

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental sejati yang dilakukan untuk membuktikan kemampuan *catechins* dalam menurunkan respon inflamasi dan pembentukan radikal bebas yang berlebihan pada jaringan otak akibat cedera otak traumatik. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$ , apoptosis sel otak dan status fungsional otak tikus (NSS) dengan menggunakan tikus wistar model cedera otak traumatik fokal.

Secara umum, cedera otak primer menyebabkan kematian sel dan defisit neurologi melalui gangguan fisik terhadap jaringan secara langsung (cedera primer), juga melalui mekanisme patofisiologi molekuler dan seluler yang menyebabkan kerusakan area putih dan abu-abu secara progresif (cedera sekunder). Pada cedera sekunder terjadi serangkaian proses yang dapat menyebabkan apoptosis. Akibat dari cedera otak primer dan sekunder tersebut antara lain terjadinya proses inflamasi secara langsung melalui pelepasan asam arakhidonat, pembentukan radikal bebas, terjadinya edema vasogenik dan sitotoksik, peningkatan influks  $Ca^{++}$  dan eksitotoksisitas glutamat. Sebagian besar kerusakan neuron yang terjadi pada cedera otak traumatik diakibatkan oleh cedera otak sekunder. Cedera otak sekunder dideskripsikan sebagai konsekuensi gangguan fisiologis, seperti iskemia, reperfusi, dan hipoksia pada area otak yang beresiko, beberapa saat setelah terjadinya cedera awal (cedera otak primer). Cedera otak sekunder sensitif terhadap terapi dan proses terjadinya dapat dicegah (Mauritz *et al*, 2008).

Selama ini, konsep penatalaksanaan cedera otak traumatik adalah dengan berbagai macam cara yang kompleks, diantaranya adalah dengan meningkatkan perfusi serebral, oksigenasi, hipotermia profilaksis, pemberian antibiotik, anti kejang profilaksis dan atau steroid. Walaupun demikian, belum ada terapi definitif yang pasti untuk menentukan outcome dari cedera otak traumatik (*Brain Trauma Foundation, 2007*).

*Catechins* adalah suatu senyawa kimia dalam teh yang merupakan salah satu kelas flavanol. *Catechins* memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang kuat serta mampu menetralsir berbagai radikal bebas dalam tubuh seperti seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan peroksinitrit. Pada penelitian ini *catechins* diharapkan mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan menurunkan ekspresi gen STAT-1 dan melalui hambatan pada NFK $\beta$ . Serta menurunkan apoptosis sel neuron, dengan menghambat pembentukan radikal bebas melalui hambatan jalur NADPH oksidase, menetralsir radikal bebas yang telah terbentuk, serta meningkatkan protein antiapoptosis (Bcl-2) dan menurunkan protein sel proapoptosis (Bax, Bcl-XS). (Berridge *et al.*, 2012). Dan selanjutnya, dengan menurunnya apoptosis sel otak dan sitokin pro inflamasi, diharapkan outcome status fungsional otak tikus akan meningkat.

Model cedera otak traumatik pada tikus wistar dilakukan sesuai dengan Marmarou (1994). Tikus dianestesi dengan menggunakan ketamin kemudian bulu kepala dicukur dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian kulit kepala dibuka. Selanjutnya, dilakukan penjatuhan beban silinder besi seberat 450 gram (diameter 4mm) dengan sudut 90° dari ketinggian 100 cm sebanyak 1 kali. Energi benturan adalah sebesar 0,45 joule. Beban tersebut akan mengenai bagian tengah depan antara kedua hemisfer otak tikus, dan tikus akan mengalami kontusio serebri dan cedera kepala ringan (Marmorou, 1994).

Secara umum, saat terjadi trauma kepala dan trauma otak terjadi 3 zona kerusakan otak yang terbagi menjadi *near* (sentral), *far* (perifer) dan penumbra. Setelah terjadi trauma, kerusakan neuron yang segera terjadi, dihasilkan akibat proses tumbukan gaya yang disebut dengan kerusakan primer. Kerusakan primer memicu gelombang kedua kaskade biokimia yang Bersama dengan perubahan metabolic dan seluler, menyebabkan kerusakan neuron sekunder. Daerah kerusakan sekunder inilah yang disebut sebagai penumbra, dan merupakan target penting dalam intervensi terapi karena masih bisa diselamatkan dan diperbaiki (Meireles *et al.*, 2017)

Pada penelitian ini, kelompok perlakuan subyek tikus model cedera otak traumatik, terbagi menjadi 2 kelompok besar, yaitu pengamatan setelah 3 hari dan 7 hari. Dari setiap kelompok besar pengamatan, terdiri dari 5 kelompok perlakuan, yaitu Kontrol Negatif yang dilakukan *sham procedure*, Kontrol Positif yang dilakukan perlakuan cedera otak traumatik, dan 3 kelompok yang dilakukan perlakuan cedera otak traumatic dan diberikan *catechins* dengan dosis berbeda, yaitu 513 mg/kgBB/hari, 926 mg/kgBB/hari dan 1113 mg/kgBB/hari.

Hasil penelitian secara umum adalah sebagai berikut, menunjukkan bahwa secara umum, hasil penelitian pada hari ke-7 lebih baik daripada hari ke-3. Secara teori, proses kerusakan otak sekunder mencapai puncaknya pada hari ke-7, walaupun masih akan terus berlangsung, sehingga, perbaikan hasil penelitian antara hari ke-3 dan ke-7, bisa mengindikasikan adanya perbaikan kondisi akibat pemberian perlakuan pada subyek penelitian, dalam hal ini adalah *catechins*. Tetapi terdapat kekurangan pada pembuatan preparat otak, karena kami peneliti tidak memotong preparat sendiri, walaupun kami sudah menentukan letak dimana preparat otak tikus tersebut dipotong (bagian penumbra).

## 6.1 Pengaruh Pemberian *Catechins* terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Jaringan Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik.

Salah satu tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan *catechins* dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak tikus model cedera otak traumatik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada kedua hari pengamatan, hari ketiga dan ketujuh, menunjukkan perbedaan yang signifikan (bermakna) antar kelompok perlakuan.

Sesaat setelah terjadi cedera otak traumatik, terjadi peningkatan infiltrasi neutrofil, astrositosis, edema dan sitokin proinflamasi serta sitokin antiinflamasi. Salah satu sitokin pro inflamasi mayor yang dilepaskan Tumor necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  dapat mulai ditemukan sejak 1 (satu) jam paska kejadian trauma, dan terus meningkat hingga 3 (tiga) minggu, diiringi dengan astrositosis. Kadar TNF- $\alpha$  berhubungan dengan kadar MMP-9 dan MMP-8, yang merupakan marker cedera otak fokal. (Algattas and Huang, 2014)

Pada kasus cedera otak traumatik, keberadaan TNF- $\alpha$  yang dapat menyebabkan perburukan kondisi, telah dikonfirmasi pada berbagai studi klinis. Salah satunya adalah studi kohort pada 1096 pasien cedera otak traumatik, yang dianalisis untuk mengetahui pengaruh polimorfisme gen sitokin terhadap hasil nilai Glasgow. Hasil penelitian menunjukkan bahwa karier homozigot TNF- $\alpha$ 308 single nucleotide polymorphisms (SNP) memiliki outcome cedera otak traumatic yang lebih buruk secara signifikan dibandingkan dengan kelompok yang lain. SNP sendiri merupakan promoter TNF- $\alpha$  dan berhubungan dengan peningkatan kadar TNF- $\alpha$  (Algattas and Huang, 2014).

Secara teori, *catechins* telah terbukti memiliki aktivitas anti inflamasi (Kartegeris et al., 2015). *Catechins* dapat menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi, pada penelitian ini adalah TNF- $\alpha$ , dengan meningkatkan ekspresi

gen STAT-1, sehingga menghambat aktivitas NFK $\beta$ . Dari berbagai penelitian, sel-sel yang mengalami kekurangan STAT-1 menunjukkan peningkatan jumlah TNF-alpha yang signifikan, akibat adanya pembentukan kompleks TRADD-RIP dan TRADD-TRAF2, sementara kompleks TRADD-FADD tidak menunjukkan perbedaan. Hal ini bisa terjadi karena STAT-1 bisa berinteraksi langsung dengan TNFR1 dan TRADD, namun tidak bisa berinteraksi langsung dengan FADD. Pada sel yang mengalami kekurangan STAT-1, terjadi peningkatan aktivasi NF-KB dan ekspresi TNF-alpha. Sehingga, STAT-1 beraksi sebagai molekul sinyal TNFR-1 untuk menekan aktivasi NF-KB dan selanjutnya menurunkan ekspresi TNF-alpha (Wang *et al*, 2005)

Pada penelitian ini, terbukti *catechins* mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hari pengamatan ketiga dan ketujuh. Diduga hal ini bisa terjadi karena Catechins mampu menghambat aktivitas pada NFK $\beta$ . Seperti yang ditunjukkan pada penelitian sebelumnya mengenai pengaruh pemberian *catechins* pada tikus model cedera hepar akibat endotoksin yang dipicu alcohol. Walaupun pada organ yang berbeda, namun kaskade yang terjadi, tidak memiliki perbedaan yang berarti. Pada penelitian tersebut, variable yang diamati adalah aktivitas NFK $\beta$ , ekspresi TNF- $\alpha$ , iNOS dan ROS. Kelompok yang diberikan *catechins* menunjukkan penurunan aktivitas NFK $\beta$  yang berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol, diikuti dengan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ , iNOS dan ROS, sehingga hasil penelitian menyimpulkan bahwa *catechins* mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ , iNOS dan ROS, dengan menekan induksi dan menghambat aktivitas NFK $\beta$  (Bharrhan *et al.*, 2011)

Hasil penelitian pada pengamatan hari ketiga menunjukkan, Kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok dosis 926 mg/kgBB/hari dan 1113 mg/kgBB/hari. Dan pada pengamatan hari ketujuh, kontrol positif menunjukkan

perbedaan yang bermakna dengan semua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  terhadap kontrol positif dan berbasis waktu serta dosis, walaupun jika dibandingkan dengan kontrol negatif masih berbeda bermakna juga, yang mengindikasikan bahwa pemberian terapi *catechins* belum menunjukkan hasil sebaik normal (kontrol negatif) hingga hari ketujuh pemberian terapi.

Hasil uji korelasi berbasis dosis menunjukkan korelasi dengan kekuatan sangat kuat (R. 3 hari = -0.866; R. 7 hari = -0.947) dengan arah negatif, yang berarti semakin tinggi dosis *catechins*, maka semakin rendah ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus model cedera otak traumatik. Analisis regresi linier menunjukkan nilai  $R^2 > 70\%$  untuk kedua hari pengamatan, menunjukkan bahwa variasi dosis pemberian *catechins* merupakan faktor dominan dari ekspresi TNF- $\alpha$  pada penelitian ini.

## **6.2 Pengaruh Pemberian *Catechins* terhadap Apoptosis Sel pada Jaringan Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik.**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *catechins* mampu menurunkan jumlah apoptosis sel pada jaringan otak tikus model cedera otak traumatik, pada kedua hari pengamatan. Terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) antara kelompok kontrol dan perlakuan pada kedua hari pengamatan.

Apoptosis merupakan jenis kematian sel yang berperan penting pada perkembangan dan pertumbuhan jaringan. Apoptosis diregulasi oleh stimulus tertentu. Karakteristik utamanya adalah *fragmentasi nuclear* dan *cellular breakdown* di dalam *apoptotic vesicles*. Apoptosis berbeda dengan nekrosis, dimana pada penelitian ini tentunya harus dibedakan, karena penggunaan model cedera otak traumatic. Salah satu cara untuk mendeteksi apoptosis adalah

dengan metode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*), yang dipakai pada penelitian ini. Salah satu karakteristik utama apoptosis adalah degradasi DNA setelah aktivasi *Ca/Mg dependent endonucleases*. Namun, nekrosis juga dapat menyebabkan celah DNA yang serupa. metode TUNEL mengidentifikasi pemecahan DNA insitu dengan menggunakan *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) untuk mentransfer biotin-dUTP celah DNA. Daerah celah yang dilabeli dengan biotin kemudian terdeteksi dengan reaksi HRP (horse radish peroxidase) yang berkonjugasi dengan streptavidin dan divisualisasikan oleh DAB (diaminobenzidine), yang memberikan warna coklat. Kelebihan teknik ini adalah teknik yang paling sensitif dan cepat dilakukan. Kekurangannya adalah mahal dan terjadinya kemungkinan positif palsu pada sel nekrosis, sel yang mengalami repair DNA dan transkripsi gene. (Elmore, 2007)

Secara teori, EGCG pada *catechins* menunjukkan fungsi penghambatan yang bermakna pada pembentukan edema serebri pada cedera otak traumatik dan menurunkan permeabilitas vaskular. Inflamasi yang diinduksi oleh cedera otak traumatik juga terbukti dapat dihambat oleh pemberian EGCG. Terlebih lagi, pemberian EGCG dapat menghambat ekspresi AQP4, protein kanal air yang diekspresikan dengan kuat di otak, dominan di kaki astrosit di sekitar kapiler, dan GFAP, protein yang menginduksi astrogliosis, pada jaringan otak yang cedera. Sebagai antioksidan, EGCG mampu memperbaiki stress oksidatif pada cedera otak traumatika dengan menghambat translokasi p47 phox dari sitoplasma ke membran plasma. (Zhang *et al.*, 2015).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa EGCG dapat mengurangi kerusakan BBB dan stres akut pada otak. Terlebih lagi, EGCG telah terbukti mampu menembus BBB dan mencapai parenkim otak. Data penelitian

menunjukkan bahwa pemberian EGCG sebanyak 100 mg/kgBB dapat menurunkan kandungan air intrakranial dan juga memperbaiki permeabilitas vaskular (Zhang *et al.*, 2015).

Selain itu, EGCG juga dilaporkan mampu melindungi neuron dengan meregulasi glutamat, mediator inflamasi. EGCG, juga terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat oskidasi NADPH, yang berperan pada cedera otak sekunder dengan memediasi stress oksidatif, dengan menghambat translokasi p47phox (Zhang *et al.*, 2015).

*Catechins* juga memodulasi apoptosis dengan mempengaruhi gen pro-apoptosis dan anti-apoptosis. EGCG menghambat ekspresi gen pro-apoptosis Bax, Bad, dan Mdm2 serta menginduksi ekspresi gen anti-apoptosis, yaitu Bcl-2, Bcl-w, dan Bcl-xl, sehingga melindungi sel dari apoptosis. (Sutherland, Rahman, dan Appleton, 2006). Sehingga, secara teori, *catechins* diharapkan mampu menurunkan apoptosis sel neuron, dengan menghambat ekspresi AQP4, menghambat pembentukan radikal bebas melalui hambatan jalur NADPH oksidase, menetralsir radikal bebas yang telah terbentuk, memperbaiki BBB, serta meningkatkan protein antiapoptosis (Bcl-2) dan menurunkan protein sel pro apoptosis (Bax, Bcl-XS)

Pada penelitian ini *catechins* terbukti dapat menurunkan sel apoptosis secara bermakna, diduga hal tersebut terjadi, dengan menghambat pembentukan radikal bebas melalui hambatan jalur NADPH oksidase, menetralsir radikal bebas yang telah terbentuk, serta meningkatkan protein antiapoptosis (Bcl-2) dan menurunkan protein sel proapoptosis (Bax, Bcl-XS) (Berridge *et al.*, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif berbeda bermakna dengan semua kelompok perlakuan lainnya, yang mengindikasikan bahwa



pemberian terapi *catechins* belum menunjukkan hasil sebaik normal (kontrol negatif) hingga hari ketujuh pemberian terapi. Kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok dosis terbesar, 1113 mg/kgBB/hari, pada hari ketiga dan dengan semua kelompok dosis *catechins* (513 mg/kgBB/hari, 926 mg/kgBB/hari dan 1113 mg/kgBB/hari) pada hari ketujuh. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan apoptosis sel terhadap kontrol positif dan berbasis waktu serta dosis pemberian *catechins*. Hasil uji korelasi berbasis dosis menunjukkan korelasi dengan kekuatan sangat kuat dengan arah negatif ( R 3 hari = -0.679; R. 7 hari = -0.922), yang berarti semakin tinggi dosis *catechins*, maka semakin sedikit jumlah sel apoptosis pada tikus model cedera otak traumatik. Analisis regresi linier menunjukkan nilai  $R^2 > 70\%$  untuk hari pengamatan ketujuh, menunjukkan bahwa variasi dosis pemberian *catechins* merupakan faktor dominan dari penurunan sel apoptosis.

### **6.3 Pengaruh Pemberian *Catechins* terhadap Status Fungsional Otak Tikus**

#### **Model Cedera Otak Traumatik**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada terjadi perbaikan NSS yang bermakna pada semua kelompok perlakuan yang diberikan *catechins* dengan dosis tertentu antara hari ke-0 dan di hari akhir pengamatan (3 dan 7 hari). Kontrol negatif memiliki skor NSS yang tetap (0, tidak ada gangguan status fungsional) dan Kontrol Positif menunjukkan perburukan antara hari ke-0 dan di akhir hari pengamatan. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang bermakna pada kedua hari pengamatan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif berbeda bermakna dengan semua kelompok perlakuan lainnya, yang mengindikasikan bahwa pemberian terapi *catechins* belum menunjukkan hasil sebaik normal (kontrol negative) hingga hari ketujuh pemberian terapi. Kelompok kontrol positif berbeda

bermakna dengan kelompok dosis terkecil dan terbesar, 513 mg/kgbb/hari dan 1113 mg/kgBB/hari, pada hari ketiga dan dengan semua kelompok dosis *catechins* (513 mg/kgBB/hari, 926 mg/kgBB/hari dan 1113 mg/kgBB/hari) pada hari ketujuh. Hal ini menunjukkan terjadinya peningkatan status fungsional otak tikus terhadap kontrol positif dan berbasis waktu serta dosis pemberian *catechins*. Hasil uji korelasi berbasis dosis menunjukkan korelasi dengan kekuatan moderat ( $R = -0.441$ ) untuk hari ketiga dan sangat kuat untuk hari ketujuh ( $R = -0.754$ ), dengan arah negatif, yang berarti semakin tinggi dosis *catechins*, maka semakin baik status fungsional otak tikus model cedera otak traumatic. Analisis regresi linier menunjukkan nilai  $R^2 = 19.4\%$  untuk hari pengamatan ketiga, menunjukkan bahwa variasi dosis pemberian *catechins* bukan merupakan factor dominan dari perbaikan status fungsional.

#### **6.4 Hubungan Antara TNF- $\alpha$ , Apoptosis Sel dan Status Fungsional Otak Tikus Wistar Model Cedera Otak Traumatik**

Secara teori, TNF- $\alpha$  dan apoptosis sel, serta TNF- $\alpha$  dan status fungsional otak memiliki hubungan secara tidak langsung. Sedangkan apoptosis sel dan status fungsional otak memiliki hubungan secara langsung. TNF alfa menginduksi pelepasan TRADD yang mengaktifasi caspase 8 melalui mediasi FADD. Ekspresi TNFR-1 dan TRADD mengatur kaskade apoptosis yang berhubungan dengan reseptor. Akhirnya, peningkatan jumlah TNF alfa, caspase 8 dan FADD, menyebabkan terjadinya pelepasan asam etakrinik yang dapat menginduksi apoptosis sel dengan melakukan fragmentasi DNA. Selain itu, peningkatan caspase 8 juga meningkatkan ekspresi caspase 3. Caspase-3 teraktivasi sebagai mesin utama apoptosis, membelah DNA pada daerah *linker* menggunakan *caspase associated DNase* (CAD) dengan terlebih dahulu mendegradasi inhibitorynya, *inhibitor of CAD* (ICAD). Kehilangan sel neuron

akibat nekrosis dan apoptosis sel selanjutnya mempengaruhi kemampuan otak secara umum, dan menurunkan status fungsionalnya.

Pada penelitian ini, dilakukan uji analisis statistika bivariate, Korelasi Pearson, untuk mengetahui hubungan antara ekspresi TNF- $\alpha$ , apoptosis sel dan status fungsional otak tikus model cedera otak traumatik. Uji analisis statistik dilakukan pada masing-masing kelompok Kontrol Negatif dan Hari pengamatan secara terpisah untuk meminimalisir bias.

Hasil uji Korelasi Pearson, sesuai dengan teori, untuk hubungan antara NSS dengan TNF- $\alpha$  dan apoptosis sel, menunjukkan arah korelasi yang negatif (hari 3 : NSS dan TNF- $\alpha$ ,  $p = 0.317$ ;  $r = 0.267$ ; NSS dan apoptosis sel,  $p = 0.206$ ,  $r = 0.334$ ; hari 7 : NSS dan TNF- $\alpha$ ,  $p = 0.001^*$ ;  $r = 0.729$ ; NSS dan apoptosis sel,  $p = 0.000^*$ ,  $r = 0.334793$ ). Dan sebaliknya, sesuai teori pula, hubungan antara TNF- $\alpha$  dan apoptosis sel menunjukkan arah korelasi yang positif, ( hari 3 : TNF- $\alpha$  dan apoptosis sel,  $p = 0.020^*$ ,  $r = 0.567$ ; hari 7 : TNF- $\alpha$  dan apoptosis sel,  $p = 0.000^*$ ,  $r = 0.880$ ). Hal ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi kadar TNF- $\alpha$  maka jumlah sel apoptosis juga akan semakin meningkat dan status fungsional otak tikus model cedera otak traumatik juga akan semakin memburuk.

## **6.5 Keterbatasan Penelitian**

Secara umum, ada 4 (empat) keterbatasan pada penelitian ini. Keterbatasan pertama adalah keterbatasan pada bahan yang digunakan. Proses ekstraksi dan asal bahan yang digunakan berhubungan dengan kandungan dan jumlah bahan aktif. Perbedaan metode dan tempat memiliki kandungan dan jumlah bahan aktif yang berbeda. Bahkan dengan metode dan tempat yang sama sekalipun, masih ada kemungkinan terjadi perbedaan kandungan dan jumlah bahan aktif. Pada penelitian ini tidak dilakukan analisis fitokimia terhadap

*catechins* yang digunakan. Sehingga, tidak diketahui dengan pasti kandungan turunan *catechins* yang digunakan pada penelitian ini.

Keterbatasan kedua, pada penelitian ini adalah belum dipilihnya variable penelitian yang memiliki keberuntutan jaras secara teori, sehingga sulit untuk mengetahui secara pasti cara kerja dan hambatan serta kemungkinan munculnya variabel -variabel perancu lainnya pada pengaruh *catechins* terhadap variabel-variabelnya

Keterbatasan yang ketiga dalam penelitian ini adalah *catechins* yang diteliti belum siap diaplikasikan secara langsung, karena belum dilakukan uji toksisitas secara *in vivo*, sehingga belum dapat diketahui dosis yang aman digunakan.

Keterbatasan yang keempat dalam penelitian ini kami peneliti tidak memotong preparat otak sendiri karena keterbatasan alat, walaupun kami sudah menginformasikan untuk mengambil potongan di daerah transisional (penumbra) tetapi kami tidak dapat memastikan apakah potongan preparat otak tikus tersebut didaerah transisional (penumbra).