas preparat sehingga, mempengaruhi hasil penelitian.

#### **Pengaruh Frekuensi Stres Fisik Terhadap Jumlah NMJ Otot Paha Tikus Wistar Betina Dengan Diet Atherogenik**

Pengaruh frekuensi stres fisik terhadap jumlah NMJ otot pada kelompok Kontrol Positif (KP) dengan kelompok perlakuan KSK menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) dan kelompok perlakuan NMJ cenderung rendah dibanding KP. Hal ini bertolak belakang jika dilihat dari mekanismenya, NMJ akan naik jika di papar oleh olahraga yang cukup karena perbaikan kinerja insulin sehingga tidak sampai menimbulkan sel nekrosis. Tetapi, hasil yang didapatkan pada penelitian ini justru mengalami penurunan pada kelompok perlakuan. Hal ini diduga karena preparat histologi yang jelek sehingga hasil yang didapat tidak selaras<sup>13</sup>.

Hasil yang signifikan antara KN dengan KSK, dan KDH serta KP dengan KSK. Hal ini dapat ditarik asumsi bahwa kemungkinan NMJ masih mampu menjalankan perannya dengan baik jika stres fisik yang diberikan dua atau tiga kali dalam seminggu. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan penambahan berbagai aspek yang diamati, tidak hanya dari jumlah NMJ pada perubahan struktur histologis otot paha.

#### **Hubungan Antara LDH Total Dengan Jumlah NMJ Otot Paha Tikus Wistar Betina Dengan Diet Atherogenik**

Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan negatif antara kadar LDH dengan NMJ. Jika dilihat dari nilai signifikansinya, tidak terdapat hubungan yang signifikan antara kadar LDH dengan NMJ. Hubungan LDH dengan NMJ serta diet atherogenik belum pernah dilakukan sebelumnya. Tetapi pada fakta yang terjadi selama proses perlakuan tikus

mengalami kelemahan otot saat berenang dan membaik setelah dikeringkan dan diistirahatkan<sup>31</sup>. Mekanisme tersebut karena otot butuh ATP untuk kontraksi. Perlakuan stres fisik yang kuat dan pendek akan menyebabkan terjadinya glikolisis anaerob sehingga, terjadi penimbunan asam laktat yang memberikan efek kelelahan<sup>18</sup>. Setelah tikus diistirahatkan maka oksigen akan masuk untuk menghasilkan energi lagi maka, tikus akan membaik setelah istirahat<sup>31</sup>.

Aktivitas fisik yang diberikan selama perlakuan akan menyebabkan kerusakan sel sehingga LDH total akan meningkat. Peningkatan LDH menyebabkan kerusakan sel dimana, NMJ juga bagian dari sel hal ini NMJ akan banyak hilang. Rendahnya jumlah NMJ terkait jumlah AChR yang menurun ini disebabkan karena proses yang dapat memblok AChR dan merusak membran post-synaptic<sup>32</sup>. Oleh karena itu, Peningkatan LDH akan menurunkan jumlah NMJ. Hal ini bisa jadi korelasi antara LDH dan jumlah NMJ otot paha dapat berhubungan secara tidak langsung di penelitian selanjutnya, jika pengamatan histologis jumlah NMJ otot dilihat dari berbagai aspek dengan sediaan preparat yang berkualitas. Faktor kendala pada penelitian ini menyebabkan hasil penelitian yang didapatkan tidak ada hubungan antara LDH total dengan jumlah NMJ. Faktor-faktor tersebut antara lain: kualitas preparat yang jelek, alat pengamatan mikroskopis yang sempat error dan faktor bias pengamatan karena dilakukan pengamatan sendiri. Kendala yang terjadi, dapat menjadi evaluasi pada penelitian selanjutnya agar hasil yang didapatkan dapat membuktikan hasil yang signifikan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Diet atherogenik meningkatkan kadar serum LDH total namun tidak mempengaruhi jumlah NMJ otot paha tikus betina.
2. Berbagai frekuensi stres fisik tidak meningkatkan kadar serum LDH total namun, namun menurunkan jumlah NMJ otot paha pada kelompok KSK.
3. Tidak ada hubungan antara kadar LDH total dengan jumlah NMJ.

## SARAN

Untuk penelitian selanjutnya, peneliti menyarankan untuk:

1. Melakukan pewarnaan preparat yang berkualitas untuk hasil pengamatan histologis yang lebih baik.
2. Melakukan penelitian lanjutan dengan menambah waktu induksi diet atherogenik hingga lebih dari 10 minggu untuk melihat efek hiperlipidemia pada otot.

3. Melakukan penelitian lanjutan dengan durasi perlakuan stres fisik lebih dari 5 menit dalam periode yang lebih dari 4 minggu.
4. Melakukan penelitian lanjutan dengan menambah kelompok tikus dengan ovariectomi untuk mengetahui peran estrogen pada hiperlipidemia dan perlakuan frekuensi stres fisik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada IOM dan FK yang telah mendanai penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Onwe, P.E., Folawiyo, M.A., Anyigor, O.C.S., Umahi, G., Okorocho, A.E., & Afoke, A.O. Hyperlipidemia: Etiology and Possible Control. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015; 14(10): 93-100.
2. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI Tahun 2013. <http://www.depkes.go.id/resources/download/geral/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf>. Diakses tanggal 04 Desember 2017
3. Nindrea. Meta Analisis Faktor Risiko Penyakit Jantung Koroner di Asia Tenggara. Padang: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Andalas; 2015.
4. Nirosha, K, et al. A review on hyperlipidemia. *International Journal of Novel Trends In Pharmaceutical Science*. 2014;5(4).
5. Triliana, Rahma. Pengaruh Terapi Suplementasi Sterol Tanaman (Fitosterol) pada Profil Lemak, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, dan Perhitungan Sel Busa Aorta Tikus Pascadiet Atherogenik. Tesis Program Studi Biomedik Minat Farmakologi Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Brawijaya; tidak diterbitkan. 2005.
6. Pelton, K., Krieder, J., Joiner, D., Freeman, M.R., Goldstein, S.A., & Solomon, K.R. Hypercholesterolemia Promotes an Osteoporotic Phenotype. *Am. J. Pathol.* 2012;181(3):928 - 936.
7. Kesh et al. High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress and Its Impact on Metabolic Syndrome: A Review. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016; 9(1): 47 - 52.
8. Picard M, McEwen BS. Mitochondrial synapses: intracellular communication and signal integration. 2015.
9. Marta et al. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. 2014; 06:1-12.

10. Abbas, A.K., Aster, J.C., dan Kumar, V. Buku Ajar Patologi Robbins. Singapura: Elsevier Saunders; 2013. Edisi 9.
  11. Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. Biokimia Harper. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2009. Edisi 27.
  12. Victor. P. Eroschenko. Atlas Histologi diFiore: dengan Korelasi Fungsional, Ed. 11. Jakarta: EGC; 2008.
  13. McArdle W D, Katch F I, Katch V L. Exercise physiology: Nutrition, energy, and human performance. Edisi ke 7. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2010.
  14. Devaki, N, M and Yajurvedi, H. N. Chronic Stress-Induced Oxidative Damage and Hyperlipidemia are Accompanied by Atherosclerotic Development in Rats. *Informa Healthcare USA*, Inc. 2012; 16(2): 233–243.
  15. Clark, A., & Mach, N. Exercise-induced Stress Behavior, Gut Microbiota-brain Axis and Diet: A Systematic Review for Athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2016; 13 (43):1–21.
  16. Sherwood, L. *Fisiologi Manusia*. Jakarta: EGC; 2015.
  17. Catoire, M, et al. Fatty Acid-Inducible ANGPTL4 Governs Lipid Metabolic Response to Exercise. *PNAS Direct Submission*. 2014; E1043–E1052
  18. Sinaga, FA. Stres oksidatif dan status antioksidan pada aktivitas fisik maksimal. 2016;9(2):176-182.
  19. Wahyuni dan Nita Pratiwi. Hubungan Antara Kadar Kolesterol Baik dengan Penurunan Fungsi Kognitif pada Wanita Setelah Menopause. *Jurnal Kesehatan*. 2011;4(1):58–67.
  20. Rosario. LDH-L For the determination of lactate dehydrogenase in serum, plasma and cerebrospinal fluid. Argentina. 2000.
  21. Coelho *et al.* Effect of High Fat Diets on Body Composition, Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity, and the Role of Exercise on These Parameters. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(10): 966-972.
  22. David. Hantaran Sinyal Leptin dan Obesitas: Hubungannya dengan Penyakit Kardiovaskuler; 2013. Vol 1(2).
  23. Amelia, I.N. & Syauqy, A. Hubungan Antara Asupan Energi dan Aktivitas Fisik dengan Persen Lemak Tubuh pada Wanita Peserta Senam Aerobik. *Lecturer of Nutrition Science Medical Faculty in Diponegoro University Semarang*. 2013; hal: 1–14.
  24. Herianyah, T. Pengaruh Berbagai Durasi Pemberian Diet Tinggi Lemak Terhadap Kadar Profil Lipid Tikus Putih (*Rattus Novergicus Strain Wistar*) Jantan. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 2013;13(3):114-150.
  25. Anandhi *et al.* Evaluation of the Anti-atherogenic Potential of Chrysin in Wistar Rats. *Mol Cel Biochem*. 2014; 385:103-113.
  26. Agbecha, A., Usoro, A.J., and Gberindyer, J.S. Relationship of Serum Alkaline Phosphatase with Atherogenic Indices in Apparently Healthy Men, Makurdi, Nigeria. *Int J Clin Exp Physiol*. 2018.
  27. Nie *et al.* The Effect of Depression on Fracture Healing and Osteoblast Differentiation in Rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2018; 14:1705-1713.
  28. Kathleen, D.P., & Timothy, D.P. *MOSBY'S Diagnostic and Laboratory Test Reference*. China: Elsevier. 2009.
  29. Maitra A, Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 2037–2042.
  30. Rolls OG, Farmer JN, Hall BJ. Artifacts in Histological and Cytological Preparation. *Scientia Leica Microsystems Education Series*. 2008; 27-30.
  31. Cigolle, C.T., Langa, K.M., Kabeto, M.U., Tian, Z., Blaum, C.S. *Geriatric Conditions and Disability: The Health and Retirement Study*. American College of Physicians. 2007. 147(3):156-164.
- Setiyohadi B. Miologi. In: Sudoyo AW, Setiyohadi, Bambang, Alwi, idrus, Simadibrata K., Marcellus, Setiati, Siti, editor. Buku Ajar