

Pelatihan Fisik Berlebih Meningkatkan Indeks Apoptosis pada Hepatosit Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan

¹Elionardo Pangkahila, ²Ni Made Linawati, ²I Wayan Sugiritama, ³Ferbian M. Siswanto*

¹Program Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar, Bali

²Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar, Bali

³Program Studi Bioteknologi Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Universitas Dhyana Pura Kabupaten Badung Bali

Email: ferbianms@undhirabali.ac.id

Abstract: Excessive physical training or overtraining can increase the production of free radicals such as peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals. These free radicals can cause apoptosis of various organ cells, including liver. This study was aimed to prove that overtraining led to hepatocyte apoptosis in male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). This was an experimental laboratory study. Samples were 16 healthy male Wistar rats, aged 2.5-3 months, weighing ± 200 grams, which were divided into 2 groups ($n= 8$ rats), as follows: control group (P0) and treatment group (P1). The control group was not given any treatment (sedentary lifestyle) meanwhile the treatment group was given overtraining (60 minutes of swimming, 7 times a week for 3 weeks). After 3 weeks of treatment, all rats were euthanized with ketamine to obtain the liver specimens. The apoptotic index was examined in histopathological slides with HE staining, 3 fields of views each, at 400 times magnification. The results showed that excessive physical training increased the apoptotic index in hepatocyte cells by $\sim 700\%$. The apoptosis index in the P0 group was $0.78 \pm 0.31\%$, whereas in the P1 group was $5.42 \pm 0.44\%$ ($p < 0.001$). In conclusion, overtraining leads to apoptosis in the hepatocytes of male Wistar rats.

Keywords: overtraining, apoptosis, hepatocytes

Abstrak: Pelatihan fisik berlebih dapat meningkatkan produksi radikal bebas seperti radikal peroksida, superoksida, dan hidroksil. Radikal bebas ini dapat berlanjut menyebabkan apoptosis berbagai sel-sel organ, termasuk hati. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pelatihan fisik berlebih dapat meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan. Pada penelitian ini digunakan 16 ekor tikus wistar jantan berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan ± 200 gram dan sehat, dibagi menjadi 2 kelompok ($n= 8$ ekor) yaitu kelompok kontrol (P) dan perlakuan (P1). Kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan sedangkan kelompok perlakuan diberi pelatihan berlebih. Setelah 21 hari perlakuan, tikus dieuthanasi dengan menggunakan ketamin untuk diambil organ hati. Indeks apoptosis diperiksa pada sediaan histopatologik dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) pada 3 lapang pandang pembesaran 400x. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pelatihan fisik berlebih meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit sebesar $\sim 700\%$. Indeks apoptosis pada kelompok P0 ialah $0,78 \pm 0,31\%$, sedangkan pada kelompok P1 ialah $5,42 \pm 0,44\%$ ($p < 0,001$). Simpulan penelitian ini ialah pelatihan fisik berlebih meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit tikus Wistar jantan.

Kata kunci: pelatihan fisik berlebih, apoptosis, hepatosit

Akumulasi kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh tingginya radikal bebas dalam tubuh merupakan salah satu etiologi dari berbagai penyakit khususnya penyakit degeneratif. Radikal bebas adalah suatu molekul reaktif dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar.¹ Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh maupun luar tubuh. Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh dapat terjadi akibat proses enzimatik (oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma, dan inti sel) maupun akibat proses nonenzimatik (pada reaksi inflamasi dan iskemia). Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh diakibatkan oleh adanya polutan seperti asap rokok, asap kendaraan bermotor, radiasi sinar UV, sinar X, sinar gamma, konsumsi makanan tinggi lemak, kafein, alkohol, pestisida atau zat beracun lainnya.² Selain itu radikal bebas juga dapat dipicu oleh adanya stres atau pelatihan fisik berlebihan.³⁻⁵

Pelatihan fisik berlebihan adalah volume latihan yang terlalu banyak, intensitas pelatihan yang terlalu tinggi, durasi pelatihan yang terlalu panjang, atau frekuensi pelatihan yang terlalu sering yang menghasilkan penurunan kinerja jangka panjang, atau bahkan ditandai oleh penurunan kinerja yang spesifik.⁶ Banyak penelitian menunjukkan bahwa pelatihan fisik berlebihan dapat mengakibatkan stres oksidatif. Hal ini karena aktivitas fisik berlebihan dapat meningkatkan konsumsi oksigen sampai 100-200 kali lipat. Umumnya 2-5% dari oksigen yang dipakai dalam proses metabolisme akan menjadi ion superoksid, sehingga saat aktivitas fisik berat terjadi peningkatan produksi radikal bebas yang akan memicu terjadinya stres oksidatif dan dapat merusak semua sel di dalam tubuh termasuk sel-sel hati atau hepatosit.^{1,7}

Hati merupakan organ yang paling penting dalam proses metabolisme. Hati terdiri dari kumpulan sel-sel yaitu hepatosit, sel stelata, sel Kupffer, dan sel unik lainnya. Hepatosit berperan dalam banyak proses penting di dalam tubuh seperti metabolisme obat, degradasi ammonia, sintesis albumin, metabolisme bilirubin, dan meta-

bolisme senyawa radikal. Patofisiologi organ hati sangat erat kaitannya dengan status antioksidan didukung fakta bahwa aktivitas antioksidan hati ialah yang terbesar dibandingkan organ lain dalam tubuh.⁸ Patofisiologi tersebut khususnya integritas hepatosit dapat sangat berkaitan dengan status redoks di dalam tubuh dan secara mudah diamati melalui perubahan struktur maupun fungsi hati.⁸⁻¹⁰

Pelatihan fisik berlebihan adalah volume latihan yang terlalu banyak, intensitas pelatihan yang terlalu tinggi, durasi pelatihan yang terlalu panjang, atau frekuensi pelatihan yang terlalu sering yang menghasilkan penurunan kinerja jangka panjang, atau bahkan ditandai oleh penurunan kinerja yang spesifik.⁶ Banyak penelitian menunjukkan bahwa pelatihan fisik berlebihan dapat mengakibatkan stres oksidatif. Hal ini karena aktivitas fisik berlebihan dapat meningkatkan konsumsi oksigen sampai 100-200 kali lipat. Umumnya 2-5% dari oksigen yang dipakai dalam proses metabolisme akan menjadi ion superoksid, sehingga saat aktivitas fisik berat terjadi peningkatan produksi radikal bebas yang akan memicu terjadinya stres oksidatif dan dapat merusak semua sel di dalam tubuh termasuk sel-sel hati atau hepatosit.^{1,7}

Telah dibuktikan bahwa pelatihan fisik berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel beta pankreas,¹ dan juga kerusakan sel-sel ginjal,³ melalui induksi ketidakseimbangan *growth hormone* (GH) dan induksi aktivitas protease sistemik yang dimediasi oleh radikal bebas.⁴ Pelatihan fisik berlebihan dapat meningkatkan stres oksidatif, dan penelitian sebelumnya juga menjelaskan mekanisme apoptosis yang terjadi pada kondisi *sustained* stres oksidatif akibat perlakuan parakuat.⁸ Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pelatihan fisik berlebihan dapat meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini ialah eksperimental, dengan menggunakan *randomized post test only control group design*.¹¹ Sampel yang

digunakan ialah tikus yang memenuhi kriteria inklusi (tikus Wistar jantan, umur 2,5-3 bulan, berat badan ± 200 gram, sehat yang ditandai dengan tikus aktif dan mau makan). Jumlah sampel dalam penelitian ini didasarkan pada rumus Zhong (2009) dan didapatkan 8 ekor/kelompok.¹²

Kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan atau *sedentary lifestyle* selama 21 hari (P0) dan kelompok perlakuan diberi pelatihan berlebih selama 21 hari (P1). Pelatihan fisik berlebih ialah tikus direnangkan selama 60 menit berdasarkan waktu maksimal kemampuan renang tikus dalam ember yang berisi air dengan diameter ± 30 cm dan kedalaman ± 40 cm, dikeringkan selama ± 15 menit. Perlakuan diberikan 7 kali seminggu selama 2 minggu dengan periode pemulihan selama 24 jam.³ Untuk menjaga agar tikus tetap bergerak selama waktu yang ditentukan maka dilakukan rangsangan pada ekor tikus dengan lidi setiap kali tikus berhenti berenang. Tanda kelelahan berupa tikus hampir tenggelam oleh karena menurunnya kekuatan otot, menurunnya waktu reaksi dan frekuensi gerakan, serta menurunnya reflek.

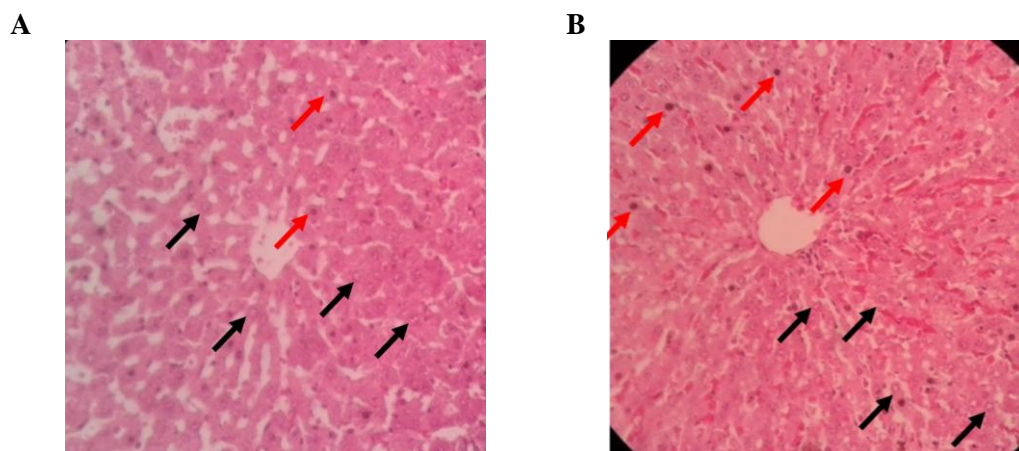
Setelah 21 hari perlakuan, tikus dieuthanasi dengan menggunakan ketamin untuk diambil organ hati, difiksasi dengan medium transpor bufer formalin 10% dan dilakukan pemeriksaan apoptosis. Pemeriksaan indeks apoptosis hepatosit dilakukan

dengan menggunakan pewarnaan rutin Hematoksin-Eosin (HE) sesuai prosedur baku.¹³ Indeks apoptosis merupakan rasio jumlah hepatosit yang mengalami apoptosis dibandingkan jumlah hepatosit normal pada hati masing-masing 3 lapang pandang dengan pembesaran mikroskop 400 kali kemudian hasil yang didapat dirataratakan.^{14,15}

Data penelitian ini diolah dengan menggunakan *SPSS Version 17.0 for Windows* pada tingkat kepercayaan 95%. Langkah-langkah analisis data yang dikerjakan ialah sebagai berikut: 1) analisis deskriptif, 2) uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk Test*, 3) uji homogenitas data dengan *Levene's Test*, dan 4) uji komparasi menggunakan *independent T test*.

HASIL PENELITIAN

Indeks apoptosis pada penelitian ini dinilai pada sediaan histopatologik hati yang diwarnai dengan pewarnaan HE. Pada pewarnaan HE, sel yang apoptosis tampak piknotik (inti sel menjadi lebih padat), sel mengerut, dan sitoplasma menjadi lebih eosinofilik. Indeks apoptosis adalah sel-sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan sel-sel normal pada hati masing-masing 3 lapang pandang, dengan mikroskop Olympus CX-41 (Japan), pembesaran 400 kali, dan difoto dengan menggunakan kamera Optilab pro (Gambar 1).



Gambar 1. Pemeriksaan apoptosis hepatosit dengan menggunakan pewarnaan rutin HE. A) Kelompok kontrol; dan B) Kelompok perlakuan (400x), panah hitam menunjukkan hepatosit normal, panah merah menunjukkan hepatosit yang mengalami apoptosis

Indeks apoptosis berdasarkan pewarnaan HE yang didapatkan dari 3 lapang pandang/sampel kemudian dianalisis dan disajikan secara deskriptif meliputi rerata, simpangan baku, median, nilai minimum dan nilai maksimum (Tabel 1).

Untuk menentukan analisis komparasi yang tepat, maka dilakukan uji normalitas

dan homogenitas data, yang merupakan prasyarat uji parametrik. Pada penelitian ini uji normalitas data dilakukan dengan *Shapiro-Wilk Test* dan uji homogenitas data dengan menggunakan *Levene's Test*. Hasilnya menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p>0,05$); dengan varian yang homogen ($p>0,05$) (Tabel 2).

Tabel 1. Analisis Deskriptif

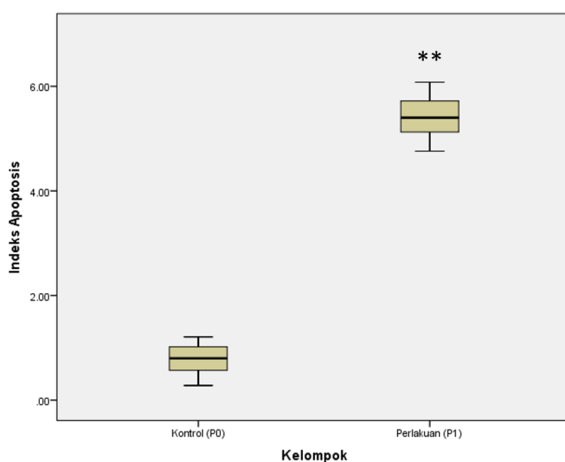
Kelompok	N	Rerata (%)	SB	Median	Min.	Maks.
Kontrol (P0)	8	0,78	0,31	0,80	0,28	1,21
Perlakuan (P1)	8	5,42	0,44	5,40	4,76	6,08

Ket: N= Jumlah sampel; SB= Simpangan Baku; Min.= Nilai Minimum; Maks.= Nilai Maksimum

Tabel 2. Normalitas dan Homogenitas Data

Uji	Kelompok	N	p	Keterangan
Normalitas	Kontrol (P0)	8	0,950	Normal
	Perlakuan (P1)	8	0,801	Normal
Homogenitas	Kontrol dan Perlakuan	16	0,516	Homogen

Karena data terdistribusi normal dengan varian yang homogen, maka syarat uji parametrik terpenuhi. Analisis komparasi dilakukan dengan *independent T test*. Hasilnya menunjukkan bahwa indeks apoptosis antar kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan (P1) berbeda secara bermakna ($p<0,05$) (Gambar 2).



Gambar 2. Boxplot perbandingan rerata indeks apoptosis antar kelompok

** $p<0,05$ dianalisis dengan *independent T test*

BAHASAN

Pada penelitian ini, dibuktikan bahwa pelatihan fisik berlebih dapat meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit sebesar $\sim 700\%$, yaitu dari $0,78\pm 0,31$ menjadi $5,42\pm 0,44\%$ ($p<0,001$). Hal ini sudah banyak dibuktikan oleh penelitian sebelumnya bahwa pelatihan fisik berlebih dapat menyebabkan berbagai patologi yang berkaitan dengan kerusakan jaringan akibat akumulasi sel-sel yang mengalami apoptosis.

Pada penelitian ini, pelatihan fisik berlebih dibuktikan dapat merusak sel-sel hati, sehingga fungsi hati akan terganggu. Hal ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa pelatihan fisik berlebih merusak fungsi hati ditandai dengan meningkatkan kadar serum dari parameter fisiologi hati yaitu enzim aspartate transaminase (AST) dan alanine aminotransferase (ALT).¹⁶

Pelatihan fisik berlebih merupakan salah satu penyebab patologi berbagai penyakit yang berkaitan dengan stres oksidatif. Hal ini disebabkan karena pelatihan fisik berlebih meningkatkan

konsumsi oksigen sampai 100-200 kali lipat. Peningkatan oksigen ini memicu peningkatan pelepasan radikal bebas, yang secara fisiologis memang terjadi pada membran dalam mitokondria yang terlibat dalam rantai transer elektron yang akan terlibat dalam proses oksidasi lemak membran sel otot. Proses tersebut disebut peroksidasi lipid.¹⁷

Sumber lain pembentuk ROS selama pelatihan, terutama pelatihan fisik berlebihan ialah santin oksidase (XO). Pelatihan berlebih dapat mengakibatkan iskemia atau hipoksia di daerah tertentu dari tubuh. ATP akan dikonversi ke adenosin difosfat, adenosin monofosfat, inosin, dan akhirnya hiposantin.¹⁸ Dalam kondisi fisiologis normal, santin dehidrogenase merupakan bentuk dominan dari XO, yang dapat mengatalisis oksidasi hiposantin menjadi santin atau lebih lanjut oksidasi santin menjadi asam urat dengan menggunakan NAD⁺ sebagai akseptor elektron. Pada kondisi iskemia, santin dehidrogenase dikonversi ke XO oleh oksidasi sulfhidril. Sebaliknya pada kondisi reperfusi, terjadi pembentukan anion superoksida dan H₂O₂. XO ini bertanggung jawab atas produksi ROS dan kerusakan jaringan selama atau setelah aktivitas fisik berlebih.^{19,20}

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pelatihan fisik berlebih dapat meningkatkan indeks apoptosis pada hepatosit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan.

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian lanjutan tentang mekanisme proses apoptosis hepatosit dan jalur molekuler yang terlibat akibat pelatihan fisik berlebih. Selain itu, hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar teori untuk penelitian klinis pada manusia, khususnya pada kelompok masyarakat dengan risiko tinggi pelatihan fisik berlebih. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dijadikan pedoman, informasi, pengetahuan dan edukasi pada masyarakat khususnya olahragawan atau atlet dan instruktur olahraga, tentang dampak negatif

dari olahraga yang berlebihan terhadap kerusakan hati.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Siswanto FM, Yenniastuti BP, Putra TA, Kardena IM.** Aktivitas fisik maksimal akut (acute overtraining) menyebabkan kerusakan sel β pankreas mencit. *Jurnal Biomedik*. 2015;7(2):125-30.
2. **Pangkahila EA, Adiputra N, Pangkahila W, Yasa WPS.** Balanced physical exercise increase physical fitness, optimize endorphin levels, and decrease malondialdehyde levels. *Bali Med J*. 2016;5:145.
3. **Kartiko BH, Siswanto FM.** Overtraining elevates serum protease level, increases renal p16INK4a gene expression and induces apoptosis in rat kidney. *Sport Sci Health*. 2018;14:1-7.
4. **Nyandra M, Kartiko BH, Arunngam P, Pangkahila A, Siswanto FM.** Overtraining induces oxidative stress mediated renal damage in male wistar rats. *Transylvanian Rev*. 2018;26:7659-66.
5. **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4:89-96.
6. **Urhausen A, Kindermann W.** Diagnosis of overtraining: what tools do we have? *Sports Med*. 2002;32:95-102.
7. **de Souza TP, de Oliveira PR, Pereira B.** Physical exercise and oxidative stress. Effect of intense physical exercise on the urinary chemiluminescence and plasmatic malondialdehyde. *Rev Bras Med do Esporte*. 2005;11:97-101.
8. **Ishihara Y, Shimamoto N.** Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *J Biol Chem*. 2006;281:6726-33.
9. **Ishihara Y, Shiba D, Shimamoto N.** Primary hepatocyte apoptosis is unlikely to relate to caspase-3 activity under sustained endogenous oxidative stress. *Free Radic Res*. 2005;39:163-73.
10. **Hall JE.** Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (12th ed) [PDF] [tahir99] VRG, 2011.
11. **Federer WT.** Randomization and sample size in experimentation. Lecture presented at the Food and Drug Administration Statistics Seminar, Hashington, DC, 1966; p. 1-14.

12. **Zhong B.** How to calculate sample size in randomized controlled trial? *J Thorac Dis.* 2009;1:51-4.
13. **Kiernan J.** *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* Epub ahead of print 2002. DOI: 10.1179/1465312512Z.00000000045.
14. **Burcombe R, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F, et al.** Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006; 8(3):R31.
15. **Liu S-Y, Song S-X, Lin L, Liu X.** Molecular mechanism of cell apoptosis by paclitaxel and pirarubicin in a human osteosarcoma cell line. *Chemotherapy* 2010;56(2):101-7.
16. **Pettersson J, Hindorf U, Persson P, Bengtsson T, Malmqvist U, Werkstrom V, et al.** Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(2):253-9.
17. **Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, et al.** Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget.* 2018; 9(24):17181-98.
18. **Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al.** Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sc. USA.* 2003;100(9):5119-23.
19. **Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H, Perez-Quilis C, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Garatachea N, et al.** Effects of allopurinol on exercise-induced muscle damage: new therapeutic approaches? *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(1):3-13.
20. **Steinbacher P, Eckl P.** Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules.* 2015;5:356-77.