



ARTIKEL PENELITIAN

**Stres Imobilisasi Kronik Mengganggu Memori Spasial Mencit Putih
(*Mus musculus*) Galur Swiss Webster Jantan****Desby Juananda¹, Riezky Valentina Astari²**¹KJF Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia²KJF/KSM Ilmu Penyakit Saraf, Fakultas Kedokteran, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia

Email: desby.juananda@lecturer.unri.ac.id

Abstrak: Stres kronik dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi otak, terutama hipokampus yang berperan penting dalam proses belajar dan pembentukan memori. Terjadi perbedaan dalam menentukan durasi yang efektif untuk mengembangkan model stres kronik pada hewan. Hal ini berkaitan dengan proses adaptasi terhadap paparan stres berulang. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh stres imobilisasi terhadap memori spasial pada mencit putih. Subjek penelitian ini berupa 20 ekor mencit putih (*Mus musculus*) (10-12 minggu; 25-35 gram), galur Swiss Webster jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu kelompok kontrol yang tidak dipaparkan stres dan kelompok yang dipaparkan stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari masing-masing sebanyak 5 ekor mencit. Uji *Morris Water Maze* (MWM) dilakukan untuk menilai kemampuan memori spasial. Data dianalisis menggunakan uji *analysis of variance* (ANOVA) ($p < 0,05$). Rerata waktu latensi (s) pada kelompok kontrol dan kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari masing-masing adalah 8.49 ± 0.91 , 12.40 ± 3.76 , 13.73 ± 4.09 , dan 41.62 ± 21.84 ($p < 0,05$). Uji *post-hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna rerata waktu latensi antara kelompok kontrol dengan kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari ($p < 0,05$), tetapi tidak dijumpai perbedaan yang bermakna rerata waktu latensi antara kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14 hari dengan 21 hari ($p > 0,05$). Stres imobilisasi kronik terbukti menurunkan memori spasial, dimana paparan stres 2 jam per hari selama 28 hari merupakan durasi yang paling efisien dan reliabel dalam menginduksi penurunan fungsi memori pada mencit.

Kata kunci: memori spasial, Morris Water Maze, stres imobilisasi.

Abstract: Long-term exposure to stress may induce structural and functional alterations in the brain and particularly in hippocampus. Several studies have shown that the hippocampus plays an important role in spatial learning and memory. Certain animals can perceive stressors differently depend on stress durations and paradigms. We have designed an investigation to compare the effect of different chronic stress durations, using immobilization tubes, on mice spatial memory ability. Twenty young-adult (10-12 weeks old; 25-35 g) male Swiss Webster mice were randomly assigned into four groups: control (non-stressed) group and groups were exposed to immobilization stress 2 hours/daily (09.00-11.00 am) for 14, 21 and 28 days, respectively. Spatial memory ability was tested by using Morris Water Maze. Data were analyzed with one-way ANOVA ($p < 0.05$). We found that mean escape latency (s) for



control, 2h/14 days, 2h/21 days and 2h/28 days groups were 8.49 ± 0.91 , 12.40 ± 3.76 , 13.73 ± 4.09 , and 41.62 ± 21.84 , respectively ($p < 0.05$). Post-hoc analysis showed a statistical difference between control and stressed groups ($p < 0.05$), but there was no statistical difference between 2h/21 days and 2h/14 days group ($p > 0.05$). In conclusion, this study showed that chronic immobilization stress had been proven to impair spatial memory ability in mice. Specifically, our findings support the use of 2h/28 days chronic immobilization paradigm as an efficient method to induce spatial memory deficits in mice.

Keywords: immobilization stress, Morris Water Maze, spatial memory.

PENDAHULUAN

Sebagai pusat kendali dan adaptasi terhadap stres, otak bertanggung jawab dalam menerima dan merespon *stressor* baik secara fisiologis maupun perilaku. Kortisol memiliki peranan penting dalam adaptasi dan respon stres.¹ Peningkatan kortisol pada stres kronik menyebabkan kerusakan struktur maupun fungsi otak terutama hipokampus yang sangat berperan dalam proses belajar dan pembentukan memori.^{1,2} Hipokampus memiliki banyak reseptor kortisol dengan sensitivitas yang sangat tinggi.³

Pembentukan memori di hipokampus terjadi melalui perubahan jangka pendek pada properti elektrik neuron dan perubahan jangka panjang pada struktur sinaps. Perubahan jangka pendek yang terjadi berupa *long term potentiation* (LTP) pada sinaps, sedangkan perubahan jangka panjang berupa pertumbuhan neuropil dan sinaptogenesis.³ *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) merupakan salah satu neurotrofin utama yang memegang peranan penting pada LTP. Paparan stres kronik telah terbukti menurunkan ekspresi BDNF di hipokampus.⁴

Penggunaan hewan laboratorium untuk investigasi dampak paparan stres sangat berkembang saat ini. Beberapa model stres kronik yang sering digunakan, antara lain suhu dingin, imobilisasi (*restraint*) dan listrik. Tiap model stres memicu perubahan fisiologi dan neuroendokrin yang bervariasi dan sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor,

seperti usia dan jenis kelamin, hormon dan neurotransmitter yang terlibat. Model stres imobilisasi diyakini paling potensial dalam meniru perubahan fisik maupun psikologis akibat stres.⁵ Hingga saat ini, terjadi perbedaan dalam menentukan durasi yang efektif untuk mengembangkan model hewan stres kronik. Hal tersebut berkaitan dengan proses adaptasi atau habituasi terhadap paparan stres berulang. Adanya pengaruh durasi paparan stres terhadap perubahan fisik maupun psikologis melatarbelakangi perlunya dikaji dan diteliti bagaimana perubahan yang terjadi pada memori spasial mencit pascastres imobilisasi.

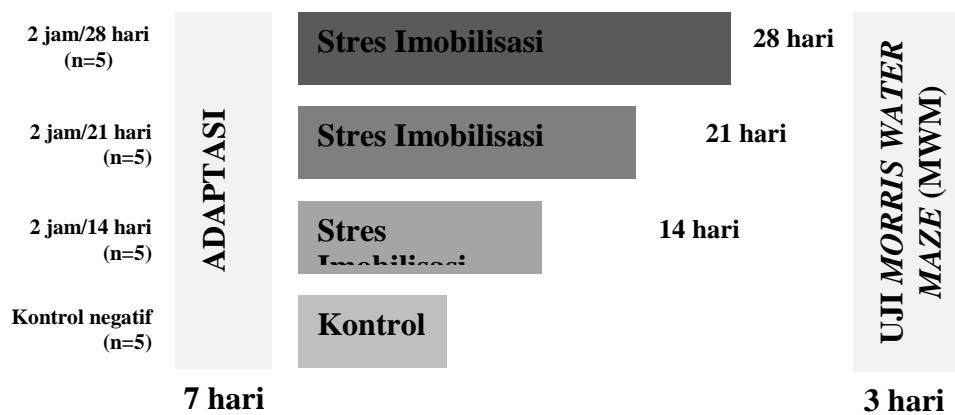
METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental quasi dengan rancangan *posttest only control group design*. Subjek penelitian berupa 20 ekor mencit putih (*Mus Musculus*), galur Swiss Webster jantan, berumur 10-12 minggu, berat badan 25-35 gram. Subjek penelitian dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu kelompok kontrol negatif (KN) yang tidak diberikan paparan stres, dan kelompok yang diberikan stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari masing-masing sebanyak 5 ekor mencit. Stres imobilisasi dilakukan dengan cara memasukkan mencit ke dalam tabung plastik, sehingga mencit tetap berada dalam posisi *dorsal recumbent* tanpa akses makanan dan minuman. Stres imobilisasi dilakukan 2 jam per hari (09.00-11.00 WIB) selama 14, 21 dan 28 hari.

Uji *Morris Water Maze* (MWM) (bejana plastik dengan diameter 1,5 m dan kedalaman 20 cm yang diisi air berwarna sebanyak 18 L) dilakukan pada hari ke-11, 18 dan 25 padatiap kelompok perlakuan untuk menilai kemampuan memori spasial. Prosedur tes MWM akan dibagi menjadi dua tahapan, yaitu *pre-training* dan uji coba yang dilakukan selama 3 hari berturut-turut. Mencit dibiarkan berenang mengitari kolam untuk menemukan *flat* pijakan (1 inci di atas permukaan air) pada tahap *pre-training*, kemudian dibiarkan berenang untuk menemukan *flat* pijakan tersembunyi pada tahap uji coba. Rerata waktu yang diperlukan mencit pada tahap uji coba disebut waktu latensi (*escape latency*). Perbedaan waktu latensi setiap kelompok akan dianalisis menggunakan uji statistik parametrik *analysis of variance*

(ANOVA), dan bila didapatkan ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), maka dilanjutkan dengan uji statistik *post hoc*.

Dua ekor mencit dipelihara dalam kandang plastik, dan diberikan pakan standar berupa *pellet* dan air minum secara *ad libitum*. Ruang pemeliharaan dilengkapi dengan ventilasi untuk sirkulasi udara, dengan suhu ruangan rerata 25-30°C, kelembaban 50%-60%, dan siklus gelap:terang 12:12 jam. Mencit akan diadaptasikan dengan lingkungan selama 7 hari. Seluruh prosedur pada penelitian ini telah mendapatkan izin dari Unit Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Riau No. 334/ UN.19.5.1.1.8/UEPKK/2017.



Gambar 1. Diagram jalannya penelitian.

HASIL

Rerata waktu latensi (detik) pada kelompok kontrol dan kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari masing-masing adalah 8.49 ± 0.91 , 12.40 ± 3.76 , 13.73 ± 4.09 , dan 41.62 ± 21.84 ($p < 0.05$) (Tabel 1). Uji *post-hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan

yang bermakna rerata waktu latensi antara kelompok kontrol dengan kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari ($p < 0.05$) (Gambar 2). Tidak dijumpai perbedaan yang bermakna rerata waktu latensi antara kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14 hari dengan 21 hari ($p > 0.05$) (Tabel 2).

Tabel 1. Rerata waktu latensi mencit pada uji *Morris Water Maze* pascastres imobilisasi kronik

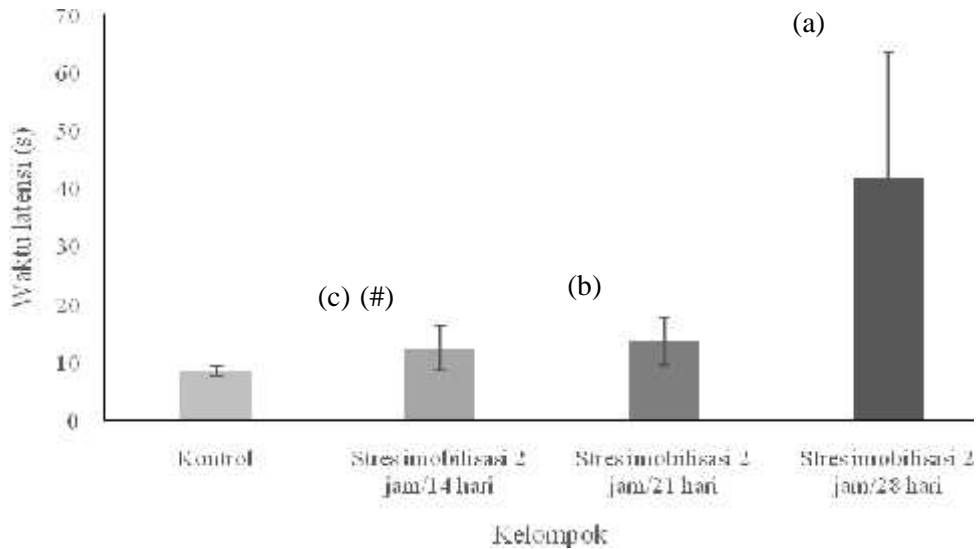
| Kelompok | n | Waktu latensi pada uji <i>Morris</i> | |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|-------|
| | | <i>Water Maze</i> (detik) | p |
| | | Rerata ± Simpangan Baku | |
| Stres imobilisasi 2 jam/28 hari | 5 | 41.62 ± 21.84 | 0.000 |
| Stres imobilisasi 2 jam/21 hari | 5 | 13.73 ± 4.09 | |
| Stres imobilisasi 2 jam/14 hari | 5 | 12.40 ± 3.76 | |
| Kontrol | 5 | 8.49 ± 0.91 | |

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p > 0.05$; Uji varians: $p > 0.05$; Data disajikan dalam rerata ± simpangan baku; Uji *one way* ANOVA: $p < 0.05$.

Tabel 2. Hasil analisis *post-hoc* rerata waktu latensi mencit pada uji *Morris Water Maze* pascastres imobilisasi kronik

| | Perbedaan Rerata (detik) | Interval Kepercayaan (IK) 95% | | p |
|--|--------------------------|--------------------------------|------------------|--------|
| | | Minimum (detik) | Maksimum (detik) | |
| | | Kontrol vs stres 2 jam/14 hari | 3.91 | |
| Kontrol vs stres 2 jam/21 hari | 5.24 | 9.88 | 20.36 | 0.014* |
| Kontrol vs stres 2 jam/28 hari | 33.12 | 18.00 | 48.25 | 0.000* |
| Stres 2 jam/14 hari vs stres 2 jam/21 hari | 1.33 | 13.79 | 16.46 | 0.563 |
| Stres 2 jam/14 hari vs stres 2 jam/28 hari | 29.22 | 14.09 | 44.34 | 0.000* |
| Stres 2 jam/21 hari vs stres 2 jam/28 hari | 27.88 | 12.76 | 43.00 | 0.000* |

Keterangan: Uji *post-hoc* LSD. Notasi (*) menunjukkan terdapat perbedaan bermakna berdasarkan uji *one way* ANOVA ($p < 0.05$).



Gambar 2. Diagram batang rerata waktu latensi pada uji *Morris Water Maze* pascastres imobilisasi kronik. Notasi (a) stres 2 jam/28 hari vs kontrol ($p < 0.05$); (b) stres 2 jam/21 hari vs kontrol ($p < 0.05$); (c) stres 2 jam/28 hari vs kontrol ($p < 0.000$); (#) stres 2 jam/14 hari vs stres 2 jam/21 hari ($p > 0.05$).

DISKUSI

Belajar dan memori merupakan proses kompleks yang melibatkan banyak area di sistem saraf pusat, salah satunya adalah hipokampus. Belajar secara sederhana mengacu pada proses akuisisi dari suatu pengetahuan (informasi) baru, sedangkan memori mengacu pada proses dimana informasi yang baru saja didapatkan akan disimpan dan digunakan pada masa yang akan datang.⁶ Memori digolongkan menjadi dua, yaitu memori deklaratif dan memori prosedural. Karakteristik memori prosedural antara lain melibatkan komponen keterampilan dan tingkah laku, membutuhkan pengulangan dan latihan yang memerlukan waktu lama, tetapi lebih sukar untuk dilupakan. Memori spasial termasuk dalam memori prosedural. *Morris Water Maze* (MWM) merupakan salah satu uji yang paling sering digunakan untuk menilai memori spasial pada mencit.⁷

Morris Water Maze memiliki beberapa keunggulan diantaranya hanya membutuhkan sedikit

tahap *pre-training*, dapat digunakan lintas spesies (mencit, tikus dan manusia), reliabilitas yang cukup tinggi, dan telah tervalidasi untuk menilai fungsi hipokampus terkait memori spasial.⁷ Beberapa kajian tentang MWM telah membuktikan bahwa terdapat hubungan antara fungsi memori dengan sistem neurotransmisi di otak. Hal tersebut terjadi pada sirkuit neuronal sistem limbik terutama hipokampus. Memori diyakini terbentuk akibat penguatan aktivitas neurotransmisi/sinapsis yang disebut *long-term potentiation* (LTP), sebaliknya gangguan memori terjadi akibat penurunan sinapsis yang disebut *long-term depression* (LTD). Kortisol memiliki peranan penting baik dalam proses LTP maupun LTD.^{8,9}

Stres, baik akut maupun kronis, dapat mempengaruhi fungsi memori. Hipokampus, regio otak yang berperan penting dalam belajar dan memori, merupakan salah satu sasaran hormon stres karena kaya akan reseptor glukokortikoid.¹⁰ Interaksi kortisol dan reseptor glukokortikoid di hipokampus



pada stres kronik dapat mengganggu konsolidasi memori, dan menyebabkan perubahan struktural maupun fungsional otak. Stres kronik memicu serangkaian peristiwa oksidatif di otak, diantaranya peningkatan jumlah nitrit oksida (NO) dan *cyclooxygenase* (COX), peningkatan oksidasi protein dan peroksidasi lipid, dan penurunan aktivitas antioksidan endogen.¹¹ Stres kronik menurunkan ekspresi neurotropin otak diantaranya *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dan protein-protein sinaps seperti SYP, *post synaptic density 95* (PSD 95), neurexin dan neuroligin.¹² Hal ini menyebabkan perubahan struktur neuron seperti penurunan aktivitas sinaps, perubahan morfologi dan kapasitas proliferasi neuron.

Paparan stres kronik mempengaruhi fungsi hipokampus dengan memicu *remodeling* neuron, menghambat aktivitas sinaps dan neurogenesis pada regio cornu ammonis 3 (CA3).¹³ Retraksi dendrit pada regio CA3 hipokampus ditandai oleh penurunan jumlah dan panjang cabang dendrit pada sinaps. Selain itu, stres kronik menyebabkan atrofi sel granular dan sel piramidal di regio CA1 hippocampus, perubahan morfologi *mossy fibers* di bagian terminal dan kehilangan sinapsis. Perubahan-perubahan tersebut secara parsial bersifat reversibel setelah dilakukan rehabilitasi terhadap stres.¹⁴ Diduga ada keterkaitan antara kadar kortisol, struktur neuritik hipokampus dan *hippocampus-dependent learning and memory*.

Penelitian mengenai pengaruh stres kronik terhadap memori menunjukkan bahwa paparan stres imobilisasi (*restraint*) selama 6 jam per hari selama 21 hari dapat menurunkan kemampuan dan deprivasi makanan, dan kemunduran kognisi.¹⁵ Hal ini diduga berhubungan dengan peningkatan kadar norepinefrin pada amygdala dan hipokampus, serta peningkatan kadar dopamin pada daerah

cortex prefrontal. Stres imobilisasi dan deprivasi makanan diyakini berpengaruh terhadap area limbik tertentu yang berhubungan dengan fungsi memori. Penelitian menunjukkan bahwa penurunan fungsi memori pascastres sangat berkaitan dengan neuroprotektor otak yang terganggu, salah satunya BDNF.¹⁶ Pembentukan memori spasial melibatkan peningkatan kadar mRNA BDNF di hipokampus pada menit ke-15 dan 30 setelah dilakukan uji *maze* radial 8 lengan.¹⁷

Pada penelitian ini, terdapat perbedaan yang bermakna rerata waktu latensi antara kelompok kontrol dengan kelompok yang terpapar stres imobilisasi selama 14, 21 dan 28 hari. Perbedaan waktu latensi ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh paparan stres imobilisasi kronik terhadap tampilan memori spasial mencit. Stres imobilisasi kronik terbukti menurunkan kemampuan memori spasial pada mencit terutama yang dipaparkan stres 2 jam per hari selama 28 hari. Tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna pada tampilan memori spasial mencit yang dipaparkan stres selama 14 dan 21 hari.

KESIMPULAN

Stres imobilisasi kronik terbukti menurunkan memori spasial pada mencit putih (*Mus musculus*) galur Swiss Webster jantan, dimana paparan stres 2 jam per hari selama 28 hari merupakan durasi yang paling efisien dan reliabel dalam menginduksi penurunan fungsi memori pada mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Fakultas Kedokteran Universitas Riau atas dukungannya untuk menyelesaikan penelitian ini. Penelitian ini telah dibiayai oleh Penelitian Hibah Fakultas Kedokteran



Universitas Riau Tahun Anggaran 2017
(No. Kontrak:
24/UN19.5.1.1.8/UPPM/2017).

DAFTAR PUSTAKA

1. McEwen, BS. Sentral effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.*2008; 583(2-3):174-85.
2. Kim, JJ, Diamond, DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Review Neuroscience.*2002; 3:453-62.
3. Yamada, K, Nabeshima, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci.*2003; 91:267-70.
4. Grønli, J, Bramham, C, Murison, R, Kanhema, T, Fiske, E, Bjorvatn, B, *et al.* Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol Biochem Behav.*2006; 85(4):842-9.
5. Jeong, JY, Lee, DH, Kang, SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab.*2013; 28:288-96.
6. Guyton, AC, Hall, JE. *Textbook of medical physiology.* 11th ed. Pennsylvania: Elsevier Inc; 2006.
7. Vorhess, CV, Williams, MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.*2006; 1(2): 848-58 (DOI:10.1038/nprot.2006.116).
8. Sari, DCR. Pengaruh dosis dan durasi pemberian estrogen terhadap memori spasial pada tikus (*Rattus novergicus*). *Jurnal Kedokteran YARSI.* 2001; V(9): 39-55.
9. McEwen, BS, Sapolsky, RM. Stress and cognitive function. *Curr opin neurobiol.*1995; 5:205-16.
10. McEwen, BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev Neurosci.*1999; 22:105-22.
11. ahin, E, Gümü lü, S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res.*2004; 155(2):241-8.
12. Bath, KG, Schilit, A, Lee, FS. Stress Effect on BDNF Expression : Effect of Age, Sex, and Form of Stress. *Neuroscience.*2013; 239:149-56.
13. McLaughlin, KJ, Gomeza, JL, Baran, SE, Conrad, CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Research.*2007; 1161:56-64.
14. Sousa, N, Lucoyanov, NV, Madeira, MD, Almeida, OF, Paula-Barbosa, MM. Reorganization of morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.*2000; 97(200): 253-66.
15. Beck, KD, Luine, VN. Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Res.* 1999 May 29; 830(10):56-71.
16. Juananda, D. Pengaruh stres kronik terhadap otak: kajian biomolekuler hormon glukokortikoid dan regulasi *brain-derived neurotrophic factor*(BDNF). *Jurnal Ilmiah Kedokteran.* 2015; 9(2):65-70.
17. Mizuno, M, Yamada, K, Olariu, A, Nawa, H, Nabeshima, T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial *memory* formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *The J of Neurosci.*2000; 20(18): 7116-21.