

Pengaruh Frekuensi Stres Fisik (Berenang) Pada Kadar *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4) Serum Tikus Wistar Betina

Nur Asmi Rachmawati*, Andri Tilaqza*, Aris Widodo*

**Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang*

Email: nurasmirachmawati@gmail.com

ABSTRACT

Background: Physical stress increases levels of free fatty acids, which stimulates the synthesis of ANGPTL4. In addition, ANGPTL4 levels are associated with increased age. So, this study aims to determine the effect of physical stress frequency and age on ANGPTL4 serum level in female wistar rat.

Methods: The study was conducted by experimentally control group post-test only. The group of rats was divided into Pre-treatment Group (KPP), Negative Control Group (KN), Physical stress groups every Monday Thursday (KSK), Physical stress groups every Two Days (KDH) and Physical stress groups Every Days (KSH). The 11 week old rats was given a physical stress treatment of swimming with a duration of 5 minutes for 4 weeks. Then the rats were killed and blood samples were taken for ANGPTL4 serum levels using Rat ELISA kit.

Results: Result of statistical test of the effect of age on rats (KPP and KN) did not significant effect on serum ANGPTL4 levels ($p > 0.05$). The statistical test results of the effect of physical stress in the Negative Control group (KN) compared to treatment group (KSK, KDH and KSH) did not show a significant difference ($p > 0.05$). The highest average ANGPTL4 level was found in KSK and was low in KDH and KSH significantly ($p < 0.05$).

Conclusion: Age had no effect on serum ANGPTL4 levels, physical stress frequencies that often reduce serum ANGPTL4 levels and the frequency of physical stress which slightly increases serum ANGPTL4 levels.

Keywords: *ANGPTL4, physical stress, fed standard*

PENDAHULUAN

Aktivitas fisik yang dilakukan secara teratur, terencana dan bertujuan untuk kebugaran fisik disebut latihan fisik¹. Latihan fisik yang berlebihan (intensitas, frekuensi dan durasi) dapat menyebabkan stres fisik pada tubuh². Menurut Michaelides (2011) latihan fisik selama 60 menit dapat meningkatkan kekakuan pembuluh darah dan stres oksidatif secara signifikan dibandingkan selama 30 menit³. Latihan fisik berlebihan selama 5 kali dalam 12 minggu menyebabkan atrofi otot pada tikus⁴, sedangkan latihan fisik yang dilakukan 7 jam atau lebih dalam seminggu meningkatkan gejala infeksi saluran pernafasan atas (ISPA) serta peningkatan interleukin⁵. Oleh sebab itu, latihan fisik yang tepat harus dilakukan sesuai dengan intensitas, frekuensi dan durasinya⁶.

Latihan fisik meningkatkan kadar asam lemak bebas (*free fatty acids/FFA*) sehingga merangsang sintesis protein *angiopoietin like-protein 4* (ANGPTL4)⁷. ANGPTL4 merupakan glikosilat protein yang banyak ditemukan di hati dan jaringan adiposa. ANGPTL4 berperan dalam metabolisme lipid yaitu menghambat enzim *lipoprotein lipase* (LPL) kemudian menekan *clearance* lipoprotein yang berikatan dengan trigliserida (TG) sehingga meningkatkan kadar TG plasma. Selain itu, ANGPTL4 merangsang lipolisis pada jaringan adiposa kemudian meningkatkan kadar asam lemak bebas⁸.

Selain latihan fisik, kadar ANGPTL4 dipengaruhi oleh faktor usia. Pada tikus usia muda kadar ANGPTL4 lebih rendah apabila dibandingkan pada tikus dewasa⁹. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh usia pada kadar ANGPTL4 serum. Berbagai penelitian sebelumnya yang meneliti pengaruh latihan fisik pada kadar ANGPTL4 hanya dilakukan pada manusia saja dengan berbagai metode stres fisik yang berbeda-beda^{7,8,10,11}. Sehingga penelitian ini belum pernah dilakukan sebelumnya yang bertujuan untuk mengetahui frekuensi stres fisik yang tepat pada kadar ANGPTL4 serum pada tikus wistar betina.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorium dengan desain *control group post test only* secara *in vivo*. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) betina yang diberikan perlakuan stres fisik berupa berenang selama 4 minggu. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari-Mei 2018. Tempat Pemeliharaan hewan coba dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, perlakuan hewan coba dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pembedahan hewan coba dilakukan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan untuk pemeriksaan kadar ANGPTL4 serum dilakukan di Laboratorium Fisiologi

Universitas Brawijaya. Penelitian ini telah dilakukan uji kelayakan etik di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan nomor 851-KEP-UB.

Objek Penelitian

Hewan coba yang digunakan berupa tikus wistar betina (*Rattus norvegicus*) yang berusia 5 minggu. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok (n=6) dengan jumlah 30 ekor yaitu Kelompok Pra Perlakuan (KPP), Kontrol Negatif (KN), Kelompok Senin dan Kamis (KSK), Kelompok Dua Hari Sekali (KDH) dan Kelompok Setiap Hari (KSH).

Perlakuan Stres Fisik

Tikus diberikan perlakuan stres fisik berupa berenang saat berusia 11 sampai 15 minggu¹². Perlakuan berenang selama 5 menit¹³ di dalam akuarium (80 x 56 x 48 cm³)¹⁴ dengan suhu air 28-32°C¹⁵. Setelah diberikan perlakuan berenang, tikus dikeringkan dan diletakkan kembali ke dalam kandang. Frekuensi stres fisik berdasarkan kelompok perlakuan yaitu setiap hari (KSH), setiap dua hari sekali (KDH) dan setiap hari Senin dan Kamis (KSK)¹⁶.

Pengambilan dan Pembuatan Serum Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada saat tikus dalam kondisi tidak sadar menggunakan kloroform 500 cc. Kemudian darah diambil di jantung sebanyak 5 cc. Sampel darah diletakkan pada vakutainer tanpa anti koagulan (EDTA) dan didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruangan. Setelah itu, sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit kemudian diambil cairan supernatan serum (500µL) dan dimasukkan ke dalam *ependorf*.

Pemeriksaan Kadar ANGPTL4 Serum

Pemeriksaan kadar ANGPTL4 serum menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Larutan standar dan sampel ditetaskan pada sumuran kemudian ditambahkan antibodi larutan ELISA. *Plate* diinkubasi selama 60 menit dengan suhu 37°C kemudian dicuci dengan *wash buffer* sebanyak 5 kali. Setelah itu, sumuran ditetaskan substrat A dan B kemudian diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 37°C. Sumuran ditambahkan *stop solution* dan terjadi perubahan warna. Setelah itu, *optical density* (OD) dinilai menggunakan spektrofotometer pada 450nm selama 30 menit. Nilai rata-rata OD sumuran standar dibuat kurva standar selanjutnya dilakukan perhitungan analisis regresi untuk memperoleh konsentrasi kadar ANGPTL4 (ng/ml)¹⁷.

Teknik Analisa Data

Analisa data dilakukan menggunakan perangkat *software* statistik SPSS versi 23. Semua data dinilai dengan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* (p>0.05) dan homogenitas diuji dengan *Levene's Test* (p>0.05). Setelah itu data dianalisa

dengan *Independent Sample T-Test* dan *One-Way ANOVA*. Apabila tidak normal dan homogen dilanjutkan menggunakan *Kruskal Wallis*.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus wistar betina dengan berat awal 100-150 gram.

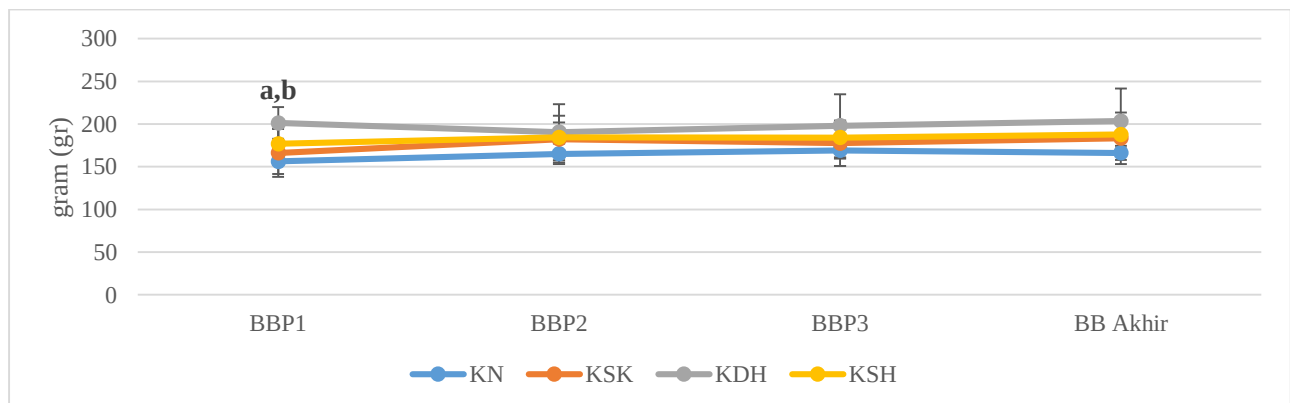
Berat Badan (BB) awal didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok KDH dengan KN dan KSH dan kelompok KSK dengan KN dan KSH. Uji statistik data BB akhir menggunakan

Kruskal Wallis karena tidak homogen. Tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada rerata BB akhir. Rata-rata total supan pakan tidak didapatkan adanya perbedaan signifikan ($p > 0.05$). Data karakteristik sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Sampel Kelompok Perlakuan

	KN (n=6)	KSK (n=6)	KDH (n=6)	KSH (n=6)
Usia Awal (minggu)	5	5	5	5
Usia Akhir (minggu)	15	15	15	15
Perlakuan	Diet Standar	Diet Standar & perlakuan stres fisik setiap hari Senin & Kamis	Diet Standar & perlakuan stres fisik setiap dua hari sekali	Diet Standar & perlakuan stres fisik setiap hari
Frekuensi Stres Fisik	-	Hari Senin dan Kamis	Setiap 2 hari sekali	Setiap hari
BB awal (gr)	151.67 ± 16.96	185.67 ± 16.51 ^{a,b}	182.83 ± 23.80 ^{a,b}	154.83 ± 25.34
BB Akhir (gr)	166.17 ± 8.18	187.67 ± 16.14	203.50 ± 38.32	183.33 ± 30.14
ΔBB	14.5 ± 12.91	2 ± 26.86	20.67 ± 45.94	28.5 ± 30.83
Rata-rata Total Asupan (gr)	25.29 ± 3.07	28.55 ± 3.70	30.80 ± 6.53	29.65 ± 4.91

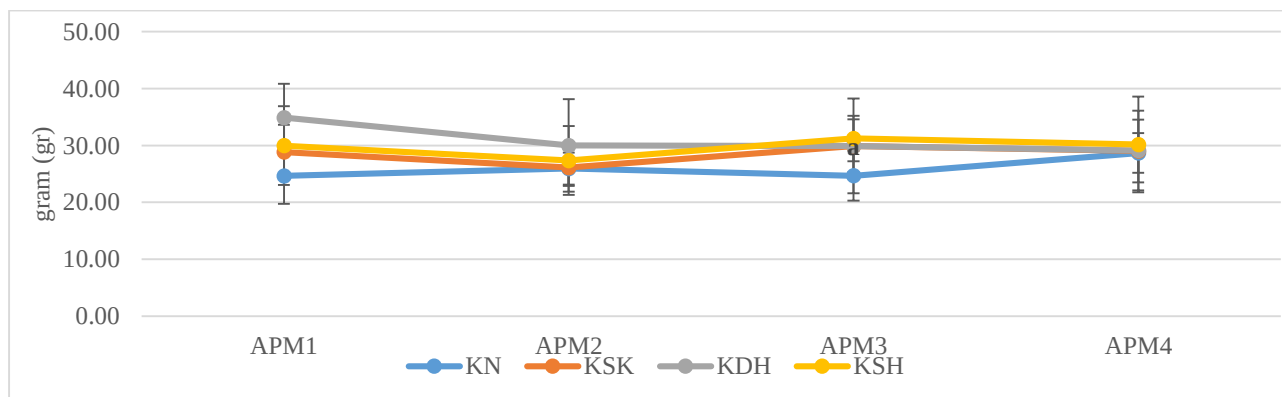
Keterangan: Data dalam rata-rata ± Standar Deviasi (SD). KN: Kontrol Negatif, KSH: Kelompok Setiap Hari, KDH: Kelompok Dua hari Sekali, KSK: Kelompok hari Senin dan Kamis, BB: Berat Badan, Δ BB: Selisih Berat Badan Akhir dengan BB awal. (a): $p < 0.05$ dengan KN. (b): $p < 0.05$ dengan KSH.



Gambar 1 Berat Badan Kelompok Stres Fisik

Keterangan: Data dalam rata-rata ± Standar Deviasi (SD). KN: Kontrol Negatif, KSH: Kelompok Setiap Hari, KDH: Kelompok Dua hari Sekali, KSK: Kelompok hari Senin dan Kamis, BB: Berat Badan, BBP 1, 2, 3: Berat Badan Perlakuan Minggu 1, 2, dan 3. (a): $p < 0.05$ dengan KN. (b): $p < 0.05$ dengan KSH.

Pada BB minggu 1 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok KDH dengan KN dan KSH. BB minggu 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$). Rerata BB kelompok perlakuan (KSK, KDH dan KSH) mengalami peningkatan apabila dibandingkan kelompok KN. Data dapat dilihat pada Gambar 1.



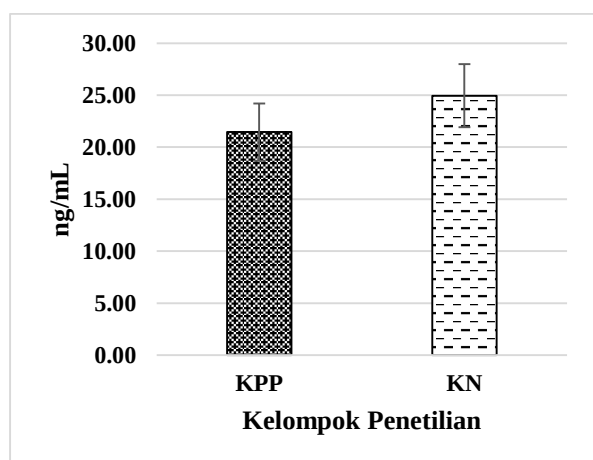
Gambar 2 Asupan Pakan Kelompok Stres Fisik

Keterangan: Data dalam rata-rata $\pm$ Standar Deviasi (SD). KN: Kontrol Negatif, KSH: Kelompok Setiap Hari, KDH: Kelompok Dua hari Sekali, KSK: Kelompok hari Senin dan Kamis, APM 1, 2, 3, dan 4: Asupan Pakan Minggu 1, 2, 3 dan 4. (a): $p < 0.05$ dengan KN.

Hasil uji statistik Asupan Pakan (AP) minggu 1 didapatkan perbedaan signifikan ($p < 0.05$) antara KN dengan KDH. Tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada asupan pakan minggu 2, 3 dan 4. Rerata asupan pakan kelompok perlakuan (KSK, KDH dan KSH) lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok KN. Data dapat dilihat pada Gambar 2.

Perbandingan Kadar ANGPTL4 Serum pada Kelompok Usia

Rata-rata kadar ANGPTL4 serum pada Kelompok Pra Perlakuan (KPP) dan Kontrol Negatif (KN) dapat dilihat pada Gambar 3 di bawah ini:



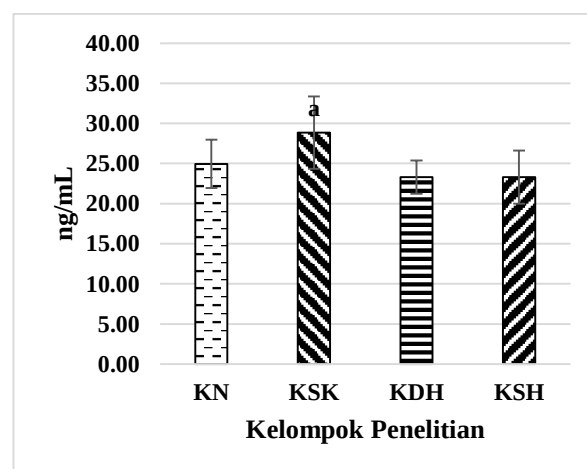
Gambar 3 Rata-rata Kadar ANGPTL4 Serum

Keterangan: Gambar 3 merupakan rata-rata kadar ANGPTL4 serum pada Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Pra Perlakuan. KN: Kontrol Negatif sebesar 24.95 ± 3.02 , KPP: Kelompok Pra Perlakuan sebesar 21.45 ± 2.75 .

Uji statistik *Independent sample t-test* kadar ANGPTL4 serum menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan ($p > 0.05$) antara KPP dan KN. Rata-rata kadar ANGPTL4 pada KN lebih tinggi daripada KPP.

Perbandingan Kadar ANGPTL4 Serum pada Kelompok Stres Fisik

Rata-rata kadar ANGPTL4 serum pada Kelompok Stres Fisik dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini:



Gambar 4 Rata-rata Kadar ANGPTL4 Serum

Keterangan: Gambar 4 menunjukkan rata-rata kadar ANGPTL4 serum pada Kelompok Perlakuan. KN: Kontrol Negatif (24.95 ± 3.02), KSH: Kelompok Setiap Hari (23.32 ± 3.31), KDH: Kelompok Dua hari Sekali (23.30 ± 2.06), KSK: Kelompok hari Senin dan Kamis (28.85 ± 4.5). a: berbeda signifikan ($p < 0.05$) dengan KDH dan KSH.

Uji *One Way ANOVA* dengan *Post Hoc* LSD pada KN dan kelompok perlakuan (KSK, KDH dan KSH) tidak didapatkan perbedaan signifikan ($p > 0.05$). Uji *Post Hoc* LSD menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok KSK dengan KSH dan KDH. Rata-rata kadar ANGPTL4 serum dari urutan tinggi ke rendah yaitu $KSK > KN > KSH > KDH$.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar jenis *Rattus norvegicus* karena mudah didapatkan, mudah untuk dipelihara dan memiliki gambaran fisiologis yang mirip dengan manusia¹⁸. Pemilihan jenis kelamin hewan coba yaitu betina. Hal ini dikarenakan hormon estrogen berperan dalam lipolisis di jaringan adiposa¹⁹. Pada perempuan kadar ANGPTL4 serum lebih rendah dibandingkan laki-laki²⁰. Namun kadar ANGPTL4 pada perempuan dengan *Polycystic Ovary Syndrome* (PCOS) meningkat dibandingkan normal²¹ serta pada perempuan hamil meningkat seiring dengan bertambahnya usia kehamilan²².

Usia hewan coba yang digunakan yaitu usia 5 minggu ketika tikus memasuki masa remaja²³. Setelah itu, tikus diberikan diet standar berupa 20 gram Comfeed-Pars, 10 gram tepung terigu dan air²⁴. Pemberian diet standar bertujuan agar pertumbuhan tikus menjadi normal serta sebagai gambaran pada manusia apabila mengkonsumsi diet yang normal.

Perlakuan stres fisik dimulai pada usia 11-15 minggu sesuai dengan penelitian Sakr (2013)¹². Perlakuan stres fisik pada penelitian ini yaitu berenang (*Forced Swim Test*) yang dilakukan selama 4 minggu. Masa hidup tikus sebanyak 2 minggu sama dengan 1 tahun manusia sehingga apabila berenang selama 4 minggu setara dengan 2 tahun manusia²⁵. Perlakuan berenang dipilih karena tikus yang ditempatkan pada air akan memaksa tikus untuk bertahan di permukaan air, sehingga dengan perlakuan ini dapat menyebabkan stres fisik²⁶. Suhu air yang dipilih yaitu 28-32°C karena memberikan respon stres pada tikus dengan peningkatan kadar kortikosteron serum secara signifikan serta suhu tersebut dapat mengurangi hipotermia²⁷. Berenang dilakukan selama 5 menit sesuai dengan penelitian yang dilakukan Arndt *et al* (2010)¹³. Menurut Gong *et al* (2015) menyebutkan bahwa stres fisik berupa berenang dapat meningkatkan kadar kortisol pada menit ketiga⁷. Sebelumnya telah dilakukan penelitian pendahuluan selama 10 menit menyebabkan tikus tidak bergerak sehingga untuk menghindari kematian pada waktu 5 menit merupakan waktu yang pas untuk perlakuan stres fisik. Berenang selama 5 menit termasuk *low performance* pada tikus²⁸, sehingga pada manusia setara dengan *low intensity* selama 1 jam²⁹.

Frekuensi stres fisik dilakukan berbeda-beda pada setiap kelompok perlakuan sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Umemura *et al* (2008)¹⁶. Pada kelompok KSH, perlakuan stres fisik dilakukan setiap hari. Pada kelompok KDH, perlakuan stres fisik dilakukan setiap dua hari sekali dan pada kelompok KSK perlakuan stres fisik dilakukan setiap hari Senin dan Kamis. Hal ini bertujuan untuk melihat frekuensi stres fisik yang paling baik sehingga dapat diaplikasikan.

Berat badan tikus ditimbang setiap minggu dan diperoleh hasil yang bervariasi. Hasil Analisa statistik yang dilakukan pada Berat Badan (BB) tikus perlakuan menunjukkan hasil yang signifikan pada BB minggu awal (sebelum perlakuan). Pada minggu pertama perlakuan didapatkan perbedaan signifikan antara KDH dengan KN dan KSH. Namun BB pada kelompok perlakuan lainnya tidak berbeda secara signifikan pada minggu selanjutnya. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan Umemura *et al* (2008) yaitu berat badan pada tikus yang dilakukan frekuensi stres fisik tidak diperoleh perbedaan signifikan¹⁶. Pada penelitian yang dilakukan Sakr (2013) berupa perlakuan berenang pada tikus dengan diet standar tidak terdapat perbedaan signifikan pada BB jika dibandingkan dengan kelompok kontrol¹². BB akhir perlakuan (berenang) tertinggi terdapat pada KDH dan terendah pada KSH (Gambar 1). Namun pada Δ BB KSH merupakan yang tertinggi sedangkan KSK memiliki Δ BB yang terendah (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa frekuensi stres fisik yang sering (KSH dan KDH) dapat meningkatkan BB daripada frekuensi yang sedikit (KSK). Hal ini sesuai dengan Rocha *et al* (2016) menemukan bahwa stres fisik berenang pada tikus selama 8 minggu mampu meningkatkan BB dengan diet standar³⁰. Hal ini diduga karena saat stres fisik berenang selama 12 minggu terjadi peningkatan massa otot secara signifikan³¹.

Asupan pakan (AP) pada kelompok perlakuan dihitung setiap hari. Uji statistik menunjukkan pada AP minggu 1 didapatkan perbedaan signifikan antara KDH dengan KN. Namun, AP pada minggu berikutnya tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Sakr (2013) yaitu asupan pakan pada kelompok perlakuan berenang tidak adanya perbedaan signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol diet standar¹². Rata-rata total AP (Tabel 1) pada kelompok perlakuan (KSK, KDH dan KSH) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (KN). Hal ini menunjukkan aktivitas fisik berupa berenang dapat meningkatkan asupan pakan pada tikus. Hal ini sesuai dengan King *et al* (2011) bahwa setelah berenang dapat meningkatkan nafsu makan dan asupan makan³². Hal ini dikarenakan peningkatan AP saat berenang diduga sebagai kompensasi dari peningkatan pengeluaran energi³³.

Pengaruh Usia pada Kadar ANGPTL4 Serum Tikus Wistar Betina

Hasil analisa statistik kadar ANGPTL4 serum kelompok Kelompok Pra Perlakuan (KPP) dan Kontrol Negatif (KN) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini diduga karena perbedaan usia antara KPP dan KN tidak terlalu jauh yaitu hanya 4 minggu. Pada penelitian sebelumnya, tikus yang diberikan diet standar kadar mRNA ANGPTL4 didapatkan lebih tinggi di usia 26 minggu dibandingkan usia 5 minggu sehingga perbedaan usia yang didapatkan yaitu 21 minggu⁹.

Hasil rata-rata kadar ANGPTL4 serum pada KN lebih tinggi dibandingkan KPP. Hal ini diduga karena usia KN yang lebih tua dibandingkan KPP. Pada KN diberikan diet standar hingga berusia 15 minggu sedangkan pada KPP hanya sampai pada usia 11 minggu. Menurut Robciuc *et al* (2010) bahwa ANGPTL4 meningkat seiring bertambahnya usia. Hal ini dikarenakan peningkatan ANGPTL4 di jaringan adiposa sebagai kompensasi untuk menurunkan mobilisasi lemak di individu usia lebih tua²⁰. Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Kroupa *et al* (2012) pada tikus usia 26 minggu ekspresi ANGPTL4 mRNA lebih tinggi jika dibandingkan dengan tikus usia 5 minggu. Hal ini karena menurut Kroupa *et al* (2012) bahwa ketika ekspresi ANGPTL4 meningkat maka aktivitas LPL akan menurun dan sebaliknya ketika ekspresi ANGPTL4 menurun maka aktivitas LPL akan meningkat. Hal ini sejalan dengan meningkatnya aktivitas LPL pada tikus usia 5 minggu dan menurunnya aktivitas LPL pada tikus usia 26 minggu⁹.

Pengaruh Frekuensi Stres Fisik Terhadap Kadar ANGPTL4 Serum Tikus Wistar Betina

Hasil analisa statistik kadar ANGPTL4 serum pada kelompok KN dengan kelompok perlakuan (KSK, KDH dan KSH) tidak didapatkan perbedaan signifikan. Hal ini diduga adanya proses adaptasi saat stres fisik³⁴. Stres fisik menyebabkan kerusakan pada otot skeletal namun dengan stres fisik yang sering otot skeletal beradaptasi sehingga kerusakan otot skeletal berkurang³⁵. Pada partisipan *untrained* dilaporkan bahwa lebih buruk kerusakan *oxidative* dan status antioksidan yang lebih lemah dibandingkan partisipan *trained*³⁶. Pada ANGPTL4 diduga karena stres fisik yang sering menyebabkan tubuh lebih terkonidisi sehingga kerusakan yang dihasilkan sedikit menghasilkan ANGPTL4 yang rendah.

Namun pada kelompok KSK terdapat perbedaan signifikan dengan KSH dan KDH. Kadar ANGPTL4 serum tertinggi terdapat pada KSK yaitu stres fisik yang dilakukan selama 2x dalam seminggu selama 4 minggu. Hal ini diduga karena stres fisik dengan frekuensi sedikit menyebabkan peningkatan kadar ANGPTL4 serum. Hal ini sesuai dengan penelitian pada Kersten *et al* (2009) berupa stres fisik dengan 50% VO₂ max selama 2 jam dan Ingerslev *et al* (2017) berupa stres fisik *knee-extensor* dengan 50% VO₂ max selama 2 jam dapat meningkatkan kadar ANGPTL4 plasma^{8,10}. Namun pada KSH dan KDH, kadar ANGPTL4 serum lebih rendah jika dibandingkan dengan Kelompok Kontrol Negatif (KN). Hal ini diduga karena stres fisik dengan frekuensi yang sering dapat menekan kadar ANGPTL4 serum. Menurut Catoire *et al* (2014) bahwa ANGPTL4 distimulasi oleh stres fisik akut sedangkan pada stres fisik kronik selama 2 minggu dan 12 minggu tidak mampu meningkatkan kadar ANGPTL4 plasma⁷. Hal ini dikarenakan pada saat stres fisik yang sering terjadi peningkatan AMP-activated protein kinase (AMPK)³⁷. Penelitian yang

dilakukan Yang *et al* (2016) berupa stres fisik berenang dengan frekuensi 5x dalam seminggu mampu meningkatkan ekspresi AMPK³⁸. AMPK berperan sebagai penghambat protein ANGPTL4 di otot skeletal dan jaringan coklat adiposa^{7,39}. Sehingga ketika stres fisik berlangsung terjadi peningkatan kebutuhan sel akan ATP, oksigen, glukosa dan asam lemak⁷. Oleh karena itu untuk memenuhi kebutuhan energi, lipolisis terjadi di jaringan adiposa sehingga memecah trigliserida menjadi asam lemak bebas dan monogliserol⁴⁰. Asam lemak diproses melalui oksidasi beta kemudian membentuk asetil koenzim A (asetil KoA) masuk ke dalam siklus asam sitrat sehingga diproses menjadi ATP yang dapat digunakan oleh otot skeletal saat stres fisik berlangsung⁴¹. Peningkatan AMPK berfungsi untuk menghambat ANGPTL4 sehingga *lipoprotein lipase* (LPL) dapat berfungsi untuk menghidrolisis trigliserida (TG) sehingga trigliserida dapat digunakan sebagai sumber energi pada otot skeletal ketika terjadi stres fisik⁷. Hal inilah yang menyebabkan kadar ANGPTL4 serum pada frekuensi stres fisik yang sering (KDH dan KSH) lebih rendah dibandingkan frekuensi stres fisik yang sedikit (KSK).

Ketika stres fisik akut terjadi peningkatan pemecahan lipid menjadi *free fatty acids*/FFA. Peningkatan FFA dapat merangsang ekspresi mRNA ANGPTL4 di otot skeletal¹¹. ANGPTL4 berfungsi untuk menghambat aktivitas LPL yaitu dengan cara bagian n-terminal ANGPTL4 berikatan dengan LPL kemudian mengubah bentuk dimer LPL aktif menjadi bentuk monomer LPL inaktif. Sehingga LPL tidak dapat menghidrolisis trigliserida menuju ke jaringan⁴². Ketika LPL dihambat maka tidak dapat menghidrolisis TG sehingga akan mengurangi *clearance* TG di plasma yang akan meningkatkan kadar TG plasma⁴³. Hal ini diduga untuk mencegah terjadinya *lipotoxicity* karena ANGPTL4 dilaporkan dapat mencegah terjadinya *lipotoxicity* di otot skeletal dan jantung^{44,45}. Teori ini sesuai dengan hasil kadar trigliserida pada kelompok perlakuan didapatkan perbedaan yang signifikan (*Unpublished data*). Kadar TG tertinggi didapatkan pada kelompok KSK hal ini sejalan dengan kadar ANGPTL4 yang tertinggi pada KSK. Menurut Mandard *et al* mencit yang *overexpressing* ANGPTL4 pada otot dan jaringan adiposa didapatkan kadar TG plasma yang meningkat⁴⁶. Sebaliknya pada mencit *knock-out* ANGPTL4 memiliki kadar TG yang rendah di darah⁴³. Hal ini sesuai dengan hasil kadar ANGPTL4 serum yang rendah sesuai dengan kadar TG yang rendah pada KSH (*Unpublished data*).

SIMPULAN

1. Usia tidak mempengaruhi kadar ANGPTL4 serum.
2. Frekuensi stres fisik yang sedikit (KSK) mampu meningkatkan kadar ANGPTL4 serum.
3. Frekuensi stres fisik yang sering (KDH, KSH) menurunkan kadar ANGPTL4 serum.

SARAN

1. Melakukan penelitian pengaruh usia pada kadar ANGPTL4 dengan perbedaan jarak usia 3 bulan (12 minggu).
2. Melakukan penelitian lanjutan stres fisik disertai pembatasan makanan pada kadar ANGPTL4 serum karena pembatasan makan dapat meningkatkan kadar ANGPTL4.
3. Melakukan penelitian lanjutan dengan frekuensi yang sama namun durasi stres fisik yang ditingkatkan secara gradual dan menggunakan beban sehingga dapat membuat tikus lebih mengalami stres fisik.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Caspersen, C. J., Powell, K. E dan Christenson, G. M. 1985. Physical Activity, Exercise and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-related Research, *Public Health Rep* **100** (2): 126-131.
- 2) Hackney, A. 2006. Stress and the neuroendocrine system: the role of exercise as a stressor and modifier of stress, *Expert Rev Endocrinol Metab* **1** (6): 783-792 doi:10.1586/17446651.1.6.783.
- 3) Michelides, A.P., Soulis, D., Antoniadis, C *et al.* 2011. Exercise duration as a determinant of vascular function and antioxidant balance in patients with coronary artery disease, *Heart*. **97** (10): 832-837.
- 4) Souza, R W A., Agular, A F., Vechetti-Junior, I J *et al.* 2014. Resistance training with excessive training load and insufficient recovery alters skeletal muscle mass-related protein expression, *Journal of Strength and Conditioning Research* **28** (8): 2338-2345.
- 5) Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira *et al.* 2011. Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production, *Scam J Med Sci Sports* **23** (4): 451-457 doi:10.1111/j.1600-0838.2011.01422.x.
- 6) Sufahani, S., Ahmad, S., Samsi, N *et al.* 2016. Frequency of Exercise Impacts on Body Weight of Obese Women, *Journal of Science and Technology* **8** (1): 6-8.
- 7) Catoire, M., Alex, S., Paraskevopoulos, N *et al.* 2014. Fatty acid-inducible ANGPTL4 govern lipid metabolic response to exercise, *Proc Natl Acad Sci USA* **111** (11): 1043-1052.
- 8) Kersten, S., Lichtenstein, L., Steenbergen, E., *et al.* 2009. Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in human via elevated free fatty acids, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **29** (6): 969-974.
- 9) Kroupa, O., Vorrso, E., Stienstra, R *et al.* 2012. Linking nutritional regulation of ANGPTL4, FPIHBP1, and LMF1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue, *BMC Physiology* **12** (13): 1-15.
- 10) Ingersiev, B., Hansen, J.S., Hoffmann, C *et al.* 2017. Angiopoietin-like protein 4 is an exercise induced hepatokine in humans, regulated by glucagon and cAMP, *Molecular Metabolism* **6** (10):1286-1295.
- 11) Norheim, F., Hjorth, M., Langley, T.M *et al.* 2014. Regulation of angiopoietin-like protein 4 production during and after exercise, *Physiological Reports* **2** (8): 1-12.
- 12) Sakr, H.F. 2013. Modulation of Metabolic and Cardiac Dysfunctions by Swimming in Overweight Rats on a High Cholesterol and Fructose Diet: Possible Role of Adiponectin, *Journal of Physiology and Pharmacology* **64** (2): 231-240.
- 13) Arndt, S.S., Lohavech, D., Van't Klooster, J., *et al.* 2010. Co-species housing in Mice and Rats: Effects on Physiological and Behavioral Stress Responsivity, *Hormones and Behavior* **57** (3): 342-351.
- 14) Ochiai, M dan Matsuo, T. 2009. Prolonged Swimming Exercise Does Not Affect Contents and Fatty Acids Composition of Rat Muscle Triacylglycerol, *Journal of Oleo Science* **58** (6): 313-321.
- 15) Aquino, A. E. Jr., Sene-Fiorese, M., Paolillo, F. R., *et al.* 2014. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Combined with Swimming Training Improved The Lipid Profile in Rats Fed With High-Fat Diet, *Lasers Med Sci* **28** (5): 1271-1280.
- 16) Umemura, Y., Nagasawa, S., Honda, A., *et al.* 2008. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats, *J Bone Miner Metab* (26): 456-460.
- 17) Bioassay Technology Laboratory. 2018. Rat Angiopoietin Like Protein 4 ELISA Kit; User Instruction. Shanghai, China. Cat. No E0887Ra.
- 18) Sihombing, M dan Raflihar. 2010. Status gizi dan fungsi hati mencit (galur cbs-swiss) dan tikus putih (galur wistar) di laboratorium hewan percobaan puslitbang biomedis dan farmasi, *media Litbang Kesehatan* **XX** (1): 33-40.
- 19) Deon, T and Braun, B. 2002. The roles of estrogen and progesterone in regulating carbohydrate and fat utilization at rest and during exercise.

- Journal of Womens Health & Gender-based Medicine* **11** (3): 225-237.
- 20) Robciuc, M.R., Tahvanainen, E., Jauhiainen, M., *et al.* 2010. Quantitation of Serum Angiopoietin-Like Proteins 3 and 4 in a Finnish Population Sample, *Journal of Lipid Research* **51** (4): 824-831.
 - 21) Gunes, M dan Bukan, N. 2015. Examination of Angiopoietin-like protein 4, neuropeptide Y, omentine-1 Levels of Obese and Non-Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome, *Gynecological Endocrinology* **31** (11): 903-906.
 - 22) Senovilla, H.O., Poppel, M.N.M., Desoye, G., *et al.* 2018. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is related to gestational weight gain in pregnant women with obesity, *Scientific Reports* **8** (12428): 1-8.
 - 23) Sengupta, P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's, *International Journal of Preventive Medicine* **4** (6): 624-630.
 - 24) Anggraeny, O., Dianovita, C., Putri, E. N *et al.* 2016. Korelasi Pemberian Diet Rendah Protein Terhadap Status Protein, Imunitas, Hemoglobin dan Nafsu Makan Tikus Wistar Jantan, *Indonesian Journal of Human Nutrition* **3** (2): 105-122.
 - 25) Quinn, R. 2005. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?, *Nutrition* **21** (6): 775-777.
 - 26) Jameel, M. K dan Joshi, A. R. 2015. Effect of Acute Stress on Serum Cortisol Level in Female Wistar Rats, *International J of Healthcare and Biomedical Research* **03** (04): 109-113.
 - 27) Drugan, R. C., Eren, S., Hazi, A., *et al.* 2005. Impact of Water Temperature and Stressor Controllability on Swim Stress-Induced Changes in Body Temperature, Serum Corticosterone and Immobility in Rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **82** (2): 397-403.
 - 28) Travassos, P. B., Godoy, G., de Souza, H. M., *et al.* 2018. Performance During a Strenuous Swimming Session is Associated with High Blood Lactate: Pyruvate Ratio and Hypoglycemia in Fasted Rats, *British Journal of Medical and Biological Research* **51** (5): 1-8.
 - 29) Connolly, L. J., Nordsborg, N. B., Nyberg, M., *et al.* 2016. Low-Volume High-Intensity Swim Training is Superior to High-Volume Low Intensity Training in Relation to Insulin Sensitivity and Glucose Control in Inactive Middle-aged Women, *Eur J Appl Physiol* **116** (10): 1889-1897.
 - 30) da Rocha, G. L., Crisp, A. H., de Oliveira, M. R. M., *et al.* 2016. Effect of High Intensity Interval and Continuous Swimming Training on Body Mass Adiposity Level and Serum Parameters in High-Fat Diet Fed Rats, *Scientific World Journal* 2016: 1-8.
 - 31) Huang, C. C., Wang, T., Tung, Y. T., *et al.* 2016. Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1 α Expression Levels in rats of Different Age, *International Journal of Medival Sciences* **13** (4): 260-270.
 - 32) King, J. A., Wasse, L. K dan Stensel, D. J. 2011. The Acute Effects of Swimming on Appetite, Food Intake, and Plasma Acylated Ghrelin, *Journal of Obesity* **2011**: 1-8.
 - 33) Holloszy, J. O. 1993. Exercise Increases Average Longevity of Female Rats Despite Increased Food Intake and No Growth Tetardation, *Journal of Gerontology* **48** (3): B97-B100.
 - 34) Hackney, A. C dan Walz, E. A. 2013. Hormonal adaptation and the stress of exercise training: the role of glucocorticoid, *Trends Sport Sci* **20** (4): 165-171.
 - 35) Ebbeling, C. B dan Clarkson, P. M. 1989. Exercise-Induced Muscle Damage and Adaptation, *Sport Medicine* **7** (4): 207-234.
 - 36) Spanidis, Y., Stagos, D., Papanikolaou, C., *et al.* 2018. Resistance-Trained Individuals Are Less Susceptible to Oxidative Damage after Eccentric Exercise, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**: 1-11.
 - 37) Frosig, C., Jorgensen S. B., Hardie, D. G., *et al.* 2007. Exercise Improves Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphate Responsiveness of Atypical Protein Kinase C and Interacts with Insulin Signalling to Peptide Elongation in Human Skeletal Muscle, *J Physiol* **582** (Pt 3): 1289-1301.
 - 38) Yang, X. Q., Yuan, H., Li, J., *et al.* 2016. Swimming Intervention Mitigates HFD-induced Obesity of Rats Through PGC-1 α -irisin pathway, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **20** (10): 2123-2130.
 - 39) Dijk, W., Heine, M., Vergens, L *et al.* 2015. ANGPTL4 Mediates Shuttling of Lipid Fuel to Brown Adipose Tissue During Sustained Cold Exposure, *Elife* **17** (4): e08428.
 - 40) Coyle, E. F. 1995. Fat Metabolism During Exercise, *Gatorade Sports Science Institute* **6** (1995): 1-6.
 - 41) Guyton, A.C & Hall, J.E. 2014. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, Widjajakusumah, D & Tanzil, A. (editor), 2014. Twelve Edition Elsevier Saunders. Ilyas, E.I.I (penterjemah). 2014. Guyton dan Hall Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi Kedua Belas. Elsevier Saunders. Indonesia.
 - 42) Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., *et al.* 2006. Angiopoietin-like Protein 4 Converts Lipoprotein Lipase to Inactive Monomers and Modulates Lipase Activity in Adipose Tissue, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (46): 17450-17455.

- 43) Yoshida, K., Shimizugawa, T., Omo, M., *et al.* 2002. Angiopoietin-like protein 4 is a Potent Hyperlipidemia-Inducing Factor in Mice and Inhibitor of Lipoprotein Lipase, *Journal of Lipid Research* **43** (11): 1770-1772.
- 44) Klingler, C., Zhao, X., Adhikary, T., *et al.*, 2016. Lysophosphatidylcholines activate PPAR α and protect human skeletal muscle cells from lipotoxicity, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1861** (12 Pt A): 1980-1992.
- 45) Puthanveetil, P., Wan, A., dan Rodrigues, B., 2015. Lipoprotein lipase and angiopoietin-like 4-cardiomyocyte secretory proteins that regulate metabolism during diabetic heart disease, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **52** (3):138e149.
- 46) Mandard, S., Zandbergen, F., Straten, E.V *et al.* 2006. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physycally associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity, *Journal of Biological Chemistry* **281** (2): 934-944.