

**TESIS**

**PENGARUH LATIHAN OLAHRAGA YANG MELELAHKAN JANGKA  
PANJANG TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH DAN DIAMETER  
PULPA PUTIH LIMPA**

Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratoris

Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Strain Wistar



HK  
KK-A  
TKD. 08/11  
Yul  
P



**TRI HARTINI YULIAWATI**

**PROGRAM PASCA SARJANA**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2010**

**PENGARUH LATIHAN OLAHRAGA YANG MELELAHKAN JANGKA  
PANJANG TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH DAN DIAMETER  
PULPA PUTIH LIMPA**

Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratoris  
Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Strain Wistar

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

Oleh :

TRI HARTINI YULIAWATI  
NIM : 090810160 M

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal 28 Juli 2010**

**Lembar Pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL : 28 JULI 2010

Oleh :

Pembimbing Utama



(Prof. dr. H. Ari Gunawan, MS.,PhD.)  
NIP. 130531759

Pembimbing



(Hj. Iskantjah BR., dr., MS.,PA)  
NIP. 19491125 197802 2 001

Mengetahui  
KPS Ilmu Kedokteran Dasar



(Prof. Retno Handajani, dr., M.S.,Ph.D)  
NIP. 130541984

Telah diuji pada  
Tanggal 28 Juli 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Moch. Wirono AS, dr.,MS., PA

Anggota : 1. Prof. H. Ari Gunawan, dr., MS., Ph.D  
2. Hj. Iskantijah B.R., dr., MS, PA  
3. H. Sudibjo, dr., MS., PA  
4. Soebagjo, dr., MS., PA  
5. H. Chairul Anwar, drh.,MS., PAVet

## UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena berkat rahmat, tuntunan dan karunia-Nya saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penyusunan tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Minat Studi Anatomi-Histologi pada Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Selanjutnya ucapan terimakasih saya sampaikan kepada para pembimbing yaitu Prof. H. Ari Gunawan, dr.,MS., PhD selaku pembimbing ketua dan Hj. Iskantijah B.R., dr., MS.,PA selaku pembimbing, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, serta doa restunya selama penulisan tesis ini.

Terimakasih juga sebesar-besarnya kepada para penguji proposal dan tesis saya : Moch. Wirono AS, dr., MS.,PA, H. Sudibjo, dr., MS.,PA, Soebagio, dr., MS., PA dan H. Chairul Anwar, drh., MS., PAVet yang telah memberikan banyak masukan serta pengetahuan yang bermanfaat, sehingga tesis ini diharapkan menjadi lebih baik.

Ucapan terimakasih juga saya sampaikan kepada Rektor Universitas Airlangga : Prof. Dr. Fasich, Apt. dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga : Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., SpP(K) atas segala bantuan dan kemudahan yang diberikan selama pendidikan. Ucapan terimakasih kepada Prof. Dr. Harjanto, JM., dr.,AIF sebagai ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister

(TKPSM) dan Prof. Retno Handajani, dr.,MS., PhD selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar , Dr. H. Abdurachman, dr.,M.Kes,PA(K) selaku Ketua Minat Studi Anatomi-Histologi, H. Abdoel Kamid Iskandar, dr.,MS., PA(K) sebagai Ketua Departemen Anatomi dan Histologi serta semua staf pengajar di Departemen Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan, bantuan dan motivasi selama mengikuti pendidikan magister.

Untuk suami saya, dr. Agus Subiyantoro, terimakasih atas semua doa, perhatian, pengertian dan motivasi yang diberikan selama ini, untuk kedua orang tua saya tercinta : Drs. H. Kayadi dan ibu Hj. Sumiyati yang telah banyak membantu dengan memberikan doa dan kasih sayang, ananda tercinta Fathimatuzzahroh atas pengertiannya, kedua kakak saya, Umi Salamah, SPd sekeluarga dan Sri Utaminingsih, SSi sekeluarga yang senantiasa mendoakan dan memberikan semangat selama saya menempuh pendidikan. Rasa hormat saya sampaikan kepada Bapak dan Ibu mertua saya atas bantuan yang diberikan selama ini. Untuk teman seangkatan saya dr. Roziana, M.Ked., yang telah memberikan semangat dan dukungan, serta semua pihak yang telah membantu penyelesaian studi saya ucapkan banyak terimakasih.

Akhirnya dengan segenap rasa kerendahan hati saya meminta maaf atas segala kekurangan yang ada. Semoga tesis ini dapat member manfaat dan berguna bagi kita semua. Amin.

Surabaya, Juli 2010

## **RINGKASAN**

# **PENGARUH LATIHAN OLAHRAGA YANG MELELAHKAN JANGKA PANJANG TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH DAN DIAMETER PULPA PUTIH LIMPA**

**Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratoris**

**Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Strain Wistar**

**Tri Hartini Yuliatwati**

Latihan olahraga (*exercise*) merupakan aktifitas yang bertujuan untuk meningkatkan, mempertahankan atau menunjukkan tipe tertentu dari kebugaran fisik. Latihan olahraga dilakukan untuk berbagai tujuan, latihan untuk prestasi atau untuk rekreasi. Latihan olahraga selain memberikan pengaruh positif juga dapat memberikan pengaruh negatif terhadap sistem biologis tubuh. Aktivitas olahraga akan menimbulkan adaptasi dari sistem biologis tubuh, baik berupa adaptasi akut maupun kronis. Bentuk adaptasi tergantung dari intensitas, durasi dan tipe latihan olahraga yang dilakukan. Adaptasi ini sebagai bentuk toleransi tubuh terhadap stress akibat olahraga. Salah satu sistem tubuh yang dipengaruhi oleh aktivitas olahraga adalah sistem kekebalan tubuh (sistem imun), melalui perubahan jumlah dan fungsi sel-sel yang berperan dalam sistem imun, perubahan konsentrasi sitokin maupun immunoglobulin.

Pada latihan olahraga yang melelahkan, tanpa waktu pemulihan yang cukup, melalui jalur stress oksidatif dan jalur neuroendokrin (aktivasi *HPA axis* melalui produksi glukokortikoid dan sistem saraf simpatis melalui produksi katekolamin) akan mempengaruhi sistem imun. Salah satu komponen sistem imun yang mengalami perubahan adalah populasi limfosit baik di dalam darah maupun di organ limfatik primer maupun sekunder. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat adaptasi akut sistem imun terhadap latihan olahraga, tetapi adaptasi kronik dari sistem imun belum banyak dilakukan.

Pada penelitian ini latihan olahraga berupa aktivitas berenang dengan intensitas maksimal sampai kelelahan setiap hari dalam waktu 15 hari dan 30 hari diberikan sebagai bentuk stress fisik terhadap hewan coba, kemudian dilihat pengaruhnya terhadap jumlah limfosit dalam darah dan di salah satu organ limfatik sekunder melalui pengukuran diameter pulpa putih limpa. Jenis penelitian yang digunakan adalah *true eksperimental laboratoris* dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol 15 hari (K1), kelompok perlakuan 15 hari (P1), kelompok kontrol 30 hari (K2) dan kelompok perlakuan 30 hari (P2). Pada kelompok perlakuan, tikus yang diberi beban 6% berat badan dipaksa berenang sampai kelelahan. Variabel yang diukur adalah kadar MDA darah (variabel antara), dan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa (variabel tergantung). Data yang diperoleh dianalisis statistiknya dengan ANOVA satu arah dengan derajat kesalahan ( $\alpha=0,05$ ).

Kadar MDA darah diukur dengan metode TBA, jumlah limfosit darah dihitung secara digital dengan alat Cell-Dyn 3200, dan diameter pulpa putih pada

preparat limpa dengan pewarnaan H.E, diukur dengan alat ukur *software Motic Image Plus 2.0 ML* pada pembesaran 100x. Pengukuran diameter dilakukan pada semua pulpa putih yang tampak pada preparat limpa potongan membujur.

Dari data penelitian kadar MDA darah tetap tinggi pada kelompok P1 dan P2 dan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ ). Jumlah limfosit darah berbeda bermakna antara kelompok P1 dan kelompok P2. Dibandingkan dengan harga normal, jumlah limfosit pada kelompok P1 masih dalam batas normal sedangkan pada P2 diatas harga normal. Pada P1 terjadi pengecilan diameter pulpa putih limpa yang berbeda bermakna dibanding kelompok kontrol, sedangkan pada P2 diameter jumlah limfosit meningkat mendekati kontrol. Sebagai data tambahan, jumlah leukosit darah pada kelompok P1 masih dalam batas normal tetapi pada kelompok P2 menunjukkan terjadinya leukositosis.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa latihan olahraga yang melelahkan dalam waktu 15 hari dan 30 hari menunjukkan terjadinya stress oksidatif melalui tingginya kadar MDA darah. Pada 15 hari tidak menurunkan jumlah limfosit darah, tetapi pada waktu 30 hari menyebabkan peningkatan jumlah limfosit dan leukosit darah. Latihan olahraga yang melelahkan dalam waktu 15 hari menurunkan diameter pulpa putih limpa, dan dalam waktu 30 hari diameter pulpa putih limpa kembali mendekati normal. Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang dapat menyebabkan modulasi sistem imun berdasarkan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa.

## **SUMMARY**

### **THE EFFECT OF PROLONGED EXHAUSTIVE EXERCISE TO BLOOD LYMPHOCYTE COUNT AND DIAMETER OF SPLEEN WHITE PULP**

**A True Experimental Laboratoris  
in Male Rat (*Rattus norvegicus*) of Wistar Strain**

**Tri Hartini Yuliatwati**

Exercise is the activity to improves, maintains or enhances the specific type of physical fitness. Exercise can influences and makes positive or negative effect to biological system. Exercise causes both acute and chronic adaptation of biological system. The manifestation of the adaptation depends on intensity, duration and type of exercise. The adaptation is a body tolerance to stress caused by exercise. One of biological system influenced by exercise is the immune system through modulation the number and function of cells in immune system, plasma concentration of immunoglobulin and plasma concentration of cytokines.

Exhaustive exercise without adequate recovery time, can influences immune system through oxidative stress and neuroendocrine pathways. The neuroendocrine pathway activates HPA axis which results in release of glucocorticoids, and the sympathetic nervous system which results in release of catecholamines. Lymphocyte population in blood and in both primary and secondary lymphoid organ can be influenced by exercise. Many studies have been done to show the acute adaptation of immune system, but the chronic adaptation in exercise has not been reported yet.

This study is true experimental laboratories with post test only control group design. Twenty eight male rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain divided into four groups : the control group of fifteen days (K1), the treatment group of fifteen days (P1), the control group of thirty days (K2) and the treatment group of thirty days (P2). Treatment was given as exhaustive swimming with six percent of body weight load on their tail. The treatment was given everyday for fifteen and thirty days. The effects of treatment to malondialdehyde level (as moderate variable), blood lymphocyte count and diameter of spleen white pulp (as dependent variable) were analyzed. One way ANOVA was used to determine significant differences of the variables.

The malondialdehyde (MDA) level was measured with thiobarbituric acid (TBA) method. Blood lymphocytes were counted, and the diameter of spleen white pulp was measured with software Motic Image Plus 2.0 ML on 100x magnification. All of the white pulp in longitudinal section of spleen were measured.

The result shown that the MDA level increased in P1 and P2 groups (significant difference with control groups). The blood lymphocytes count differs significantly between P1 and P2 group. In P1 group, the blood lymphocytes count was in normal range, but increase from normal range in P2 group. P1 group show a decreased response of the diameter of spleen white pulp (significant difference with control groups), and then later the response increased in P2 group as well as in control groups. The leukocytes count was shown to give more information. The blood leukocytes count was in normal range in P1 group, but then increase over normal range in P2 group (leukocytosis).

The conclusion of this study show that prolonged exhaustive exercise for fifteen and thirty days causes oxidative stress bases on MDA level. The blood lymphocytes and leukocytes count are still in normal range in fifteen days groups, and then increase above normal range in thirty days groups. Prolonged exhaustive exercise causes diminution of spleen white pulp diameter in fifteen days group (P1), and causes adaptation response in thirty days group (P2). Prolonged exhaustive exercise could modulated immune system based on blood lymphocyte count and diameter of spleen white pulp.

## ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effect of prolonged exhaustive exercise to blood lymphocyte count and the diameter of spleen white pulp. This study was true experimental laboratories with post test only control group design. Twenty eight male rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain divided into four groups : the control group of fifteen days (K1), the treatment group of fifteen days (P1), the control group of thirty days (K2) and the treatment group of thirty days (P2). Treatment was given as exhaustive swimming with six percent of body weight load on their tail. After treatment, the blood was collected to examine malondialdehyde (MDA) level in serum and blood lymphocyte count. Then the animal was sacrificed with decapitation method and the spleen was removed. Spleen was processed to histological preparation with haematoxylin eosin staining. The diameter of spleen white pulp was measured on light microscope with 100x magnification. The data were analyzed with one way ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). The result shown that the treatment caused oxydative stress based on blood MDA level. The treatment for fifteen days decreased diameter of spleen white pulp, but blood lymphocyte count still in normal range. The treatment for thirty days increased diameter of spleen white pulp and no significant difference with control group, also increased blood lymphocyte count. The conclusion of this study was the prolonged exhaustive exercise could modulated immune system based on blood lymphocyte count and diameter of spleen white pulp.

**Keywords** : prolonged exhaustive exercise, malondialdehyde level, blood lymphocyte count, diameter of spleen white pulp



## DAFTAR ISI

|   |          |
|---|----------|
| Sampul Dalam .....  | i        |
| Prasyarat Gelar .....   | ii       |
| Persetujuan .....   | iii      |
| Penetapan Panitia Penguji .....                                 | iv       |
| Ucapan Terima Kasih .....                                       | v        |
| Ringkasan .....   | vii      |
| Summary .....   | x        |
| Abstract .....  | xiii     |
| Daftar Isi .....  | xiv      |
| Daftar Tabel .....  | xvii     |
| Daftar Gambar .....   | xviii    |
| Daftar Lampiran .....   | xix      |
| Daftar Singkatan .....  | xx       |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....                                  | <b>1</b> |
| 1.1 Latar Belakang .....  | 1        |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                                       | 5        |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                                     | 5        |
| 1.3.1 Tujuan Umum .....   | 5        |
| 1.3.2 Tujuan Khusus .....                                       | 5        |
| 1.4 Manfaat penelitian .....                                    | 5        |
| 1.4.1 Manfaat teoritis .....                                    | 5        |
| 1.4.2 Manfaat Praktis .....                                     | 6        |
| <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                             | <b>7</b> |
| 2.1 Sistem Kekebalan Tubuh (Sistem Imun) .....                  | 7        |
| 2.1.1 Kekebalan Tubuh Alamiah dan Kekebalan Tubuh Didapat ..... | 8        |
| 2.1.2 Sel yang Berperan pada Sistem Imun .....                  | 11       |
| 2.1.3 Perkembangan Limfosit dan Heterogenitasnya .....          | 12       |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.4 Anatomi Organ Limfatik .....                              | 14        |
| 2.2 Radikal Bebas .....   | 17        |
| 2.2.1 Kerusakan Sel Akibat Radikal Bebas .....                  | 20        |
| 2.2.2 Metode Deteksi Radikal Bebas .....                        | 22        |
| 2.3 Latihan Olahraga (exercise) .....                           | 23        |
| 2.4 Pengaruh Latihan Olahraga terhadap Sistem Imun .....        | 26        |
| <b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b> | <b>31</b> |
| 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....                        | 31        |
| 3.2 Hipotesis .....   | 33        |
| <b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>                            | <b>34</b> |
| 4.1 Rancangan Penelitian .....                                  | 34        |
| 4.2 Skema Rancangan Penelitian .....                            | 34        |
| 4.3 Sampel dan Besar Sampel .....                               | 35        |
| 4.4 Variabel Penelitian .....                                   | 36        |
| 4.4.1 Variabel Bebas .....                                      | 36        |
| 4.4.2 Variabel Tergantung .....                                 | 36        |
| 4.4.3 Variabel Antara .....                                     | 36        |
| 4.4.4 Variabel Kendali .....                                    | 36        |
| 4.4.5 Definisi Operasional Variabel .....                       | 37        |
| 4.5 Bahan Penelitian .....                                      | 38        |
| 4.6 Instrumen Penelitian .....                                  | 39        |
| 4.7 Waktu dan Tempat Penelitian .....                           | 39        |
| 4.8 Prosedur Penelitian .....                                   | 39        |
| 4.8.1 Persiapan Penelitian .....                                | 39        |
| 4.8.2 Pelaksanaan Perlakuan .....                               | 40        |
| 4.8.3 Etika Penelitian .....                                    | 40        |
| 4.8.4 Pengorbanan Hewan Coba .....                              | 40        |
| 4.8.5 Pengumpulan Data .....                                    | 41        |
| 4.9 Kerangka Operasional Penelitian .....                       | 42        |
| 4.10 Analisis Data .....  | 43        |

|   |    |
|---|----|
| BAB 5 DATA DAN ANALISIS PENELITIAN .....  | 44 |
| 5.1 Data Penelitian .....   | 44 |
| 5.1.1 Rerata Berat Badan Tikus Putih .....  | 44 |
| 5.1.2 Kadar MDA Darah .....   | 45 |
| 5.1.3 Data Jumlah Limfosit dan Leukosit Darah .....   | 46 |
| 5.1.4 Data Diameter Pulpa Putih Limpa .....   | 46 |
| 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian .....   | 47 |
| 5.2.1 Analisis Data Berat Badan .....   | 47 |
| 5.2.2 Analisis Data Kadar MDA Darah .....   | 47 |
| 5.2.3 Analisis Data Jumlah Limfosit Darah .....   | 48 |
| 5.2.4 Analisis Data Jumlah Leukosit Darah .....   | 49 |
| 5.2.5 Analisis Data Diameter Pulpa Putih Limpa .....  | 49 |
| 5.2.6 Uji Korelasi Kadar MDA Darah dengan Jumlah Limfosit Darah dan<br>Diameter Pulpa Putih Limpa ..... | 50 |
| BAB 6 PEMBAHASAN .....  | 52 |
| BAB 7 PENUTUP .....   | 60 |
| 7.1 Kesimpulan .....  | 60 |
| 7.2 Saran .....   | 60 |
| DAFTAR PUSTAKA .....  | 62 |
| LAMPIRAN .....  | 66 |

**DAFTAR TABEL**

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabel 2.1 | Peroksidasi Lipid Serum pada Individu Normal .....                           | 23 |
| Tabel 2.2 | Efek Olahraga Berat pada Sistem Imun .....                                   | 26 |
| Tabel 5.1 | Rerata Berat Badan Tikus Putih .....   | 44 |
| Tabel 5.2 | Rerata Kadar MDA Darah Tikus Putih .....                                     | 45 |
| Tabel 5.3 | Rerata Jumlah Limfosit dan Leukosit Darah Tikus Putih .....                  | 46 |
| Tabel 5.4 | Rerata Diameter Pulpa Putih Limpa Tikus Putih .....                          | 46 |
| Tabel 5.5 | Beda Rerata dan Signifikansi Kadar MDA Darah Antar Kelompok .....            | 48 |
| Tabel 5.6 | Beda Rerata dan Signifikansi Jumlah Limfosit Darah Antar kelompok .....      | 49 |
| Tabel 5.7 | Beda Rerata dan Signifikansi Diameter Pulpa Putih Limpa Antar Kelompok ..... | 50 |

## DAFTAR GAMBAR

|  |    |
|--|----|
| Gambar 5.1 Grafik Korelasi Kadar MDA Darah dengan Jumlah Limfosit Darah Pada Kelompok P1 ..... | 51 |
| Gambar 5.2 Grafik Korelasi Kadar MDA Darah dengan Diameter Pulpa Putih Pada Kelompok P1 .....  | 51 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|  |    |
|--|----|
| Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik.....                              | 66 |
| Lampiran 2. Pembuatan Sediaan Histologis dan Teknik Pewarnaan H.E..... | 67 |
| Lampiran 3. Prosedur Pemeriksaan MDA.....                              | 72 |
| Lampiran 4. Data Hasil Penelitian.....                                 | 73 |
| Lampiran 5. Hasil Uji Statistik.....                                   | 75 |
| Lampiran 6. Gambar Sediaan Limpa dengan Pewarnaan H.E.....             | 82 |

**DAFTAR SINGKATAN**

|                |                                     |
|----------------|-------------------------------------|
| ACTH           | : Adrenocorticotropic Hormone       |
| ADP            | : Adenosin Diphosphate              |
| ANOVA          | : Analysis of Variance              |
| APC            | : Antigen Presenting Cell           |
| AP-1           | : Activator Protein 1               |
| ATP            | : Adenosin Triphosphate             |
| CD4            | : Cluster Differentiation 4         |
| CD8            | : Cluster Differentiation 8         |
| CD95           | : Cluster Differentiation 95        |
| CRH            | : Corticotrophin Releasing Hormon   |
| CIO-           | : Ion Hypochlorite                  |
| C2H6           | : Etana                             |
| C5H12          | : Pentana                           |
| DNA            | : Deoxyribosa Nucleic Acid          |
| EDTA           | : Ethylenediaminetetraacetic acid   |
| EPR            | : Electron Paramagnetic Resonance   |
| ESR            | : Electron Spin Resonance           |
| FDC            | : Follicular Dendritic Cell         |
| GSH            | : Glutathion Peroksidase            |
| GSSG           | : Glutathion Teroksidasi            |
| GR             | : Glucocorticoid Receptor           |
| ·GS            | : Radikal Glutathione               |
| HE             | : Haematoxylin Eosin                |
| HEV            | : High Endothelial Venules          |
| HPA            | : Hypothalamus Pituitary Adrenal    |
| H2O            | : Hidrogen Dioksida                 |
| H2O2           | : Hidrogen Peroksida                |
| IDC            | : Interdigitating Cell              |
| IFN $\gamma$   | : Interferon Gamma                  |
| IL             | : Interleukin                       |
| LSD            | : Least Significant Difference      |
| MALT           | : Mucosa Associated Lymphoid Tissue |
| MDA            | : Malondialdehyde                   |
| NF- $\kappa$ B | : Nuclear Factor Kappa Binding      |
| NK cell        | : Natural Killer cell               |
| O2             | : Dioksigen                         |
| O2 $\cdot$ -   | : Ion Superoksida                   |
| ·OH            | : Radikal Hidroksil                 |
| ·OOH           | : Radikal Peroksil                  |
| $^1$ O2        | : Singlet Oksigen                   |
| PALS           | : Periarteriolar Lymphatic Sheaths  |

|              |   |
|--------------|---|
| PBS          | : Phospat Buffer Saline   |
| PCr          | : Creatinin Phospat   |
| PGE2         | : Prostaglandin E2  |
| ROS          | : Reactive Oxygen Species                                       |
| SOD          | : Superoxide Dismutase  |
| TBA          | : Thiobarbituric Acid   |
| TBARS        | : Thiobarbituric Acid Reactive Substance                        |
| TCA          | : Trichloroacetic Acid  |
| Th0          | : T Helper Precursor  |
| Th1          | : T Helper 1  |
| Th2          | : T Helper 2  |
| TNF $\alpha$ | : Tumor Necrosing Factor Alpha                                  |
| TUNEL        | : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling |

# BAB1 PENDAHULUAN

## BAB 1

### PENDAHULUAN



#### 1.1 Latar Belakang

Stres merupakan kondisi yang umum didapatkan pada kehidupan sehari-hari. Berbagai macam sumber stres atau stresor antara lain stres fisik dan stres psikologis, baik akut maupun kronis, dapat menimbulkan pengaruh yang berbeda pada hormon stres dan sistem imun. Dua jalur respon neuroendokrin utama pada stres adalah *hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis* dan sistem saraf simpatis (Marketon, Glaser, 2008).

Stresor dapat memberikan efek positif atau negatif pada sistem imun tergantung antara lain pada lama, intensitas, tipe, dan waktu terjadinya stresor. Oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi efek stresor pada sistem imun, dan mediator tertentu yang terlibat di dalamnya. Pemahaman interaksi antara neuroendokrine dan sistem imun akibat paparan stresor sangat penting untuk melihat perubahan molekuler atau seluler pada sistem imun (Pruett, 2003).

Salah satu aktivitas fisik yang dapat menimbulkan terjadinya kondisi stres adalah latihan olahraga. Penelitian yang dilakukan oleh Goetz *et al.* (1986) menunjukkan bahwa baik latihan olahraga sesaat akut maupun kronik mampu memodifikasi jumlah dan fungsi limfosit pada limpa. Latihan treadmill selama 6 minggu menurunkan jumlah limfosit pada limpa dibandingkan kelompok kontrol. Latihan olahraga akut dan kronik menunjukkan penurunan jumlah limfosit pada limpa dibanding kelompok kontrol. Latihan olahraga yang berlebihan (*overtraining*),

meningkatkan resiko terhadap penyakit dan berbahaya bagi kesehatan. Pada kondisi ini tubuh gagal melakukan proses adaptasi, yang merupakan akibat pemulihan yang tidak komplis dan menghasilkan keadaan maladaptasi (Ogonovszky *et al.*, 2005).

Beberapa komponen sistem imun yang mengalami perubahan pada stres fisik antara lain menurunnya jumlah dan aktivitas limfosit dalam darah dan limpa, penurunan aktivitas fagositosis neutrofil pada mukosa saluran napas, dan penurunan konsentrasi imunoglobulin A pada sekret hidung dan saliva. Beberapa mekanisme yang terlibat pada perubahan sistem imun akibat stres fisik antara lain adanya perubahan hormon stres, perubahan suhu tubuh, peningkatan aliran darah, apoptosis limfosit dan dehidrasi. Pada kompetisi seperti maraton, konsentrasi kortisol serum meningkat secara signifikan dalam beberapa jam dan berhubungan dengan perubahan peredaran sel selama masa pemulihan. Pada waktu 'open window' perubahan imunitas ( antara 3 sampai 72 jam setelah aktivitas fisik), resiko infeksi virus dan bakteri akan meningkat (Nieman, 2007). Secara umum latihan olahraga intensitas tinggi atau dengan durasi lama dapat menyebabkan immunosupresi dan meningkatkan resiko terhadap infeksi.

Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa stres pada latihan olahraga disebabkan karena pembentukan senyawa radikal yang menyebabkan timbulnya stres oksidatif yaitu terjadinya reaksi senyawa radikal dengan molekul biologis tubuh. Senyawa radikal dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu asam lemak yang merupakan komponen penyusun membran sel dan organel, protein yang membentuk enzim,

reseptor, antibodi, matriks sel dan sitoskeleton, dan molekul DNA yang merupakan penyusun genetik sel (Halliwell, 1999 ; Suryohudoyo, 2007).

Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh sebagian besar berasal dari oksigen, sehingga disebut senyawa oksigen reaktif (*Reactive oxygen species / ROS*). ROS mempengaruhi proses biologis tubuh, mulai dari regulasi jalur sinyal transduksi sampai dengan kerusakan jaringan yang luas. Radikal bebas juga berpengaruh pada proses kerusakan maupun adaptasi akibat aktivitas fisik dan latihan olahraga (Sachdev, Davies, 2008).

ROS berperan dalam terjadinya apoptosis pada jaringan limfoid setelah latihan olahraga. Pada mencit yang melakukan treadmill hingga kelelahan, terjadi akumulasi peroksidasi lipid membran pada thymus dan limpa. Peningkatan peroksidasi lipid secara signifikan terjadi sesaat dan 24 jam setelah latihan sampai kelelahan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Besarnya peroksidasi lipid setelah latihan lebih besar pada thymus dibandingkan pada limpa. Penurunan superoxide dismutase (SOD) secara signifikan terjadi sesaat setelah latihan dan kembali 24 jam setelah latihan baik pada thymus maupun limpa. Stres oksidatif pada thymus dan limpa bisa dilihat dari peningkatan peroksidasi lipid membran pada kelompok perlakuan dibanding kontrol. Lipid peroksida merupakan radikal bebas yang berperan pada kematian sel. Latihan olahraga sesaat sampai kelelahan mempengaruhi keseimbangan antara produksi radikal bebas dengan pertahanan enzim antioksidan di dalam jaringan, melibatkan reaksi imun dan produksi radikal bebas dan berefek pada membran lemak tak jenuh yang ditunjukkan dengan peningkatan pembentukan peroksidasi lipid (Azenabor, Goetz, 1999).

Pada kondisi normal, latihan olahraga diikuti oleh periode istirahat. Selama periode ini tubuh akan beradaptasi dengan stresor yang disebabkan latihan olahraga. Adaptasi terhadap latihan olahraga yang teratur bersifat sistemik dan spesifik, tergantung karakteristik latihan. Misalnya pada latihan aerobik yang lama akan menurunkan konsentrasi glikogen, sedangkan pada kondisi latihan yang normal akan meningkatkan konsentrasi glikogen. Latihan anaerobik yang intensif akan meningkatkan asam laktat dalam darah, sedangkan pada latihan anaerobik yang teratur akan terjadi adaptasi, tubuh akan mengeliminasi asam laktat sehingga konsentrasinya tidak meningkat dalam darah (Radak *et al.*, 2008).

Teori stres yang dikemukakan Selye (1956) yang dikutip oleh Radak *et al.*, (2008), menyebutkan bahwa paparan terhadap stresor kronik akan menurunkan alarm (tanda) dalam tubuh, dan meningkatkan resistensi kemudian diikuti oleh kondisi kelelahan. Stres kronik sangat berbahaya apabila waktu istirahat yang dibutuhkan untuk pemulihan tidak mencukupi atau tidak ada. Pada latihan olahraga dengan durasi yang lama seperti lari atau berenang selama 18 – 24 jam akan menyebabkan kondisi kelelahan yang berbahaya bagi kesehatan.

Berdasarkan uraian di atas, stres fisik misalnya akibat latihan olahraga yang berlebihan akan mempengaruhi sistem imun, salah satunya pada sel limfosit, melalui respon neuroendokrin dan aktivitas radikal bebas. Beberapa penelitian menunjukkan terjadinya peningkatan kadar hormon stres yang mempengaruhi respon imun, baik pada latihan olahraga sesaat maupun jangka panjang. Penelitian lain menunjukkan terjadinya stres oksidatif setelah latihan olahraga sesaat, yang juga berpengaruh pada respon imun. Akan tetapi efek stres oksidatif pada sistem imun, terutama pada sel

limfosit, akibat latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang belum dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap salah satu komponen sistem imun yaitu sel limfosit baik di darah dan di jaringan limfoid terutama limpa.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Apakah latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang akan menurunkan jumlah limfosit dalam darah?
2. Apakah latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang akan menurunkan diameter pulpa putih pada limpa?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mempelajari pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap salah satu komponen sistem imun yaitu sel limfosit.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membuktikan pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap jumlah limfosit dalam darah.
2. Membuktikan pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap diameter pulpa putih limpa.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap sistem imun.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat praktis kepada masyarakat pada umumnya dan masyarakat olahraga pada khususnya :

1. Memprediksi masalah kesehatan akibat latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap sistem imun.
2. Memberi masukan pada pihak yang terkait tentang manajemen pelatihan olahraga yang baik.

# BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sistem Kekebalan Tubuh (Sistem Imun)

Istilah kekebalan (*immunity*) berasal dari bahasa latin *imunos*, yang berarti dikecualikan. Menurut sejarah, kekebalan berarti proteksi terhadap penyakit dan lebih spesifik lagi terhadap penyakit infeksi (Abbas *et al.*, 1994 ; Baratawidjaja dan Rengganis,2009). Sel dan molekul yang bertanggung jawab pada kekebalan tubuh merupakan bagian dari sistim imun, sedangkan pengumpulan dan koordinasi untuk merespon pengenalan terhadap benda asing disebut respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi juga berlaku terhadap benda asing. Mekanisme yang secara normal melindungi individu dari infeksi dan mengeliminasi benda asing ternyata mampu juga menyebabkan injuri dan penyakit pada situasi yang sama. Oleh karena itu definisi yang lebih tepat dari kekebalan adalah sebuah reaksi terhadap benda asing, termasuk mikroba, makromolekul, dan polisakarida tanpa pernyataan konsekwensi fisiologis atau patologis (Abbas *et al.*, 1994).

Sistem imun dapat dibagi menjadi sistem imun alamiah atau nonspesifik (*natural/innate/native/nonadaptif*) dan didapat atau spesifik (*acquired*). Perbedaan sistem imun alamiah dan didapat terdapat pada mekanisme kerjanya dan sel-sel yang terlibat. Mekanisme imunitas didapat atau spesifik timbul atau bekerja lebih lambat dibanding imunitas nonspesifik. Sistem imun nonspesifik dan spesifik saling

bekerjasama dan tidak dapat dipisahkan satu dengan yang lain (Baratawidjaja dan Rengganis,2009).

### 2.1.1 Kekebalan tubuh alamiah dan kekebalan tubuh didapat

Individu yang sehat akan memproteksi dirinya sendiri dari mikroba dengan berbagai mekanisme, meliputi barrier fisik, sel-sel fagosit, eosinofil di darah dan jaringan, sebuah kelas sejenis limfosit yaitu *Natural Killer (NK) cell*, dan bermacam-macam molekul pada plasma darah yang semuanya berpartisipasi untuk pertahanan individu dari lingkungan yang tidak bersahabat. Semua mekanisme pertahanan ini muncul sebelum adanya paparan infeksius mikroba atau makromolekul, tidak diubah oleh jenis paparan dan tidak dapat membedakan benda asing. Hal itu adalah bagian dari kekebalan tubuh alami atau nonspesifik.

Jenis mekanisme kekebalan lainnya adalah kekebalan yang diinduksi atau distimulasi oleh paparan benda asing, yang sangat spesifik untuk makromolekul yang berbeda, dan meningkat pada besaran dan kemampuan pertahanan. Mekanisme ini merupakan bagian dari kekebalan spesifik. Substansi asing yang dapat menginduksi kekebalan spesifik disebut antigen.

Respon imun spesifik merupakan bagian dari sistim pertahanan tubuh secara menyeluruh. Sistem kekebalan spesifik tetap melibatkan beberapa mekanisme kekebalan alamiah yang penting untuk mengeliminasi infeksi benda asing. Keterlibatan imunitas alami ini penting untuk dua alasan yaitu:

**Pertama**, respon imun spesifik mengingat setiap pertemuan dengan sebuah mikroba atau makromolekul sebagai antigen asing, sehingga pertemuan dengan antigen

berikutnya akan secara efektif meningkatkan stimulasi sistem pertahanan tubuh. Hal ini disebut memori imunologi yang merupakan dasar dari imunisasi.

**Kedua**, sistem imun spesifik menguatkan respon imun alamiah /natural. Mekanisme ini secara langsung terfokus pada sisi masuknya antigen sehingga meningkatkan kemampuan sel untuk mengeliminasi antigen.

Respon imun spesifik terdiri dari limfosit dan hasil sekresinya, misalnya adalah antibodi yang terdapat pada respon imun vertebrata dan juga pada ikan. Sebaliknya sel-sel fagosit dan komplemen tidak dapat membedakan antigen yang berbeda dan tidak secara khusus ditingkatkan dengan pengulangan paparan antigen yang sama. Limfosit dan antibodi memiliki sifat sangat spesifik. Produksi atau penambahan produksinya di stimulasi oleh antigen asing. Namun untuk keperluan pertahanan / kekebalan dari suatu individu untuk mengeliminasi antigen asing, limfosit dan antibodi membutuhkan partisipasi dari fagosit dan komplemen.

Kulit dan mukosa adalah komponen utama sistem imun alamiah sebab mereka berfungsi sebagai barier fisik. Respon imun spesifik yang juga terdapat pada permukaan kulit dan mukosa akan membantu meningkatkan fungsi kekebalan alamiah (*immune natural function*) (Abbas *et al*, 1994).

Ketahanan natural non spesifik, tidak dapat membedakan *self* dan *non-self*, serta tidak mempunyai daya ingat (memori). Sedang ketahanan tubuh adaptif, yang dilakukan oleh antibodi, limfokin, limfosit B, dan limfosit T, bersifat spesifik, dapat membedakan antara *self* dan *non-self*, serta mempunyai daya ingat. Kualitas ketahanan tubuh dapat dicerminkan oleh perubahan yang terjadi pada respons imun (Taata Putra, 1999).

Respon imun yang dipicu oleh interaksi dengan antigen, ditentukan oleh reseptor spesifik pada limfosit. Pada limfosit T terdapat  $10^{15}$  sampai  $10^{18}$  reseptor yang berbeda, sedangkan limfosit B mempunyai  $10^{11}$  reseptor pada permukaannya. Adanya reseptor tersebut menyebabkan limfosit dapat mengenali berbagai epitop dari mikroba atau substansi dari luar tubuh yang berbahaya. Pada saat sistem imun terpapar benda asing, akan cenderung berkembang menjadi respon imun yang sangat hebat. Pembedaan atau diskriminasi terhadap *self* dan *nonself* berdasarkan pada kemampuan sistem imun mengenali secara luas berbagai macam struktur benda asing yang berbeda (Virella, 2007).

Respon imun spesifik dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis berdasarkan komponen sistem imun yang memediasi respon :

1. *Humoral immunity* (kekebalan humoral)

Dimediasi oleh molekul dalam darah yang bertanggung jawab terhadap pengenalan dan eliminasi spesifik terhadap antigen. Molekul ini disebut *antibody*.

Hal ini dapat ditransfer ke individu lain melalui serum atau plasma.

2. *Cell-mediated immunity* (kekebalan seluler )

Dimediasi oleh sel yaitu sel limfosit T, dapat ditransfer ke individu lain dalam bentuk sel limfosit T yang terimunisasi dan bukan melalui serum atau plasma.

*Humoral dan cellular immunity* dimediasi oleh limfosit yang berbeda. Limfosit B merespon antigen asing kemudian berkembang menjadi sel pembentuk antibodi. Sebaliknya, limfosit T sebagai mediator untuk *cellular immunity*. *Humoral immunity* adalah pertahanan utama melawan mikroba ekstra seluler dan toksinnya

sebab antibodi dapat mengikat dan membantu untuk menghancurkan mikroba tersebut. Sebaliknya infeksi mikroba intraseluler seperti virus dan beberapa bakteri, berproliferasi di dalam sel *host* sehingga tidak terakses oleh antibodi. Pertahanan tubuh seperti ini dilakukan oleh mekanisme *cell mediated immunity* yang berfungsi menginduksi dan mempromosikan lisisnya mikroba atau lisisnya sel yang terinfeksi (Abbas *et al.*,1994).

### 2.1.2 Sel yang berperan pada sistem imun

Berbagai macam sel memegang peranan dalam sistem imun, antara lain limfosit, *antigen presenting cell* (APC) termasuk makrofag dan sel dendritik, sel-sel yang mempunyai kemampuan fagositik (monosit, makrofag dan granulosit) serta *natural killer (NK) cell*. Dalam keadaan normal sel-sel ini terdapat di dalam sirkulasi baik darah maupun pembuluh limfe, dan juga pada jaringan limfoid. Organisasi sel-sel tersebut secara anatomi dan kemampuan untuk mengatur sirkulasi dan pertukaran sel sistem imun antara darah, limfe dan jaringan memegang peran penting dalam respon imun (Abbas *et al.*,1994 ; Virella, 2007).

Darah perifer berisi dua populasi besar sel yaitu sel darah merah yang berperan pada pengangkutan oksigen ke jaringan dan sel darah putih yang berperan pada eliminasi bahan-bahan atau organisme yang berbahaya. Terdapat dua subpopulasi limfosit yaitu limfosit B dan limfosit T. Limfosit B melalui proses tertentu akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi yang berperan pada respon imun humoral. Limfosit T dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

- 1) Limfosit T helper (Th) yang berasal dari sel precursor (Th0) dan mempunyai peranan sangat penting dalam respon imun. Berdasarkan fungsinya limfosit T

helper dibagi menjadi Th1 yang berdiferensiasi menjadi sel sitotoksik dan mengaktifkan makrofag. Sedangkan limfosit Th2 akan mempengaruhi respon limfosit B. Limfosit Th bekerja dengan menghasilkan sitokin yang merupakan mediator komunikasi antar sel.

- 2) Limfosit T sitotoksik berperan sebagai efektor untuk eliminasi sel yang terinfeksi.
- 3) Limfosit T immunoregulator mempunyai kemampuan untuk mengatur respon imun melalui produksi interleukin 10/IL-10 (Virella, 2007).

Diantara sel yang berperan dalam sistem imun, limfosit mempunyai peran penting untuk mengontrol dan meregulasi respon imun. Limfosit berdiferensiasi dari sel induk (*stem cell*) dalam hepar fetus, sumsum tulang, dan thymus menjadi dua kelompok sel yang fungsional. Limfosit terdapat di dalam darah dan jaringan limfoid. Sistem imun pada manusia dan sebagian besar mamalia terdiri dari berbagai macam sel dan jaringan yang saling terintegrasi (Virella, 2007).

### **2.1.3 Perkembangan limfosit dan heterogenitasnya**

Limfosit kecil berdiameter 8 – 10 mikrometer, memiliki inti yang besar dan *dense heterochromatin*. Sitoplasmanya sedikit dan mengandung sedikit mitokondria, ribosom, lisosom. Seperti semua sel darah, limfosit berasal dari sumsum tulang. Limfosit dan *stem* sel bersifat radiosensitif, terbukti dapat dimatikan oleh radiasi sinar gama dosis tinggi.

Pada tahap awal perkembangannya, limfosit tidak memproduksi reseptor permukaan untuk antigen sehingga tidak responsif terhadap antigen, setelah menjadi matur, limfosit dapat mengekspresikan reseptor antigen dan menjadi responsif terhadap antigen dan berkembang menjadi beberapa kelas fungsional. Limfosit terdiri

dari subset yang berbeda dan berbeda fungsi serta produk sekresinya. Walaupun demikian mereka memiliki morfologi yang hampir sama.

Limfosit B merupakan satu-satunya sel yang mampu memproduksi antibodi. Interaksi antigen dengan membran sel ini akan mencetuskan aktivasi dari sel limfosit B, yang akhirnya menjadi sebuah sel efektor yang memproduksi antibodi.

Limfosit T berasal dari sumsum tulang kemudian bermigrasi dan matur di thymus. Kemudian berdasarkan fungsinya dibagi menjadi beberapa subdivisi yaitu helper-T cell dan cytolytic-T cell. Limfosit-T tidak memproduksi molekul antibodi.

Limfosit *Helper* dan *cytolytic-T* memiliki kekhususan yang luar biasa untuk antigen. Mereka hanya mengenali antigen peptida yang melekat pada protein yang dikode oleh *major histocompatibility complex*, dan diekspresikan oleh sel yang lain. Sebagai hasilnya sel limfosit T ini hanya mengenali antigen di permukaan sel dan bukan antigen yang terlarut.

Sebagai respon dari stimulasi antigen terhadap sel limfosit-T ini adalah , dihasilkannya hormon protein yang disebut sitokin, yang berfungsi merangsang proliferasi limfosit T dan sel lain termasuk makrofag dan limfosit B. Sitokin juga menarik sel-sel leukosit inflamasi, termasuk makrofag dan granulosit, sehingga hal ini menciptakan suatu hubungan yang penting antara imunitas spesifik dari limfosit T dan imunitas natural.

*Cytolytic T-lymphocyte* menghancurkan sel yang memproduksi antigen asing, seperti sel yang terinfeksi virus dan mikroba intra seluler yang lainnya. Kelompok limfosit T, selain terdiri dari sel limfosit T *helper* dan *cytolytic*, juga sel limfosit-T supresor yang berfungsi menghambat respon imun.

Identifikasi berbagai jenis limfosit ini dapat diketahui dengan melihat perbedaan protein membrannya. Sebagai contoh, limfosit T *helper* mengekspresikan protein permukaan yang disebut CD4 (*cluster differentiation-4*), sedangkan sel *cytotoxic* T mengekspresikan protein yang disebut CD8.

Kelas besar ketiga dari limfosit tidak mengekspresikan *marker* seperti limfosit T maupun limfosit B, karenanya disebut *null cell*. Ciri morfologinya adalah merupakan sel limfosit besar, mempunyai banyak granula sitoplasma yang mempunyai kemampuan menghancurkan bermacam-macam sel kanker dan sel yang terinfeksi virus tanpa stimulasi antigenik yang jelas. Oleh karena itu sel ini disebut juga *natural killer (NK) cells*.

#### 2.1.4 Anatomi organ limfatik

Organ limfatik dibagi menjadi organ limfatik primer (sumsum tulang dan thymus) dan organ limfatik sekunder (kelenjar getah bening, limpa, *mucosa associated lymphoid tissue* / MALT di mukosa saluran napas dan saluran cerna, dan tonsil). Sumsum tulang merupakan tempat produksi limfosit baik T maupun B. Maturasi limfosit B pada sumsum tulang. Sedangkan limfosit T akan mendapatkan proses pematangan selanjutnya di thymus (Mader, 2008).

Sumsum tulang merah merupakan tempat produksi semua sel-sel darah. Pada masa anak-anak hampir semua tulang merupakan sumsum tulang merah, tetapi pada dewasa hanya sternum, vertebra, tulang iga, sebagian dari pelvis dan bagian atas humerus dan femur yang merupakan sumsum tulang merah.

Thymus merupakan kelenjar yang mempunyai dua lobus terletak di dalam rongga dada antara trachea dan sternum, superior dari jantung. Thymus bervariasi

ukurannya, paling besar pada masa anak-anak dan mengkerut pada dewasa. Thymus mempunyai dua fungsi : 1) memproduksi hormon thymus seperti thymosin, yang berperan dalam proses pematangan limfosit T dan pada kekebalan, 2) tempat pematangan (maturasi) limfosit T dari sumsum tulang melalui darah (Mader, 2008). Peptida lain yang ditemukan di thymus adalah thymopoietin, thymic humoral factor, thymulin dan thymostimulin ( Tizard, 2009). Hanya 5 % sel-sel ini yang meninggalkan thymus yaitu jika mereka bertemu dengan pathogen. Thymus merupakan tempat yang sangat penting dalam kekebalan karena tanpa adanya limfosit T yang matur, tubuh tidak merespon terhadap pathogen (Mader, 2008). Limfosit pada thymus (*thymocyte*) berada dalam berbagai tahap maturasi. Sebagian besar thymosit yang imatur tidak mengekspresikan reseptor pada permukaan sel, termasuk CD4 dan CD8 yang merupakan ciri limfosit yang matang. Sel-sel imatur ini bermigrasi dari cortex ke medulla dan kemudian kontak dengan makrofag dan sel dendritik. Di dalam medulla, thymosit mengekspresikan reseptor CD4 dan CD8 seperti limfosit matur di perifer. Hanya limfosit yang matur yang meninggalkan thymus masuk ke dalam sirkulasi maupun jaringan limfoid (Abbas *et al.*, 1994).

Limpa merupakan salah satu organ limfatik sekunder. Limpa berfungsi menyaring darah dan merupakan organ limfatik terbesar terletak di regio kiri atas rongga abdomen. Limpa terdiri dari pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah terlibat dalam proses penyaringan darah. Darah yang masuk limpa harus melewati sinus sebelum meninggalkan limpa. Disini makrofag berfungsi sebagai '*vaccum cleaner*' yang sangat kuat memakan patogen dan debris seperti sel darah merah yang rusak (Mader,2008).

Limpa merupakan organ multifungsi. Adanya limfosit dalam limpa, menyebabkan organ ini berperan dalam respon imun. Fungsi limpa lainnya adalah menyaring darah. Limpa dibungkus oleh kapsul jaringan ikat yang juga masuk dalam parenkim sebagai trabekula. Pulpa putih terdiri dari limfosit, tersusun sebagai *periarteriolar lymphatic sheaths* (PALS) yang mengelilingi arteri centralis (merupakan percabangan dari arteri lienalis), dan folikel limfoid. Limfosit T dan *interdigitating cells* (IDC) terdapat di PALS sedangkan limfosit B dan *follicular dendritic cell* (FDC) banyak terdapat di folikel. Folikel ini bisa mengandung senter germinal atau tidak tergantung pada tahap aktivasi sel limfosit. Selama respon imun, senter germinal akan berkembang di dalam folikel membentuk folikel sekunder (Lydyard *et al.*, 2000 ; Virella, 2008).

Pulpa merah terletak disekitar pulpa putih. Darah meninggalkan pulpa putih melalui arteria centralis menuju arteri penicillar dan kemudian mengalir ke sinus venosus. Pulpa merah tersusun atas sinus venosus yang dibatasi oleh jaringan limfoid (*splenic cords/ cords of Billroth*) yang banyak mengandung makrofag dan sel darah merah. Dari sinus, darah kembali ke sirkulasi sistemik melalui vena lienalis. Pulpa putih dan pulpa merah dibatasi oleh suatu daerah yang disebut zona marginalis yang merupakan jaringan yang lebih longgar dan mengandung makrofag dan limfosit B (Lydyard *et al.*, 2000 ; Virella, 2008).

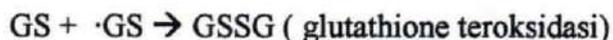
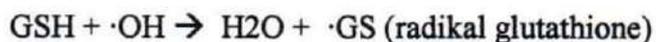
Fungsi utama limpa pada sistem imun adalah menyaring darah dengan cara menangkap antigen dalam darah (*blood-borne antigens*) dan memproduksi respon imun di dalamnya. Limpa juga merupakan tempat penyimpanan (*reservoir*) erytrosit.

Seseorang yang mengalami *splenectomy* (pengambilan limpa) mempunyai resiko yang lebih besar terhadap infeksi (Lydyard *et al.*, 2000).

## 2.2 Radikal Bebas

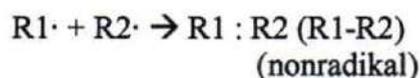
Oksidan dan radikal bebas mempunyai pengertian yang berbeda walaupun keduanya memiliki sifat yang hampir sama dan menghasilkan akibat yang sama walaupun prosesnya berbeda. Oksidan adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yaitu senyawa yang dapat menarik elektron. Sebagai contoh adalah  $Fe^{3+}$  adalah suatu oksidan pada reaksi  $Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$ . Sedangkan radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki elektron tak berpasangan (*unpaired electron*). Radikal bebas memiliki dua sifat yaitu reaktifitas tinggi karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Sifat radikal bebas yang mirip dengan oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron atau penerima elektron. Jadi setiap radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas (Suryohudoyo, 2007).

Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan dengan oksidan yang bukan radikal karena radikal bebas mempunyai reaktifitas yang tinggi dan kecenderungannya membentuk radikal baru, yang pada gilirannya apabila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*). Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal bebas itu dapat diredam. Contohnya reaksi antara radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ) dengan glutathion peroksidase (GSH) berikut :

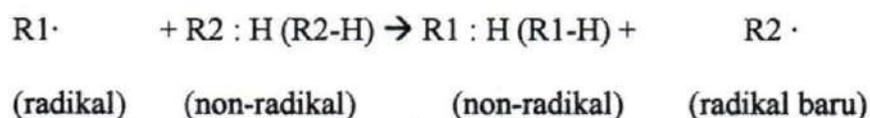


Reaksi diatas akan berhenti karena dua radikal glutathione akan bereaksi membentuk glutathione teroksidasi.

Reaktivitas radikal bebas tergantung dengan senyawa yang bereaksi dengan radikal bebas tersebut. Jika dua radikal bebas bertemu, maka mereka dapat saling menggunakan elektron tak berpasangannya menjadi senyawa non radikal melalui ikatan kovalennya.



Namun demikian bila radikal bebas bereaksi dengan non radikal, maka akan dihasilkan radikal bebas baru dan dapat menyebabkan reaksi berantai.



Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar berasal dari proses biologis alami, dan melibatkan senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species / ROS), yang berasal dari oksigen. Pada organisme aerob, oksigen diperlukan dalam proses pembentukan ATP (sumber energi) melalui fosforilasi oksidatif di mitokondria. ROS sebagian diantaranya berbentuk radikal seperti radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), radikal peroksil ( $\cdot\text{OOH}$ ), dan ion superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dan sebagian lain bukan radikal seperti singlet oksigen ( $^1\text{O}_2$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan ion hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ). ROS yang paling reaktif adalah  $\cdot\text{OH}$ . ROS dapat merusak 3 komponen penting dari sel, yaitu membran sel, protein, dan DNA. Reaksi ROS dalam

merusak membran sel disebut peroksidasi lipid (Burdon, Knippenberg, 1991 ; Suryohudoyo, 2007). Sumber radikal terbanyak dalam sistem biologis adalah dioksigen (O<sub>2</sub>) atau yang sering disebut sebagai oksigen, merupakan molekul yang sangat reaktif, dan penting untuk kehidupan organisme tingkat tinggi, walaupun dalam jumlah berlebihan sangat berbahaya, misalnya dalam kondisi reperfusi akibat iskemia. Pada saat konsentrasinya meningkat, oksigen bersifat toksik dan dapat memicu kematian sel. Toksisitas oksigen berhubungan dengan reduksi triphosphat, perubahan rantai transport elektron, deplesi glutathione dan perubahan seluler lainnya (Burdon, Knippenberg, 1991).

Daya perusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Karena reaktifitasnya yang tinggi, radikal bebas tidak stabil dan berumur sangat pendek sehingga sulit terdeteksi kecuali dengan metode khusus seperti pengukuran EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*). Radikal tertentu seperti radikal bebas vitamin E bersifat relatif stabil. Struktur molekul radikal bebas vitamin E dapat mengalami resonansi sehingga tidak terlalu reaktif dan dapat berfungsi sebagai peredam.

Diantara senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil mempunyai reaktifitas sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak, DNA dan protein struktural maupun protein fungsional.

Dalam kondisi normal, produksi radikal bebas seimbang dengan system pertahanan antioksidannya. Meskipun keseimbangan ini tidak sempurna, jumlah antioksidan tersebut cukup untuk memperbaiki kerusakan yang ditimbulkan oleh

radikal bebas yang terjadi secara terus menerus. Bila keseimbangan ini terganggu maka dapat menyebabkan stres oksidatif yang telah terbukti menyebabkan berbagai gangguan pada sistem biologis (Sies, 1991).

### 2.2.1 Kerusakan sel akibat radikal bebas

Oksidan dapat menimbulkan kerusakan sel, dan menjadi penyebab atau mendasari berbagai keadaan patologis seperti penyakit kardiovaskuler, penyakit respiratorik, gangguan sistem imun, karsinogenesis, dan dicurigai berperan dalam proses penuaan (*aging*). Oksidan dapat mengganggu integritas sel karena dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan sel, baik komponen struktural (misalnya molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen-komponen fungsional (misalnya enzim-enzim dan DNA). Oksidan yang dapat merusak sel berasal dari berbagai sumber, yaitu dari proses biologis normal namun oleh suatu sebab terdapat dalam jumlah besar; dari proses peradangan; dari luar tubuh misalnya obat-obatan dan senyawa pencemar (polutan); dan akibat radiasi.

Membran sel tersusun atas molekul fosfolipid, kolesterol dan protein. Pada membran sel, kolesterol terletak diantara rantai asam lemak fosfolipid. Adanya kolesterol menyebabkan membran menjadi lebih keras (*rigid*), sehingga jumlah kolesterol pada membran menentukan konsistensi membran sel (Junqueira, Carneiro, 2005 ; Johnson, 2008). Fosfolipid dan glikolipid membran sel mengandung asam lemak tak jenuh (asam-asam linoleat, linolenat dan arakidonat) sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil yang dapat menimbulkan reaksi rantai yang disebut peroksidasi lipid (lipid peroxidation). Akibat reaksi rantai adalah

terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain berbagai macam aldehida seperti malondialdehyda (MDA), 9-hidroksi-nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana ( $C_2H_6$ ) dan pentana ( $C_5H_{12}$ ).

Radikal bebas dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA antara lain hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tak terlalu parah maka bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*). Apabila kerusakan sangat parah misalnya DNA terputus maka kerusakan tersebut tidak dapat diperbaiki dan replikasi akan terganggu. Perbaikan DNA ini sering menimbulkan mutasi yang apabila mengenai gen-gen tertentu mutasi tersebut dapat menimbulkan kanker.

Senyawa oksigen reaktif terjadi akibat proses fisiologis dalam tubuh, namun apabila aktifitas senyawa tersebut tidak diredam akan bersifat merusak. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap oksidan adalah adanya senyawa-senyawa anti oksidan di dalam tubuh, termasuk enzim-enzim dan protein pengikat logam (Suryohudoyo, 2007). Enzim-enzim yang termasuk antioksidan adalah superoksida dismutase (SOD), catalase dan glutathione peroksidase. Beberapa enzim sangat berperan dalam perbaikan kerusakan DNA akibat ROS. Mitokondria merupakan sumber produksi ROS intraseluler dan organel yang penting untuk mempertahankan keseimbangan metabolisme tubuh. Mitokondria juga berperan penting dalam inisiasi dan promosi terjadinya kanker (Miwa *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Metode Deteksi Radikal Bebas

Keberadaan radikal bebas di dalam tubuh sulit dideteksi karena sifatnya yang sangat reaktif dan mempunyai waktu hidup sangat pendek. Oleh karena itu deteksi radikal bebas dapat dilakukan melalui dua metode yaitu langsung (*direct*) dan tidak langsung (*indirect*). Satu-satunya cara untuk deteksi dan pengukuran radikal bebas secara langsung melalui *electron spin resonance/electron paramagnetic resonance* (ESR atau EPR). Cara spektroskopi ini dapat digunakan secara langsung mendeteksi radikal bebas di dalam jaringan. Pada metode ini digunakan agen tertentu untuk menangkap (*trapping*) radikal bebas sehingga menjadi lebih stabil dan mudah dideteksi (Sachdev, Davies, 2008).

Metode lain yang digunakan untuk mendeteksi radikal bebas adalah metode tidak langsung, dimana pada metode ini dilakukan pengukuran produk akhir atau produk yang dihasilkan oleh interaksi radikal bebas dengan senyawa dalam tubuh. Sebagai contoh pengukuran hasil dari peroksidasi lipid seperti malonyldialdehyde (MDA) dalam jaringan, atau pengukuran alkana seperti etana dan pentana dalam udara yang dihembuskan (Sachdev, Davies, 2008).

Metode yang paling banyak digunakan untuk mengukur MDA adalah dengan metode thiobarbituric acid (TBA) atau thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), misalnya dengan bilirubin. Kedua metode cukup sensitif untuk mengukur terjadinya peroksidasi lipid dalam jaringan, termasuk serum atau plasma. TBA merupakan reagen yang sensitif untuk mendeteksi peroksidasi lipid, tetapi spesifitasnya rendah. Hal ini disebabkan ada bahan-bahan lain yang mengganggu dalam prosedur pemeriksaannya, misalnya glukosa, pirimidin, hemoglobin dapat

bereaksi juga dengan TBA. Beberapa bahan pengganggu ini dapat tereliminasi oleh pencucian selama proses presipitasi. Produk yang dihasilkan dari reaksi ini diukur dengan fluorometri (Burdon, Knippenberg, 1991).

Pada tabel dibawah ini harga normal MDA dalam serum pada individu normal, cenderung meningkat berdasarkan usia tetapi tidak lebih dari 4 nmol/mL. Harga normal ini, secara signifikan pada wanita cenderung lebih rendah dibanding laki-laki.

**Tabel 2.1. Peroksidasi lipid serum pada individu normal (Yagi, 1998)**

| Age (years) | Lipid peroxide level          |                               |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|
|             | Male                          | Female                        |
| ≤10         | 1.86 ± 0.60 (10)              | 2.08 ± 0.48 (8)               |
| 11–20       | 2.64 ± 0.60 (10) <sup>b</sup> | 2.64 ± 0.54 (9)               |
| 21–30       | 3.14 ± 0.56 (10)              | 2.98 ± 0.50 (9)               |
| 31–40       | 3.76 ± 0.52 (11) <sup>c</sup> | 3.06 ± 0.50 (9) <sup>d</sup>  |
| 41–50       | 3.94 ± 0.60 (11)              | 3.16 ± 0.54 (10) <sup>d</sup> |
| 51–60       | 3.92 ± 0.92 (8)               | 3.30 ± 0.74 (10)              |
| 61–70       | 3.94 ± 0.70 (10)              | 3.46 ± 0.72 (10)              |
| ≥71         | 3.76 ± 0.76 (12)              | 3.30 ± 0.78 (10)              |
| Mean        | 3.42 ± 0.94 (82)              | 3.10 ± 0.62 (75) <sup>d</sup> |

<sup>a</sup>Lipid peroxide levels were measured according to this method and expressed in terms of malondialdehyde (nmol/mL serum) Mean ± SD is given. The number of subjects is given in parentheses. Significant difference

<sup>b</sup> $p < 0.05$  vs the age group ≤10,

<sup>c</sup> $p < 0.05$  vs the age group 21–30,

<sup>d</sup> $p < 0.05$  vs the corresponding group of males.

### 2.3 Latihan Olahraga (*exercise*)

Aktifitas fisik (*physical activity*) merupakan aktifitas yang dilakukan tubuh dengan tujuan yang lebih luas dari pengembangan spesifik dari kebugaran fisik. Sedangkan latihan olahraga (*exercise*) merupakan aktifitas yang bertujuan untuk meningkatkan, mempertahankan atau menunjukkan tipe tertentu dari kebugaran fisik.

Pelatihan olahraga (*exercise training*) diartikan sebagai pelatihan yang dilakukan secara berulang, sistematis dengan suatu tujuan atau sasaran tertentu. Dari definisi tersebut menunjukkan bahwa aktifitas fisik meliputi aktifitas tubuh yang lebih luas dari olahraga. Sedangkan kebugaran fisik (*physical fitness*) merupakan keadaan fungsi tubuh yang ditandai oleh kemampuan toleransi tubuh terhadap stress akibat olahraga. Tubuh mempunyai kemampuan merespon aktifitas fisik maupun olahraga. Respon segera pada saat olahraga disebut adaptasi akut, sedangkan respon yang terjadi beberapa hari maupun beberapa minggu setelah olahraga disebut adaptasi kronik (Robergs, Keteyian, 2003).

Respon terhadap olahraga terjadi pada semua sistem biologis tubuh, misalnya pada metabolisme, sistem kardiovaskuler, sistem respirasi dan sistem neuroendokrin. Pada prinsipnya adaptasi tersebut berguna untuk mempertahankan keseimbangan (homeostasis) di dalam tubuh. Seringkali adaptasi ini menyebabkan terjadinya perubahan seluler dan morfologi yang berpotensi menyebabkan gangguan (Robergs, Keteyian, 2003 ; Kuipers, Van Breda, 2003).

Kemampuan tubuh dalam menyediakan energi untuk kontraksi otot pada latihan olahraga merupakan faktor penting. Penyediaan energi diperoleh melalui hidrolisa adenosin triphosphate (ATP). Pada reaksi ini akan menghasilkan adenosin diphosphat (ADP) dan energi. Di dalam otot, ATP tersimpan dalam jumlah kecil (5 mmol/kg berat otot), sehingga perlu aktivasi jalur metabolik lain untuk membentuk ATP. Jalur tersebut antara lain degradasi kreatinin fosfat (PCr), pemecahan glikogen otot menjadi laktat (fosforilasi tingkat substrat, tidak tergantung oksigen) dan oksidasi karbihidrat dan lemak melalui proses fosforilasi oksidatif. Latihan olahraga

dengan intensitas berat dengan durasi singkat, ATP terbentuk melalui degradasi PCr dan pemecahan glikogen otot menjadi laktat. Sedangkan pada latihan dengan durasi yang diperpanjang, pada jenis olahraga ketahanan (*endurance-type exercise*), ATP terbentuk melalui oksidasi karbohidrat dan lemak melalui fosforilasi oksidatif (Hargreaves, 2003).

Olahraga dilakukan dengan harapan dapat memberikan nilai tambah bagi kehidupan manusia. Secara biologis latihan olahraga dapat memberikan pengaruh positif (meningkatkan, memperbaiki) maupun pengaruh negatif (menghambat, merusak). Salah satu potensi pengaruh negatif terhadap fungsi biologis adalah terjadinya stres oksidatif (Harjanto, 2004).

Latihan olahraga mengandung beberapa komponen seperti modus, intensitas, durasi, ritme dan frekuensi. Modus adalah pola gerak yang spesifik dari suatu latihan seperti lari, renang, bersepeda dan sebagainya. Intensitas merupakan besaran kinerja, durasi merupakan jangka waktu lamanya latihan, ritme merupakan pola aktivitas yang berlangsung dan frekuensi merupakan jumlah kegiatan per satuan waktu (Fox, 1993).

Hal penting lain yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan hasil yang positif dari olahraga adalah cukupnya waktu pemulihan (*recovery*). Waktu pemulihan yang kurang akan menyebabkan terjadinya kondisi *overtraining*. Kondisi ini biasanya terjadi sesudah latihan olahraga yang berat jangka panjang atau terjadi bila durasi latihan ditingkatkan secara tiba-tiba. *Overtraining* menyebabkan penurunan performa, perubahan emosi dan penurunan motivasi, serta perubahan fungsi imun (Kuipers, Van Breda, 2003).

## 2.4 Pengaruh latihan olahraga terhadap sistem imun

Banyak penelitian membuktikan adanya interaksi antara stress dalam olahraga dan sistem imun. Stres pada olahraga dapat dijadikan sebagai model untuk stres fisik yang lain. Perubahan pada sistem imun akibat olahraga yang berat dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini.

**Tabel 2.2 Efek olahraga berat pada sistem imun (Pedersen, Goetz, 2000)**

|  | During Exercise | After Exercise |
|--|-----------------|----------------|
| Neutrophil count                                   | ↑               | ↑↑             |
| Monocyte count                                     |                 | ↑↑             |
| Lymphocyte count                                   | ↑               | ↓              |
| CD4+ T cell count                                  | ↑               | ↓              |
| CD8+ T cell count                                  | ↑               | ↓              |
| CD19+ B cell count                                 | ↑               | ↓              |
| CD16+56+ NK cell count                             | ↑               | ↓              |
| Lymphocyte apoptosis                               | ↑               | ↓              |
| Proliferative response to mitogens                 | ↓               | ↓              |
| Antibody response in vitro                         | ↓               | ↓              |
| Saliva IgA   | ↓               | ↓              |
| Delayed type hypersensitivity response (skin test) |                 | ↓              |
| NK cell activity                                   | ↑               | ↓              |
| Lymphokine activated killer cell activity          | ↑               | ↓              |
| C-reactive protein                                 |                 | ↑              |
| Neopterin  |                 | ↑              |
| Plasma concentration of TNF-α                      | ↑               | ↑              |
| Plasma concentration of IL-1                       | ↑               | ↑              |
| Plasma concentration of IL-6                       | ↑↑              | ↑              |
| Plasma concentration of IL-1ra                     | ↑↑              | ↑              |
| Plasma concentration of IL-10                      | ↑               | ↑              |
| Plasma concentration of TNF-R                      | ↑               | ↑              |
| Plasma concentration of MIP-1β, IL-8               |                 | ↑              |

↑, Increase; ↓, decrease; ↑↑, marked increase; TNF-α, tumor necrosis factor-α; TNF-R, tumor necrosis factor receptors; IL, interleukin; MIP, macrophage inflammatory protein.

Respon biologis terhadap stresor dapat digambarkan sebagai kurva U terbalik. Latihan fisik juga berlaku respon *hormesis* pada organisme. Dua titik pada kurva *hormesis* adalah inaktivitas dan aktivitas berlebihan (*overtraining*), keduanya akan menurunkan fungsi fisiologis (Radak *et al.*, 2008). Adaptasi positif pada tubuh didapatkan pada latihan dengan intensitas sedang dan teratur. Efek latihan olahraga

terhadap sistem imun, radikal bebas, fungsi otot, fungsi vaskuler dan penuaan mengikuti kurva *hormesis*.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa latihan olahraga yang berlebihan sesaat seperti maraton atau ultra-maraton, dan juga latihan olahraga yang berulang yang berhubungan dengan keadaan *overtraining*, akan meningkatkan angka kejadian infeksi pada saluran napas atas. Diduga pada latihan olahraga yang berlebihan menyebabkan terjadinya trauma pada jaringan antara lain otot, jaringan ikat dan tulang. Trauma tersebut akan mengaktivasi sel-sel imun lokal memproduksi sitokin tertentu. Sitokin akan merangsang limfosit T-helper *naive* (Th0) untuk berdiferensiasi menjadi limfosit T-helper 2 (Th2) yang berhubungan dengan imunitas humoral. Pada saat terjadi *up-regulation* limfosit Th2, secara bersamaan terjadi supresi limfosit Th1 yang berhubungan dengan imunitas seluler. Penekanan imunitas seluler akan memudahkan terjadinya infeksi. Metode yang sesuai untuk identifikasi *up-regulation* humoral (Th2) atau imunitas seluler (Th1), melalui pola keluarnya sitokin. Interleukin-12 (IL-12) dan IFN $\gamma$  merupakan sitokin dominan untuk Th1, dan IL-4 dan IL-10 untuk Th2. Diduga up-regulasi IL-10 menyebabkan supresi imunitas seluler. Meningkatnya konsentrasi hormon stres (glukokortikoid dan katekolamin) juga PGE2, berhubungan dengan latihan olahraga yang berlebihan, mendukung *up-regulation* Th2 (Smith, 2003).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa jenis olahraga menyebabkan perubahan pada sistem imun. Pada latihan olahraga hingga kelelahan (*exhaustive exercise*) terjadi apoptosis pada limfosit. Olahraga hingga kelelahan menginduksi terjadinya granulosis dan limfositosis yang signifikan. Satu jam

setelah olahraga, granulosit masih tetap meningkat tetapi limfosit menurun secara signifikan di bawah nilai awal (*baseline*). Akan tetapi pada olahraga yang sedang (*moderate exercise*) terjadi peningkatan granulosit, sedangkan limfosit tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara sebelum dan sesudah olahraga (Mooren *et al.*, 2003).

Konsentrasi limfosit meningkat pada saat olahraga, dan turun di bawah nilai awal sesudah aktivitas fisik dalam waktu lama. Peningkatan limfosit pada saat olahraga merupakan respon dari perpindahan limfosit dari organ limfatik ke pembuluh darah. Limpa merupakan organ limfatik sebagai tempat penyimpanan limfosit, diduga terlibat pada limfositosis akibat olahraga. Kurang lebih  $2,5 \times 10^{11}$  sel per hari mengalami sirkulasi antara darah dan pulpa limpa (Pabst, 1998 *cit.* Pedersen, Goetz, 2000). Limfosit dari organ limfatik (limpa, kelenjar getah bening dan MALT) mobilisasi ke sirkulasi selama olahraga. Jumlah sel yang masuk ke sirkulasi ditentukan oleh intensitas rangsangan. Pada olahraga dengan waktu yang lama dan atau dengan intensitas yang sangat berat, jumlah limfosit akan menurun. Mekanisme terjadinya hal tersebut disebabkan karena kurangnya sel matur yang bisa masuk ke sirkulasi, dan juga terjadinya redistribusi limfosit dari darah ke organ limfatik. Terjadinya limfopenia tergantung dari kombinasi durasi dan intensitas olahraga (Pedersen, Goetz, 2000).

Pada penelitian lain disebutkan bahwa limfositopenia setelah olahraga yang melelahkan terjadi akibat apoptosis limfosit. Analisis terjadinya nekrosis dan apoptosis pada limfosit dengan menggunakan antibodi annexin V yang merupakan golongan phosphatidylserine, menunjukkan peningkatan 50% sel apoptosis satu jam

setelah olahraga hingga kelelahan (Mooren *et al.*, 2003). Penelitian lain dengan metode TUNEL menemukan terjadinya apoptosis limfosit 63% segera setelah olahraga intensitas tinggi dan 86,2% pada 24 jam setelah olahraga. Pada penelitian ini, terjadi fragmentasi DNA pada limfosit, yang dilihat dengan gel elektroforesis (Govender *et al.*, 1998). Ekspresi reseptor kematian (*death receptor*) CD95 menunjukkan peningkatan yang signifikan setelah olahraga hingga kelelahan. Terjadinya apoptosis pada limfosit diduga diinduksi oleh 3 hal yaitu 1) peningkatan katekolamin dan kortisol setelah olahraga, 2) peningkatan konsentrasi kalsium di sitosol, dan 3) perubahan status redox akibat ROS (Mooren *et al.*, 2003).

Penelitian lain menyebutkan bahwa induksi apoptosis akibat latihan olahraga menyebabkan terjadinya limfositopenia dan menurunkan kekebalan setelah olahraga intensitas berat. Peningkatan peroksidasi lipid membran sel terjadi pada thymus dan limpa, dan penurunan konsentrasi enzim antioksidan SOD dan katalase terjadi setelah olahraga lari sampai kelelahan pada tikus (Azenabor, Goetz, 1999). Penemuan-penemuan ini mengindikasikan bahwa terjadinya apoptosis pada limfosit akibat ROS, akan menurunkan kekebalan sesudah latihan olahraga (Pedersen, Goetz, 2000).

Konsentrasi kortisol plasma meningkat hanya pada olahraga dalam waktu yang lama, sedangkan olahraga dalam waktu singkat tidak meningkatkan konsentrasi kortisol plasma. Pemberian prednisolon menyebabkan redistribusi sel dalam sirkulasi ke sumsum tulang, menurunkan lokalisasi sel ke kelenjar getah bening, dan menurunkan kemampuan limfosit melewati *high endothelial venules* /HEV (Pedersen, Goetz, 2000).

Sebagai molekul yang larut lemak, steroid secara difusi melalui membran plasma dan berikatan dengan reseptornya yang ada di sitoplasma. Kompleks steroid-reseptor translokasi ke dalam inti dan berikatan dengan daerah promotor steroid pada gen (Male *et al.*, 2006). Glukokortikoid yang berikatan dengan DNA akan mengaktifkan ekspresi gen, penekanan pada faktor transkripsi *Nuclear Factor kappa Binding* (NF- $\kappa$  B) dan *Activator Protein 1 / AP-1* (Tuckerman *et al.*, 2005).

Selain menyebabkan pengaruh langsung, steroid juga secara tidak langsung menurunkan kekebalan karena mengganggu sintesis sitokin. Pemberian steroid menyebabkan limfositopenia, yang terjadi 4-6 jam setelah olahraga dan akan kembali normal setelah 24 jam. Sel T lebih terpengaruh dibanding sel B, dan sel T CD4 lebih turun dibanding CD8. Penelitian menunjukkan sel akan redistribusi ke sumsum tulang. Steroid menghambat aktivasi dan proliferasi sel T, dimana sel T menjadi tidak respon terhadap IL-1, dan juga tidak dapat mensintesis IL-2. Steroid menghambat produksi IL-1 dan TNF $\alpha$  oleh monosit. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa baik pada konsentrasi fisiologis maupun pada pengobatan, steroid menghambat produksi sitokin tetapi berpengaruh kecil pada fungsinya. Secara *in vivo*, produksi IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  akan menurun (Male *et al.*, 2006).

**BAB 3**  
**KERANGKA**  
**KONSEPTUAL DAN**  
**HIPOTESIS PENELITIAN**

## BAB 3

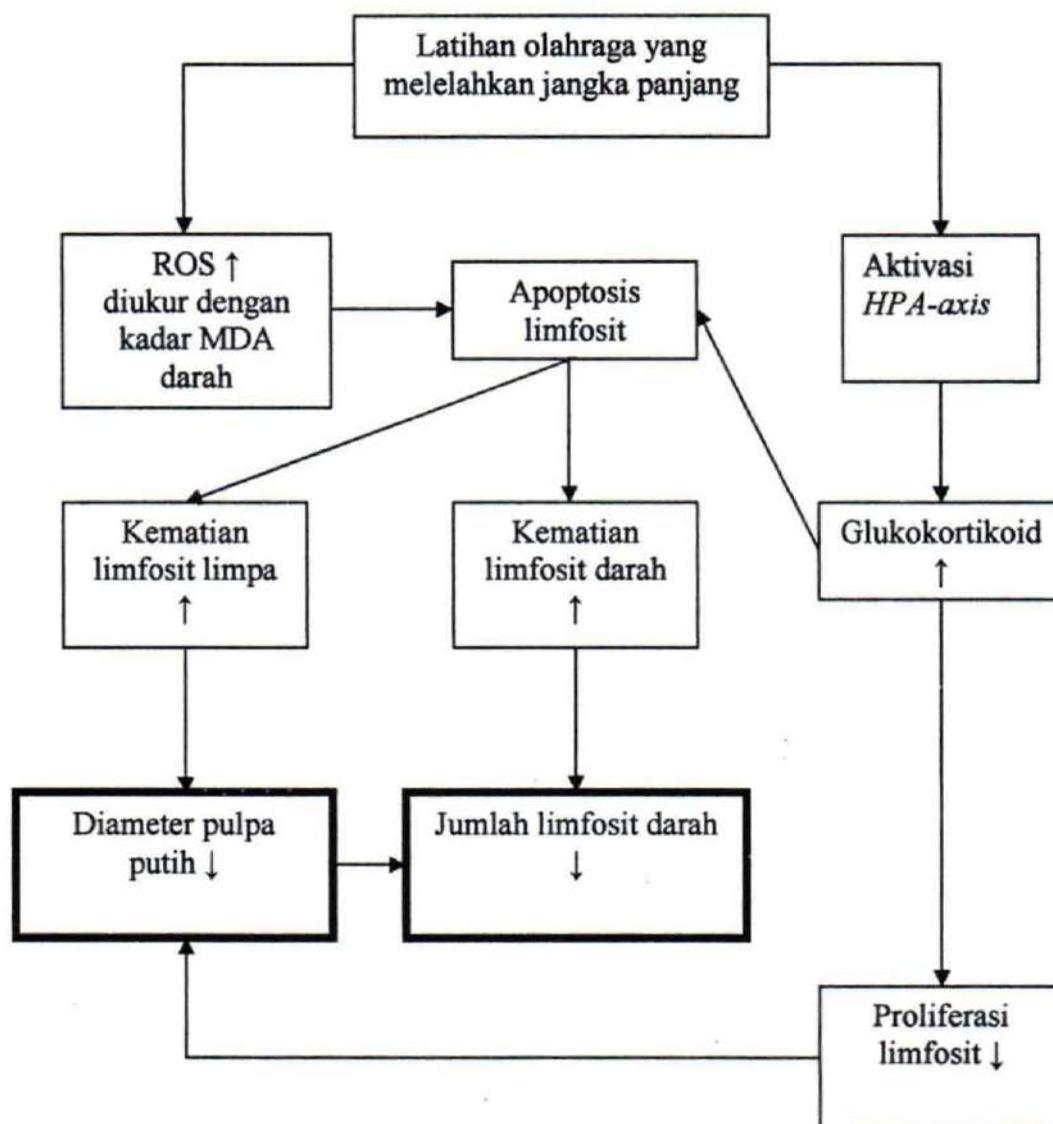
### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang merupakan salah satu model terjadinya *overtraining*, merupakan kondisi maladaptasi dan berbahaya bagi kesehatan (Ogonovszky *et al.*, 2005). Kondisi ini menyebabkan stres yang dapat mengakibatkan penurunan respon imun. Selama latihan olahraga, kebutuhan oksigen meningkat 10-15 kali dibanding saat istirahat. Pada jaringan otot kebutuhan oksigen bisa mencapai 100 kali. Otot rangka yang sangat aktif selama olahraga akan menyebabkan peningkatan ROS, sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Halliwell *and* Gutteridge, 1999). Stres oksidatif yang terjadi pada latihan olahraga berlebihan akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang dapat dilihat dengan pengukuran kadar MDA darah. (Sachdev, Davies, 2008). ROS yang meningkat akan menyebabkan apoptosis limfosit baik pada darah dan pada jaringan limfoid (Azenabor, Goetz, 1999). Apoptosis limfosit menyebabkan terjadinya penurunan jumlah limfosit dalam darah dan penurunan kekebalan (Govender *et al.*, 1998).

Stres diketahui menyebabkan pengeluaran hormon stres terutama glukokortikoid melalui aktivasi *hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis* dan catecholamin melalui aktivasi sistem saraf simpatik. Pada stress fisik, sitokin akan merangsang pengeluaran *corticotrophin releasing hormone (CRH)* dari nucleus paraventricular di hypothalamus. CRH kemudian akan merangsang hipofise anterior untuk mensekresi *adrenocorticotropin hormone (ACTH)* ke dalam sirkulasi sistemik.

ACTH ini kemudian akan menginduksi kelenjar adrenal untuk mensekresi glukokortikoid. Pada manusia glukokortikoid utama adalah kortisol, sedangkan pada rodensia adalah kortikosteron. Pada level fisiologis, glukokortikoid bersifat imunomodulator, tetapi pada level stres bersifat immunosupresan (Marketon, Glaser, 2008). Ikatan glukokortikoid dengan reseptornya di sitoplasma (GR) akan menuju inti sel dan berikatan dengan DNA yang kemudian akan mengaktifkan ekspresi gen yang menuntun proses apoptosis (Tuckerman *et al.*, 2005). Glukokortikoid juga akan menghambat proliferasi limfosit (Male *et al.*, 2006). Secara umum glukokortikoid menyebabkan penekanan pematangan, diferensiasi dan proliferasi sel pada sistem imun, salah satunya limfosit (Webster *et al.*, 2002).



Keterangan :

: Variabel yang diteliti

### 3.2 Hipotesis

1. Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang dapat menurunkan jumlah sel limfosit dalam darah.
2. Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang dapat menurunkan diameter pulpa putih limpa.

# **BAB 4**

# **METODE PENELITIAN**

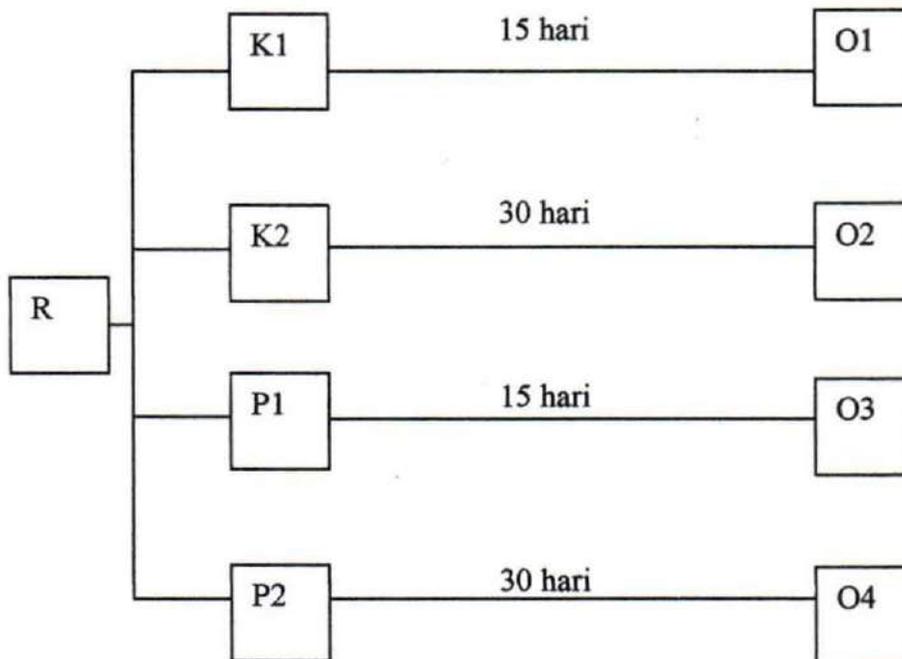
## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *true eksperimental laboratoris* dengan menggunakan rancangan *post test only control group design* (Zainuddin, 2000).

#### 4.2 Skema Rancangan Penelitian



Keterangan :

R : Randomisasi

K1 : Kelompok kontrol 15 hari

K2 : Kelompok kontrol 30 hari

P1 : Kelompok perlakuan 15 hari

P2 : Kelompok perlakuan 30 hari

O1 : Data hasil pengukuran K1

O2 : Data hasil pengukuran K2

O3 : Data hasil pengukuran P1

O4 : Data hasil pengukuran P2

### 4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, umur 3 bulan dengan berat rata-rata 160-200 gram, nampak sehat. Besar sample didapatkan dari rumus penentuan jumlah sample minimal dari Higgins dan Kleibaun (1985) yaitu sebagai berikut :

$$n = \frac{1}{1-f} \cdot \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot Sc^2}{(Xc - Xt)^2}$$

n = Besar sampel

Xc = Nilai rerata kelompok kontrol

Xt = Nilai rerata kelompok perlakuan

Sc = Simpangan baku kelompok kontrol

Z $\alpha$  dengan  $\alpha$  0,05 = 1,96

Z $\beta$  dengan  $\alpha$  0,05 = 1,28

Dari penelitian terdahulu yaitu pengaruh pemberian propolis terhadap kadar malondialdehyde darah dan ketebalan tunika intima-media arteri carotis communis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi stressor, diperoleh data rerata kadar MDA kontrol (Xc) adalah 41,6418, nilai rerata kadar MDA kelompok perlakuan (Xt) adalah

88,8661, dan nilai simpangan baku kelompok kontrol ( $S_c$ ) adalah 10,21 (Helianti, 2005). Menurut rumus tersebut dengan  $f=0,3$  diperoleh besar sampel untuk tiap kelompok minimal 2 ekor. Perhitungan replikasi dengan rumus Steel dan Torri untuk 4 kelompok, replikasi tiap kelompok adalah 7.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang

##### **4.4.2 Variabel tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

1. Jumlah limfosit darah
2. Diameter pulpa putih limpa

##### **4.4.3 Variabel antara**

Variabel antara dalam penelitian ini adalah ROS yang diukur dengan kadar MDA darah.

##### **4.4.4 Variabel kendali**

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Jenis hewan coba
2. Jenis kelamin hewan coba (jantan)
3. Umur tikus (kurang lebih 3 bulan)
4. Berat badan tikus (160-220 gram)
5. Jenis pakan yang digunakan yaitu pakan ayam pedaging berbentuk pelet dengan merk dagang BR-1

## 6. Kondisi kandang

### 4.4.5 Definisi operasional variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat di definisikan sebagai berikut:

1. Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang diberikan berupa olahraga berenang dengan intensitas maksimal yaitu menggunakan waktu maksimal kemampuan berenang tikus putih. Beban yang diberikan adalah 6% dari berat badan tikus putih yang dipasang pada ekornya (Harjanto, 2001). Tikus dipaksa berenang hingga kelelahan setiap hari selama 15 dan 30 hari (tanda kelelahan adalah bila tikus sudah tidak mau berenang lagi). Setelah berenang hingga kelelahan, tikus diangkat dari bak air kemudian dikeringkan dengan handuk dan dikembalikan lagi ke kandang.
2. ROS diukur dengan pengukuran kadar MDA serum dengan metode *thiobarbituric acid test* (TBA). Pada pemeriksaan ini darah diambil dari jantung setelah tikus dikorbankan. Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
3. Jumlah limfosit darah dihitung dengan menggunakan alat digital Cell-Dyn 3200 di Laboratorium Patologi Klinik RSUD. Dr. Soetomo-FK UNAIR.
4. Diameter pulpa putih yaitu rerata diameter pulpa putih limpa yang diukur menggunakan mikrometer dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali.
5. Jenis hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas

Kedokteran Universitas Airlangga, jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan, dengan berat badan 160-220 gram. Berat badan diukur dengan timbangan Torbal dengan satuan gram dan ketelitian satu angka di belakang koma.

6. Pakan dan minum diberikan ad libitum. Pakan berupa pakan ayam pedaging dengan merk dagang BR-1 produksi PT. Comfeed Indonesia. Minum yang diberikan adalah air mineral.

7. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

Dilakukan dalam kandang ukuran 30x40 cm yang masing-masing berisi 5 ekor hewan coba. Setelah hewan coba diberi perlakuan, maka masing-masing hewan coba akan ditaruh dalam satu kandang untuk tiap ekornya guna mengurangi bahaya morbiditas dan mortalitas. Kandang terbuat dari plastik yang ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Setiap 2 hari sekali sekam diganti untuk menjaga kebersihan kandang. Makanan yang digunakan adalah makanan hewan jenis BR-2 produksi PT Comfeed dan diberi minum air.

#### **4.5 Bahan Penelitian**

1. Bahan untuk pemeriksaan MDA : PBS, TCA 15%, TBA 0,37%
2. Bahan untuk pemeriksaan jumlah limfosit darah : tabung yang sudah mengandung EDTA (antikoagulan).
3. Bahan untuk pembuatan sediaan histologi limpa dengan pewarnaan hematoxylin eosin (H.E.) : buffer formalin 10%, alcohol, xylol, paraffin, albumin, aquadest, larutan Haemotoxylin, larutan Eosin.
4. Bahan untuk anestesi yaitu ketamin HCl, 100 mg/ml.

#### 4.6 Instrumen Penelitian

1. Alat pemeliharaan hewan (kandang, peralatan makan dan minum)
2. Peralatan perlakuan (beban, bak air, stopwatch)
3. Timbangan Torbal
4. Peralatan bedah
5. Spuit 5 cc
6. Peralatan pemeriksaan MDA (spektrofotometer)
7. Peralatan penghitungan jumlah limfosit darah
8. Peralatan pembuatan preparat histologi (*rotatoring tissue processor*, mikrotom, *water bath*, wadah untuk proses pewarnaan, gelas obyek dan tutupnya.

#### 4.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu yang digunakan kurang lebih 4 bulan dengan rincian 2 bulan untuk pendewasaan, 1 bulan waktu perlakuan, dan 1 bulan untuk pengumpulan data. Tempat penelitian di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia FK UNAIR. Tempat pemeriksaan MDA di Laboratorium Biokimia FK UNAIR, tempat pemeriksaan limfosit darah di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo- FK UNAIR dan tempat pembuatan preparat histologi di Laboratorium Histoteknik Departemen Anatomi dan Histologi FK UNAIR

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Penelitian

Seluruh hewan coba yang berumur 2 bulan ditempatkan pada kandang dan dipelihara selama 1 bulan. Setelah umur sesuai, tikus ditimbang dengan timbangan Torbal (*Torsion balance*) dengan ketelitian satu angka dibelakang koma. Berat badan

tikus selanjutnya ditimbang setiap 1 minggu untuk menyesuaikan dengan beban pada saat berenang.

#### **4.8.2 Pelaksanaan Perlakuan**

Tikus dikelompokkan secara *stratified random sampling* berdasarkan variasi berat badan dan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu :

Kelompok K1 : 7 ekor

Kelompok K2 : 7 ekor

Kelompok P1 : 7 ekor

Kelompok P3 : 7 ekor

Kelompok K adalah kelompok kontrol, sedangkan kelompok P adalah kelompok yang diberi perlakuan yaitu berenang sampai kelelahan setiap hari selama 15 hari (P1) dan 30 hari (P2).

#### **4.8.3 Etika Penelitian**

Etika penelitian pada hewan coba meliputi beberapa prinsip dasar yang mengatur perlakuan terhadap hewan coba secara terhormat. Pemeliharaan, perlakuan dan tehnik euthanasia dilakukan berdasarkan prinsip etika dan prosedur yang tepat (Smith, Mangkoewidjojo, 1988). Pada penelitian ini uji kelaikan etik diajukan pada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan dinyatakan laik etik pada tanggal 11 Januari 2010 (Lampiran 1).

#### **4.8.4 Pengorbanan Hewan Coba**

Pada penelitian ini sebelum dikorbankan hewan coba diambil darahnya. Pengambilan sample darah dan pengorbanan hewan coba dilakukan 24 jam setelah perlakuan yang terakhir (hari ke-16 dan hari ke-31). Pengambilan darah dilakukan

dengan anestesi Ketamin HCl dengan dosis 44-60 mg/kg intra muskuler, kemudian darah diambil intrakardial. Setelah pengambilan darah, hewan dikorbankan dengan cara dekapitasi (Smith, Mangkoewidjojo, 1988), kemudian diambil limpanya.

#### **4.8.5 Pengumpulan Data**

##### **1. Pemeriksaan kadar MDA serum**

Sebanyak 3-4 cc darah tanpa EDTA dimasukkan tabung reaksi dan diperiksa kadar MDA menggunakan metode TBA.

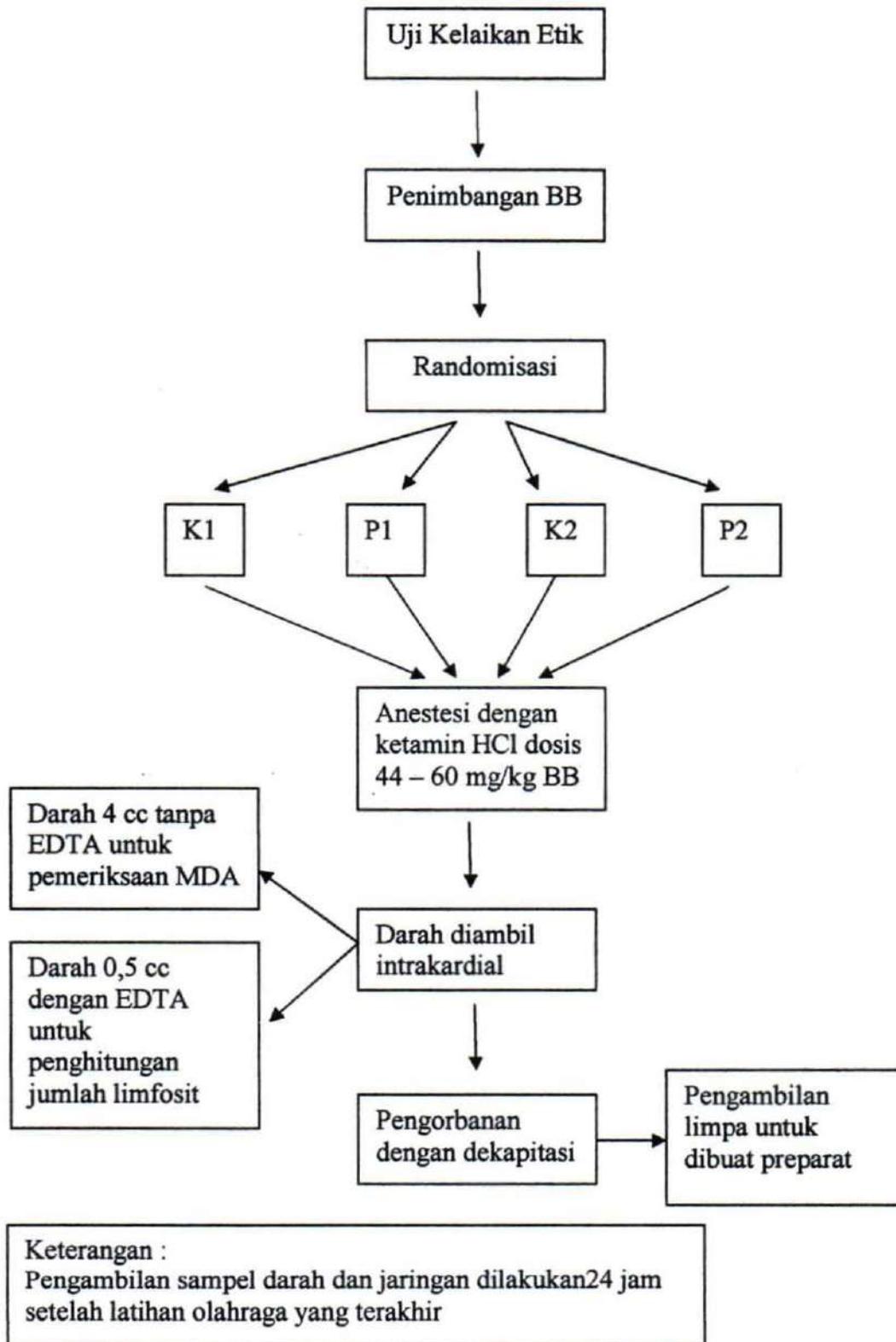
##### **2. Penghitungan jumlah limfosit darah**

Sebanyak 0,5 cc darah dimasukkan dalam tabung yang sudah ada EDTA merk BD Microtainer K2E (K<sub>2</sub>EDTA) kemudian dimasukkan ke dalam termos dan diperiksa jumlah limfosit darah dengan alat digital dalam waktu tidak lebih 2 jam sesudah pengambilan.

##### **3. Pengukuran diameter pulpa putih limpa**

Organ limpa yang diambil melalui pembedahan, dimasukkan ke dalam larutan fiksasi buffer formalin dan dilakukan proses pembuatan blok parafin. Proses selanjutnya adalah pembuatan sediaan histologi limpa dengan pewarnaan H.E. Preparat limpa kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya, dan pengukuran diameter pulpa putih dilakukan dengan micrometer pada pembesaran 100 kali. Pengukuran dilakukan pada semua pulpa putih yang tampak pada preparat limpa potongan membujur.

#### 4.9 Kerangka Operasional Penelitian



#### 4.10 Analisa Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisa dengan :

1. Uji deskriptif
2. Uji normalitas data
3. Uji homogenitas variansi
4. Uji ANOVA satu arah
5. Uji komparasi ganda (*multiple comparison*)
6. Uji korelasi antara kadar MDA dengan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa

# **BAB 5**

# **DATA DAN ANALISIS**

# **PENELITIAN**

## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Data Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, yang dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Bentuk perlakuan pada tikus putih adalah pemberian stresor dalam bentuk olahraga berenang dengan intensitas maksimal sampai kelelahan, dengan pemberian beban pada ekor sebesar 6% berat badan, selama 15 hari dan 30 hari. Berat badan tikus ditimbang tiap 3 hari sekali untuk menyesuaikan beban yang akan digunakan. Variabel dalam penelitian ini adalah kadar MDA darah (variabel antara) dan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa (variabel tergantung).

Berdasarkan hasil penelitian, data yang diperoleh dapat dideskripsikan sebagai berikut :

##### 5.1.1 Data berat badan

**Tabel 5.1 Rerata berat badan tikus putih**

| Kelompok     | Berat badan awal (gram) |                | Berat badan akhir (gram) |                |
|--------------|-------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|              | Rerata                  | Simpangan Baku | Rerata                   | Simpangan Baku |
| K1 (15 hari) | 152,00                  | 20,29          | 178,14                   | 23,10          |
| P1 (15 hari) | 150,71                  | 21,10          | 155,86                   | 20,37          |
| K2 (30 hari) | 151,29                  | 24,60          | 181,43                   | 31,45          |
| P2 (30 hari) | 153,79                  | 16,69          | 177,86                   | 14,39          |

Tabel 5.1 menunjukkan deskripsi berat badan tikus pada awal dan akhir waktu perlakuan. Pada kelompok K1 terjadi peningkatan berat badan dalam waktu 15 hari

sebesar 26,14 gram, sedangkan pada kelompok P1 peningkatan berat badan dalam waktu 15 hari sebesar 5,15 gram. Pada kelompok K2 terjadi peningkatan berat badan dalam waktu 30 hari sebesar 30,14 gram, sedangkan pada kelompok P2 peningkatan berat badan dalam waktu 30 hari sebesar 24,72 gram. Dari data tersebut peningkatan berat badan lebih banyak terjadi pada kelompok kontrol dibanding kelompok perlakuan baik dalam waktu 15 hari maupun 30 hari.

### 5.1.2 Kadar MDA darah

Tabel 5.2 Rerata kadar MDA darah tikus putih

| Kelompok | Rerata kadar MDA (nmol/ml) | Simpangan Baku |
|----------|----------------------------|----------------|
| K1       | 3,632                      | 1,731          |
| P1       | 6,483                      | 0,497          |
| K2       | 1,743                      | 0,364          |
| P2       | 6,079                      | 1,198          |

Berdasarkan deskripsi data pada tabel 5.2, menunjukkan bahwa rerata kadar MDA darah paling tinggi didapatkan pada kelompok P1 yaitu sebesar  $6,483 \pm 0,497$  nmol/ml, sedangkan rerata kadar MDA darah paling rendah pada kelompok K2 yaitu sebesar  $1,743 \pm 0,364$  nmol/ml.

### 5.1.3 Data jumlah limfosit dan leukosit darah

**Tabel 5.3 Rerata jumlah limfosit dan leukosit darah tikus putih**

| Kelompok | Rerata jumlah limfosit darah (K/ $\mu$ L) $\pm$ Simpangan Baku | Rerata jumlah leukosit darah (K/ $\mu$ L) $\pm$ Simpangan Baku |
|----------|--|--|
| K1       | 8,67 $\pm$ 2,63  | 11,53 $\pm$ 2,91   |
| P1       | 7,51 $\pm$ 3,42  | 11,87 $\pm$ 5,51   |
| K2       | 11,57 $\pm$ 2,53   | 14,57 $\pm$ 3,02   |
| P2       | 12,67 $\pm$ 5,44   | 16,02 $\pm$ 5,93   |

Hasil deskripsi pada tabel di atas menunjukkan bahwa jumlah limfosit darah paling tinggi didapatkan pada kelompok P2 yaitu 12,67  $\pm$  5,44 K/  $\mu$ L, sedangkan jumlah limfosit darah paling rendah pada kelompok P1 yaitu 7,51  $\pm$  3,42 K/  $\mu$ L. Jumlah leukosit darah paling tinggi didapatkan pada kelompok P2 yaitu 16,02  $\pm$  5,93 K/  $\mu$ L, sedangkan jumlah leukosit darah paling rendah pada kelompok K1 yaitu 11,53  $\pm$  2,91 K/  $\mu$ L.

### 5.1.4 Data diameter pulpa putih limpa

**Tabel 5.4 Rerata diameter pulpa putih limpa tikus putih**

| Kelompok | Rerata diameter pulpa putih limpa ( $\mu$ m) | Simpangan Baku |
|----------|--|----------------|
| K1       | 23,19  | 4,35           |
| P1       | 17,68  | 3,21           |
| K2       | 24,27  | 4,58           |
| P2       | 21,18  | 2,30           |

Berdasarkan hasil deskripsi pada tabel 5.4 menunjukkan bahwa rerata diameter pulpa putih limpa tikus putih paling rendah pada kelompok P1 yaitu 17,68  $\pm$  3,21  $\mu$ m, sedangkan rerata diameter pulpa putih limpa paling tinggi pada kelompok K2 yaitu 24,27  $\pm$  4,58  $\mu$ m.



## 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

### 5.2.1 Analisis data berat badan

Berdasarkan uji normalitas data dengan menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*, didapatkan bahwa semua data berat badan awal dan berat badan akhir perlakuan pada kelompok K1, P1, K2 dan P2 berdistribusi normal dengan nilai  $p > \alpha$  ( $p > 0,05$ ). Uji homogenitas variansi menunjukkan bahwa data berat badan awal (sebelum perlakuan) adalah homogen dengan nilai  $p = 0,819$  ( $p > 0,05$ ). Berdasarkan uji ANOVA satu arah tidak didapatkan perbedaan yang signifikan berat badan awal antar kelompok K1, P1, K2 dan P2 dengan nilai  $p=0,997$  ( $p > 0,05$ ).

Uji homogenitas variansi terhadap berat badan akhir perlakuan menunjukkan bahwa semua data homogen dengan nilai  $p = 0,209$  ( $p > 0,05$ ). Berdasarkan uji ANOVA satu arah tidak didapatkan perbedaan yang signifikan berat badan pada akhir perlakuan antar kelompok K1, P1, K2 dan P2 dengan nilai  $p=0,173$  ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.2 Analisis data kadar MDA darah

Uji normalitas data menunjukkan bahwa kadar MDA darah pada kelompok K1, P1, K2 dan P2 berdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Berdasarkan uji homogenitas variansi didapatkan nilai  $p=0,000$ , yang berarti data kadar MDA darah pada semua kelompok tidak homogen. Uji ANOVA satu arah menunjukkan perbedaan yang signifikan kadar MDA darah antar kelompok dengan nilai  $p=0,000$ . Selanjutnya untuk melihat kelompok yang mempunyai perbedaan bermakna digunakan uji komparasi ganda Dunnett T3 dengan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.5 Beda rerata dan signifikansi kadar MDA darah antar kelompok**

| i  | j | K1 | P1                   | K2                  | P2                   |
|----|---|----|----------------------|---------------------|----------------------|
| K1 | X |    | (-2,852)<br>p=0,021* | (1,888)<br>p=0,126  | (-2,447)<br>p=0,058  |
| P1 |   |    | X                    | (4,740)<br>p=0,000* | (0,404)<br>p=0,945   |
| K2 |   |    |                      | X                   | (-4,336)<br>p=0,000* |
| P2 |   |    |                      |                     | X                    |

i-j = beda rerata

p<0,05 : signifikan

p>0,05 : tidak signifikan

Berdasarkan tabel 5.5 di atas menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan kadar MDA darah antara kelompok K1 dengan P1, kelompok P1 dengan kelompok K2, dan kelompok K2 dengan kelompok P2. Sedangkan pada kelompok K1 dengan kelompok K2, kelompok P1 dengan kelompok P2, serta kelompok P1 dengan kelompok K2 tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.

### 5.2.3 Analisis data jumlah limfosit darah

Uji normalitas data dengan *One-Sample Kolmogorov Smirnov Test* menunjukkan bahwa data jumlah limfosit darah pada semua kelompok berdistribusi normal dengan nilai p>0,05. Uji homogenitas variansi data jumlah limfosit darah menghasilkan nilai p=0,391 (p>0,05) sehingga semua data adalah homogen. Berdasarkan uji beda dengan ANOVA satu arah menunjukkan bahwa nilai p=0,000 (p<0,05) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Uji komparasi ganda LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui pasangan kelompok yang memiliki perbedaan, didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 5.6 Beda rerata dan signifikansi jumlah limfosit darah antar kelompok**

| i | j  | K1 | P1                 | K2                  | P2                   |
|---|----|----|--------------------|---------------------|----------------------|
|   | K1 | X  | (1,160)<br>p=0,562 | (-2,904)<br>p=0,154 | (-4,004)<br>p=0,054  |
|   | P1 |    | X                  | (-4,064)<br>p=0,051 | (-5,164)<br>p=0,015* |
|   | K2 |    |                    | X                   | (-1,100)<br>p=0,583  |
|   | P2 |    |                    |                     | X                    |

$i-j$  = beda rerata

$p < 0,05$  : signifikan

$p > 0,05$  : tidak signifikan

Berdasarkan tabel 5.6 di atas menunjukkan hanya ada satu pasangan kelompok yang mempunyai beda signifikan yaitu kelompok P1 dengan kelompok P2.

#### 5.2.4 Analisis data jumlah leukosit darah

Uji normalitas data dengan *One-Sample Kolmogorov Smirnov Test* menunjukkan bahwa data jumlah leukosit darah pada semua kelompok berdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Uji homogenitas variansi data jumlah leukosit darah menghasilkan nilai  $p = 0,494$  ( $p > 0,05$ ) sehingga semua data adalah homogen. Uji ANOVA satu arah menunjukkan nilai  $p = 0,221$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti tidak ada perbedaan bermakna jumlah leukosit darah antar kelompok.

#### 5.2.5 Analisis data diameter pulpa putih limpa

Uji normalitas data dengan *One-Sample Kolmogorov Smirnov Test* menunjukkan bahwa data diameter pulpa putih limpa pada semua kelompok berdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Uji homogenitas variansi data diameter pulpa putih limpa menghasilkan nilai  $p = 0,489$  ( $p > 0,05$ ) sehingga semua data adalah

homogen. Berdasarkan uji beda dengan ANOVA satu arah menunjukkan bahwa nilai  $p=0,015$  ( $p<0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Uji komparasi ganda LSD untuk mengetahui pasangan kelompok yang memiliki perbedaan, didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 5.7** Beda rerata dan signifikansi diameter pulpa putih limpa antar kelompok

| i | j  | K1 | P1                     | K2                      | P2                    |
|---|----|----|------------------------|-------------------------|-----------------------|
|   | K1 | X  | (5,513)<br>$p=0,011^*$ | (-1,071)<br>$p=0,595$   | (2,027)<br>$p=0,319$  |
|   | P1 |    | X                      | (-6,584)<br>$p=0,003^*$ | (-3,486)<br>$p=0,093$ |
|   | K2 |    |                        | X                       | (3,099)<br>$p=0,133$  |
|   | P2 |    |                        |                         | X                     |

$i-j$  = beda rerata

$p<0,05$  : signifikan

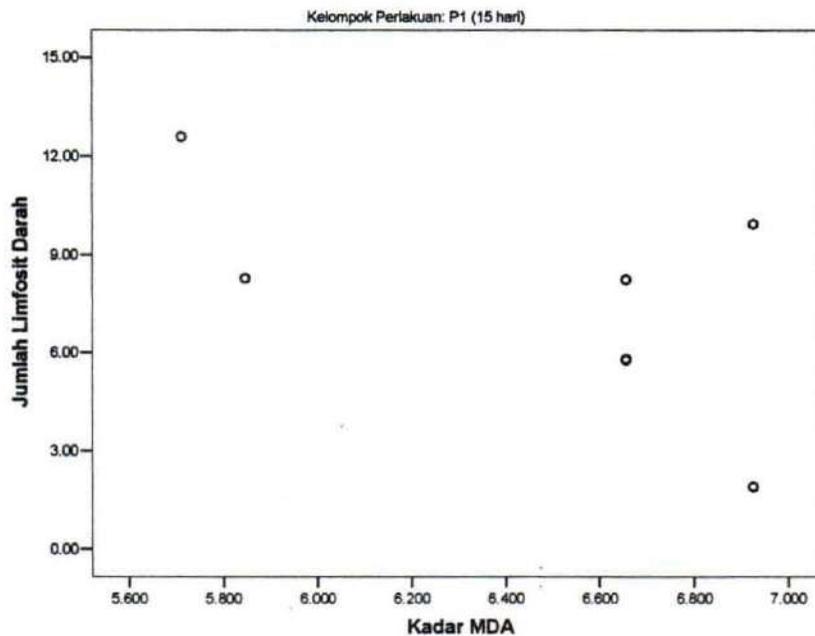
$p>0,05$  : tidak signifikan

Berdasarkan tabel di atas terdapat perbedaan bermakna diameter pulpa putih limpa antara kelompok K1 dengan kelompok P1, dan antara kelompok P1 dengan kelompok K2. Sedangkan antara kelompok K1 dengan K2, K1 dengan P2, P1 dengan P2 dan K2 dengan P2 tidak ada perbedaan bermakna.

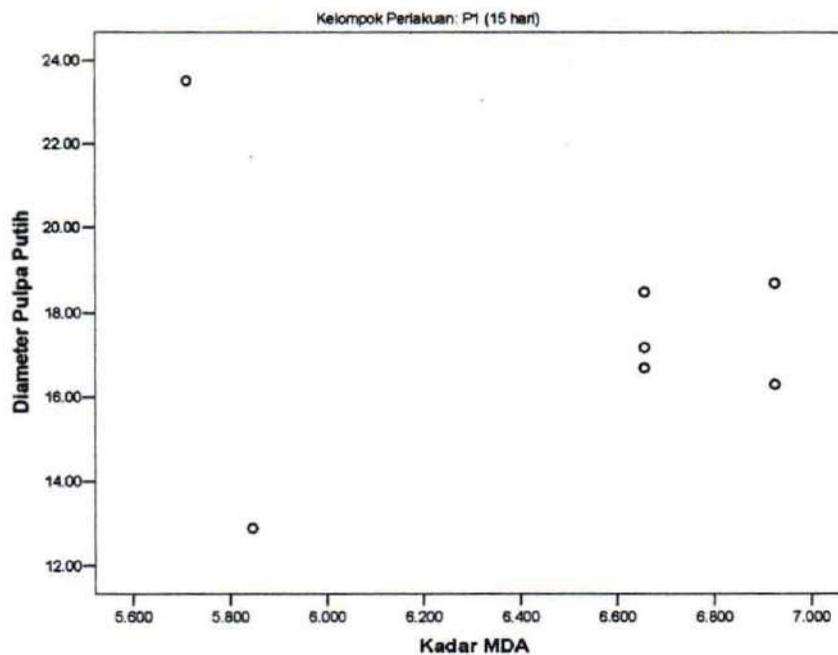
### 5.2.6 Uji korelasi kadar MDA darah dengan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih

Hasil uji korelasi pada masing-masing kelompok menunjukkan tidak ada korelasi antara perubahan kadar MDA darah dengan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa. Berdasarkan grafik korelasi, pada kelompok P1 walaupun tidak menunjukkan adanya korelasi antara kadar MDA darah dengan jumlah limfosit

darah dan diameter pulpa putih, akan tetapi pada grafik menunjukkan kecenderungan terjadinya korelasi negatif.



**Gambar 5.1** Grafik korelasi kadar MDA darah dengan jumlah limfosit darah pada kelompok P1



**Gambar 5.2** Grafik korelasi kadar MDA darah dengan diameter pulpa putih limpa pada kelompok P1

# BAB 6

# PEMBAHASAN

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Latihan olahraga (*exercise*) merupakan aktifitas yang bertujuan untuk meningkatkan, mempertahankan atau menunjukkan tipe tertentu dari kebugaran fisik. Latihan olahraga dilakukan untuk berbagai tujuan, latihan untuk prestasi atau untuk rekreasi. Latihan olahraga selain memberikan pengaruh positif juga dapat memberikan pengaruh negatif terhadap sistem biologis tubuh. Pada penelitian ini, latihan olahraga yang melelahkan berupa berenang dengan pemberian beban 6% berat badan jangka panjang dalam waktu 15 hari dan 30 hari diberikan sebagai bentuk perlakuan pada hewan coba. Pada akhir perlakuan hewan coba dikorbankan dan dilihat pengaruhnya terhadap salah satu komponen sistem kekebalan tubuh yaitu jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih pada limpa, yang merupakan salah satu organ limfatik sekunder yang terbesar dalam tubuh.

Penimbangan berat badan pada hewan coba dilakukan sebelum perlakuan dimulai, kemudian hewan coba dibagi secara random menjadi empat kelompok yaitu K1, P1, K2 dan P2. Hasil uji normalitas data dan uji homogenitas variansi terhadap berat badan sebelum perlakuan menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan uji ANOVA satu arah, tidak didapatkan perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ) berat badan sebelum perlakuan pada semua kelompok. Hasil uji statistik di atas menunjukkan bahwa randomisasi yang dilakukan sudah tepat. Penimbangan berat badan selanjutnya dilakukan setiap 3 hari sekali untuk menentukan berat beban yang akan diberikan pada masing-masing hewan coba. Setelah perlakuan (hari ke 16

dan hari ke 31) dilakukan penimbangan berat badan. Hasil uji normalitas data dan homogenitas variansi terhadap berat badan akhir menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen. Hasil ANOVA satu arah menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna berat badan akhir pada semua kelompok. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada penelitian ini latihan olahraga dalam bentuk berenang yang diberikan menggunakan intensitas maksimal, dengan beban 6% sehingga waktu berenang maksimal yang terjadi relatif singkat. Sedangkan aktifitas fisik yang telah terbukti dapat menurunkan berat badan dan meningkatkan kesehatan adalah aktivitas fisik dengan intensitas sedang (moderat), dan dilakukan berulang dalam waktu yang lebih lama (Jakicic *and* Otto, 2005). Penjelasan lain tidak adanya perbedaan yang bermakna berat badan akhir karena pada penelitian ini tidak ada pembatasan atau pengaturan pemberian makanan dan minuman sebagai sumber energi, dalam arti makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*, sehingga pada kelompok perlakuan tetap mendapatkan makanan yang cukup untuk mengganti energi yang telah digunakan untuk berenang. Walaupun demikian pada kelompok perlakuan (P1 dan P2) penambahan berat badan dari awal dan akhir perlakuan menunjukkan hasil lebih sedikit dibanding kelompok kontrol.

Latihan olahraga juga dapat menimbulkan pengaruh negatif antara lain terjadinya stres oksidatif (Harjanto, 2004). Selama latihan olahraga, kebutuhan oksigen meningkat 10-15 kali dibanding saat istirahat. Pada jaringan otot kebutuhan oksigen bisa mencapai 100 kali. Otot rangka yang sangat aktif selama olahraga akan menyebabkan peningkatan ROS, sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Halliwell *and* Gutteridge, 1999). Terjadinya stres oksidatif disebabkan karena

ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan pertahanan enzim antioksidan. Stres oksidatif akibat latihan olahraga bisa terjadi pada jaringan termasuk darah (Halliwell *and* Gutteridge, 1999). Stres oksidatif yang terjadi pada latihan olahraga berlebihan akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang dapat dilihat dengan pengukuran kadar MDA darah (Sachdev, Davies, 2008). Pada penelitian ini hasil pengukuran kadar MDA darah pada kelompok perlakuan (P1 dan P2) lebih besar dan menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding kelompok kontrol (K1 dan K2). Antara P1 dan K1 berbeda signifikan dengan  $p=0,021$ , dan antara P2 dan K2 berbeda signifikan dengan  $p=0,000$ . Hal ini dapat dijelaskan bahwa latihan olahraga yaitu berenang sampai kelelahan setiap hari dalam waktu 15 hari maupun 30 hari akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang ditunjukkan dengan tingginya kadar MDA darah yaitu  $6,483 \pm 0,497$  nmol/ml pada P1 dan  $6,079 \pm 1,198$  nmol/ml pada P2. Sedangkan antara P1 dan P2 tidak berbeda signifikan ( $p=0,945$ ), hal ini menunjukkan bahwa perbedaan waktu perlakuan latihan olahraga (15 hari dan 30 hari) tidak menyebabkan perbedaan kadar MDA (kadar MDA tetap tinggi). Hal ini juga menunjukkan bahwa pada latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang stres oksidatif tetap terjadi. Sama juga dengan pada latihan aerobik sesaat akan terjadi stres oksidatif yang ditunjukkan dengan tingginya kadar MDA darah (Harjanto, 2003).

Produksi radikal bebas pada latihan olahraga bisa disebabkan karena kebutuhan oksigen pada jaringan otot yang meningkat mencapai 100 kali. Otot rangka yang sangat aktif selama olahraga akan menyebabkan peningkatan ROS, sehingga bisa menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Halliwell *and* Gutteridge,

1999). Hal lain yang menyebabkan produksi radikal bebas meningkat karena meningkatnya aktifitas fagositosis dari sel-sel sistem imun, karena pada latihan olahraga yang berlebihan menyebabkan trauma pada jaringan otot, jaringan ikat dan tulang (Smith, 2003).

Tubuh mempunyai kemampuan merespon aktifitas fisik maupun olahraga. Respon segera pada saat olahraga disebut adaptasi akut, sedangkan respon yang terjadi beberapa hari maupun beberapa minggu setelah olahraga disebut adaptasi kronik (Robergs, Keteyian, 2003). Respon tubuh terhadap kondisi stres terjadi pada semua sistem yang disebut GAS (*General Adaptation Syndrome*), yang terdiri dari 3 fase yaitu fase terjadinya peringatan (alarm), fase resistensi dan fase kelelahan (Greenstein and Wood, 2006). Pada penelitian ini, variabel dalam sistem kekebalan tubuh yang dilihat respon adaptasinya terhadap latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang adalah jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok 15 hari (K1 dan P1) jumlah limfosit darah adalah  $8,67 \pm 2,63$  untuk K1 dan  $7,51 \pm 3,42$  untuk P1. Pada kelompok 30 hari (K2 dan P2) jumlah limfosit darah adalah  $11,57 \pm 2,53$  untuk K2 dan  $12,67 \pm 5,44$  untuk P2. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) jumlah limfosit antara kelompok kontrol dan perlakuan baik pada kelompok 15 hari maupun 30 hari, tetapi terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok P1 dan P2. Bila dibandingkan dengan harga normal jumlah limfosit darah pada tikus (Kusumawati, 2004) yaitu  $4,00 - 10,00 ( \times 10^3 / \text{mm}^3 )$ , pada kelompok hari 15 (K1 dan P1) jumlah limfosit dalam batas normal, sedangkan pada kelompok 30 hari (K2 dan P2) jumlah limfosit diatas harga normal.

Pada penelitian ini, sebagai tambahan informasi data jumlah leukosit darah juga ditampilkan. Jumlah leukosit darah untuk kelompok K1 adalah  $11,53 \pm 2,91$ , kelompok P1  $11,87 \pm 5,51$ , kelompok K2  $14,57 \pm 3,02$ , dan kelompok P2  $16,02 \pm 5,93$ . Hasil uji statistik jumlah leukosit darah pada semua kelompok tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ). Harga normal jumlah leukosit darah tikus (Kusumawati, 2004) adalah  $3,00 - 15,00 (x10^3 / mm^3)$ . Bila dibandingkan dengan harga normal, jumlah leukosit darah untuk kelompok K1, P1 dan K2 masih dalam batas normal, tetapi pada kelompok P2 menunjukkan terjadinya leukositosis (lebih tinggi dari harga normal).

Pada kelompok 15 hari jumlah limfosit darah pada kelompok perlakuan masih dalam batas normal, dapat dijelaskan karena limfosit yang diproduksi di organ limfatik primer (thymus dan sumsum tulang) melalui aliran darah akan berdistribusi ke organ limfatik sekunder atau jaringan dan secara terus menerus mengalami resirkulasi ke seluruh tubuh sampai terpapar dengan antigen (Lydyard *et al.*, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan selama 15 hari terjadi fase resistensi terhadap stres, dimana tubuh mulai melakukan adaptasi terhadap stres yang terjadi, sehingga jumlah limfosit darah walaupun lebih sedikit dibanding kelompok kontrol tetapi masih dalam batas normal. Jumlah limfosit darah yang berbeda bermakna antara kelompok P1 dan P2 menunjukkan bahwa setelah fase resistensi, apabila stres diperpanjang akan terjadi fase kelelahan dimana pada kelompok P2 terjadi limfositosis maupun leukositosis, yang merupakan salah satu indikator terjadinya efek sistemik dari adanya reaksi inflamasi. Leukositosis terjadi karena pelepasan leukosit dari sumsum tulang akibat pengaruh IL-1 dan TNF, dan seringkali juga

menyebabkan peningkatan neutrofil yang imatur (Mitchell *and* Cotran, 2003). Latihan olahraga berat menyebabkan peningkatan konsentrasi IL-1, IL-6 dan TNF $\alpha$  dalam plasma selama dan sesudah latihan (Pedersen, Goetz, 2000). Hal ini sesuai dengan teori bahwa pada kelelahan yang patologis dan *overtraining* akan terjadi perubahan sistem imun sehingga memudahkan terjadinya infeksi (Lewis *et al.*, 2010).

Diameter pulpa putih limpa pada kelompok K1 adalah  $23,19 \pm 4,35$ , kelompok P1  $17,68 \pm 3,21$ , kelompok K2  $24,27 \pm 4,58$  dan kelompok P2  $21,18 \pm 2,30$ . Hasil uji statistik diameter pulpa putih limpa menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok P1 dengan K1, dan P1 dengan K2 ( $p < 0,05$ ). Perbedaan diameter pulpa putih yang signifikan antara P1 dan K1 menunjukkan bahwa latihan olahraga sampai kelelahan jangka panjang (15 hari) disebabkan oleh kematian limfosit yang meningkat dan proliferasi yang menurun. Sedangkan pada kelompok P2 diameter pulpa putih limpa meningkat dan hampir mendekati normal menunjukkan adanya kompensasi yang merupakan respon terhadap pengaruh sitokin dalam darah. Adanya sitokin ini merangsang aktivasi sistem saraf simpatis, yang merangsang pengeluaran acetilkolin dari serat preganglioner parasimpatis pada medulla kelenjar adrenal. Hal ini akan menginduksi sekresi katekolamin (epinephrin dan norepinephrin). Peningkatan katekolamin akan meningkatkan aktivasi reseptor  $\beta_2$  adrenergic pada limfosit sehingga proliferasi limfosit pada jaringan limfatik meningkat (Marketon, Glaser, 2008). Kemungkinan lain adalah bahwa latihan olahraga dalam jangka panjang apapun tipenya, berpotensi mempengaruhi perubahan sekresi hormon melalui 3 mekanisme, yaitu : 1) merubah rangsangan yang dapat mempengaruhi keluarnya hormon; 2) merubah kemampuan sel dalam merespon

hormon; dan 3) merubah kapasitas maksimal kelenjar endokrin untuk mengeluarkan hormon (Robergs, Keteyian, 2003).

Uji korelasi antara kadar MDA darah dengan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa menunjukkan tidak adanya korelasi. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada latihan olahraga jangka panjang terjadinya perubahan pada jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa tidak hanya disebabkan oleh karena pengaruh radikal bebas tetapi ada jalur lain yang mempengaruhi yaitu pengaruh hormon stres melalui aktivasi *HPA axis* dan jalur saraf simpatis. Grafik korelasi pada kelompok P1 yang menunjuk ke arah negatif dapat diartikan bahwa stres oksidatif mempunyai pengaruh lebih besar dibanding jalur lain terhadap perubahan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa. Vider *et al.*, (2000) menyebutkan bahwa mekanisme yang mendasari perubahan respon imun seluler terhadap latihan olahraga disebabkan oleh multifaktor dan tidak hanya terkait dengan perubahan hormonal dan metabolik akibat kerja otot, tetapi juga adanya stres oksidatif akibat latihan olahraga dan perubahan ekspresi gen.

Secara garis besar dapat dijelaskan bahwa pada kelompok 15 hari, latihan olahraga yang melelahkan menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang ditunjukkan meningkatnya kadar MDA darah. Berdasarkan penelitian Karandrea *et al.* (2002) pada *long term swimming stress* dalam waktu 14 hari menyebabkan peningkatan kadar kortikosteron plasma pada tikus jantan dan betina. Dari kedua hal di atas, dapat diasumsikan bahwa keduanya bisa mempengaruhi populasi limfosit baik di darah maupun di jaringan limfatik. Meningkatnya kadar glukokortikoid dalam darah merupakan tanda adanya fase resistensi terhadap stres (Marrieb, 2007). Peran

glukokortikoid pada fase ini terhadap sel limfosit terlihat pada limpa, dimana glukokortikoid menyebabkan kematian limfosit meningkat dan proliferasi menurun, sehingga tampak bahwa diameter pulpa putih limpa pada P1 mengalami pengecilan. Sedangkan di dalam darah, jumlah limfosit pada P1 meskipun lebih sedikit dari kelompok kontrol tetapi masih dalam batas normal disebabkan karena populasi limfosit di darah bisa berasal dari organ limfatik primer maupun sekunder. Limfosit dari thymus yang bisa masuk ke sirkulasi bisa berupa limfosit imatur (sensitif terhadap kortison) maupun limfosit matur yang resisten terhadap kortison (Burmester, Pezzutto, 2003). Adanya variasi jenis limfosit inilah yang kemungkinan menyebabkan jumlah limfosit di dalam darah tidak menurun (normal).

Pada kelompok 30 hari, stres oksidatif masih terus terjadi karena kadar MDA darah masih tinggi dan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Kondisi stres yang diperpanjang bisa menyebabkan terjadinya fase kelelahan. Pada fase ini, bisa menyebabkan sel atau jaringan menjadi kelelahan dan terjadi dekompensasi terhadap stres. Terjadinya limfositosis dan leukositosis menunjukkan adanya inflamasi yang merupakan akibat tubuh tidak dapat mengkompensasi stres yang terus terjadi. Pada fase kelelahan terjadi penurunan sistem imun yang bisa menyebabkan terjadinya penyakit. Pada organ limfatik sekunder (limpa) terjadi peningkatan diameter pulpa putih mendekati normal, bisa disebabkan karena pengaruh sitokin yang meningkat dalam darah akibat leukositosis. Sitokin ini selanjutnya akan mengaktivasi reseptor  $\beta$  adrenergic pada limfosit yang menyebabkan proliferasi meningkat.

# BAB 7

# PENUTUP

## **BAB 7**

### **PENUTUP**

#### **7.1 Kesimpulan**

1. Latihan olahraga yang melelahkan dalam waktu 15 hari dan 30 hari menyebabkan peningkatan kadar MDA darah.
2. Latihan olahraga yang melelahkan dalam waktu 15 hari tidak menurunkan jumlah limfosit darah, dan dalam waktu 30 hari menyebabkan peningkatan jumlah limfosit darah.
3. Latihan olahraga yang melelahkan dalam waktu 15 hari dapat menurunkan diameter pulpa putih limpa, dan dalam waktu 30 hari terjadi peningkatan diameter pulpa putih kelompok perlakuan mendekati kelompok kontrol.
4. Latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang dalam kurun waktu yang berbeda (15 hari dan 30 hari) dapat menyebabkan modulasi sistem imun melalui perubahan jumlah limfosit darah dan diameter pulpa putih limpa.

#### **7.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi waktu yang lebih banyak untuk melihat respon adaptasi sistem imun terhadap latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui korelasi jalur hormonal dan saraf simpatis terhadap sistem imun pada latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang.

3. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh latihan olahraga yang melelahkan jangka panjang terhadap fungsi dari sel-sel pada sistem imun dengan menggunakan metode ujiantang terhadap antigen tertentu.

# DAFTAR PUSTAKA

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 1994. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B.Saunders, Philadelphia, Pp. 4 – 95,187-204.
- Azenabor AA, Goetz LH, 1999. Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocyte and splenocyte damage in acutely exercised mice. *Journal Appl Physiol*, 86, 1823-1827.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I, 2009. *Imunologi dasar*. Edisi kedelapan, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, Hal. 29-31.
- Burdon RH, Knippenberg PH, 1991. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 22, Elsevier , Amsterdam, Pp. 250-259.
- Burmester GR, Pezzutto A, 2003. *Color Atlas of immunology*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 6.
- Fox E, Bowers RW, Foss ML, 1993. *The Physiological basis for Exercise and Sports*, Fifth edition, Wm C Brown Communications Inc., Dubuque, Pp. 344-354.
- Goetz LH, Keir R, Thorne R, Houston ME, Young C, 1986. Chronic exercise stress in mice depresses splenic T lymphocyte mitogenesis in vitro. *Clin. exp. Immunol*, 66, 551-557.
- Govender MMS , Weston A, Naicker V, Chuturgoon A, 1998. High intensity exercise : a cause of lymphocyte apoptosis?. *Biochemical and biophysical research communication*, 249, Pp. 366-370.
- Greenstein B, Wood D, 2006. *The endocrine system at a glance*. Second edition, Blackwell Publishing, Massachusetts, p. 43.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition, Oxford University Press, New York, Pp. 291-296, 300-304, 625-638.
- Harjanto, 2003. *Petanda biologis dan faktor yang mempengaruhi derajat stres oksidatif pada latihan plahraga aerobik sesaat : penelitian eksperimental laboratoris*. Airlangga University Library, Surabaya.
- Harjanto, 2004. *Hubungan antara berat badan dan intensitas latihan dengan derajat stress oksidatif pada latihan olahraga aerobic sesaat*. Laporan penelitian, Puslit Olahraga Universitas Airlanga, Surabaya.

- Harjanto, Santoso KP, 2001. Penelitian Pendahuluan tentang Pengaruh Intensitas dan Durasi Latihan Renang pada Tikus Terhadap Derajat Stres Oksidatif. *Majalah Ilmu Faal Indonesia*, Vol. 1, No.1, hlm. 13-21.
- Hargreaves M, 2003. Exercise metabolism : fuels for sport. In : *Physiological bases of Sports Performance* (eds : Mark Hargreaves and John Hawley). McGraw-Hill, NSW, Pp. 27-45.
- Helianti D, 2005. Pengaruh Pemberian Propolis Terhadap Kadar Malondialdehyde Darah dan Ketebalan Tunika Intima-Media Arteri Carotis Communis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Stresor. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Jakicic JM, Otto AD, 2005. Physical activity considerations for the treatment and prevention of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 82, No. 1, Pp. 226S-229S.
- Johnson MD, 2008. *Human Biology Concepts and Current Issues*. 4<sup>th</sup> edition, Pearson Education, San Fransisco, p. 54.
- Junqueira LC, Carneiro J, 2005. *Basic Histology text and atlas*. 11<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, New York, Pp. 23-25, 30.
- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E, 2002. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology*, 75, 217-226.
- Kuipers H, Van Breda E, 2003. Overtraining. In : *Physiological bases of Sports Performance* (eds : Mark Hargreaves and John Hawley). McGraw-Hill, NSW, Pp. 108-119.
- Kusumawati D, 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta, Hal. 9.
- Lewis EJ, Howard T, Connor, FG, 2010. Overtraining. In : *Netter's Sports medicine* (eds : Christopher C. Madden, Margot Putukian, Craig C. Young, Eric C. McCarty). Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 189.
- Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW, 2000. *Instant Notes in Immunology*. BIOS Scientific Publisher, Singapore, Pp. 33-41, 46.
- Mader SS, 2008. *Human Biology*. McGraw-Hill, New York, New York, Pp. 121-139.
- Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I, 2006. *Immunology*. Seventh edition, Elsevier, Canada, Pp. 311-312.

- Marieb EN, 2007. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*. Eighth edition, Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco, p. 313.
- Marketon JIW , Glaser R, 2008. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology*, 252, 16-26.
- Mitchell RN, Cotran RS, 2003. Acute and Chronic Inflammation. In : Robbins Basic Pathology (eds : Vinay Kumar, Ramzi S. Cotran, Stanley L. Robbins). Seventh edition, Saunders, Philadelphia, Pp. 58-59.
- Miwa S, Beckman KB, Muller FL, 2008. Oxidative Stress in aging from Model System to Human Diseases (eds). Humana Press, Totowa, Pp.250-259.
- Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K, 2002. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol*, 93, Pp. 147-153.
- Nieman DC, 2007. Marathon training and immune function. *Sport Med*, 37, 4-5, p.413.
- Ogonovszky H, Sasvari M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S, Radak Z, 2005. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can. J. Appl. Physiol.* 30, 186-195.
- Pedersen BK, Goetz LH, 2000. Exercise and the Immune System: Regulation, integration and adaptation. *Physiological reviews*, Vol. 80, No. 3, Pp. 1056-1081.
- Pruett SB, 2003. Stress and the immune system. *Pathophysiology*, 9 : 146-150.
- Radak Z , Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S, 2008. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*, 7 : 39-42.
- Robergs RA, Keteyian SJ, 2003. *Fundamentals of exercise physiology for fitness, performance and health*. Second edition, McGraw-Hill, New York, Pp. 17, 201.
- Sachdev S, Davies KJA, 2008. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, p. 216.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, Hal. 54-57.

- Smith LL, 2003. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity, is this T Helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response?. *Sporta Med*, 33 (5), p.160-163.
- Suryohudoyo P, 2007. Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler. Sagung seto, Jakarta hal. 31-47.
- Taat Putra Suhartono,1999. Patologi Molekuler Kanker. Dalam: Biologi Molekuler Kedokteran (ed. Suhartono Taat Putra), edisi pertama, AUP, Surabaya, Pp.59-89.
- Tizard IR, 2009. Veterinary Immunology an Introduction. Eighth edition, Saunders, Missouri, p. 116.
- Tuckerman JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM, 2005. Molecular mechanism of glucocorticoids in control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, Vol. 42, No.1, Pp. 71-104.
- Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landor A, Karu T, Zilmer M, 2000. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*, 7, Pp. 263-270.
- Virella G, 2007. Medical Immunology. Sixth edition, Informa Healthcare USA, New York, Pp. 2-3.
- Webster JI, Tonelli L, Sternbergx EM, 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, Pp. 125-163.
- Yagi K, 1998. Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in serum or plasma. In : Methods in Molecular Biology, Free radical and antioxidant protocol (ed: Donald Amstrong). Vol. 108, Humana Press Inc., New Jersey, Pp. 105.
- Zainuddin A, 2000. Metode Penelitian. Program Pasca Sarjana Unair, Surabaya, hlm. 73-74.

# LAMPIRAN

## UJI KELAIKAN ETIK



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

**No. 01/EC/KEPK/FKUA/2010**

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**PENGARUH LATIHAN OLAH RAGA YANG MELELAHKAN JANGKA PANJANG  
TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH DAN DIAMETER PULPA PUTIH LIMPA  
Suatu Eksperimental Murni Laboratoris  
Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Jantan Strain Wistar**

PENELITI UTAMA :

**Tri Hartini Yulawati, dr (NIM: 090810160/M)**

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Laboratorium Ilmu Biokimia FK Unair, Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr.  
Soetomo dan Laboratorium Histoteknik Departemen Anatomi dan Histologi  
FK Unair**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Surabaya, 11 Januari 2010



**Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS**

**LAMPIRAN 2****PEMBUATAN SEDIAAN HISTOLOGIS DAN TEKNIK PEWARNAAN HE**Fiksasi

Organ limpa dari masing-masing binatang coba baik kelompok perlakuan maupun kontrol diambil segera setelah binatang coba dikorbankan kemudian dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan fiksasi dan diberi label sesuai dengan jenis perlakuannya, adapun tujuan fiksasi ini adalah:

Untuk mempertahankan struktur dan komponen sel seperti semula.

Untuk mencegah proses autolisis pada post mortem

Untuk mencegah proses pembusukan atau pertumbuhan bakteri/ jamur.

Larutan yang digunakan untuk proses fiksasi bisa bermacam-macam, pada penelitian ini digunakan larutan fiksasi neutral buffer formalin yang dibuat dari:

Formaldehyde 40% : 100 cc

Aquadestilata : 900 cc

Sodium hidrogen posphat monobasik ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) : 4 gr

Sodium hidrogen posphat di basik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) : 6,5 gr

Lama fiksasi yang diperlukan minimal 12 –18 jam sebelum dilakukan proses selanjutnya.

Pemrosesan jaringan / Blok parafin

Setelah fiksasi kemudian dilakukan pemrosesan jaringan , yang tahapannya terdiri dari dehidrasi, clearing, impregnasi /embedding. Dehidrasi yaitu penarikan air dari jaringan dengan perlakuan menggunakan etanol dengan konsentrasi sedikit demi sedikit dinaikan sampai konsentrasi absolut, kemudian setelah itu dilakukan clearing dengan memasukkan kedalam xylol dan kemudian dilakukan impregnasi/embedding dengan parafin. Adapun langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

Jaringan setelah di fiksasi dimasukkan kedalam larutan secara berturut-turut dibawah ini

Alkohol 70% : -

Alkohol 80% : 1 jam

Alkohol 95% : 2 jam

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Alkohol 95%             | : 1 jam |
| Alkohol 100%            | : 1 jam |
| Alkohol 100%            | : 1 jam |
| Alkohol 100%            | : 1 jam |
| Xylol                   | : 1 jam |
| Xylol                   | : 1 jam |
| Xylol                   | : 2 jam |
| Paraffin ( 56 - 58°C )  | : 2 jam |
| Paraffin ( 56 - 58° C ) | : 2 jam |
| Paraffin ( 56 - 58° C ) | : 2 jam |

Setelah proses ini dilakukan pengeblokan jaringan kedalam paraffin dengan cara sebagai berikut; pertama – tama kita siapkan alat cetak blok paraffin dan kita tempatkan pada permukaan yang rata, kemudian kita tuangkan paraffin cair (56 – 60°C) ke dalam alat cetak tersebut disusul dengan mengambil jaringan dari tahap akhir proses impregnasi dan meletakkannya kedalam cetakan yang ber isi paraffin cair tersebut serta kita tempeli label, selanjutnya kita tunggu beberapa menit sampai paraffin membeku dan kemudian kita keluarkan dari cetakan. Cara ini disebut juga dengan istilah Embedding.

#### Penyayatan dan penempelan jaringan pada gelas obyek

Proses selanjutnya adalah penyayatan jaringan untuk ditempelkan pada objek glass. Jaringan yang sudah berada dalam blok paraffin dipotong dengan menggunakan microtome dengan ketebalan 4 mikron, potongan yang berbentuk ribbon kemudian dimasukkan ke water bath dengan temperatur air antara 45 - 55° C, dengan objek glass yang telah diolesi dengan perekat albumin potongan ribbon jaringan tersebut di tempelkan pada objekglass dan dibiarkan kering pada suhu kamar, agar jaringan menempel betul pada objek glass maka dilakukan pemanasan pada oven dengan suhu 56 - 58°C selama 3 – 4 jam, setelah dikeluarkan dari oven dan dibiarkan dingin pada suhu kamar maka jaringan siap untuk diwarnai.

Pewarnaan Haematoxylin Eosin

Formula yang sering dipakai adalah formula dari Harris, Mayer, Delafield, Ehrlich, Bullard dan Bohmer.

Di laboratorium Histoteknik FK UNAIR yang dipakai adalah formula Harris.

## HARRIS'S ALUM HEMATOXYLIN

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| Hematoxylin kristal .....          | 5 gram   |
| Alkohol absolute .....             | 50 cc    |
| Ammonium atau potassium alum ..... | 100 gram |
| Aquadestilata .....                | 1000 cc  |
| Mercuric oxide .....               | 2,5 gram |

Larutkan hematoxylin dalam alkohol, dan alum dalam air kemudian panaskan. Selanjutnya campur kedua larutan tersebut, kemudian didihkan secepat mungkin. Setelah itu angkat dan tambahkan mercuric oxide perlahan-lahan. Panaskan kembali sampai berwarna ungu gelap, angkat dari api dan celup dalam wadah yang berisi air dingin. Tunggu sampai larutan menjadi dingin dan siap digunakan. Tambahkan 2 sampai 4 cc asam acetic glacial per 100 cc larutan untuk memperjelas pewarnaan pada inti. Saring larutan sebelum digunakan.

## Counterstains untuk Pewarnaan Hematoxylin

## STOCK 1% AQUEOUS EOSIN SOLUTION

|   |         |
|---|---------|
| Eosin Y, water soluble .....                        | 10 gram |
| Aquadestilata .....                                 | 1000 cc |
| Larutkan kemudian tambahkan asam cuka glacial ..... | 2 cc    |

## Bahan tambahan untuk proses pewarnaan H.E

## LARUTAN ACID ALKOHOL

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Alkohol 70% .....       | 1000 cc |
| Asam hydrochloric ..... | 10 cc   |

LARUTAN AIR AMMONIAK

Tap water/air kran ..... 1000 cc  
 Amonium hydroxide ( NH<sub>4</sub>OH) 28% ..... 2 – 3 cc

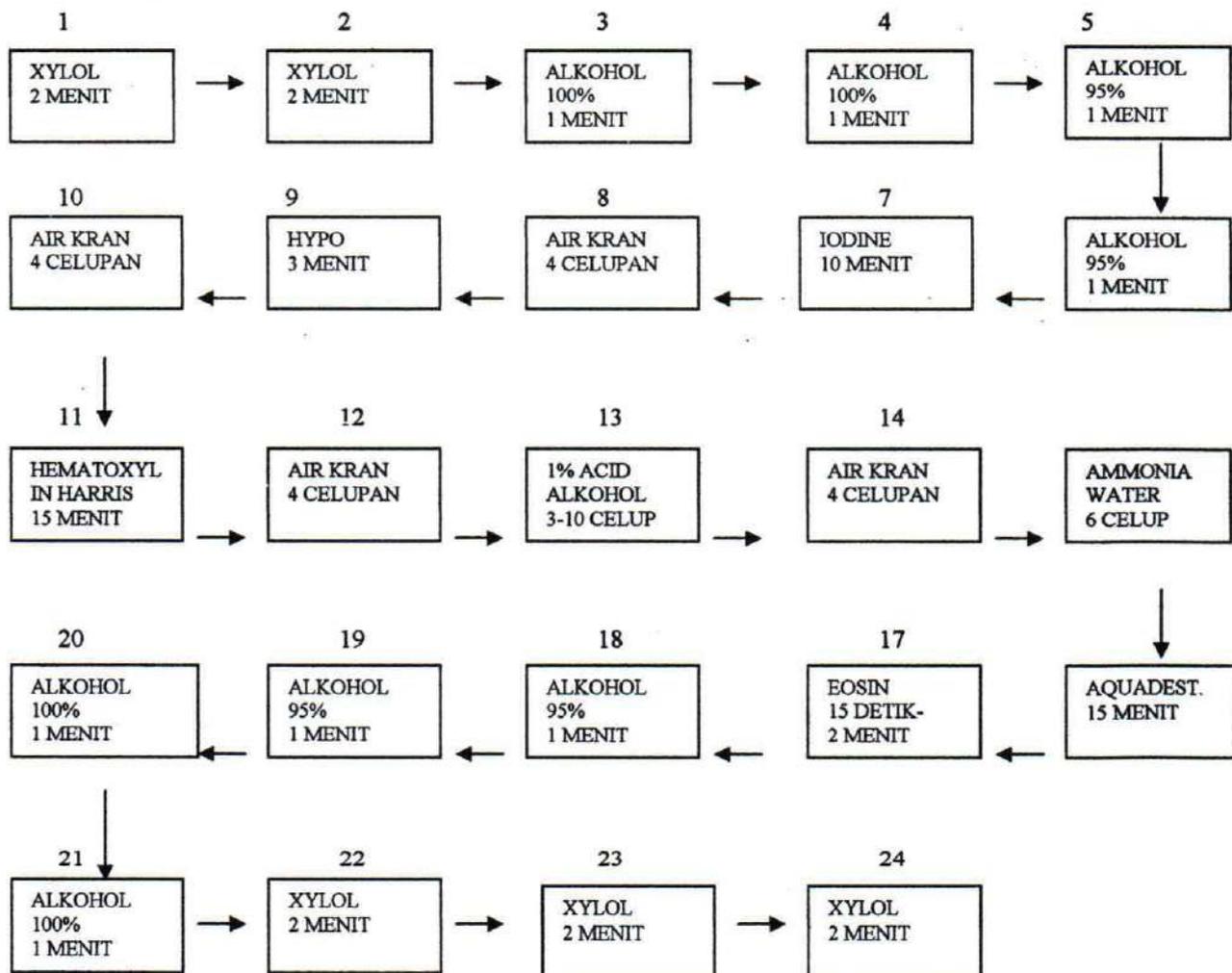
LARUTAN ALKOHOL IODINE

Kristal iodine ..... 1 gram  
 Alkohol 95% ..... 100 cc

LARUTAN SODIUM THIOSULFAT ( HYPO )

Sodium thiosulfat ..... 5 gram  
 Aquadestilata ..... 100 cc

BAGAN PROSEDUR PEWARNAAN



**KETERANGAN :**

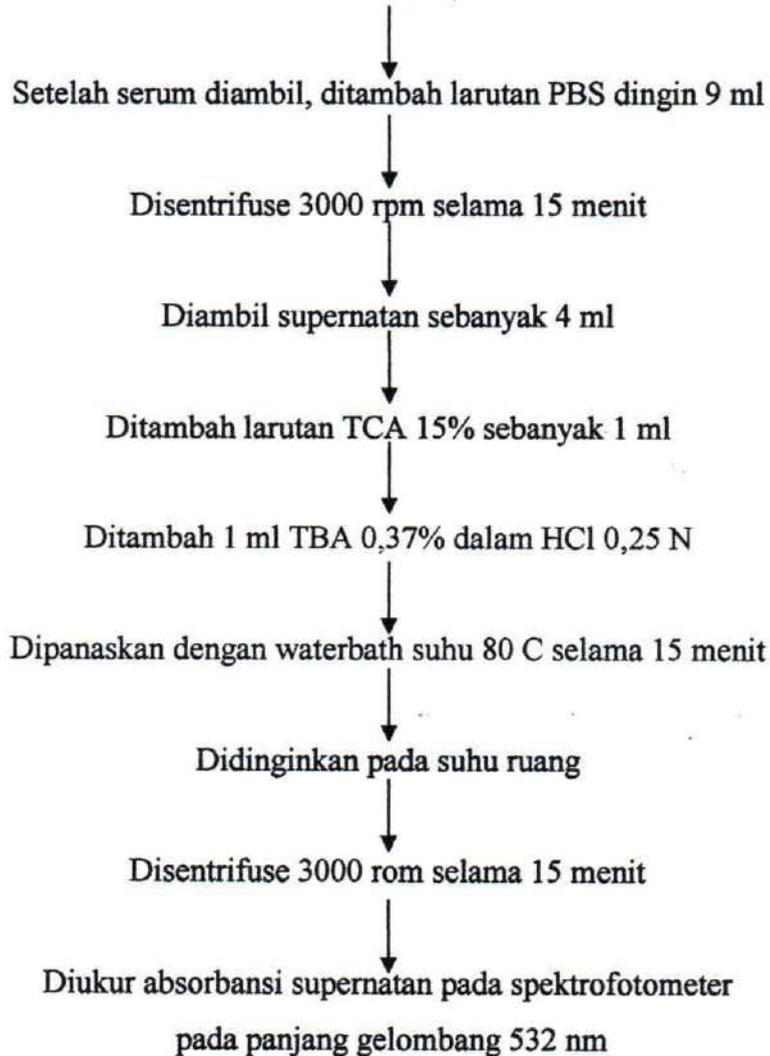
- Prosedur 7 sampai 10 digunakan apabila fiksasi yang dipakai adalah larutan Zenker
- Setelah prosedur 13 cek pada mikroskop dimana inti sel dapat dibedakan dengan latar belakang yang terang
- Prosedur 15 dilakukan sampai potongan jaringan berwarna biru cerah

**HASIL PEWARNAAN H.E :**

Inti sel akan berwarna biru, sitoplasma berwarna merah muda

**LAMPIRAN 3****PROSEDUR PEMERIKSAAN MDA**

Sampel darah diambil 3-4 cc, dimasukkan ke dalam tabung tanpa EDTA untuk diambil serumnya



## LAMPIRAN 4

## DATA HASIL PENELITIAN

| Berat Badan (gram)    | K 1 (15 hari) |               | P1(15 hari)   |               | K2 (30 hari)  |               | P2 (30 hari)  |               |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                       | Awal          | Akhir         | Awal          | Akhir         | Awal          | Akhir         | Awal          | Akhir         |
| 1                     | 150           | 182           | 170           | 129           | 182           | 210           | 168           | 205           |
| 2                     | 164           | 193           | 162           | 151           | 155           | 200           | 140           | 180           |
| 3                     | 144           | 153           | 130           | 153           | 165           | 200           | 143           | 160           |
| 4                     | 167           | 182           | 142           | 171           | 115           | 125           | 137           | 170           |
| 5                     | 117           | 144           | 167           | 177           | 162           | 195           | 168           | 185           |
| 6                     | 179           | 212           | 167           | 178           | 160           | 190           | 176           | 175           |
| 7                     | 143           | 181           | 117           | 132           | 120           | 150           | 140           | 170           |
| Rerata                | <b>152.00</b> | <b>178.14</b> | <b>150.71</b> | <b>155.86</b> | <b>151.29</b> | <b>181.43</b> | <b>153.14</b> | <b>177.86</b> |
| Perubahan BB          | K1            | P1            | K2            | P2            |               |               |               |               |
|                       | 26.14         | 5.15          | 30.14         | 24.72         |               |               |               |               |
| Berat Limpa (gram)    | K1            | P1            | K2            | P2            |               |               |               |               |
| 1                     | 0.9563        | 0.3832        | 0.7770        | 0.7583        |               |               |               |               |
| 2                     | 0.6108        | 0.6777        | 0.7673        | 0.77          |               |               |               |               |
| 3                     | 0.6058        | 0.713         | 0.676         | 0.7369        |               |               |               |               |
| 4                     | 0.7083        | 0.7262        | 0.5957        | 0.6845        |               |               |               |               |
| 5                     | 0.5191        | 0.8202        | 0.6435        | 0.8232        |               |               |               |               |
| 6                     | 0.8195        | 0.4128        | 0.7509        | 0.8131        |               |               |               |               |
| 7                     | 1.028         | 0.8603        | 0.6924        | 0.9969        |               |               |               |               |
| Rerata                | <b>0.75</b>   | <b>0.66</b>   | <b>0.70</b>   | <b>0.80</b>   |               |               |               |               |
| Kadar MDA             | K1            | P1            | K2            | P2            |               |               |               |               |
| 1                     | 2.071         | 6.926         | 2.071         | 7.871         |               |               |               |               |
| 2                     | 1.531         | 5.847         | 2.071         | 4.633         |               |               |               |               |
| 3                     | 1.936         | 5.712         | 1.531         | 4.768         |               |               |               |               |
| 4                     | 4.229         | 6.657         | 1.531         | 6.657         |               |               |               |               |
| 5                     | 4.768         | 6.657         | 2.206         | 6.657         |               |               |               |               |
| 6                     | 5.308         | 5.578         | 1.261         | 5.308         |               |               |               |               |
| 7                     | 5.578         | 6.926         | 1.531         | 6.657         |               |               |               |               |
| Rerata                | <b>3.63</b>   | <b>6.33</b>   | <b>1.74</b>   | <b>6.08</b>   |               |               |               |               |
| Jumlah Limfosit Darah | K1            | P1            | K2            | P2            |               |               |               |               |
| 1                     | 7.98          | 1.9           | 15.9          | 15.6          |               |               |               |               |
| 2                     | 7.94          | 8.28          | 12.2          | 15.8          |               |               |               |               |
| 3                     | 8.68          | 12.6          | 13.7          | 1.39          |               |               |               |               |
| 4                     | 10.9          | 5.81          | 9.14          | 10.6          |               |               |               |               |
| 5                     | 6.52          | 8.24          | 9.05          | 12.6          |               |               |               |               |
| 6                     | 5.44          | 5.77          | 10.2          | 16.7          |               |               |               |               |
| 7                     | 13.2          | 9.94          | 10.8          | 16            |               |               |               |               |
| Rerata                | <b>8.67</b>   | <b>7.51</b>   | <b>11.57</b>  | <b>12.67</b>  |               |               |               |               |

| <b>Diameter Pulpa Putih</b> | K1           | P1           | K2           | P2           |  |  |  |  |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|--|--|--|
| 1                           | 23.32        | 18.7         | 20.99        | 19.1         |  |  |  |  |
| 2                           | 30.04        | 12.89        | 29.26        | 19.15        |  |  |  |  |
| 3                           | 15.44        | 23.52        | 28.37        | 21.19        |  |  |  |  |
| 4                           | 22.01        | 17.18        | 23.65        | 22           |  |  |  |  |
| 5                           | 25.39        | 16.69        | 27.95        | 22.32        |  |  |  |  |
| 6                           | 23.41        | 18.49        | 22.97        | 19.11        |  |  |  |  |
| 7                           | 22.75        | 16.3         | 16.67        | 25.3         |  |  |  |  |
| <b>Rerata</b>               | <b>23.19</b> | <b>17.68</b> | <b>24.27</b> | <b>21.17</b> |  |  |  |  |
|                             |              |              |              |              |  |  |  |  |
| <b>Jumlah leukosit drh</b>  | K1           | P1           | K2           | P2           |  |  |  |  |
| 1                           | 10.7         | 3.18         | 18.7         | 20.1         |  |  |  |  |
| 2                           | 10.6         | 12.3         | 16.2         | 18.1         |  |  |  |  |
| 3                           | 11.5         | 17.6         | 17.5         | 3.61         |  |  |  |  |
| 4                           | 14.2         | 8.8          | 10.6         | 14.5         |  |  |  |  |
| 5                           | 8.23         | 11.1         | 11.5         | 15.8         |  |  |  |  |
| 6                           | 8.95         | 10.4         | 13.8         | 21           |  |  |  |  |
| 7                           | 16.5         | 19.7         | 13.7         | 19           |  |  |  |  |
| <b>Rerata</b>               | <b>11.53</b> | <b>11.87</b> | <b>14.57</b> | <b>16.02</b> |  |  |  |  |

## LAMPIRAN 5

## HASIL UJI STATISTIK

## 1. Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| Kelompok Perakuan      |                                  |                | Berat Badan Awal (gram) | Berat Badan Akhir (gram) | Berat Limpa (gram) | Jumlah Leukosit Darah |
|------------------------|----------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| K1 (15 hari)           | N                                |                | 7                       | 7                        | 7                  | 7                     |
|                        | Normal Parameters <sup>a,b</sup> | Mean           | 152.00                  | 178.14                   | .749686            | 11.5257               |
|                        |                                  | Std. Deviation | 20.298                  | 23.104                   | .1914407           | 2.91350               |
|                        | Most Extreme Differences         | Absolute       | .186                    | .263                     | .194               | .218                  |
|                        |                                  | Positive       | .111                    | .148                     | .194               | .218                  |
|                        |                                  | Negative       | -.186                   | -.263                    | -.145              | -.129                 |
|                        | Kolmogorov-Smirnov Z             |                | .492                    | .697                     | .515               | .576                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed) |                                  | .969           | .716                    | .954                     | .894               |                       |
| P1 (15 hari)           | N                                |                | 7                       | 7                        | 7                  | 7                     |
|                        | Normal Parameters <sup>a,b</sup> | Mean           | 150.71                  | 155.86                   | .656029            | 11.8686               |
|                        |                                  | Std. Deviation | 21.101                  | 20.367                   | .1877810           | 5.50790               |
|                        | Most Extreme Differences         | Absolute       | .275                    | .200                     | .260               | .183                  |
|                        |                                  | Positive       | .180                    | .165                     | .188               | .183                  |
|                        |                                  | Negative       | -.275                   | -.200                    | -.260              | -.146                 |
|                        | Kolmogorov-Smirnov Z             |                | .728                    | .529                     | .688               | .484                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed) |                                  | .665           | .942                    | .730                     | .973               |                       |
| K2 (30 hari)           | N                                |                | 7                       | 7                        | 7                  | 7                     |
|                        | Normal Parameters <sup>a,b</sup> | Mean           | 151.29                  | 181.43                   | .700400            | 14.5714               |
|                        |                                  | Std. Deviation | 24.602                  | 31.453                   | .0680104           | 3.02309               |
|                        | Most Extreme Differences         | Absolute       | .274                    | .322                     | .200               | .172                  |
|                        |                                  | Positive       | .184                    | .182                     | .130               | .172                  |
|                        |                                  | Negative       | -.274                   | -.322                    | -.200              | -.134                 |
|                        | Kolmogorov-Smirnov Z             |                | .726                    | .851                     | .528               | .455                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed) |                                  | .668           | .464                    | .943                     | .986               |                       |
| P2 (30 hari)           | N                                |                | 7                       | 7                        | 7                  | 7                     |
|                        | Normal Parameters <sup>a,b</sup> | Mean           | 153.14                  | 177.86                   | .797557            | 16.0157               |
|                        |                                  | Std. Deviation | 16.698                  | 14.392                   | .0994974           | 5.93044               |
|                        | Most Extreme Differences         | Absolute       | .300                    | .167                     | .255               | .256                  |
|                        |                                  | Positive       | .300                    | .167                     | .255               | .200                  |
|                        |                                  | Negative       | -.242                   | -.150                    | -.128              | -.256                 |
|                        | Kolmogorov-Smirnov Z             |                | .793                    | .442                     | .676               | .678                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed) |                                  | .556           | .990                    | .751                     | .747               |                       |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| Kelompok<br>Perlakuan |                             | Kadar MDA      | Jumlah<br>Limfosit<br>Darah | Diameter<br>Pulpa Putih |         |
|-----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|---------|
| K1 (15 hari) N        |                             | 7              | 7                           | 7                       |         |
|                       | Normal Parameters           | Mean           | 3.63157                     | 8.6657                  | 23.1943 |
|                       |                             | Std. Deviation | 1.730613                    | 2.63180                 | 4.34887 |
|                       | Most Extreme<br>Differences | Absolute       | .245                        | .212                    | .250    |
|                       |                             | Positive       | .245                        | .212                    | .195    |
|                       |                             | Negative       | -.206                       | -.110                   | -.250   |
|                       | Kolmogorov-Smirnov Z        | .648           | .561                        | .661                    |         |
|                       | Asymp. Sig. (2-tailed)      | .795           | .911                        | .775                    |         |
| P1 (15 hari) N        |                             | 7              | 7                           | 7                       |         |
|                       | Normal Parameters           | Mean           | 6.48314                     | 7.5057                  | 17.6814 |
|                       |                             | Std. Deviation | .497035                     | 3.42365                 | 3.21146 |
|                       | Most Extreme<br>Differences | Absolute       | .351                        | .163                    | .233    |
|                       |                             | Positive       | .186                        | .125                    | .233    |
|                       |                             | Negative       | -.351                       | -.163                   | -.191   |
|                       | Kolmogorov-Smirnov Z        | .929           | .432                        | .616                    |         |
|                       | Asymp. Sig. (2-tailed)      | .354           | .992                        | .843                    |         |
| K2 (30 hari) N        |                             | 7              | 7                           | 7                       |         |
|                       | Normal Parameters           | Mean           | 1.74314                     | 11.5700                 | 24.2657 |
|                       |                             | Std. Deviation | .364393                     | 2.53008                 | 4.57976 |
|                       | Most Extreme<br>Differences | Absolute       | .291                        | .191                    | .218    |
|                       |                             | Positive       | .291                        | .191                    | .138    |
|                       |                             | Negative       | -.244                       | -.160                   | -.218   |
|                       | Kolmogorov-Smirnov Z        | .770           | .505                        | .577                    |         |
|                       | Asymp. Sig. (2-tailed)      | .593           | .960                        | .893                    |         |
| P2 (30 hari) N        |                             | 7              | 7                           | 7                       |         |
|                       | Normal Parameters           | Mean           | 6.07871                     | 12.6700                 | 21.1671 |
|                       |                             | Std. Deviation | 1.198443                    | 5.43507                 | 2.29774 |
|                       | Most Extreme<br>Differences | Absolute       | .257                        | .277                    | .239    |
|                       |                             | Positive       | .172                        | .229                    | .239    |
|                       |                             | Negative       | -.257                       | -.277                   | -.184   |
|                       | Kolmogorov-Smirnov Z        | .679           | .732                        | .631                    |         |
|                       | Asymp. Sig. (2-tailed)      | .746           | .658                        | .820                    |         |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## 2. Uji Homogenitas Variansi dan Anova Berat Badan

## Oneway

## Descriptives

## Berat Badan Awal (gram)

|              | N  | Mean   | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|--------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|              |    |        |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| K1 (15 hari) | 7  | 152.00 | 20.298         | 7.672      | 133.23                           | 170.77      | 117     | 179     |
| P1 (15 hari) | 7  | 150.71 | 21.101         | 7.975      | 131.20                           | 170.23      | 117     | 170     |
| K2 (30 hari) | 7  | 151.29 | 24.602         | 9.299      | 128.53                           | 174.04      | 115     | 182     |
| P2 (30 hari) | 7  | 153.14 | 16.698         | 6.311      | 137.70                           | 168.59      | 137     | 176     |
| Total        | 28 | 151.79 | 19.693         | 3.722      | 144.15                           | 159.42      | 115     | 182     |

## Test of Homogeneity of Variances

## Berat Badan Awal (gram)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .309             | 3   | 24  | .819 |

## ANOVA

## Berat Badan Awal (gram)

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F    | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 23.000         | 3  | 7.667       | .018 | .997 |
| Within Groups  | 10447.714      | 24 | 435.321     |      |      |
| Total          | 10470.714      | 27 |             |      |      |

## Descriptives

## Berat Badan Akhir (gram)

|              | N  | Mean   | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|--------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|              |    |        |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| K1 (15 hari) | 7  | 178.14 | 23.104         | 8.733      | 156.77                           | 199.51      | 144     | 212     |
| P1 (15 hari) | 7  | 155.86 | 20.367         | 7.698      | 137.02                           | 174.69      | 129     | 178     |
| K2 (30 hari) | 7  | 181.43 | 31.453         | 11.888     | 152.34                           | 210.52      | 125     | 210     |
| P2 (30 hari) | 7  | 177.86 | 14.392         | 5.440      | 164.55                           | 191.17      | 160     | 205     |
| Total        | 28 | 173.32 | 24.169         | 4.568      | 163.95                           | 182.69      | 125     | 212     |

**Test of Homogeneity of Variances**

Berat Badan Akhir (gram)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.629            | 3   | 24  | .209 |

**ANOVA**

Berat Badan Akhir (gram)

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 2901.821       | 3  | 967.274     | 1.804 | .173 |
| Within Groups  | 12870.286      | 24 | 536.262     |       |      |
| Total          | 15772.107      | 27 |             |       |      |

## 3. Uji Homogenitas Variansi Kadar MDA, jumlah limfosit dan diameter pulpa putih

**Descriptives**

|                       | N            | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |       |
|-----------------------|--------------|------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|-------|
|                       |              |      |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |       |
| Kadar MDA             | K1 (15 hari) | 7    | 3.63157        | 1.730613   | .654110                          | 2.03102     | 5.23212 | 1.531   | 5.578 |
|                       | P1 (15 hari) | 7    | 6.48314        | .497035    | .187862                          | 6.02346     | 6.94282 | 5.712   | 6.926 |
|                       | K2 (30 hari) | 7    | 1.74314        | .364393    | .137728                          | 1.40614     | 2.08015 | 1.261   | 2.206 |
|                       | P2 (30 hari) | 7    | 6.07871        | 1.198443   | .452969                          | 4.97034     | 7.18709 | 4.633   | 7.871 |
|                       | Total        | 28   | 4.48414        | 2.213737   | .418357                          | 3.62575     | 5.34254 | 1.261   | 7.871 |
| Jumlah Limfosit Darah | K1 (15 hari) | 7    | 8.6657         | 2.63180    | .99473                           | 6.2317      | 11.0997 | 5.44    | 13.20 |
|                       | P1 (15 hari) | 7    | 7.5057         | 3.42365    | 1.29402                          | 4.3394      | 10.6721 | 1.90    | 12.60 |
|                       | K2 (30 hari) | 7    | 11.5700        | 2.53008    | .95628                           | 9.2301      | 13.9099 | 9.05    | 15.90 |
|                       | P2 (30 hari) | 7    | 12.6700        | 5.43507    | 2.05426                          | 7.6434      | 17.6966 | 1.39    | 16.70 |
|                       | Total        | 28   | 10.1029        | 4.08433    | .77187                           | 8.5191      | 11.6866 | 1.39    | 16.70 |
| Diameter Pulpa Putih  | K1 (15 hari) | 7    | 23.1943        | 4.34887    | 1.64372                          | 19.1722     | 27.2163 | 15.44   | 30.04 |
|                       | P1 (15 hari) | 7    | 17.6814        | 3.21146    | 1.21382                          | 14.7113     | 20.6515 | 12.89   | 23.52 |
|                       | K2 (30 hari) | 7    | 24.2657        | 4.57976    | 1.73099                          | 20.0301     | 28.5013 | 16.67   | 29.26 |
|                       | P2 (30 hari) | 7    | 21.1671        | 2.29774    | .86846                           | 19.0421     | 23.2922 | 19.10   | 25.30 |
|                       | Total        | 28   | 21.5771        | 4.34271    | .82070                           | 19.8932     | 23.2611 | 12.89   | 30.04 |

**Test of Homogeneity of Variances**

|                       | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|------------------|-----|-----|------|
| Kadar MDA             | 15.378           | 3   | 24  | .000 |
| Jumlah Limfosit Darah | 1.044            | 3   | 24  | .391 |
| Diameter Pulpa Putih  | .832             | 3   | 24  | .489 |

**ANOVA**

|                       |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|-----------------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Kadar MDA             | Between Groups | 103.450        | 3  | 34.483      | 28.670 | .000 |
|                       | Within Groups  | 28.867         | 24 | 1.203       |        |      |
|                       | Total          | 132.317        | 27 |             |        |      |
| Jumlah Limfosit Darah | Between Groups | 122.873        | 3  | 40.958      | 3.001  | .050 |
|                       | Within Groups  | 327.534        | 24 | 13.647      |        |      |
|                       | Total          | 450.407        | 27 |             |        |      |
| Diameter Pulpa Putih  | Between Groups | 176.318        | 3  | 58.773      | 4.237  | .015 |
|                       | Within Groups  | 332.880        | 24 | 13.870      |        |      |
|                       | Total          | 509.197        | 27 |             |        |      |

## 4. Uji Komparasi Ganda

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar MDA

Dunnnett T3

| (I) Kelompok Perlakuan | (J) Kelompok Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                        |                        |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| K1 (15 hari)           | P1 (15 hari)           | -2.851571*            | .680553    | .021 | -5.22796                | -.47519     |
|                        | K2 (30 hari)           | 1.888429              | .668453    | .126 | -.49362                 | 4.27047     |
|                        | P2 (30 hari)           | -2.447143             | .795639    | .058 | -4.96042                | .06613      |
| P1 (15 hari)           | K1 (15 hari)           | 2.851571*             | .680553    | .021 | .47519                  | 5.22796     |
|                        | K2 (30 hari)           | 4.740000*             | .232940    | .000 | 4.00825                 | 5.47175     |
|                        | P2 (30 hari)           | .404429               | .490380    | .945 | -1.24533                | 2.05419     |
| K2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | -1.888429             | .668453    | .126 | -4.27047                | .49362      |
|                        | P1 (15 hari)           | -4.740000*            | .232940    | .000 | -5.47175                | -4.00825    |
|                        | P2 (30 hari)           | -4.335571*            | .473444    | .000 | -5.98082                | -2.69032    |
| P2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | 2.447143              | .795639    | .058 | -.06613                 | 4.96042     |
|                        | P1 (15 hari)           | -.404429              | .490380    | .945 | -2.05419                | 1.24533     |
|                        | K2 (30 hari)           | 4.335571*             | .473444    | .000 | 2.69032                 | 5.98082     |

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Multiple Comparisons

LSD

| Dependent Variable    | (I) Kelompok Perlakuan | (J) Kelompok Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                       |                        |                        |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| Jumlah Limfosit Darah | K1 (15 hari)           | P1 (15 hari)           | 1.16000               | 1.97464    | .562 | -2.9155                 | 5.2355      |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | -2.90429              | 1.97464    | .154 | -6.9797                 | 1.1712      |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | -4.00429              | 1.97464    | .054 | -8.0797                 | .0712       |
|                       | P1 (15 hari)           | K1 (15 hari)           | -1.16000              | 1.97464    | .562 | -5.2355                 | 2.9155      |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | -4.06429              | 1.97464    | .051 | -8.1397                 | .0112       |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | -5.16429*             | 1.97464    | .015 | -9.2397                 | -1.0888     |
|                       | K2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | 2.90429               | 1.97464    | .154 | -1.1712                 | 6.9797      |
|                       |                        | P1 (15 hari)           | 4.06429               | 1.97464    | .051 | -.0112                  | 8.1397      |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | -1.10000              | 1.97464    | .583 | -5.1755                 | 2.9755      |
|                       | P2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | 4.00429               | 1.97464    | .054 | -.0712                  | 8.0797      |
|                       |                        | P1 (15 hari)           | 5.16429*              | 1.97464    | .015 | 1.0888                  | 9.2397      |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | 1.10000               | 1.97464    | .583 | -2.9755                 | 5.1755      |
| Diameter Pulpa Putih  | K1 (15 hari)           | P1 (15 hari)           | 5.51286*              | 1.99069    | .011 | 1.4043                  | 9.6214      |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | -1.07143              | 1.99069    | .595 | -5.1800                 | 3.0372      |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | 2.02714               | 1.99069    | .319 | -2.0814                 | 6.1357      |
|                       | P1 (15 hari)           | K1 (15 hari)           | -5.51286*             | 1.99069    | .011 | -9.6214                 | -1.4043     |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | -6.58429*             | 1.99069    | .003 | -10.6929                | -2.4757     |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | -3.48571              | 1.99069    | .093 | -7.5943                 | .6229       |
|                       | K2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | 1.07143               | 1.99069    | .595 | -3.0372                 | 5.1800      |
|                       |                        | P1 (15 hari)           | 6.58429*              | 1.99069    | .003 | 2.4757                  | 10.6929     |
|                       |                        | P2 (30 hari)           | 3.09857               | 1.99069    | .133 | -1.0100                 | 7.2072      |
|                       | P2 (30 hari)           | K1 (15 hari)           | -2.02714              | 1.99069    | .319 | -6.1357                 | 2.0814      |
|                       |                        | P1 (15 hari)           | 3.48571               | 1.99069    | .093 | -.6229                  | 7.5943      |
|                       |                        | K2 (30 hari)           | -3.09857              | 1.99069    | .133 | -7.2072                 | 1.0100      |

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## 5. Uji Homogenitas Variansi Jumlah Leukosit Darah

## Descriptives

|                       |              | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-----------------------|--------------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                       |              |    |         |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Berat Limpa (gram)    | K1 (15 hari) | 7  | .749688 | .1914407       | .0723578   | .572633                          | .926739     | .5191   | 1.0280  |
|                       | P1 (15 hari) | 7  | .656029 | .1877810       | .0709746   | .482360                          | .829697     | .3820   | .8603   |
|                       | K2 (30 hari) | 7  | .700400 | .0680104       | .0257055   | .637501                          | .763299     | .5957   | .7770   |
|                       | P2 (30 hari) | 7  | .797557 | .0994974       | .0376065   | .705537                          | .889577     | .6845   | .9969   |
|                       | Total        | 28 | .725918 | .1487289       | .0281071   | .668247                          | .783589     | .3820   | 1.0280  |
| Jumlah Leukosit Darah | K1 (15 hari) | 7  | 11.5257 | 2.91350        | 1.10120    | 8.8312                           | 14.2202     | 8.23    | 16.50   |
|                       | P1 (15 hari) | 7  | 11.8688 | 5.50790        | 2.08179    | 6.7746                           | 16.9625     | 3.18    | 19.70   |
|                       | K2 (30 hari) | 7  | 14.5714 | 3.02309        | 1.14262    | 11.7755                          | 17.3673     | 10.60   | 18.70   |
|                       | P2 (30 hari) | 7  | 16.0157 | 5.93044        | 2.24149    | 10.5310                          | 21.5005     | 3.61    | 21.00   |
|                       | Total        | 28 | 13.4954 | 4.70248        | .88868     | 11.6719                          | 15.3188     | 3.18    | 21.00   |

**Test of Homogeneity of Variances**

|                       | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|------------------|-----|-----|------|
| Berat Limpa (gram)    | 3.493            | 3   | 24  | .031 |
| Jumlah Leukosit Darah | .824             | 3   | 24  | .494 |

**ANOVA**

|                       |               | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|-----------------------|---------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Berat Limpa (gram)    | Between Group | .079           | 3  | .026        | 1.213 | .326 |
|                       | Within Groups | .519           | 24 | .022        |       |      |
|                       | Total         | .597           | 27 |             |       |      |
| Jumlah Leukosit Darah | Between Group | 98.252         | 3  | 32.751      | 1.576 | .221 |
|                       | Within Groups | 498.807        | 24 | 20.784      |       |      |
|                       | Total         | 597.059        | 27 |             |       |      |

6. Uji Korelasi Kadar MDA darah dengan Jumlah Limfosit Darah dan Diameter Pulpa Putih Limpa

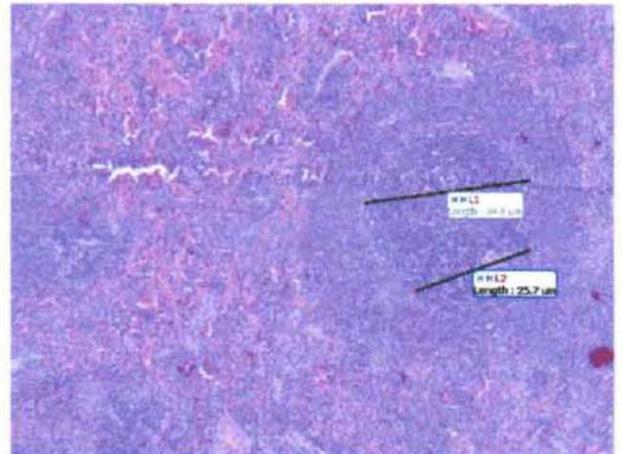
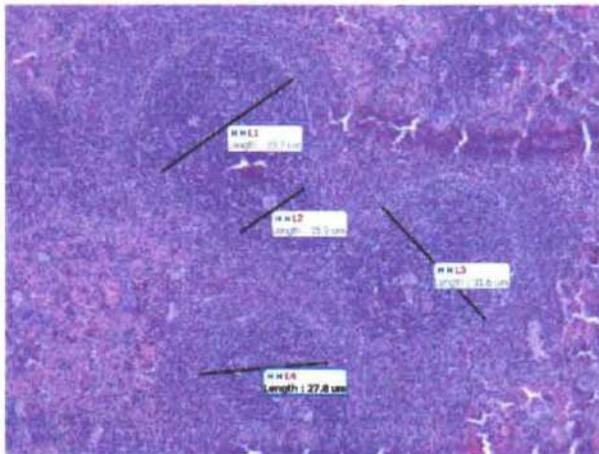
**Correlations**

| Kelompok Perlakuan |           |                     | Jumlah Limfosit Darah | Diameter Pulpa Putih |
|--------------------|-----------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| K1 (15 hari)       | Kadar MDA | Pearson Correlation | .179                  | -.003                |
|                    |           | Sig. (2-tailed)     | .701                  | .995                 |
|                    |           | N                   | 7                     | 7                    |
| P1 (15 hari)       | Kadar MDA | Pearson Correlation | -.616                 | -.181                |
|                    |           | Sig. (2-tailed)     | .140                  | .698                 |
|                    |           | N                   | 7                     | 7                    |
| K2 (30 hari)       | Kadar MDA | Pearson Correlation | .244                  | .376                 |
|                    |           | Sig. (2-tailed)     | .599                  | .406                 |
|                    |           | N                   | 7                     | 7                    |
| P2 (30 hari)       | Kadar MDA | Pearson Correlation | .335                  | .261                 |
|                    |           | Sig. (2-tailed)     | .463                  | .573                 |
|                    |           | N                   | 7                     | 7                    |

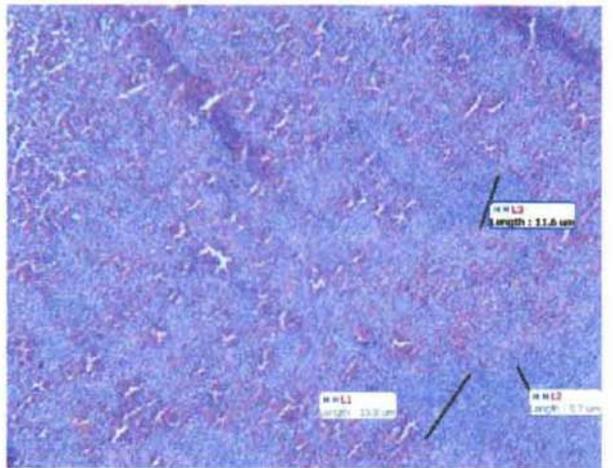
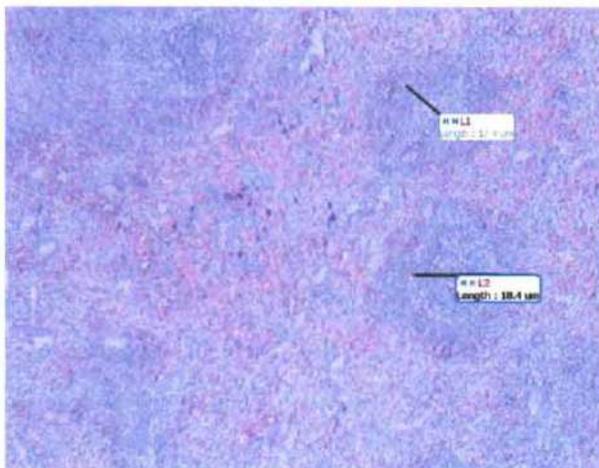
**LAMPIRAN 6**

**GAMBAR SEDIAAN LIMPA DENGAN PEWARNAAN H.E.**

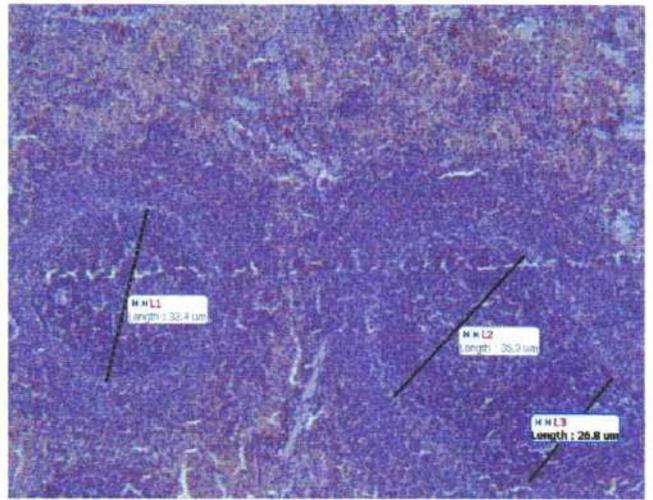
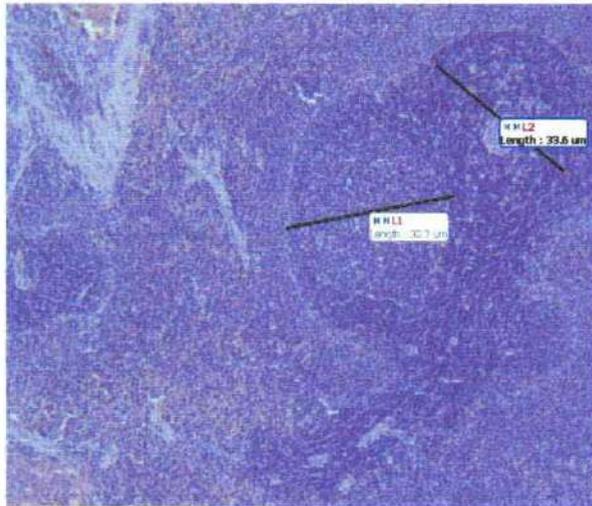
**Kelompok K1**



**Kelompok P1**



### Kelompok K2



### Kelompok P2

