



KEPUTUSAN

KETUA LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN

Nomor : Kept. 118/UN23.18/PT.01.05/2020

Tentang

PELAKSANA PENELITIAN SKEMA RISET UNGGULAN UNSOED (TERAPAN)
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN TAHUN ANGGARAN 2020

KETUA LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN

- Menimbang : a. bahwa perguruan tinggi mempunyai tugas menyelenggarakan pendidikan, penelitian, dan pengabdian kepada masyarakat;
- b. bahwa untuk memenuhi kualitas dan kuantitas penelitian di Universitas Jenderal Soedirman, maka perlu dilakukan penelitian secara kompetitif dan memenuhi standar mutu
- c. Bahwa untuk itu perlu diangkat pelaksana Penelitian Skema Riset Unggulan Unsoed (Terapan) dengan Surat Keputusan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Jenderal Soedirman.
- Mengingat : 1. Undang-undang RI Nomor 5 Tahun 2014 tentang Aparatur Sipil Negara;
2. Undang-undang RI Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional;
3. Undang-undang RI Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi;
4. Peraturan Pemerintah RI Nomor 17 Tahun 2010 jo Nomor 66 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan;
5. Keputusan Presiden Republik Indonesia Nomor 195 Tahun 1963 jo Kept. Menteri PTIP No. 153 Tahun 1963 tentang Pendirian Unsoed;
6. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor 28/2017 tanggal 10 April 2017 tentang Statuta Universitas Jenderal Soedirman;
7. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor 10 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unsoed jo Nomor 23 Tahun 2017 tanggal 3 Maret 2017;
8. Peraturan Menteri Keuangan RI Nomor 127/PMK.02/2019 tentang Standar Biaya Keluaran (SBK) Tahun Anggaran 2020;
9. Keputusan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi RI Nomor 222/M/KPT.KP/ 2018 tanggal 30 April 2018 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Rektor Universitas Jenderal Soedirman Periode 2018 – 2022 ;
10. SK Rektor Unsoed No. Kept. 175/UN23/KP.02.02/2019 tanggal 4 Februari 2019 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian

MEMUTUSKAN

- Menetapkan : KEPUTUSAN KETUA LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN TENTANG PELAKSANA PENELITIAN SKEMA RISET UNGGULAN UNSOED (TERAPAN) UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN TAHUN ANGGARAN 2020
- KESATU : Menugaskan kepada dosen yang namanya tercantum dalam lampiran keputusan ini untuk melaksanakan penelitian yang judul, biaya, waktu dan tugas dalam penelitian masing-masing termaktub dalam surat keputusan ini selanjutnya disebut "Peneliti"
- KEDUA : Dalam melaksanakan tugasnya "Peneliti" membuat laporan dan bertanggungjawab kepada Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Jenderal Soedirman.
- KETIGA : Penelitian dilakukan selama 8 (delapan) bulan mulai 2 Maret 2020 sampai dengan 30 November 2020
- KEEMPAT : Biaya pelaksanaan penelitian di bebaskan kepada DIPA BLU LPPM Unsoed.
- KELIMA : Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Purwokerto
Pada tanggal, 18 Pebruari 2020



RIEDA NAUFALIN

NIP. 19701121199512 2 001

Lampiran : Surat Keputusan Ketua LPPM Universitas Jenderal Soedirman
 Nomor Kept. : 118/UN23.18/PT.01.05/2020 tanggal 18 Pebruari 20
 Pelaksana Penelitian Skema Riset Unggulan Unsoed (Terapan)
 Universitas Jenderal Soedirman Tahun Anggaran 2020

No	Personalia	Jabatan	Judul Penelitian	Dana Disetujui (Rp)	Fa
1	Prof. Ir. Totok Agung Dwi Haryanto, MP, Ph.D Agus Riyanto, SP., MSI. Sugiyono, S.Si., Ph.D Dr. Ir. Ponendi Hidayat, MP.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Perakitan Varietas Unggul Kedelai Berdaya Hasil Tinggi, Berbiji Besar Dan Berumur Genjah	50,000,000	Per
2	Dr. Pepita Haryanti, S.TP., M.Sc Condro Wibowo, STP, MSc, PhD Dr. Rumpoko Wicaksono, S.P., M.P	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Pemanfaatan Sumber Daya Lokal Untuk Pembuatan Edible Coating Dan Penggunaannya Pada Buah Dengan Berbagai Metode Aplikasi	55,000,000	Per
3	Karseno, SP., MP., Ph.D Dr.Ir. Tri Yanto, M.T. Dr. Isti Handayani, STP, MP	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Pengembangan Produk Pangan Berbasis Kelapa Sebagai Produk Unggulan Daerah Dalam Menunjang Ketahanan Pangan Nasional (Tahun Ke-2)	50,000,000	Per
4	Dr. Purwanto, SP., M.Sc Ir. Teguh Widiatmoko, M.P. Ir. Bambang Rudianto Wijanarko, MP	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Aplikasi Konsorsium Pgpr Unggul Indigenous Tanah Sawah Untuk Meningkatkan Kesehatan Tanaman, Efisiensi Pemupukan Dan Hasil Tanaman Padi	50,000,000	Per
5	Dr. Nuniek Ina Ratnaningtyas, M.S. Dr. Hernayanti, M.Si. Dr. Nuraeni Ekowati, M.S.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Potensi Antidiabetik Dan Antioksidan Coprinus Comatus Pada Tikus Putih Model Diabetes Yang Diinduksi Streptozotocin	57,500,000	Bi
6	Dr. Adi Wiratno, MM, Ak. Drs. Sukirman, M.Si, Ak. Drs. I Wayan Mustika, Ak. M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Akuntansi Aset Biologis Pada Usaha Kecil Dan Menengah Perkebunan Kopi Banjarnegara	41,500,000	Eko dan
7	Ir. Juni Sumarmono, M.Sc., Ph.D Dr. Nur Aini, S.TP., MP Eka Safitri, S.Pd.I., M.Pd.I	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Formulasi Keju Analog Dari Jagung Manis Menggunakan Maltodekstrin Sebagai Bahan Pengisi Dan Buah Lokal Sebagai Pengatur Keasaman	55,000,000	Peter

8	Dr. Ir. Datta Dewi Purwantini, MS Dr.sc.agr. Ir. R. Singgih Sugeng Santosa, M.P. Setya Agus Santosa, S.Pt., MP Dr. Ir. Agus Susanto, M.Sc.Agr.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Penetapan Prolactin Gene Berbasis SNP Terkait Kinerja Reproduksi Dan Produksi Sebagai Dasar Seleksi Itik Lokal Di Kabupaten Banyumas	52,500,000
9	Dr.sc.agr. Ir. Muhamad Bata, MS Dr. Ir. Sri Rahayu, M.Si. Dr. Ir. Efka Aris Rimbawanto, MP	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Performa, Kecepatan Makan Dan Kecernaan Nutrien Berbagai Bangsa Sapi Lokal Yang Diberi Pakan Jerami Padi Amoniasi Dan Konsentrat	52,500,000
10	Dr. Ir. Krismiwati Muatip, M.Si Titin Widiyastuti, S.Pt, M.Si Dr. Ir. Sri Rahayu, M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Profil & Potensi Hijauan Pakan Dan Limbah Agroindustri Di Wilayah Kabupaten Banyumas Untuk Pengembangan Ternak Ruminansia Lokal	50,000,000
11	Dr. Ir. Elly Tugiyanti, MP Dr. Ir. Emmy Susanti, MP.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I	Pengaruh Pakan Tanpa Antibiotic Growth Promotor Terhadap Respon Fisiologi, Animal Welfare Dan Biaya Produksi Dua Strain Ayam Broiler Yang Berbeda (Tahun Kedua)	55,000,000
12	Saryono Hanadi, S.H., M.H. Alef Musyahadah Rahmah, S.H., M.H. Nayla Alawiya, S.H., M.H. Drs . Antonius Sidik Maryono, S.H., M.S.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Model Pembangunan Hukum Yang Integratif Berbasis Inklusi Sosial Dalam Rangka Pembaharuan Hukum Pemerintahan Desa Di Kabupaten Banyumas (Tahun Kedua)	52,500,000
13	Dr. Abdul Aziz Nasihuddin, S.H, M.H. Dr. Slamet Rosyadi, S.Sos., M.Si. Dr. Kadar Pamudji, S.H., M.H.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Model Pembangunan Kawasan Perdesaan Untuk Pengembangan Potensi Agro Wisata Berbasis Komunitas Di Kecamatan Somagede Kabupaten Banyumas (Penelitian Lanjutan)	55,000,000
14	Dr.Eng. Suroso, S.T., M.Eng. Hari Siswantoro, S.T., M.T., Ph.D.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I	Penerapan Operasi Paralel Inverter Sumber Arus Dan Inverter Sumber Tegangan Pada Pembangkit Listrik Tenaga Surya	52,500,000
15	Dr. Eng. Agus Maryoto, ST., MT Arnie Widyaningrum, ST., M.T. Dr . Rachmad Setijadi, S.Si., M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Pengaruh Penggunaan Calcium Stearate Terhadap Sifat Fisik Dan Mekanik Mortar Dan Beton	55,000,000

16	Dr. Ir. Hidayah Dwiyantri, M.Si Dr. Ir. V. Prihananto, M.Si dr. Diah Krisnansari, Msi Ir. Retno Setyowati, M.P.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Pengembangan Kopi Mix Low Glycemic Index Dengan Penambahan Minyak Sawit Merah Dan Ekstrak Beras Hitam. Kajian Terhadap Efek Hipoglikemik Dan Anti Stress Oksidatif	55,000,000
17	Budi Dharmawan, S.P., M.Si., Ph.D. Ratna Satriani, S.P., M.Sc Ulfah Nurdiani, SP, M.Sc.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Desain Sistem Penunjang Keputusan Strategi Bersaing Varietas Unggul Padi Gogo "Inpago Unsoed 1" Menggunakan Blue Ocean Strategy	55,000,000
18	Arief Sudarmaji, S.T., M.T., Ph.D. Susanto Budi Sulistyio, S.TP., M.Si., Ph.D. Ir. Agus Margiwyatno, MS., Ph.D Dr. Ir. Saporso, MP	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Deteksi Kemurnian Dan Adulterasi Minyak Nilam Berbasis Sistem Penciuman Elektronik (E-Nose)	60,000,000
19	Ahadiyah Yugi Rahayu, S.P., M.Si., D.Tech.Sc. Ahmad Fauzi, S.P., M.P. Okti Herliana, SP., MP. Dr. Ir. Achmad Iqbal, M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Profil Kontaminasi Logam Berat Arsenik (As), Kadmium (Cd), Krom (Cr) Dan Timbal (Pb) Di Lahan Budidaya Padi Sawah Serta Upaya Remediasi Guna Mendukung "Go Organic"	40,000,000
20	Prof. Dr.rer.nat. Imam Widhiono MZ, MS Dr. Eming Sudiana, M.Si. Drs. Darsono, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Dampak Introduksi Lebah Madu Pada Lahan Pertanian Terhadap Keragaman Lebah Liar Penyerbuk	59,000,000
21	Dr. Pudji Widodo, M.Sc. Dr. Elly Proklamasingih, M.P.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I	Kemotaksonomi Kultivar Jambu (Syzygium Spp.)	47,500,000
22	Dr. Agus Hery Susanto, M.S. Dr. Murni Dwiati, M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I	Pengembangan Tanaman Kantong Semar Nepenthes Gymnamphora Berbasis Deteksi Dini Jenis Kelamin Secara Molekuler	55,000,000
23	Dr. Bambang Heru Budianto, MS. drh. Rokhmani, M.Si. Edi Basuki, Ph.D	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Faktor Ekologis Yang Menentukan Kelulushidupan Phytoseius Amba Resisten Temperatur Dan Augmentasinya Dalam Upaya Pengendalian Tetranychus Urticae Koch	46,250,000

24	Dr. Agus Nuryanto, SS.Si., M.Si. Dr. Farida Nur Rachmawati, Msi Dr. rer. nat. Moh. Husein Sastranegara, M.Si. Drs. Kusbiyanto, Msi Dr. Pi. Dian Bhagawati, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III Anggota Peneliti IV	Status Taksonomi Dan Genetika Populasi Ikan Sidat (<i>Anguilla Spp</i>) Di Perairan Sungai Kabupaten Cilacap Sebagai Acuan Pemanfaatan Berkelanjutan	59,000,000
25	Dr. Trisnowati Budi Ambarningrum, M.Si. Trisno Haryanto, S.Si., M.Si. Drs. Edi Basuki, Ph.D. Dr. Dwi Sarwani Sri Rejeki, SKM, M.Kes(Epid) Prof. Dra. Endang Srimurni Kusmintarsih, Ph.D	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III Anggota Peneliti IV	Status Resistensi Kecoak Jerman, <i>Blattella Germanica L.</i> Asal Beberapa Pasar Di Kota Purwokerto Serta Penguujian Model Trap Dalam Upaya Pengendaliannya	52,500,000
26	Dr. Untung Susilo, M.S. Eko Setio Wibowo, S.Si., M.Si Dra. Yulia Sistina, MSc., PhD.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Aplikasi Strategi Pemberian Pakan Untuk Meningkatkan Pertumbuhan, Efisiensi Pakan Dan Aktivitas Enzim Digesti Ikan Lunjar, <i>Rasbora</i> <i>Lateristriata Blkr.</i>	46,000,000
27	Drs. Priyo Susatyo, M.Si Dra . Titi Chasanah, MP Drs. Sugiharto, M.Si Dra . Nuning Setyaningrum, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Pemetaan Database Bioreproduksi Ikan Tangkapan Di Beberapa Ruas Sungai Di Wilayah Banyumas: Upaya Pengembangan Potensi Reproduksi, Domestikasi Dan Budidayanya Secara Berkelanjutan Menuju Ketahanan Pangan	54,500,000
28	Dr. Sri Lestari, S.Si., M.Si Dr. Oedjijono, M.Sc Drs. Slamet Santoso, M.S	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Bioremediasi Logam Berat Pada Limbah Cair Tekstil Dengan Campuran Tanaman Air Dan Rhizobakteria	54,500,000
29	Dr. Ratna Stia Dewi, S.Si., M.Sc. Drs. Aris Mumpuni, MPhil. Mardiyah Kurniasih, S.Si., M.Sc	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Bioreaktor Artifisial Terintegrasi Aplikasi Monitoring Berbasis Mobile : Fungsionalisasi Coating Magnetite- <i>Aspergillus Spp.</i> Dalam Degradasi Limbah Batik	54,500,000
30	Istiqomah, SE,M.Sc., Ph.D Arif Andri Wibowo, S.E., M.E. Prof . Wiwiek Rabiatal Adawiyah, M.Sc, PhD	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Model Pengembangan Agrowisata Dan Agribisnis Hilirisasi Bengkoang di Desa Linggasari Kecamatan Kembaran Kabupaten Banyumas	50,000,000

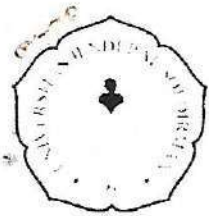
31	Dr. Rahab, SE., M.Sc Dr. Lusi Suwandari, M.Si Drs Sudjono, M.Si., Ak, CA	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Model Bisnis Berwawasan Lingkungan Pada Iklim Batik Banyumas Guna Mendorong Daya Saing Berkelanjutan Industri Kreatif Lokal	50,000,000	
32	Prof. Dr. Ir. Fransisca Maria Suhartati, SU Prof. Dr. Ir. Wardhana Suryapratama, MS	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Optimalisasi Produksi Protein Mikroba Rumen Melalui Rekayasa Pakan Aditif	60,000,000	I
33	Dr.Ir. Efka Aris Rimbawanto, MP Dr.sc.agr. Ir. Muhamad Bata, MS Dr. Ir. Bambang Hartoyo, Msi	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Suplementasi Slow Release Urea (Urea-Zeolit) Dan Bungkil Kedelai Terproteksi Dalam Pakan Ruminansia	57,000,000	I
34	Ir. Imam Suswoyo, M.Agr.Sc. Dr. Ir. Rosidi, M.P.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I	Upaya Peningkatan Kenyamanan, Produktivitas, Keamanan Produk Dan Pendapatan Peternak Itik Dengan Menggunakan Probiotik Alami Guna Menghadapi Dampak Perubahan Iklim	55,000,000	I
35	Mochamad Sugiarto, Ph.D Dr. Yusmi Nur Wakhidati, M.Si Ir. Oentoeng Edy Djatmiko, MP Dr. Ir. Syarifuddin Nur, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Pola Integrasi Sosial Pada Kelompok Peternak Sapi Jabres Untuk Mewujudkan Keberlanjutan Usaha Peternakan Di Kabupaten Brebes	51,500,000	I
36	Dr. Dyah Retna Puspita, M. Hum. Hikmah Nuraini, S.Sos, MPA Drs. Pawrtha Dharmá, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Model Optimalisasi Program “Kampung Kb” Guna Mewujudkan Desa Berketahanan Keluarga Di Kabupaten Banyumas	57,500,000	I
37	Dr. Edy Suyanto, M.Si. Drs . Fransiskus Xaverius Wardiyono, Msi Dra. Tri Rini Widyastuti, M.Si Dr. Soetji Lestari, M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti IV	Rekayasa Sosial Model Partisipasi Masyarakat Dalam Pengelolaan Sampah Domestik Green Waste Sistem Hanggar Berbasis Aplikasi Sampah On-Line (Salinmas) Menuju Purwokerto Green City Dan Smart City	50,000,000	I
38	Dr. Tyas Retno Wulan, M.Si Dr. Drs Muslihudin, Msi Ankarlina Pandu Primadata, S.Sos., M.Si. Drs . Dalhar Shodiq, M.Si	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II Anggota Peneliti III	Model Integrasi Sustainable Development Goals (Sdgs) Pada Perencanaan Dan Penganggaran Desa (Studi Terhadap Kepala Desa Perempuan Di Kabupaten Banyumas)	55,000,000	I

39	Dr. Sulyana Dadan, S.Sos., M.A. Dr. Rawuh Edy Priyono, M.Si. Dra. Endang Dwi Sulistyoningih, M.Si.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Model Pemberdayaan Masyarakat Adat Melalui Digitalisasi Dan Penguatan Literasi Teknologi Informasi Pada Komunitas Bonokeling Kabupaten Banyumas	55,000,000
40	Dr. dr. Fitranto Arjadi, M.Kes. dr. Massita Dwi Y, Sp.KFR dr. Mustofa, M.Sc.	Ketua Peneliti Anggota Peneliti I Anggota Peneliti II	Pengaruh Induksi Berbagai Model Sleep Deprivation Terhadap Fungsi Dan Mikroanatomi Pankreas Dan Otak Pada Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus)	<u>40,000,000</u>



RIFDAMNAUFALIN

NIP. 19701121199512 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Jl. Dr. Suparno Grendeng Purwokerto 53122 Telpon/Fax (0281) 625739
Website : lppm.unsoed.ac.id dan email : lppm_unsoed@yahoo.co.id

KONTRAK PENELITIAN
RISET UNGGULAN UNSOED (TERAPAN)
Tahun Anggaran 2020
Nomor: T/250/UN23.18/PT.01.03/2020

Pada hari ini Senin tanggal Dua Maret tahun Dua Ribu Dua puluh, kami yang bertanda tangan dibawah ini :

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Rifda Naufalin,
SP., M.Si | : Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Soedirman, dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama Universitas Jenderal Soedirman, yang berkedudukan di Jl. Dr. Suparno Grendeng Purwokerto 53122, untuk selanjutnya disebut PIHAK PERTAMA ; |
| 2. Dr. dr. Fitranto Arjadi,
M.Kes | : Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2020 untuk selanjutnya disebut PIHAK KEDUA . |

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama sepakat mengikatkan diri dalam suatu Kontrak Penelitian Riset Unggulan Unsoed (Terapan) Tahun Anggaran 2020 dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut:

Pasal 1

Kontrak Penelitian ini berdasarkan kepada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2003, tentang Keuangan Negara;
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2003, tentang Sistem Pendidikan Nasional;
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 10 Tahun 2004, tentang Pemeriksaan Pengelolaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 15 Tahun 2004, tentang Pemeriksaan Pengelolaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2012, tentang Pendidikan Tinggi;
6. Undang-Undang Nomor 39 Tahun 2008, Tentang Kementerian Negara;

7. Peraturan Presiden Nomor 13 Tahun 2015, tentang Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi;
8. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 39/PMK.02/2018 tentang Standar Biaya Keluaran Tahun 2018;
9. Peraturan Direktur Jenderal Perbendaharaan Kementerian Keuangan Republik Indonesia Nomor 15/PB/2017, tentang Petunjuk Pelaksanaan Pembayaran Anggaran Penilaian Berbasis Standar Biaya Keluaran Sub Keluaran Penelitian;
10. Keputusan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi RI Nomor 222/M/KPT.KP/2018 tanggal 30 April 2018 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Rektor Universitas Jenderal Soedirman Periode 2018 – 2022 ;
11. SK Rektor Unsoed No. Kept. 175/UN23/KP.02.02/2019 tanggal 4 Februari 2019 tentang Pemberhentian dan Pengangkatan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat periode 2019-2023;

Pasal 2

Ruang Lingkup Kontrak

PIHAK PERTAMA memberi pekerjaan kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima pekerjaan tersebut dari **PIHAK PERTAMA**, untuk melaksanakan dan menyelesaikan Penelitian Riset Unggulan Unsoed (Terapan) Tahun Anggaran 2020 dengan judul **"Pengaruh Induksi Berbagai Model Sleep Deprivation Terhadap Fungsi Dan Mikroanatomi Pankreas Dan Otak Pada Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus)"**.

Pasal 3

Jangka Waktu

Kontrak Penelitian ini dilaksanakan dalam jangka waktu 9 (sembilan) bulan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 terhitung sejak **tanggal 2 Maret 2020** dan berakhir pada **tanggal 30 Nopember 2020**

Pasal 4

Hak dan Kewajiban Para Pihak

(1) Hak dan Kewajiban **PIHAK PERTAMA**:

- a. **PIHAK PERTAMA** berkewajiban untuk memberikan dana penelitian kepada **PIHAK KEDUA** .
- b. **PIHAK PERTAMA** berhak untuk memantau pengunggahan ke laman SINELITABMAS dokumen sebagai berikut :
 1. Revisi proposal penelitian
 2. Laporan kemajuan pelaksanaan penelitian
 3. SPTB atas dana penelitian yang telah ditetapkan
 4. Laporan akhir penelitian
 5. Luaran penelitian.

(2) Hak dan Kewajiban **PIHAK KEDUA**:

- a. **PIHAK KEDUA** berhak menerima dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA**
- b. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk mengunggah ke laman SINELITABMAS dokumen sebagai berikut :
 1. Revisi proposal penelitian
 2. Laporan kemajuan pelaksanaan penelitian
 3. SPTB atas dana penelitian yang telah ditetapkan
 4. Laporan akhir penelitian
 5. Luaran penelitian.
- c. **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab dalam penggunaan dana penelitian yang diterima sesuai dengan proposal kegiatan yang telah disetujui dan berkewajiban menyimpan seluruh bukti pengeluaran.
- d. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** Surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTB), laporan penggunaan dana sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3.

Pasal 5

Dana Penelitian

- (1) Besarnya dana untuk melaksanakan penelitian dengan judul sebagaimana dimaksud pada Pasal 2 adalah sebesar Rp.40,000,000 (**Empat puluh juta rupiah**) sudah termasuk pajak.
- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Universitas Jenderal Soedirman

Pasal 6

Tata Cara Pembayaran Dana Penelitian

- (1) **PIHAK PERTAMA** akan membayarkan Dana Penelitian kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
 - a. Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total dana penelitian yaitu $70\% \times \text{Rp } 40,000,000 = \text{Rp.28,000,000}$ (**Dua puluh delapan juta rupiah**) yang akan dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PIHAK KEDUA** menandatangani kontrak penelitian dan menyerahkan hardcopy proposal.
 - b. Pembayaran Tahap Kedua sebesar 30% dari total dana penelitian yaitu $30\% \times \text{Rp.40,000,000} = \text{Rp.12,000,000}$ (**Dua belas juta rupiah**), dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke SINELITBMAS yaitu Revisi Proposal, Laporan Kemajuan Pelaksanaan Penelitian, dan Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) atas dana penelitian yang telah ditetapkan paling lambat 10 September 2020
- (2) **PIHAK PERTAMA** tidak bertanggung jawab atas keterlambatan dan/atau tidak terbayarnya sejumlah dana sebagaimana dimaksud pada ayat (1) yang disebabkan karena kesalahan **PIHAK KEDUA** dalam menyampaikan data peneliti, nama bank, nomor rekening, dan persyaratan lainnya yang tidak sesuai dengan ketentuan.

Pasal 7
Monitoring dan Evaluasi

- (1) **PIHAK PERTAMA** dalam rangka pengawasan akan melakukan Monitoring dan Evaluasi terhadap kemajuan pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2020.
- (2) Peneliti/pelaksanaan penelitian yang tidak hadir dalam kegiatan pemantauan dan evaluasi tanpa pemberitahuan sebelumnya, maka Pelaksanaan Penelitian tidak berhak menerima sisa dan tahap kedua.
- (3) Monitoring dan Evaluasi pelaksanaan penelitian akan dilaksanakan pada Minggu ke - 3 bulan September 2020.

Pasal 8
Target Luaran

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk mencapai target luaran wajib penelitian sesuai yang disampaikan dalam proposal.
- (2) **PIHAK KEDUA** diharapkan dapat mencapai target luaran tambahan.
- (3) **PIHAK KEDUA** wajib mengunggah luaran wajib dan luaran tambahan ke SINELITABMAS selambat-lambatnya 10 Desember 2020
- (4) **PIHAK KEDUA** wajib mengikuti evaluasi luaran yang jadwalnya akan ditentukan kemudian.

Pasal 9
Laporan Pelaksanaan Penelitian

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** berupa laporan kemajuan dan laporan akhir, luaran penelitian, SPTB dan rekapitulasi penggunaan anggaran sesuai dengan jumlah dana yang diberikan oleh **PIHAK PERTAMA** yang tersusun secara sistematis sesuai pedoman yang ditentukan oleh **PIHAK PERTAMA**.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Laporan Kemajuan, dan surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTB), atas dana penelitian yang telah ditetapkan SINELITABMAS paling lambat **10 September 2020**
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan *Hardcopy* Laporan Kemajuan, (SPTB) dan Rekapitulasi Penggunaan Anggaran 70% kepada **PIHAK PERTAMA**, paling lambat **15 September 2020**
- (4) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah, penyelesaian seluruh pekerjaan pada SINELITABMAS berupa :
 - a. Laporan Akhir penelitian
 - b. Luaran Penelitian
 - c. SPTBPaling lambat tanggal 30 Nopember 2020

- (5) Laporan hasil Penelitian sebagaimana tersebut pada ayat (4) harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:
- a. Format Font Times New Roman ukuran 12 spasi 1,5;
 - b. Bentuk/ukuran kertas A4;
 - c. Warna sampul muka (cover) disesuaikan dengan Panduan Riset Tahun 2020.
- (6) Hardcopy laporan hasil program Penelitian harus dikumpulkan ke **PIHAK PERTAMA** paling lambat tanggal **30 Nopember 2020**

Pasal 10 **Penilaian Luaran**

1. Penilaian luaran penelitian dilakukan oleh Komite Penilai/*Reviewer* Luaran sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
2. Evaluasi luaran Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Desember 2020.

Pasal 11 **Penggantian Keanggotaan**

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua pelaksana tidak dapat melaksanakan Penelitian ini, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua pelaksana yang merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua sebagaimana dimaksud pada ayat(1), maka **PIHAK KEDUA** harus mengembalikan dana penelitian kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (3) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (2) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 12 **Pajak**

PIHAK PERTAMA berkewajiban memungut dan menyetor pajak ke kantor pelayanan pajak setempat yang berkenan dengan kewajiban pajak berupa PPN sebesar 10% dan PPh pasal 23 sebesar 2 %.

Pasal 13 **Kekayaan Intelektual (KI)**

1. Hak Kekayaan Intelektual yang Dihasilkan Dari Pelaksanaan penelitian Menjadi milik Pihak Pertama Diatur Dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan.
2. Setiap publikasi, makalah dan/atau ekspos dalam bentuk apapun yang berkaitan dengan hasil penelitian ini wajib mencatumkan pemberi dan penelitian.
3. Hasil Pelaksanaan Penelitian berupa peralatan dan/atau alat yang di beli dari pelaksanaan Penelitian ini adalah milik Negara yang dapat di hibahkan kepada melalui Berita Acara Serah Terima (BAST) sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan:

Pasal 14 **Sanksi**

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Penelitian ini telah berakhir, namun **PIHAK KEDUA** belum menyelesaikan tugasnya, terlambat mengirim laporan Kemajuan, dan/atau terlambat mengirim laporan akhir, maka **PIHAK KEDUA** dikenakan sanksi administratif berupa penghentian pembayaran dan tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu dua tahun berturut-turut.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat mencapai target luaran, maka kekurangan capaian target luaran tersebut akan dicatat sebagai hutang **PIHAK KEDUA** kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (3) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat mencapai target luaran pada akhir tahun maka **PIHAK KEDUA** tidak bisa mendapatkan dana penelitian pada tahun berikutnya.

Pasal 15 **Keadaan Kahar**

- (1) PARA PIHAK dibebaskan dari tanggung jawab atas keterlambatan atau kegagalan dalam memenuhi kewajiban yang dimaksud dalam **Kontrak Penelitian** disebabkan atau diakibatkan oleh peristiwa atau kejadian diluar kekuasaan **PARA PIHAK** yang dapat digolongkan sebagai keadaan memaksa (*force majeure*).
- (2) Peristiwa atau kejadian yang dapat digolongkan keadaan memaksa (*force majeure*) dalam **Kontrak Penelitian** ini adalah bencana alam, wabah penyakit, kebakaran, perang, blockade, peledakan, sabotase, revolusi, pemberontakan, huru-hara, serta adanya tindakan pemerintah dalam bidang ekonomi dan moneter yang secara nyata berpengaruh terhadap pelaksanaan **Kontrak Penelitian** ini.

- (3) Apabila terjadi keadaan memaksa (*force majeure*) maka pihak yang mengalami wajib memberitahukan kepada pihak lainnya secara tertulis, selambat-lambatnya dalam waktu 7 (tujuh) hari kerja sejak terjadinya keadaan memaksa (*force majeure*), disertai dengan bukti-bukti yang sah dari pihak yang berwajib, dan **PARA PIHAK** dengan itikad baik akan segera membicarakan penyelesaiannya.

Pasal 16 **Duplikasi Judul Proposal**

- (1) Apabila di kemudian hari terhadap judul Riset Unggulan Unsoed (Terapan) sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ditemukan adanya duplikasi dengan penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidakjujuran, itikad tidak baik, dan/atau perbuatan yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah dari atau dilakukan oleh **PIHAK KEDUA**, maka perjanjian Penelitian ini dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya akan disetor ke Kas Negara.
- (2) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (1) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 17 **Penyelesaian Sengketa**

Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah dan mufakat, dan apabila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah dan mufakat maka penyelesaian dilakukan melalui proses hukum.

Pasal 18 **Lain-lain**

- (1) **PIHAK KEDUA** menjamin bahwa penelitian dengan judul tersebut di atas belum pernah dibiayai dan/atau diikutsertakan pada pendanaan penelitian lainnya, baik yang diselenggarakan oleh instansi, lembaga, perusahaan atau yayasan, baik di dalam maupun di luar negeri.
- (2) Segala sesuatu yang belum cukup diatur dalam Kontrak Penelitian ini dan dipandang perlu diatur lebih lanjut dan dilakukan perubahan oleh **PARA PIHAK**, maka perubahan-perubahannya akan diatur dalam perjanjian tambahan atau perubahan yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari Kontrak ini.

Kontrak Penelitian ini dibuat dan ditanda tangani oleh PARA PIHAK pada hari dan tanggal tersebut di atas, dibuat dalam rangkap 2 (dua) dan bermeterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku, yang masing-masing mempunyai kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA



Prof. Dr. Rifda Naufalin, SP., M.Si
NIDN: 0021117001

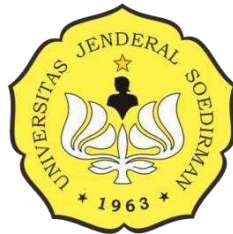
PIHAK KEDUA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fitranto", written over a horizontal line.

Dr. dr. Fitranto Arjadi, M.Kes
NIDN: 0022117101

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH RISET UNGGULAN TERAPAN**

**PENGARUH INDUKSI BERBAGAI MODEL *SLEEP DEPRIVATION*
TERHADAP FUNGSI DAN MIKROANATOMI PANKREAS DAN OTAK
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN**



Oleh :

Dr dr Fitranto Arjadi MKes NIDN 0022117101

Dr Massita Dwi Y SpKFR NIDN 0023077701

Dr Mustofa MSc NIDN 0028027809

No Kontrak penelitian :

T/250/UN23.18/PT.01.03/2020

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
PURWOKERTO**

2020

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Pengaruh Induksi Berbagai Model Sleep Deprivation Terhadap Toleransi Glukosa Serta Gambaran Histologi Pankreas Dan Otak Tikus Putih Jantan
2. Bidang Ilmu : Anatomi/ Kedokteran
3. Ketua Tim Pelaksana :
 - a. Nama : Dr dr Fitranto Arjadi MKes
 - b. NIP : 197111222000121001
 - c. NIDN : 0022117101
 - d. Disiplin Ilmu : Anatomi
 - e. Pangkat/Golongan : Pembina/IVA
 - f. Jabatan : Lektor Kepala
 - g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran/Kedokteran
 - h. Alamat Kantor : Jl. Dr. Gumbreg No. 1 Mersi, Purwokerto Timur
 - i. Telp/Faks/E-mail : (0281) 622011/ (0281) 624990/ fk@unsoed.ac.id
 - j. Telp/ Hp : 08112522022
4. Jumlah Anggota : 2 orang
 - a. Nama Anggota I : dr. Massita SpKFR NID 0023077701
Fakultas/Jurusan : Kedokteran/Kedokteran
 - b. Nama Anggota II : dr. Mustofa MScNIDN 0028027809
Fakultas/Jurusan : Kedokteran/Kedokteran
5. Lokasi Kegiatan : Lab. Anatomi FK Unsoed
6. Jumlah Biaya Tahun Berjalan : Rp. 40.000.000,00

Purwokerto, 22 September 2020



Ketua Tim Pelaksana

Dr. dr. Fitranto Arjadi, M.Kes
NIP. 1971111110001210



Prof. Dr. Istikom Nurdin, SP. M. Si.
NIP. 197401111995122001

RINGKASAN

Kurang tidur (*sleep deprivation*) dapat menyebabkan stres oksidatif pada organ pankreas. Stres oksidatif berhubungan dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan disfungsi sel beta pankreas. Disfungsi sel beta pankreas berpengaruh terhadap histopatologi pulau Langerhans pankreas dan berubah secara fungsi maupun struktur. Individu dengan *sleep deprivation* dilaporkan mengalami gangguan yang signifikan dalam fungsi kognisi dan kontrol perilaku yang diperankan oleh korteks prefrontal serebrum.

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pankreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi model stres *paradoxical sleep deprivation* dan *total sleep deprivation*. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan desain *post test only with control group*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 30 ekor dibagi secara acak menjadi 3 kelompok, yaitu A (kontrol sehat), B (*Paradoxical Sleep Deprivation* 20 jam/hari selama 8 hari), dan C (*Total Sleep Deprivation* 24 jam/hari selama 8 hari). Model *sleep deprivation* menggunakan *modified multiple platform method* (MMPM). Organ pankreas dan otak dibuat preparat histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Jumlah dan diameter pulau Langerhans, sel neuroglia dan sel piramidal diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x dan kadar glukosa darah diukur menggunakan glukometer pada menit ke-0, 60 dan 120.

Hasil rerata jumlah pulau Langerhans tertinggi hingga terendah adalah kelompok A ($22,90 \pm 13,54$), C ($22,00 \pm 10,34$), dan B ($21,33 \pm 6,42$). Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($p > 0,05$). Rerata diameter pulau Langerhans tertinggi hingga terendah adalah kelompok A ($0,213 \pm 0,019$) mm, B ($0,160 \pm 0,011$) mm, dan C ($0,132 \pm 0,031$) mm. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) kemudian uji *Post-Hoc LSD* menghasilkan perbedaan rerata yang signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok A-B, A-C, dan B-C. Rerata jumlah sel piramidal korteks prefrontal tertinggi terdapat pada KI ($77,10 \pm 26,113$), diikuti KII ($66,67 \pm 24,556$) dan terendah KIII ($65,90 \pm 34,911$). Uji *One Way ANOVA* didapatkan $p > 0,05$, yaitu $p = 0,638$. Rerata jumlah sel neuroglia normal tertinggi terdapat pada K.A ($126,00 \pm 48,81$), diikuti K.B ($97,78 \pm 28,17$), dan terendah K.C ($75,80 \pm 22,79$). Uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) kemudian uji *Post-Hoc Bonferroni* menunjukkan perbedaan rerata signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok A-C, dan tidak signifikan ($P > 0,05$) pada kelompok A-B dan B-C. Hasil rerata LDDK⁰⁻¹²⁰ kadar glukosa dari nilai terendah hingga tertinggi secara berurutan adalah kelompok

kontrol (14082 ± 955), PSD (15670 ± 1352), dan TSD (16293 ± 2195) mg.menit/dL. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$), kemudian dilanjutkan uji *Post-Hoc LSD* yang menunjukkan perbedaan rerata signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol dengan PSD dan kelompok kontrol dengan TSD.

Penelitian ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan jumlah pulau Langerhans tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi stres *sleep deprivation* dan kontrol, sedangkan pada analisis terhadap diameter pulau Langerhans menunjukkan hasil yang lebih rendah pada tikus putih yang diinduksi stres *sleep deprivation* dibandingkan kontrol. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata jumlah sel piramidal korteks prefrontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi *paradoxical sleep deprivation* (PSD) dan *total sleep deprivation* (TSD). Tidak terdapat perbedaan signifikan jumlah sel neuroglia tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi berbagai model stres *sleep deprivation*. Toleransi glukosa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi stres *sleep deprivation* lebih rendah dibandingkan kontrol.

Kata kunci : *sleep deprivation*, pankreas, otak

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	v
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan dan Manfaat	19
D. Keaslian Penelitian.....	4
BAB III METODE PENELITIAN	7
A. Materi dan Bahan	21
B. Rancangan Penelitian	23
C. Rancangan Percobaan dan Pengambilan Sampel.....	23
D. Variabel yang Diukur	27
E. Cara Mengukur Variabel	29
F. Tata Urutan Kerja.....	32
G. Analisis Data.....	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
A. Hasil Penelitian	39
B. Pembahasan	57
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	71
A. Kesimpulan.....	71
B. Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1Keaslian Penelitian	4
Tabel 3. 1Definisi Operasional Variabel.....	27
Tabel 4. 1 Rerata Berat Badan Hewan Coba Selama Penelitian	39
Tabel 4. 2 Rerata Kadar Glukosa Darah	40
Tabel 4. 3 Rerata Nilai LDDK0-120	42
Tabel 4. 4 Rerata Jumlah Pulau Langerhans	44
Tabel 4. 5 Rerata Diameter Pulau Langerhans	46
Tabel 4. 6 Rerata Persentase Sel Beta Pankreas Normal	50
Tabel 4. 7Rerata jumlah sel piramidal setiap kelompok perlakuan.....	54
Tabel 4. 8 Rerata Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Hewan Coba	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3. 1 Alur Perlakuan Penelitian	27
Gambar 4. 1 Kurva Rerata Glukosa Darah dan Waktu Pengukuran	41
Gambar 4. 2 Rerata LDDK0-120 Kadar Glukosa Darah.	43
Gambar 4. 3 Organ pankreas dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400X.....	45
Gambar 4. 4 Pulau Langerhans pankreas pewarnaan HE pada perbesaran 400x..	46
Gambar 4. 5 Rerata diameter pulau Langerhans	48
Gambar 4. 6 Hasil pengamatan sel beta pada pulau Langerhans pankreas.....	49
Gambar 4. 7 Rerata Jumlah Sel Beta Pankreas.	51
Gambar 4. 8 Sel piramidal korteks prefrontal.	52
Gambar 4. 9 Gambaran histologi sel piramidal korteks prefrontal	53
Gambar 4. 10 Hasil Pengamatan Preparat Histologi Medial Korteks Prefrontal .	56
Gambar 4. 11 Rerata Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Tikus.	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Lembar Persetujuan Etik	82
Lampiran 2 Prosedur Pengambilan Sampel	83
Lampiran 3 Komposisi Pakan Standar Comfeed AD II.....	84
Lampiran 4 Tata Urutan Kerja	85
Lampiran 5 Tata Cara Pengukuran Toleransi Glukosa.....	86
Lampiran 6. Tata Cara pembedahan dan Pengambilan Organ Pankreas	87
Lampiran 7. Cara Pembedahan dan Pengambilan Korteks Prefrontal.....	88
Lampiran 8. Pembuatan Preparat Hematoksin Eosin Pankreas Tikus.....	93
Lampiran 9. Pembuatan Preparat Hematoksin Eosin Otak Tikus	95
Lampiran 10. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus	97
Lampiran 11. Hasil Pengukuran Glukosa Darah	98
Lampiran 12. Hasil Penghitungan Jumlah Pulau Langerhans.....	99
Lampiran 13. Hasil Pengukuran Diameter Pulau Langerhans	100
Lampiran 14. Hasil Penghitungan Sel Beta Pankreas.....	103
Lampiran 15. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Piramidal	105
Lampiran 16. Dokumentasi Penelitian.....	106
Lampiran 17. Hasil Uji Reliabilitas Jumlah Pulau Langerhans	108
Lampiran 18. Hasil Uji Reliabilitas Diameter Pulau Langerhans	109
Lampiran 19. Uji Reliabilitas Pengamatan Jumlah Sel Piramidal.....	110
Lampiran 20. Hasil Uji Reliabilitas Jumlah Sel Neuroglia.....	111
Lampiran 21. Hasil Olah Data Berat Badan.....	112
Lampiran 22. Hasil Olah Data LDDK0-120 Glukosa Darah	115
Lampiran 23. Hasil Olah Data Jumlah Pulau Langerhans Pankreas	117
Lampiran 24. Hasil Olah Data Diameter Pulau Langerhans Pankreas	120
Lampiran 25. Hasil Olah Data Sel Beta Pankreas	123
Lampiran 26. Hasil Olah Data Sel Piramidal	126
Lampiran 27. Hasil Olah Data Jumlah Sel Neuroglia.....	129
Lampiran 28. Draft Publikasi	

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tidur merupakan proses fisiologis yang penting bagi tubuh manusia sehingga harus dijaga kualitas maupun durasinya (Irwin, 2015). Studi epidemiologi menyatakan sekitar 30 % pria dan wanita dengan usia antara 30 - 64 tahun tidur kurang dari 6 jam per hari (Hirshkowitz *et al.*, 2015). *Sleep deprivation* merupakan keadaan berkurangnya durasi tidur, terganggunya waktu tidur, atau kombinasi keduanya. Durasi tidur normal pada orang dewasa adalah 7–8 jam, remaja 9 jam, dan anak-anak 9 jam atau lebih sesuai usia (AASM, 2008). Kekurangan tidur atau *sleep deprivation* dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu *Paradoxical Sleep Deprivation* (PSD) dan *Total Sleep Deprivation* (TSD). Keduanya dapat menyebabkan kerusakan multi organ termasuk otak dan pankreas akibat terjadinya stres oksidatif dan inflamasi (Landolt *et al.*, 2014 ; Periasamy *et al.*, 2015). Kondisi metabolisme pada orang yang kurang tidur memiliki beberapa persamaan dengan penderita diabetes melitus tipe 2, diantaranya penurunan penyerapan glukosa otot, peningkatan *output* glukosa hati, dan disfungsi sel β pankreas (Buxton *et al.*, 2012). Sedangkan penurunan penyerapan glukosa atau hipometabolisme glukosa di otak yang dipicu oleh meningkatnya hormon glukokortikoid dapat menyebabkan eksitotoksisitas glutamat yang dapat berujung dengan kematian sel-sel otak (Squire *et al.*, 2008).

Sleep deprivation menyebabkan penurunan respon sel β pankreas terhadap glukosa yang mengakibatkan penurunan toleransi glukosa dan

penurunan sekresi insulin. Selain itu *sleep deprivation* juga dapat menyebabkan mutasi gen *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) dan *Brain and Muscle ARNT-Like 1* (BMAL1) yang dikaitkan dengan kerusakan atau kegagalan fungsi dari sel β pankreas melalui mekanisme yang belum diketahui secara pasti (Marcheva *et al.*, 2010). Hormon melatonin yang berperan mencegah terjadinya proses apoptosis sel dan melindungi sel dari glukotoksisitas juga mengalami penurunan pada induksi stress ini (Costes, 2015; Rakshit *et al.*, 2014). Glukotoksisitas dapat meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan disfungsi dan perubahan massa sel beta pankreas karena stres oksidatif (Farid *et al.*, 2014). Glukotoksisitas juga menginduksi stres oksidatif pada sel alfa pankreas dan disfungsi sekresi glucagon (Kawamori, 2017). Stres oksidatif akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam jangka panjang dapat memicu kerusakan sel dan jaringan melalui berbagai mekanisme seperti perubahan aktivitas enzimatis, disregulasi ekspresi gen, dan apoptosis sehingga susunan pada pulau Langerhans berubah baik secara struktur maupun fungsi (Robertson dan Harmon, 2007; Keane *et al.*, 2015).

Selain berdampak bagi pankreas *sleep deprivation* juga menyebabkan hipometabolisme glukosa di otak terutama otak bagian thalamus, striatum, hipotalamus, korteks prefrontal, lobus frontal, lobus parietal, lobus temporal, cingulate, korteks visual primer, dan bahkan di otak kecil (Gryglewska, 2010). *Sleep deprivation* mengaktifkan *Hypothalamus-pituitary axis* (HPA) dan sistem simpatoadrenomedular sehingga meningkatkan produksi *corticotropin-releasing hormone* (CRH) dan

arginine-vasopressin (AVP) (Vargas, 2017). Hal tersebut memicu peningkatan episode sekresi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dan glukokortikoid, sekaligus menurunkan ekspresi reseptor glukokortikoid (Chrousos *et al.*, 2000). Glukokortikoid ini meningkatkan pelepasan glutamat di otak dan ekspresi reseptor *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) serta *á-amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid* (AMPA) pada membran postsinaps yang menyebabkan pelepasan blokade ion magnesium (Mg^{2+}) dari reseptor NMDA, dan memicu mobilisasi ion Ca^{2+} dalam jumlah banyak menuju sitosol sebagai sinyal apoptosis sel neuron (Bellei *et al.*, 2017).

Berdasarkan temuan diatas hipometabolisme glukosa merupakan keadaan yang dikaitkan dengan kerusakan organ pankreas dan otak akibat induksi stress sleep deprivation. Sebagian besar penelitian tentang *sleep deprivation* terhadap metabolisme glukosa dilakukan menggunakan subjek manusia (Buxton *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016). Kesulitan dalam mengendalikan pola makan dan perilaku tidur menyebabkan hasil penelitian yang berbeda-beda, sehingga perlu dilakukan penelitian menggunakan hewan coba (Kushida, 2009). Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui apakah induksi sleep deprivation terhadap hewan coba berpengaruh terhadap toleransi glukosa sebagai indikator kemampuan tubuh dalam memetabolisme glukosa. Selain itu peneliti juga ingin mengetahui pengaruh induksi tersebut terhadap jumlah sel beta serta jumlah dan diameter pulau langerhans terkait hubungan sleep deprivation dengan diabetes melitus tipe 2 dan jumlah sel neuroglia serta sel piramidal korteks prefrontal terkait hubungan sleep

deprivation terhadap fungsi kognisi dan kontrol perilaku yang dilaporkan banyak mengalami gangguan saat individu mengalami kekurangan tidur.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, perumusan masalah penelitian ini adalah “Apakah terdapat perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pankreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi model stres *paradoxical sleep deprivation* dan *total sleep deprivation*?”

C. Keaslian Penelitian

Penelitian ini dilakukan didasarkan pada penelitian terdahulu yang tercantum pada Tabel 1.1.

Tabel 1. 1Keaslian Penelitian

No	Judul Penelitian	Persamaan	Perbedaan
1	Judul : <i>EffectsOf Chronic Sleep Deprivation on Glucose Homeostasis In Rats</i> Penulis : Xiaowen Xu, Liang Wang, Yan Zhang, Tianjiao Su, Liying Chen, Yan Zhang, Weifeng, Yuanyuan Xie, Tiantian Wang,	1. Penelitian Xiaowen <i>et al.</i> (2016) dan penelitian ini sama-sama memberikan induksi stres <i>sleep deprivation</i> dengan metode <i>modified multiple platform method</i> (MMPM) pada hewan coba 2. Hewan coba pada penelitian Xiaowen <i>et al.</i> (2016) dan penelitian ini sama-sama menggunakan tikus putih (<i>Rattus</i>	1. Variabel terikat pada penelitian Xiaowen <i>et al.</i> (2016) adalah <i>aspartate transaminase</i> (AST), <i>alanine aminotransferase</i> (ALT), kreatinin, profil lipid, <i>homeostatic model assessment-insulin resistance</i> (HOMA-IR) dan <i>insulin tolerance test</i> (ITT). Sedangkan pada penelitian ini adalah toleransi glukosa oral 2. Penelitian Xiaowen <i>et al.</i> (2016) menggunakan dua kelompok sampel yaitu <i>chronic sleep deprivation</i> (CSD) dan kontrol. Sedangkan pada penelitian ini menggunakan 3 kelompok sampel yaitu

Fan Yang, Li He, Wenjiao Wang, Xuemei Fu, Hongxia Hao, Yuanzheng Ma	<i>norvegicus</i>) jantan galur Wistar.	<i>paradoxical sleep deprivation</i> (PSD), <i>total sleep deprivation</i> (TSD), dan kontrol. 3. Penelitian Xiaowen <i>et al.</i> (2016) menggunakan analisis statistik <i>Independent T-test</i>. Sedangkan pada penelitian ini menggunakan analisis <i>One-Way ANOVA</i>.
2. Judul : <i>A Mouse Model of Beta-Cell Dysfunction as Seen in Human Type 2 Diabetes</i> Penulis : Parilla <i>et al.</i>, 2018.	Penelitian Parilla <i>et al.</i> (2018) ini sama sama meneliti tentang sel beta pankreas.	1. Penelitian Parilla <i>et al.</i> variabel bebasnya adalah perlakuan diet rendah lemak dan tinggi lemak, sedangkan penelitian ini menggunakan perlakuan stres <i>paradoxical</i> dan <i>totalsleep deprivation</i>. 2. Penelitian Parilla <i>et al.</i> melakukan penilaian menggunakan pewarnaan immunohistokimia sedangkan penelitian ini menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin.
3. Judul : <i>Aging and sleep deprivation induce the unfolded protein response in the pancreas: implications for metabolism.</i> Penulis : Naidoo, N. Davis, James G. Zhu, Jingxu.	1. Penelitian Naidoo <i>et al.</i> (2014) dan penelitian ini menggunakan metode <i>chronic sleep deprivation</i> selama 8 hari 2. Penelitian Naidoo <i>et al.</i> (2014) dan penelitian ini menggunakan subjek tikus jantan	1. Penelitian Naidoo <i>et al.</i> (2014) menggunakan subjek tikus putih C57BL/6 sedangkan penelitian ini menggunakan galur wistar 2. Perlakuan yang diberikan pada penelitian Naidoo <i>et al.</i> (2014) adalah induksi PSD sedangkan pada penelitian ini tikus diberi induksi PSD dan TSD
4. Judul : Pengaruh Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Gambaran Histopatologi Sel Piramidal Cortex Cerebri dan Fungsi memori	1. Penelitian Rahmadhani (2018) dan penelitian ini, sama-sama meneliti sel piramidal korteks serebri. 2. Hewan coba pada Penelitian Rahmadhani (2018) dan penelitian ini	1. Penelitian Rahmadhani (2018) menggunakan induksi MSG 0,8g/ml sebagai paparan perusak struktur sel piramidal sedangkan penelitian ini menggunakan PSD dan TSD. 2. Penelitian Rahmadhani (2018) menggunakan bahan uji berupa ekstrak daun pepaya sedangkan penelitian ini tidak.

Tikus Putih Jantan yang diinduksi MSG Penulis : Kuni Zakiyah Rahmadhani	sama-sama menggunakan tikus putih(<i>Rattus norvegicus</i>) jantan.	3. Penelitian Rahmadhani(2018) menilai skor memori otak tikus sedangkan penelitian ini tidak.
5. Judul : <i>Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex</i> Penulis : Michele Bellesi, Luisa de Vivo, Giulio Tononi and Chiara Cirelli	1. Penelitian Bellesi <i>et al.</i>(2017) dan penelitian ini, sama-sama meneliti sel neuroglia otak tikus.	1. Variabel Penelitian Bellesi <i>et al.</i>(2017) variabel terikatnya adalah aktivasi dari sel mikroglia dan fagositosis astrosit, sedangkan pada penelitian ini variabel terikatnya adalah jumlah sel neuroglia. 2. Penelitian Bellesi <i>et al.</i> (2017) menggunakan hewan coba tikus jantan dan betina Sprague Dawley, sedangkan pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur Wistar.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. *Sleep Deprivation*

1. Definisi *Sleep Deprivation*

Sleep deprivation diartikan sebagai pengurangan durasi tidur, terganggunya waktu tidur, atau kombinasi keduanya. *Sleep deprivation* terjadi ketika seseorang tidak mendapatkan durasi tidur yang cukup. Durasi tidur yang dibutuhkan bervariasi pada setiap individu tergantung usia. Orang dewasa membutuhkan tidur selama 7–8 jam per hari, remaja sekitar 9 jam, dan anak-anak perlu tidur 9 jam atau lebih sesuai usianya (AASM, 2008).

Definisi *sleep deprivation* berkaitan dengan beberapa aspek meliputi kualitas, kuantitas, dan kebiasaan tidur. Penurunan kualitas tidur akibat *sleep fragmentation* yang berulang menyebabkan gangguan tubuh meskipun durasi tidur mencukupi. *Sleep fragmentation* selama 2 hari mengakibatkan penurunan kinerja mirip dengan tidak tidur selama 40–60 jam. Aspek kuantitas tidur yang digunakan secara absolut untuk mendefinisikan *sleep deprivation* dinilai kurang tepat. Pada dasarnya manusia membutuhkan tidur selama 7–8 jam untuk merasa cukup, namun ada beberapa individu yang hanya membutuhkan sedikit tidur atau yang dikenal sebagai "*Short Sleeper*". Individu ini tidur kurang dari 5 jam per hari tanpa menyebabkan kantuk atau gangguan lain yang disebabkan oleh kurang tidur. Dengan demikian, istilah *sleep deprivation* memiliki sejumlah arti yang berbeda bergantung pada kualitas, durasi, dan kebiasaan tidur (Kushida, 2009).

Sleep deprivation memiliki pengertian yang berbeda dalam lingkup penelitian ataupun dalam penegakkan diagnosis klinis. Definisi klinis cenderung menekankan pada diagnosis yang didasarkan pada riwayat kebiasaan tidur. Sedangkan studi penelitian lebih menekankan pada verifikasi objektif dalam mendefinisikan *sleep deprivation* (Krishman & Auckley, 2011).

2. Penyebab *Sleep Deprivation*

Terdapat beberapa penyebab *sleep deprivation* baik yang bersifat akut maupun kronis. Penyebab akut diantaranya nyeri akut, penyakit akut, stres emosional, dan pekerjaan. Sejumlah penyebab kronis seperti kondisi medis, obat-obatan atau narkoba, tuntutan pekerjaan (termasuk jam kerja yang panjang dan kerja *shift*), dan tanggung jawab keluarga (Krishman & Auckley, 2011).

Menurut *American Academy of Sleep Medicine* (2008), penyebab *sleep deprivation* diantaranya :

a. *Voluntary Behavior*

Sleep deprivation dilakukan secara sadar oleh seseorang dalam jangka waktu yang lama. Ini merupakan jenis hipersomnia yang diklasifikasikan sebagai *behaviorally induced insufficient sleep syndrome*. Pola pembatasan tidur terjadi hampir setiap hari selama 3 bulan (AASM, 2008).

b. Kewajiban Pribadi

Kurang tidur dapat terjadi ketika kewajiban pribadi membatasi waktu tidur. Misalnya, seseorang kehilangan waktu tidur saat memberikan perawatan bagi kerabat yang sakit (AASM, 2008).

c. Jam Kerja

Jam kerja yang dibutuhkan dalam beberapa pekerjaan dapat menyebabkan kurang tidur (AASM, 2008).

d. Kondisi Medis

Sleep deprivation dapat menjadi suatu gejala dari gangguan tidur yang sedang berlangsung atau kondisi medis lainnya yang mengganggu tidur (AASM, 2008).

3. Jenis *Sleep Deprivation*

Sebelum membahas mengenai jenis *sleep deprivation*, perlu dipahami terlebih dahulu mengenai fase tidur normal pada mamalia. Mamalia memiliki 3 fase tidur yaitu *wakefulness* (keadaan terjaga), *Non-Rapid Eye Movement* / NREM (tidur gelombang lambat), dan *Rapid Eye Movement* / REM (disebut juga *paradoxical sleep*) (Mignot, 2008).

Fase *wakefulness* (keadaan terjaga) dicirikan dengan adanya gelombang *electroencephalography* (EEG) cepat (5–12 Hz), amplitudo rendah dan aktivitas motorik terus-menerus. Kelompok neuron di hipotalamus merupakan puncak perintah dalam pengaturan fase *wakefulness*. Neuron ini mensekresikan neurotransmitter eksitatorik hipokretin. Neuron penghasil hipokretin melepaskan muatan secara otonom dan terus-menerus agar tubuh tetap terjaga dengan merangsang *reticular activating system* (RAS). Fase NREM ditandai dengan gelombang EEG lambat (1–4 Hz) dan amplitudo tinggi. Fase ini diatur oleh *sleep-on neuron* yang bertanggung jawab dalam menginduksi tidur melalui pelepasan neurotransmitter inhibitorik *gamma amino butirat acid* (GABA) pada neuron pusat *wakefulness*. *Sleep-on neuron* menjadi inaktif ketika seseorang terbangun dan aktif maksimal pada tidur NREM. Fase REM memiliki karakteristik gelombang EEG relatif cepat (6–12 Hz) dengan amplitudo rendah dan disertai atonia otot yang menetap. Mimpi terjadi pada keadaan tidur REM (Adamantidis *et al.*, 2010; Sherwood, 2014).

Berikut merupakan jenis *sleep deprivation* :

a. *Paradoxical Sleep Deprivation*

Paradoxical sleep atau tidur paradoks yakni keadaan tidur dalam yang ditandai dengan aktivitas otak yang intens. Pola perilaku yang menyertai tidur paradoks ditandai oleh inhibisi mendadak tonus otot seluruh tubuh. Otot-otot mengalami relaksasi total tanpa gerakan kecuali di bagian otot mata. Tidur paradoks ditandai oleh gerakan mata cepat sehingga disebut juga tidur *rapid eye movement* (REM) (Sherwood, 2014). Dengan demikian, *paradoxical sleep deprivation* / *REM deprivation* merupakan sebuah upaya yang dilakukan agar fase tidur REM tidak terjadi (Potter & Kaplan, 2012).

Pendapat lain mengartikan *paradoxical sleep deprivation* (PSD) dalam dua paradigma yang berbeda. Pertama, PSD merupakan tidur yang dibatasi pada tingkat kurang dari durasi normal tanpa memperhatikan fase tidur. Waktu tidur dibatasi hingga menjadi 4 jam per hari dibandingkan dengan durasi tidur normal 8 jam. Paradigma kedua, PSD merupakan keadaan tidur yang spesifik dimana subjek secara khusus kehilangan fase tidur REM. Meski demikian, tidak mungkin untuk menghilangkan salah satu fase tidur tanpa mempengaruhi fase yang lain. Gangguan pada fase tidur REM mengakibatkan penurunan durasi fase NREM dan begitu juga sebaliknya (Kushida, 2009).

Istilah *paradoxical sleep deprivation* (PSD) mirip dengan *partial sleep deprivation* yaitu pembatasan sebagian waktu tidur. *Acute partial sleep deprivation* merupakan pembatasan durasi tidur antara 1–4 jam lebih rendah dari durasi tidur normal yang dilakukan selama 1–2 hari. *Chronic partial sleep deprivation* diartikan sebagai pembatasan waktu tidur menjadi 4–6 jam per hari yang dilakukan selama 7–14 hari (Krishman & Auckley, 2011).

Model PSD pada hewan coba dilakukan dengan memberikan induksi *sleep deprivation* selama 20 jam kemudian diistirahatkan selama 4 jam per hari. Metode ini sering dilakukan karena lebih efektif serta tidak ada perlakuan invasif dari segi anatomi maupun neurofisiologi hewan coba (Garyglewska, 2010).

b. *Total Sleep Deprivation*

Total sleep deprivation (TSD) merupakan keadaan seseorang tidak tidur sama sekali melewati satu atau lebih periode tidur normal. Model TSD ini dilakukan dengan cara membuat tikus tidak tidur selama 24 jam sehari (Chennaoui *et al.*, 2015). Induksi TSD yang dimulai pukul 11.00 siang menunjukkan tingkat stres yang minimal dan dapat membuat tikus tetap terjaga selama 97 % dari 24 jam yang dibuktikan dengan gambaran EEG (Dyspersyn *et al.*, 2013). Perbedaan TSD dan PSD hanya pada

durasi pembatasan tidur yaitu TSD tidak diberikan waktu tidur, sedangkan pada PSD diberikan waktu tidur selama 4 jam per hari (Garyglewska, 2010).

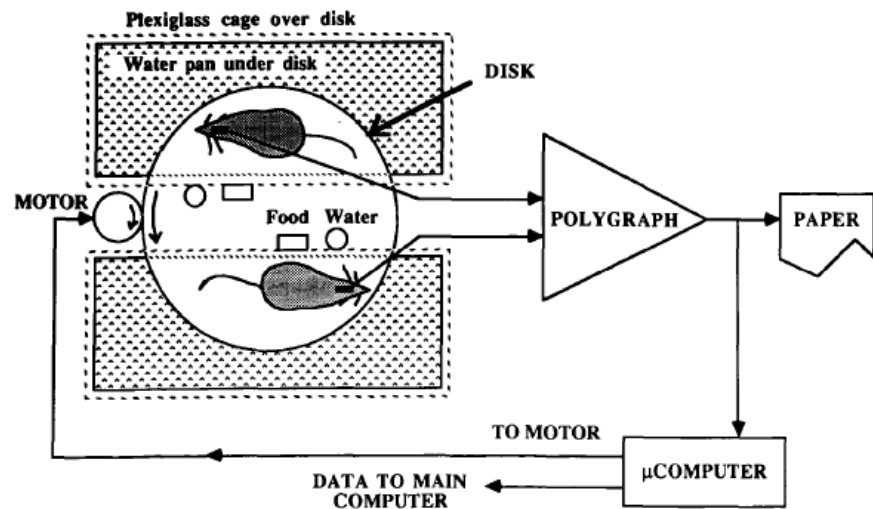
Pengaruh yang ditimbulkan TSD lebih besar dan lebih cepat daripada PSD. Tikus dengan perlakuan PSD dapat bertahan hidup antara 4 sampai 6 minggu perlakuan. Sedangkan pada TSD tikus hanya dapat bertahan hidup antara 2 sampai 3 minggu perlakuan. *Chronic sleep restriction* yaitu pembatasan waktu tidur menjadi 4 jam selama 14 hari, terbukti dapat menyebabkan penurunan daya ingat dengan derajat yang sama dengan *total sleep deprivation* selama 2 hari (Chennaoui *et al.*, 2015).

4. Metode *Sleep Deprivation*

a. *Disk Over Water Method*

Dalam upaya mengurangi aktivitas motorik dan stimulasi sensorik yang diperlukan untuk menginduksi *sleep deprivation*, *University of Chicago* mengembangkan metode *disk over water* (DOW). Dalam metode ini, tikus percobaan dan tikus kontrol mengalami stimulasi sensorik dan aktivitas motorik yang serupa. Tikus-tikus ditempatkan pada piringan berputar di dalam tangki yang berisi air dengan kedalaman 1 cm. Piringan diputar menggunakan dinamo selama 1/3 hari dengan total putaran sekitar 1 kilometer per hari. Putaran ini relatif lebih ringan dibandingkan aktivitas normal tikus yang biasa berjalan sekitar 3

kilometer per hari. Setiap tikus dipasang *headplug* yang dilengkapi *recording cable* pada bagian kepala. Kabel ini memungkinkan untuk transfer sinyal listrik yang berasal dari elektroda menuju alat polisomnografis (Kushida, 2009).



Gambar 2.3. *Disk Over Water Method* (Kushida, 2009)

b. *Single Platform Method (SPM) / Flower Pot Method*

Teknik *flower pot* lebih banyak digunakan untuk model *rapid eye movement (REM) deprivation* pada tikus. Teknik ini telah dikembangkan untuk membatasi tidur REM secara selektif. Mula-mula tikus yang akan diinduksi ditempatkan dalam kandang biasa selama 2 hari sebelum memulai perlakuan. Pemantauan dilakukan terhadap aktivitas alat gerak hewan di dalam kandang tersebut. Langkah ini dilakukan untuk memastikan kondisi alat gerak dalam keadaan normal. Hewan

yang menunjukkan aktivitas motorik abnormal akan dieliminasi (Mahmoudi *et al.*, 2017).

Teknik *flower pot* dilakukan dengan menempatkan platform bulat atau pot terbalik berdiameter 7 cm di tengah tangki bundar berisi air hingga 1 cm di bawah permukaan platform. Dinding tangki harus tinggi untuk mencegah hewan melompat keluar. Hewan coba yang memasuki fase tidur REM akan kehilangan tonus otot, sehingga akan terjatuh ke dalam air kemudian terbangun. Fase tidur NREM tidak dapat dihilangkan dengan metode ini karena pada tidur NREM tidak terjadi atonia otot. Metode ini menyebabkan stres tambahan pada hewan coba karena adanya isolasi sosial dan pembatasan aktivitas fisik (Jeddi *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016).

c. *Modified Multiple Platform Method (MMPM)*

Teknik ini diawali dengan menyiapkan tangki air berukuran $127 \times 44 \times 45$ cm yang dilengkapi dengan platform berukuran 6 cm. Sebanyak 14 platform disusun dengan jarak 10 cm dan jarak dengan dasar tangki setinggi 6 cm. Kawat kisi ditambahkan di atas tangki untuk meletakkan makanan dan minuman hewan. Tangki diisi air hingga 1 cm di bawah permukaan platform kemudian hewan coba dimasukkan sebanyak 4–6 ekor. Hewan coba dapat bergerak bebas dengan melompat dari satu platform ke platform yang lain. Hewan coba yang memasuki fase

paradoxical sleep mengalami atonia otot sehingga terjatuh ke dalam air dan terbangun. Model ini dapat dilengkapi dengan alat kejut *muscle atonia* yang menyala secara otomatis setiap 10 menit (Mahmoudi *et al.*, 2017).

Menurut Arjadi *et al.* (2015) model stres *paradoxical sleep deprivation* (PSD) dan *total sleep deprivation* (TSD) menggunakan metode *modified multiple platform method* (MMPM) analog dengan stres kerja pada manusia karena terjadi pengurangan waktu tidur dan kualitas tidur. Model stres tersebut tidak menyebabkan stres fisik dan psikologis tambahan pada hewan coba.

Teknik MMPM lebih menghemat waktu dan tenaga karena dalam satu tangki dapat diisi beberapa hewan coba. Hal ini mengurangi efek isolasi sosial dan tidak membatasi pergerakan hewan coba selama penelitian berlangsung. Adanya pembatasan aktivitas gerak dan isolasi sosial terbukti dapat meningkatkan kadar kortikosteron plasma diluar induksi stres *sleep deprivation* (Ma *et al.*, 2014). Teknik MMPM dapat meniadakan efek tersebut (Mahmoudi *et al.*, 2017).

5. *Sleep Deprivation* Menyebabkan Kondisi Stres

Sleep deprivation menyebabkan kondisi stres fisik dan emosi yang diterima oleh hipotalamus melalui sejumlah reseptor di seluruh tubuh. Hipotalamus secara langsung mengaktifkan sistem saraf simpatis,

mengeluarkan *corticotropin releasing hormone* (CRH), dan melepaskan vasopresin. Stimulasi simpatis meningkatkan sekresi epinefrin yang memiliki efek menurunkan sekresi insulin dan meningkatkan sekresi glukagon (Hamish *et al.*, 2013).

Penelitian Olayaki *et al.* (2015) menunjukkan bahwa *paradoxical sleep deprivation* selama 20 jam sehari dapat meningkatkan kadar kortisol sebesar 2 kali lipat dibandingkan dengan subjek kontrol. Hal tersebut terjadi karena adanya aktivasi dari aksis HPA sebagai respon terhadap perlakuan PSD. Peningkatan kortisol merupakan salah satu tanda terjadinya stres pada tubuh manusia.

Sekresi kortisol oleh korteks adrenal diatur sistem umpan balik negatif yang melibatkan hipotalamus dan hipofisis anterior. *Adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dari hipofisis anterior bekerja melalui jalur *cyclic adenosine monophosphate* (CAMP) merangsang korteks adrenal untuk mensekresikan kortisol. ACTH berperan dalam stimulasi sekresi zona fasikulata dan retikularis korteks adrenal. Pada saat jumlah ACTH sedikit, lapisan ini mengkerut dan sekresi kortisol menurun drastis. Sel penghasil ACTH hanya mengeluarkan produknya atas stimulasi CRH dari hipotalamus. Kontrol umpan balik negatif menjadi lengkap oleh efek inhibisi kortisol pada sekresi CRH dan ACTH masing-masing di hipotalamus dan hipofisis anterior. Faktor lain dapat mengganggu sistem umpan balik ini, salah satunya adalah kondisi stres. Peningkatan sekresi kortisol yang diperantarai oleh

aktivasi aksis HPA terjadi sebagai respon terhadap segala jenis stres termasuk kurang tidur (Sherwood, 2014).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

D. Tujuan dan Manfaat

1. Tujuan

a. Tujuan Umum

Mengetahui perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pankreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi model stres *paradoxical sleep deprivation* dan *total sleep deprivation*.

b. Tujuan Khusus

- 1) Membandingkan perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pancreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia kelompok tikus putih jantan pasca induksi model stres *paradoxical sleep deprivation* (PSD) dengan kelompok kontrol sehat.
- 2) Membandingkan perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pancreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia kelompok tikus putih jantan pasca induksi model stress *total sleep deprivation* (TSD) dengan kelompok kontrol sehat.
- 3) Membandingkan jumlah perbedaan toleransi glukosa, jumlah sel beta pancreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan kelompok *total sleep deprivation* (TSD) dengan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD).

2. Manfaat

a. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan ilmiah tentang dampak stres akibat berkurangnya waktu tidur terhadap toleransi glukosa, jumlah sel beta pancreas, jumlah dan diameter pulau langerhans, jumlah sel piramidal, dan jumlah sel neuroglia.

b. Manfaat Praktis

1) Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan kewaspadaan masyarakat dan memberikan informasi mengenai dampak stres akibat berkurangnya waktu tidur terhadap terganggunya toleransi glukosa, penurunan jumlah sel beta pancreas, pengurangan jumlah dan diameter pulau langerhans, penurunan jumlah sel piramidal, dan penurunan jumlah sel neuroglia.

2) Bagi Peneliti Lain

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan masukan bagi peneliti lain untuk melakukan penelitian selanjutnya.

3) Bagi Praktisi atau Tenaga Kesehatan

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai sumber informasi dalam memberikan edukasi terhadap pasien untuk tidur dengan waktu yang cukup.

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Materi dan Bahan

1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berjumlah 30 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) 4 Universitas Gadjah Mada. Kerancuan dalam penelitian dikontrol menggunakan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai berikut :

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus Wistar jantan.
- 2) Usia 3–4 bulan.
- 3) Berat badan 100–200 gram.
- 4) Sehat, aktif, dan tidak memiliki kelainan anatomi (cacat).

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus sakit pada saat aklimatisasi, ditandai dengan gerakan tidak aktif, tidak mau makan, bulu kusam, dan rontok.
- 2) Tikus dengan peningkatan atau penurunan berat badan $> 10\%$ antara sebelum dan sesudah masa aklimatisasi.
- 3) Tikus mati pada saat proses penelitian berlangsung.

Tikus dipilih dalam penelitian ini karena lebih mudah dalam memberikan substansi melalui oral dibandingkan mencit. Kriteria inklusi dibuat dengan pertimbangan bahwa tikus putih (*Rattus*

norvegicus) sudah mencapai dewasa pada usia 3–4 bulan. Jenis kelamin jantan dipilih untuk meminimalkan kerancuan hasil penelitian akibat pengaruh hormonal. Maturitas sistem tubuh tikus putih sudah tercapai pada usia 34–38 hari (Sengupta, 2011).

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan untuk aklimatisasi dan perlakuan *sleep deprivation* meliputi kandang ukuran 60 x 30 x 30 cm, tangki ukuran 123 x 44 x 44 cm dilengkapi 14 platform berdiameter 6,5 cm serta jarak antar platform 10 cm, alat kejut *muscle atonia*, timbangan analitik, timbangan digital dan spidol hitam. Alat untuk pengukuran toleransi glukosa meliputi sonde lambung, lancet, sarung tangan, gelas ukur 100 cc, gelas beker, pengaduk, glukometer, gunting, dan *stopwatch*. Alat yang digunakan untuk pembuatan dan pengamatan preparat berupa setalat bedah, pinset, pipet pasteur, mikropipet, inkubator, tabung eppendorf, mikrotom, holder, kontainer plastik 29 buah, *object glass*, *cover glass*, *water bath*, *hot plate*, dan mikroskop cahaya binokuler Motic dilengkapi dengan OPTILAB (perbesaran 10X dan 40X objektif).

b. Bahan

Pakan hewan standar, air mineral, akuades, alkohol 70 %, kasa steril, glukosa monohidrat, aquades, strip glukosa, *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10%, Pewarna Hematoksilin Eosin, Ether, xylol, paraffin, gelatin 0,5% , danentelan DPX.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only with control group*. Penelitian ini termasuk penelitian analitik dimana uji analisis data digunakan untuk menguji hipotesis penelitian sehingga didapatkan hubungan antar variabel. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh induksi berbagai model stres *sleep deprivation* terhadap perbedaan toleransi glukosa, diameter pulau langerhaens, jumlah sel beta pankreas, sel piramidal dan neuroglia. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD), *total sleep deprivation* (TSD), dan kontrol. Induksi *sleep deprivation* menggunakan metode *modified multiple platform method* (MMPM). Pengukuran dan pengamatan terhadap variabel penelitian dilakukan satu kali pada akhir perlakuan.

C. Rancangan Percobaan dan Pengambilan Sampel

Hewan coba yang memenuhi kriteria inklusi ditimbang berat badannya kemudian diaklimatisasi selama 7 (tujuh) hari. Aklimatisasi bertujuan agar tikus mampu beradaptasi dengan lingkungan yang baru serta mengurangi risiko stres yang berpengaruh terhadap hasil penelitian. Selama aklimatisasi tikus diberikan makanan dan minuman dengan jenis, jumlah dan komposisi

yang sama secara *ad libitum*. Berat badan ditimbang kembali pada akhir aklimatisasi dan hanya tikus yang sehat serta memenuhi kriteria yang diikuti dalam penelitian.

Hewan coba kemudian dikelompokkan secara random menggunakan *completed randomized design* (CRD) / Rancangan Acak Lengkap (RAL) menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok A, B, dan C. Kelompok A merupakan kelompok kontrol, kelompok B *paradoxical sleep deprivation* (PSD), dan kelompok C adalah *total sleep deprivation* (TSD). Hewan coba pada masing-masing kelompok diberikan penanda berupa titik menggunakan spidol berwarna hitam pada bagian ekor. Jumlah hewan coba yang digunakan pada setiap kelompok ditentukan berdasarkan rumus *Federer* sebagai berikut:

$\begin{aligned}(t-1)(n-1) &\geq 15 \\ (3-1)(n-1) &\geq 15 \\ 2n - 2 &\geq 15 \\ 2n &\geq 17 \\ n &\geq 8,5 \text{ (dibulatkan menjadi 9)}\end{aligned}$	$t = \text{jumlah perlakuan}$ $n = \text{jumlah ulangan}$
--	--

jumlah sampel yang digunakan minimal 9 ekor tikus untuk setiap kelompok. Antisipasi adanya *drop out* yang diperkirakan sebesar 10 %, maka jumlah sampel dikoreksi menggunakan rumus :

$n' = \frac{n}{1 - f}$	$n' = \text{besar sampel terkoreksi}$ $n = \text{besar sampel minimum}$ $f = \text{proporsi perkiraan drop out}$
------------------------	--

$$n' = \frac{9}{1 - 0,1}$$

$$n' = 10$$

itungan di atas didapatkan hasil setiap kelompok

membutuhkan 10 ekor tikus. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok sehingga total sampel adalah 30 ekor. Induksi *sleep deprivation* menggunakan

metode *modified multiple platform method* (MMPM) yang dilengkapi *muscle atonia* untuk memberikan efek kejut setiap 10 menit. Alat kejut berfungsi untuk mencegah tidur *nonrapid eye movement* (NREM) pada tikus yang berdiri di atas platform. Hewan coba yang memasuki fase tidur *rapid eye movement* (REM) akan terjatuh ke dalam air dan terbangun kembali. Berikut ini merupakan perlakuan pada masing-masing kelompok:

1. Kelompok A (kontrol)

Kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan model stres *sleep deprivation*.

2. Kelompok B (PSD)

Kelompok perlakuan *paradoxical sleep deprivation* (PSD) yaitu 20 jam diinduksi *sleep deprivation* mulai dari pukul 11.00–07.00 WIB dan 4 jam istirahat pukul 07.00–11.00 WIB yang dilakukan secara terus-menerus selama 192 jam menggunakan metode *modified multiple platform method* (MMPM).

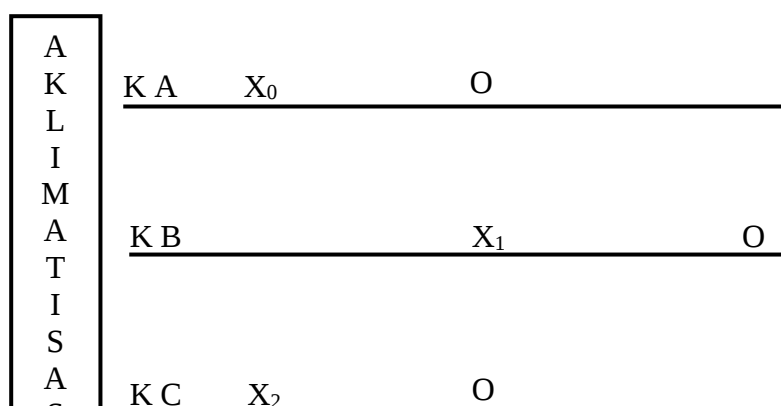
3. Kelompok C (TSD)

Kelompok perlakuan *total sleep deprivation* (TSD) yaitu diinduksi *sleep deprivation* mulai dari pukul 11.00–11.00 WIB tanpa waktu istirahat yang dilakukan secara terus-menerus selama 192 jam menggunakan metode *modified multiple platform method* (MMPM).

Durasi tidur kelompok PSD dibatasi menjadi 4 jam per hari, sedangkan TSD tidak diberikan waktu tidur. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur

Wistar membutuhkan tidur selama 8 jam per hari, sehingga model perlakuan di atas sudah mengurangi durasi tidur normal pada hewan coba (Simasko, 2008). Tikus merupakan hewan nokturnal (aktif pada malam hari) sehingga waktu tidur kelompok PSD diberikan pada pukul 07.00-11.00 WIB. Induksi TSD dimulai pukul 11.00 WIB untuk membuat tikus tetap terjaga selama 97 % dari 24 jam yang dibuktikan dengan gambaran EEG (Dyspersyn *et al.*, 2013).

Durasi pemberian perlakuan didasarkan pada penelitian sebelumnya bahwa tikus yang diinduksi *sleep deprivation* mengalami gangguan homeostasis glukosa setelah 8 hari perlakuan (Barf *et al.*, 2010). Penelitian dilakukan secara serial (Gambar 3.1) yang dimulai pada kelompok kontrol dan TSD terlebih dahulu selama 8 hari dan diikuti tes toleransi glukosa. Selanjutnya dilakukan induksi pada kelompok PSD selama 8 hari dan diikuti tes toleransi glukosa. Berat badan hewan coba diukur kembali setelah perlakuan *sleep deprivation* selesai diberikan. Uji Toleransi Glukosa Oral (UTGO) dilakukan pada masing-masing kelompok kemudian hasilnya dicatat dan dianalisis untuk mengetahui efek *sleep deprivation* terhadap toleransi glukosa darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan. Setelah uji toleransi glukosa selesai dilakukan, hewan coba diterminasi dan diambil otak sertapankreasnya. Kedua organ tersebut dibuat menjadi preparat histologis menggunakan pewarnaan Hematoksin Eosin untuk diamati di bawah mikroskop cahaya.



Gambar 3. 1 Alur Perlakuan Penelitian

Keterangan :

K A : Kelompok kontrol

K B : Kelompok perlakuan I

K C : Kelompok perlakuan II

X₀ : Tidak diberi perlakuan

X₁ : Diberi perlakuan PSD

X₂ : Diberi perlakuan TSD

O : Pengukuran variabel penelitian

D. Variabel yang Diukur

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Nama Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Variabel
Independen				
Berbagai model stres <i>sleep deprivation</i>	Model <i>sleep deprivation</i> menggunakan metode <i>modified multiple platform method</i> (MMPM) yang dilengkapi dengan <i>muscle atonia</i> untuk menimbulkan efek kejut setiap 10 menit. Pada penelitian ini terdapat 2 kategori, yaitu : 1. <i>Paradoxical sleep deprivation</i> (PSD) yaitu tikus dibuat tidak tidur selama 20 jam dari pukul 11.00–07.00 WIB kemudian diberi waktu tidur 4 jam dari pukul 07.00–11.00 WIB yang dilakukan secara terus-menerus selama 192 jam. 2. <i>Total sleep deprivation</i> (TSD) yaitu tikus dibuat tidak tidur selama 24 jam dari pukul 11.00–11.00 WIB yang dilakukan selama 192 jam.	Durasi perlakuan diukur menggunakan jam	jam	Kategorik-Nominal

Dependen

Toleransi glukosa	Kadar glukosa yang diperiksa dari sampel darah ekor tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) jantan yang telah diinduksi stres <i>sleep deprivation</i> . Kadar glukosa diukur pada menit ke 60 dan 120 setelah pemberian beban larutan glukosa dengan dosis 2 g/kgBB secara per oral menggunakan sonde lambung.	Diukur menggunakan glukometer	mg/dL	Numerik-Rasio
Diameter pulau Langerhans	Diameter kumpulan sel-sel endokrin yang dipisahkan dari bagian eksokrin oleh kapsul jaringan ikat pada pewarnaan Hematoksilin Eosin (Eroschenko, 2015).	Diamati dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan <i>ImageJ software</i>	mm	Numerik-Rasio
Jumlah pulau Langerhans	Jumlah rata-rata pulau Langerhans pada setiap <i>slide</i> pankreas (Tandri <i>et al.</i> , 2009).	Diamati dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan <i>ImageJ software</i>	Bilangan desimal	Numerik-Rasio
Jumlah sel beta pada pankreas	Jumlah sel beta normal (Bn) dan total keseluruhan sel beta (Bt) (normal dan rusak) digunakan untuk menentukan persentase sel beta (Beta-p) dalam satu pulau Langerhans. Rumus yang digunakan adalah $\text{Beta-p} = (\text{Bn}/\text{Bt}) \times 100\%$. Parameter ini digunakan dalam 4 pulau Langerhans setiap sampel dan hasilnya di rata-rata. Sel yang dihitung adalah sel normal dan sel rusak dengan kriteria mengalami hal seperti berikut : piknotik (inti menggelap, memadat, dan melisut), karioreksis (inti robek dan terbagi menjadi fragmen-fragmen), kariolisis (inti pucat	Diamati dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan <i>ImageJ software</i>	%	Numerik-Rasio

tidak lagi menyerap warna).

Jumlah sel piramidal korteks prefrontal serebrum tikus	Jumlah sel piramidal korteks prefrontal serebrum tikus yang dihitung dari preparat pewarnaan HE kelompok I, II, dan III. Penghitungan dilakukan dalam 10 lapang pandang. Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung struktur sel piramidal normal.	Diamati dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan <i>Image raster</i>	Bilangan desimal	Numerik-Rasio
Jumlah sel neuroglia normal pada korteks medial prefrontal cerebrum tikus	Jumlah sel neuroglia dihitung dari preparat histologi otak tikus dengan pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin</i> (HE) yang dibagi menjadi kelompok A, B, dan C. Penghitungan dilakukan dalam 10 lapang pandang. Sel yang dihitung adalah sel normal dengan kriteria tidak mengalami hal seperti berikut : piknotik (inti memadat, menggelap, dan melisut), karioreksis (inti robek dan membentuk fragmen-fragmen), kariolisis (inti pucat karena tidak dapat menyerap warna).	Diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler dan sel dihitung dalam 10 lapang pandang. Perhitungan dilakukan dengan bantuan <i>software Image raster</i>	Bilangan desimal	Numerik-Rasio

E. Cara Mengukur Variabel

1. Pengukuran Toleransi Glukosa

Sebelum dilakukan pengukuran variabel, tikus dipuasakan selama 12 jam agar glukosa darah stabil dan tidak ada perubahan glukosa akibat adanya asupan makanan (Zhang, 2011). Tikus tetap diberi minum selama puasa. Setelah selesai perlakuan *sleep deprivation* selama 8 hari, setiap tikus diukur kadar glukosa darah awal terlebih dahulu (T_0). Uji Toleransi Glukosa Oral (UTGO) dalam penelitian ini menggunakan glukosa monohidrat dengan dosis 2 g/kgBB (Ayala *et al.*, 2010). Jumlah glukosa yang diberikan disesuaikan dengan berat badan

masing-masing tikus kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquades (Jones, 2012). Sebanyak 2 ml larutan glukosa (dosis 2 g/kgBB) diberikan pada tikus secara per oral menggunakan sonde lambung. Tikus kemudian diletakkan dalam kandang biasa dan dibiarkan tanpa diberi makanan. Kadar glukosa diukur kembali pada menit 60 (Tg_1) dan 120 (Tg_2). Pemilihan waktu pengukuran didasarkan pada teori bahwa kadar glukosa mengalami peningkatan beberapa saat pasca pemberian beban glukosa, kemudian turun kembali hingga mendekati normal setelah 2 jam (Power, 2015).

Selanjutnya dilakukan prosedur pengukuran kadar glukosa menggunakan glukometer. Strip dimasukkan pada slot yang tersedia kemudian ditunggu hingga indikator pada layar menyala. Darah yang berasal dari ekor tikus diteteskan pada strip glukosa yang telah dimasukkan ke dalam glukometer dan ditunggu selama 10 detik untuk membaca hasil konsentrasi glukosa darah dalam satuan mg/dL (Shelly, 2014).

2. Pengukuran Jumlah dan Diameter Pulau Langerhans

Pengamatan jumlah dan diameter pulau Langerhans menggunakan mikroskop Motic® dan kamera OptiLab oleh peneliti dan 1 orang interobserver dibawah supervisi ahli histologi di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. Pengamatan jumlah pulau Langerhans dilakukan pada perbesaran 400x. Total jumlah pulau Langerhans dihitung pada setiap *slide* dan dirata-rata pada setiap kelompok. Rerata jumlah pulau

Langerhans pada kelompok kontrol kemudian dibandingkan dengan kelompok yang diberi perlakuan PSD dan TSD. Pengamatan diameter pulau Langerhans dilakukan pada perbesaran 400x kemudian dianalisis menggunakan ImageJ *software* (da Silva *et al.*, 2016; Walvekar *et al.*, 2016). Diameter pulau Langerhans dihitung dan dirata-rata pada setiap *slide*. Perlakuan yang dilakukan pada penelitian ini dinyatakan dapat berpengaruh negatif terhadap jumlah dan diameter pulau Langerhans jika didapatkan perbedaan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3. Perhitungan Jumlah Sel Beta Pankreas

Penghitungan sel-sel beta pankreas dilakukan per pulau Langerhans dengan pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya binokuler Motic dihubungkan dengan OPTILAB. Jumlah sel beta normal (Bn) dan total keseluruhan sel beta (Bt) (normal dan rusak) digunakan untuk menentukan persentase sel beta (Beta-p) dalam satu pulau Langerhans. Rumus yang digunakan adalah $\text{Beta-p} = (\text{Bn}/\text{Bt}) \times 100\%$. Parameter ini digunakan dalam 4 pulau Langerhans setiap sampel dan hasilnya di rata-rata. Sel yang dihitung adalah sel normal dan sel rusak dengan kriteria mengalami hal seperti berikut : piknotik (inti menggelap, memadat, dan melisut), karioreksis (inti robek dan terbagi menjadi fragmen-fragmen), kariolisis (inti pucat tidak lagi menyerap warna) (Abunasef *et al.*, 2014; Suarsana *et al.*, 2010).

4. Perhitungan Jumlah Sel Piramidal dan Neuroglia

Pengukuran jumlah sel piramidal dan neuroglia dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali pada 10 lapang pandang.

Pengamatan dilakukan oleh 2 orang interobserver dibawah supervisi ahli histologi di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman menggunakan mikroskop cahaya binokuler Motic®. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan bantuan *software image raster*. Jumlah sel pada setiap kelompok perlakuan dibuat rerata sebagai data untuk perbandingan antar kelompok (Farindra, 2018).

F. Tata Urutan Kerja

1. Permohonan Etik

Mengajukan permohonan *ethical clearance* pada Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman.

2. Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari dalam kandang berukuran 60 x 30 x 30 cm dengan tujuan agar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Sebanyak 30 ekor hewan coba ditempatkan dalam 5 buah kandang. Semua hewan coba diberikan perlakuan yang sama baik dari segi tempat, makanan dan minuman selama aklimatisasi berlangsung. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Selama aklimatisasi dilakukan pengendalian terhadap beberapa variabel perancu, diantaranya:

a. Lingkungan

Hewan coba dipelihara dalam kandang yang sama dengan ukuran 60 x 30 x 30 cm, suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dan kelembapan $75 \pm 5 \%$.

Kondisi lingkungan dibuat sebaik mungkin agar proses pertumbuhan hewan coba tidak mengalami hambatan. Pencahayaan dilakukan secara alami dan disesuaikan agar hewan coba mendapat pajanan cahaya selama 12 jam terang (07.00–19.00 WIB) dan 12 jam gelap (19.00–07.00 WIB) (Capdevila, 2017).

b. Asupan Makanan

Makanan dan minuman diberikan dalam jenis, jumlah, dan komposisi yang sama secara *ad libitum*. Makanan berupa pakan standar (*Comfeed AD II*[®]) dan minuman air mineral (*Aqua*[®]). Nutrisi perlu dikendalikan sedemikian rupa karena sangat berpengaruh terhadap kadar glukosa darah (Ayala *et al.*, 2010).

c. Variasi Berat Badan Hewan Coba

Variasi berat badan dikendalikan melalui pemilihan hewan coba dengan berat yang relatif sama antara 200–300 gram. Peningkatan atau penurunan berat badan yang dapat ditoleransi setelah masa aklimatisasi adalah 10 % atau kurang (Capdevila, 2017).

3. Pengelompokkan Hewan Coba

Hewan coba yang telah diaklimatisasi dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok A (kontrol), kelompok B (PSD), dan kelompok C (TSD). Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*). Setelah dikelompokkan, hewan

coba diberi label dengan cara sebagai berikut:

- a. Kelompok A : Hewan coba diberi 1 titik hitam pada pangkal ekor.
- b. Kelompok B : Hewan coba diberi 2 titik hitam pada pangkal ekor.
- c. Kelompok C : Hewan coba diberi 3 titik hitam pada pangkal ekor.

4. Perlakuan Hewan Coba

Masing-masing kelompok perlakuan ditempatkan pada tangki *stainless steel* dengan ukuran 123 x 44 x 44 cm dan dilengkapi dengan 14 platform berdiameter 6,5 cm dengan jarak 10 cm antar platform. Dasar tangki diisi air dengan ketinggian 1 cm yang diganti setiap hari. Tangki dilengkapi dengan alat kejut *muscle atonia* yang otomatis menyala setiap 10 menit. Tikus dapat bergerak bebas dalam tangki dan melompat antar platform. Tahap pemberian perlakuan hewan coba dilakukan berdasarkan ketentuan berikut :

- a. Kelompok A : Kontrol sehat, hewan coba tidak diinduksi stres *sleep deprivation*.
- b. Kelompok B : *paradoxical sleep deprivation* (PSD), hewan coba diinduksi *sleep deprivation* 20 jam dan istirahat selama 4 jam yang dilakukan secara terus-menerus selama 192 jam.
- c. Kelompok C : *total sleep deprivation* (TSD), hewan coba diinduksi *sleep deprivation* 24 jam tanpa istirahat yang dilakukan selama 192 jam.

Kelompok A sebagai kontrol ditempatkan dalam kandang biasa selama 192 jam. Kelompok B diinduksi *sleep deprivation* selama 20 jam (11.00–07.00 WIB) kemudian dikembalikan ke dalam kandang

biasa dan diberikan waktu tidur 4 jam (07.00–11.00 WIB) yang dilakukan secara terus-menerus selama 192 jam. Kelompok C diinduksi stres *sleep deprivation* 24 jam sehari (11.00–11.00 WIB) yang dilakukan selama 192 jam.

5. Pembuatan Larutan Glukosa

Dosis glukosa monohidrat untuk Uji Toleransi Glukosa Oral (UTGO) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah 2 g/kgBB (Ayala *et al.*, 2010). Volume pemberian larutan dibuat seminimal mungkin yaitu sebanyak 2 ml (Jones, 2012). Glukosa monohidrat ditimbang sesuai dengan berat badan masing-masing tikus kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquades dan diaduk hingga tercampur rata. Konsentrasi larutan diperoleh berdasarkan rumus:

$$\text{Konsentrasi (C)} = \frac{\text{Dosis (2 g/kgBB)}}{\text{Volume (2 ml)}} \times \text{Berat Badan Tikus (kg)}$$

6. Pengukuran Toleransi Glukosa

Pengukuran toleransi glukosa dilakukan setelah induksi *sleep deprivation* selama 8 hari. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam kemudian diberi glukosa dengan dosis 2 g/kgBB yang dilarutkan dalam 2 ml aquades (Ayala *et al.*, 2010). Larutan glukosa diberikan menggunakan sonde lambung. Selanjutnya dilakukan prosedur pengukuran kadar glukosa menggunakan glukometer pada menit 60 dan 120 (Shelly, 2014).

7. Perhitungan Luas Daerah Di bawah Kurva Menit Ke-0 hingga 120

Kadar glukosa darah berdasarkan waktu pengukuran dibuat dalam bentuk kurva, kemudian luas daerah di bawah kurva dari menit

ke-0 sampai menit ke-120 dihitung menggunakan rumus trapesium.

$$\text{LDDK}^{t_0-t_n} = \frac{T_1 - T_0}{2} \times (C_0 + C_1) + \frac{T_2 - T_1}{2} \times (C_1 + C_2) + \dots + \frac{T_n - T_{n-1}}{2} \times (C_n + C_{n-1})$$

Keterangan :

T : waktu (menit)

C : konsentrasi zat dalam darah (mg/dL)

LDDK^{t₀-t_n} : luas daerah di bawah kurva dari waktu ke-0 sampai ke-n

8. Terminasi dan Pengambilan Organ

Hewan coba diterminasi menggunakan teknik *cervical dislocation* yang sebelumnya dianestesi menggunakan eter untuk menghilangkan rasa sakit. Terminasi hewan coba dilakukan dibawah supervisi pembimbing di Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. Setelah dilakukan terminasi, langkah selanjutnya adalah pembedahan dan pengambilan korteks prefrontal bagian medial dan pankreas. Otak dan pankreas kemudian difiksasi dengan *Buffer Normal Formalin* 10%.

9. Pembuatan Preparat Histologi

Preparat dibuat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman.

10. Pengamatan Preparat Histologi

Pengamatan sel beta pankreas, pulau Langerhans, sel piramidal dan neuroglia dilakukan menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan supervisi ahli histologi dari Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. Perhitungan jumlah sel

dilakukan dengan bantuan *ImageJ software*.

11. Dokumentasi

Dokumentasi data dan foto terkait proses penelitian dari pemeliharaan hewan coba, aklimatisasi, pemberian induksi stress *sleep deprivation* serta pemeriksaan kadar glukosa darah tikus, pengamatan sel piramidal, neuroglia, sel β pankreas dan pulau Langerhaens.

12. Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan dan analisis data hasil penelitian dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak komputer.

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan bantuan perangkat lunak komputer. Analisis univariat digunakan untuk mendeskripsikan variabel penelitian. Data disajikan dalam bentuk rerata, dan standar deviasi terhadap variabel yang diteliti. Uji reliabilitas antarobserver pada pengamatan preparat histologi menggunakan uji *Bland Almant*. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengetahui normalitas data, sedangkan homogenitas data diuji menggunakan *Levene's test*. Masing-masing variabel penelitian memiliki distribusi data yang normal dan varians data homogen. Uji hipotesis komparatif menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) karena syarat uji parametrik telah terpenuhi. Hasil uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan pada minimal 2 kelompok untuk variabel toleransi glukosa, sel beta pankreas, pulau Langerhans, dan sel neuroglia

sehingga dilanjutkan uji *Post-Hoc Least Significant Difference* (LSD) untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Jumlah sel piramidal memiliki hasil yang tidak signifikan sehingga tidak dilanjutkan uji *Post-Hoc*. Analisis data dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Dahlan, 2009).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental post test only with control group design* yang bertujuan untuk mengetahui sejauh mana efek *sleep deprivation* terhadap toleransi glukosa, diameter pulau Langerhans, jumlah sel beta pankreas, sel piramidal dan neuroglia. Subjek penelitian berupa 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang dibagi dalam tiga kelompok yaitu kelompok A (kontrol sehat), kelompok B (PSD selama 192 jam), dan kelompok C (TSD selama 192 jam). Pada saat induksi *sleep deprivation* didapatkan 1 (satu) ekor tikus mati pada kelompok B.

Perubahan Berat Badan Hewan Coba

Perubahan berat badan hewan coba sebelum aklimatisasi, setelah aklimatisasi/sebelum perlakuan *sleep deprivation*, dan setelah *sleep deprivation* dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Rerata Berat Badan Hewan Coba Selama Penelitian (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok Perlakuan	N	Rerata Berat Badan (gram)			
		BB Sebelum Aklimatisasi	BB Setelah Aklimatisasi/ Sebelum <i>sleep deprivation</i>	BB setelah <i>sleep deprivation</i>	Perubahan BB setelah <i>sleep deprivation</i>
Kontrol	10	137±22,4	144±22,5	157±29,8	+ 13±9,3
PSD	9	150±16,5	161±18,6	153±15,9	- 7±3,5
TSD	10	128±25,8	136±26,7	126±22,5	- 9±7,3

Selama proses aklimatisasi terjadi peningkatan rerata berat badan pada semua kelompok dengan peningkatan terbesar pada kelompok kontrol (13±9,3 gram). Sesudah diberikan perlakuan, kelompok TSD (9±7,3 gram)

mengalami penurunan rerata berat badan lebih besar dibandingkan kelompok PSD ($7 \pm 3,5$ gram). Normalitas data rerata berat badan dianalisis menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada semua kelompok yang berarti data terdistribusi normal. Uji homogenitas menggunakan *Levene's test* dan didapatkan nilai $p = 0,107$ ($p > 0,05$) yang berarti varians data homogen. Data terdistribusi normal dan varians data homogen sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistik *One-Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai $p = 0,0001$ ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan signifikan pada minimal 2 kelompok perlakuan. Uji *Post-Hoc LSD* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) rerata berat badan tikus putih terdapat pada kelompok kontrol-PSD ($p = 0,0001$) dan kontrol-TSD ($p = 0,0001$).

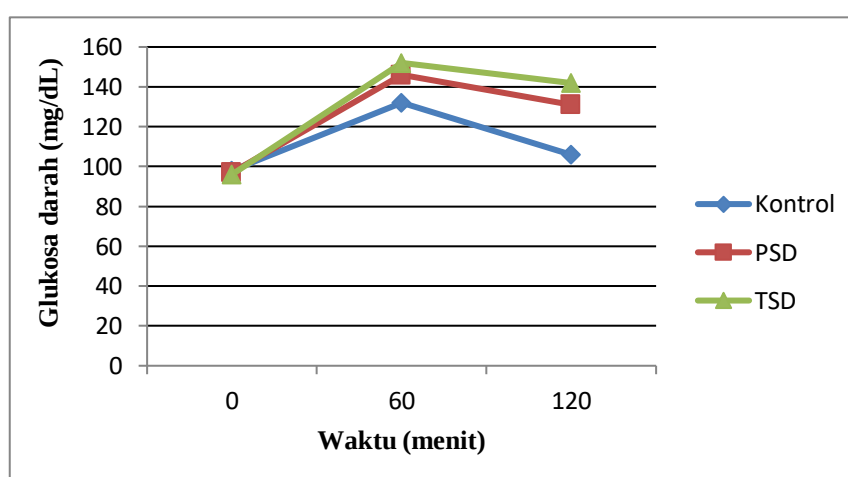
Perbedaan Toleransi Glukosa

Pengukuran kadar glukosa dilakukan sebanyak 3 kali yaitu sebelum diberikan beban glukosa (T_0), 60 menit pasca pemberian glukosa (Tg_1), dan 120 menit pasca pemberian glukosa (Tg_2). Rerata kadar glukosa pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Rerata Kadar Glukosa Darah (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok Perlakuan	N	Rerata Kadar Glukosa (mg/dL)			Perubahan Pada Menit 60 (mg/dL)	Perubahan Pada Menit 120 (mg/dL)
		Menit ke-				
		0 (T ₀)	60(Tg ₁)	120(Tg ₂)		
Kontrol	10	98±14,4	132±10,9	106±7,5	33±13,8	26±12,4
PSD	9	97±15,4	146±14,8	131±10,3	48±13,8	15±14,1
TSD	10	96±23,4	152±20,4	142±18,5	56±22,6	10±6,9

Rerata kadar glukosa darah awal (T₀) pada semua kelompok memiliki nilai yang hampir serupa dikarenakan hewan coba dipuasakan terlebih dahulu sebelum dilakukan pengukuran. Kadar glukosa darah pada setiap kelompok mengalami peningkatan pada menit ke-60 (Tg₁) pasca pemberian beban glukosa dengan peningkatan terbesar pada kelompok TSD (56±22,6 mg/dL). Glukosa darah turun kembali pada menit ke-120 (Tg₂) dengan penurunan terbesar hingga terendah secara berurutan adalah kontrol (26±12,4 mg/dL), PSD (15±14,1 mg/dL), dan TSD (10±6,9 mg/dL). Grafik hubungan kadar glukosa darah dengan waktu pengukuran dari setiap kelompok dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1 Kurva Rerata Glukosa Darah dan Waktu Pengukuran

Kadar glukosa darah yang telah didapat digunakan untuk menghitung

nilai $LDDK^{0-120}$ pada masing-masing kelompok perlakuan. Perhitungan dilakukan dengan metode trapesium dan nilai rerata $LDDK^{0-120}$ dapat dilihat pada Tabel 4.3.

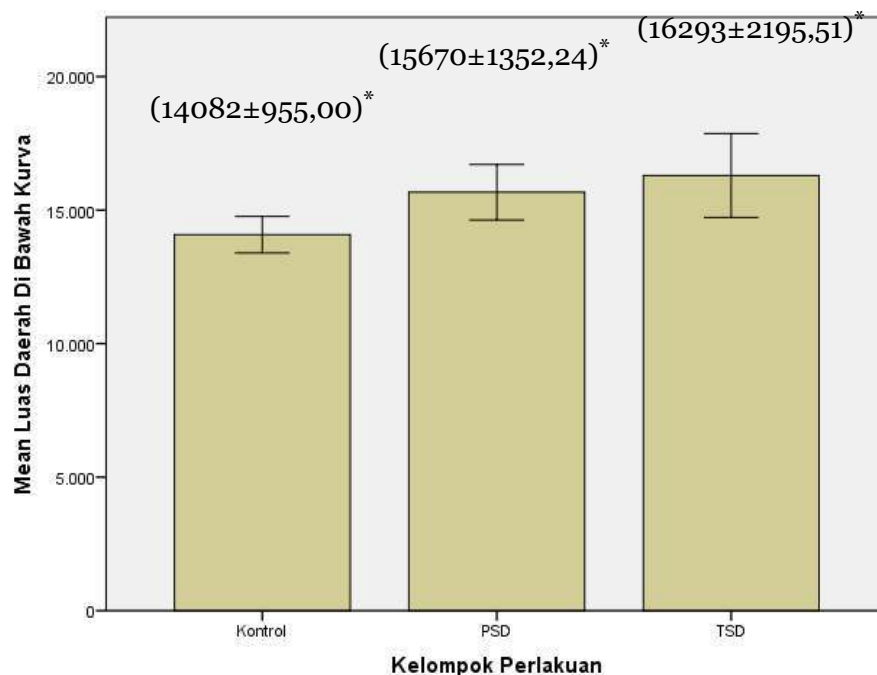
Tabel 4. 3 Rerata Nilai $LDDK^{0-120}$ (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok	N	LDDK ⁰⁻¹²⁰ (mg.menit/dL)				Analisis Statistik
		Rerata ±SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	14082,00 ± 955,00	12390,00	15150,00	14490,00	P=0,014 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	15670,00±13 52,24	13860,00	18330,00	15270,00	
III (TSD)	10	16293,00±21 95,51	11160,00	19050,00	16560,00	
Keterangan :SD = standar deviasi						

Analisis univariat dilakukan untuk mengetahui rerata luas daerah di bawah kurva dari menit ke-0 sampai menit ke-120 ($LDDK^{0-120}$) pada masing-masing kelompok. Beda rerata $LDDK^{0-120}$ tertinggi terdapat pada kelompok TSD (16293 $\pm$ 2195,51mg.menit/dL) dan beda rerata terendah pada kelompok kontrol (14082 $\pm$ 955,00mg.menit/dL). Urutan kelompok perlakuan dengan beda rerata $LDDK^{0-120}$ tertinggi hingga terendah adalah TSD, PSD, dan kontrol. Rerata $LDDK^{0-120}$ kadar glukosa darah hewan coba dijelaskan lebih lanjut pada Gambar 4.2.

Data rerata $LDDK^{0-120}$ dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada semua kelompok perlakuan. Uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitas data menggunakan *Levene's test*. Derajat signifikansi yang ditetapkan dalam penelitian ini yaitu nilai $p < 0,05$. Uji *One-Way ANOVA*

menunjukkan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan signifikan pada minimal 2 kelompok perlakuan. Uji *Post-Hoc LSD* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) rerata LDDK⁰⁻¹²⁰ terdapat pada kelompok kontrol-PSD ($p = 0,04$) dan kontrol-TSD ($p = 0,005$). Tidak terdapat perbedaan rerata LDDK⁰⁻¹²⁰ yang signifikan antara kelompok PSD dengan TSD karena nilai $p = 0,403$ ($p > 0,05$).



Gambar 4. 2Rerata LDDK0-120 Kadar Glukosa Darah. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$). *berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada uji *Post-Hoc LSD* terhadap kelompok lainnya. (Sumber : Data Primer Penelitian)

Keterangan: * (Perbedaan signifikan antara kelompok Kontrol dan PSD, TSD)

Perbedaan Jumlah dan Diameter Pulau Langerhans

Penghitungan jumlah pulau Langerhans dilakukan oleh dua orang

observer pada waktu yang sama dan data hasil pengamatan dianalisis menggunakan uji reliabilitas *Bland Altman*. Hasil uji *Bland Altman* didapatkan rentang *limit of agreement* berada di antara -5 dan 5, sehingga antarobserver mempunyai kesesuaian atau reliabilitas yang baik. Rerata selisih pada uji *one sample t test* adalah -0,067 dengan IK95% (-0,074 - 0,059) yang berarti selisih antarobserver jauh lebih kecil daripada nilai maksimal yang dapat ditolerir yaitu lima. Nilai $p=0,00$ sehingga secara statistik rerata selisih tidak berbeda dengan nol. Gambar jumlah pulau Langerhans pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.3. dan rerata jumlah pulau Langerhans pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.4.

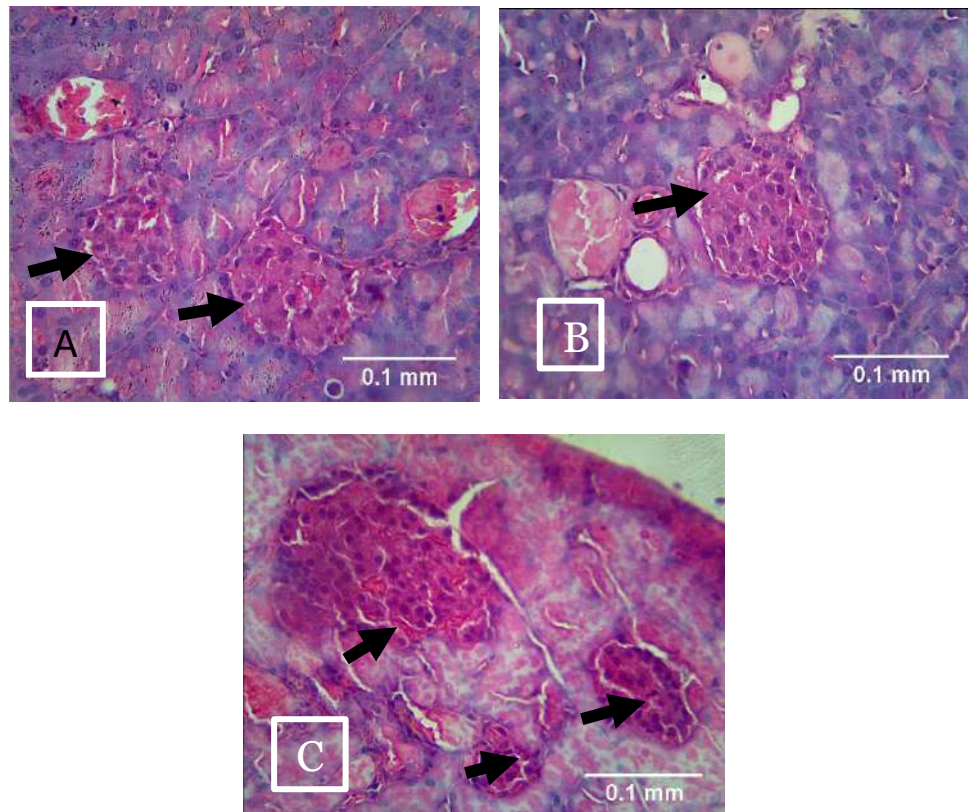
Tabel 4. 4 Rerata Jumlah Pulau Langerhans (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok	N	Jumlah Pulau Langerhans				Analisis Statistik
		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	22,90 $\pm$ 13,54	5,00	47,00	23,00	P=0,949 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	21,33 $\pm$ 6,42	13,00	30,00	23,00	
III (TSD)	10	22,00 $\pm$ 10,34	4,00	44,00	22,00	

Keterangan :SD = standar deviasi

Analisis univariat dilakukan untuk mengetahui rerata jumlah pulau Langerhans setelah perlakuan. Tabel 4.4 menunjukkan rerata jumlah pulau Langerhans tertinggi pada kelompok kontrol yaitu sebesar 22,90 $\pm$ 13,54 dan rerata terendah pada kelompok PSD sebesar 21,33 $\pm$ 6,42. Urutan kelompok dengan rerata jumlah pulau Langerhans tertinggi hingga terendah adalah kelompok kontrol (22,90 $\pm$ 13,54), TSD (22,00 $\pm$ 10,34), dan PSD (21,33 $\pm$ 6,42). Nilai rerata ini dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA*

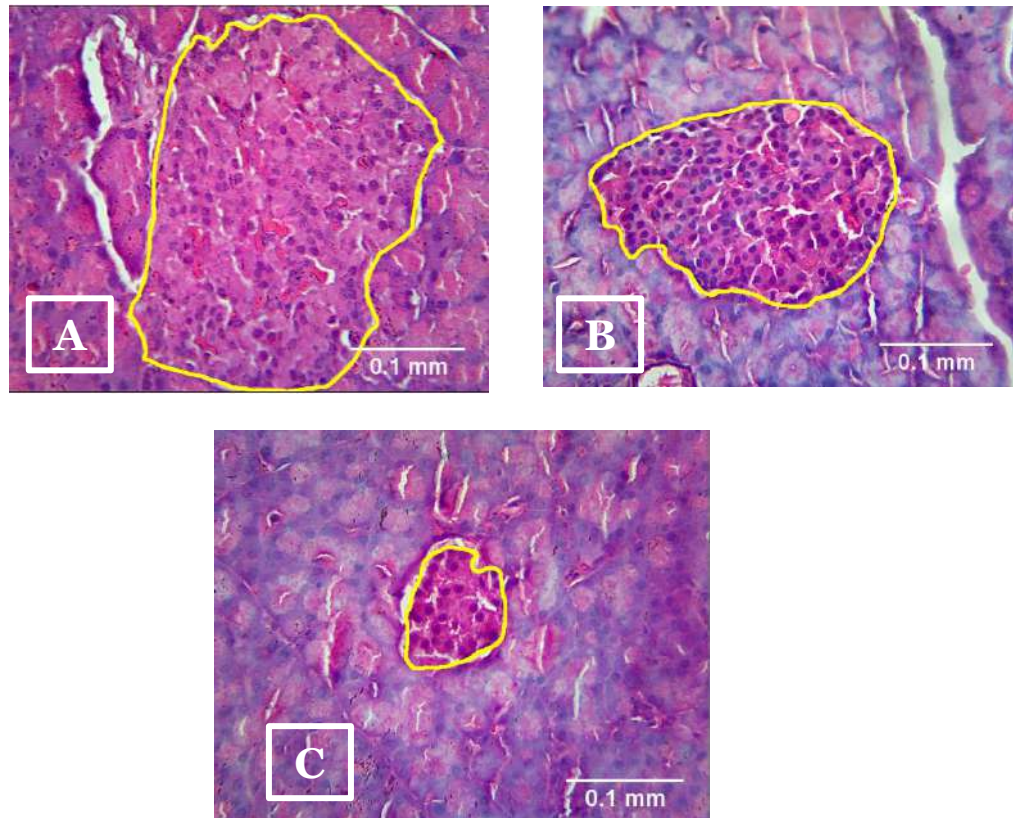
untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok. Nilai uji *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai $p = 0,949$ sehingga tidak terdapat perbedaan jumlah pulau Langerhans yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$).



Gambar 4. 3 Organ pankreas dengan pewarnaan HE pada perbesaran A. kelompok kontrol (jumlah pulau Langerhans = 2). B. Kelompok PSD (jumlah pulau langerhans 1). C. Kelompok TSD (jumlah pulau langerhans = 3). (Sumber: Dokumentasi Penelitian)

Pengukuran diameter pulau Langerhans dilakukan oleh 2 orang observer dengan hasil uji *Bland Altman* menunjukkan *limit of agreement* berada di antara -5 dan 5, sehingga antarobserver mempunyai kesesuaian atau reliabilitas yang baik. Diameter pulau Langerhans diukur menggunakan mikroskop binokuler Motic® perbesaran 400x yang dilengkapi kamera

optilab. Cuplikan citra kamera optilab kemudian dianalisis dengan *imageJsoftware* setelah dilakukan kalibrasi. Gambar 4.4 menunjukkan diameter pulau Langerhans pada setiap kelompok perlakuan, sedangkan data rerata jumlah pulau Langerhans dapat dilihat pada Tabel 4.5.



Gambar 4. 4 Pulau Langerhans pankreas pewarnaan HE pada perbesaran 400x dianalisis menggunakan ImageJ software. A. kelompok kontrol (diameter 0.340 mm); B. kelompok PSD (diameter 0.258 mm); C. kelompok TSD (diameter 0.114 mm). (Sumber: Dokumentasi Penelitian)

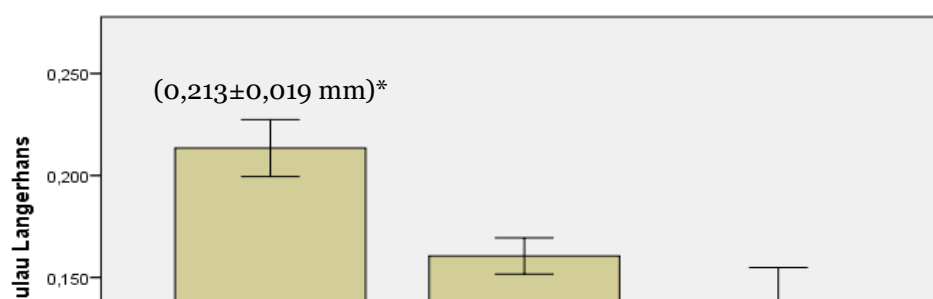
Tabel 4. 5 Rerata Diameter Pulau Langerhans (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok	N	Rerata Diameter Pulau Langerhans (mm)
----------	---	---------------------------------------

		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	Analisis Statistik
I (Kontrol)	10	0,213 $\pm$ 0,019	0,188	0,254	0,211	P=0,0001 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	0,160 $\pm$ 0,011	0,144	0,183	0,161	
III (TSD)	10	0,132 $\pm$ 0,031	0,84	0,191	0,129	

Keterangan :SD = standar deviasi

Rerata diameter pulau Langerhans tertinggi pada kelompok kontrol yaitu sebesar (0,213 $\pm$ 0,019) mm dan rerata terendah pada kelompok TSD sebesar (0,132 $\pm$ 0,031) mm. Urutan kelompok dengan rerata diameter pulau Langerhans tertinggi hingga terendah adalah kelompok kontrol (0,213 $\pm$ 0,019), PSD (0,160 $\pm$ 0,011) mm, dan TSD (0,132 $\pm$ 0,031) mm. Rerata diameter pulau Langerhans dijelaskan lebih lanjut pada Gambar 4.5. Hasil uji statistik *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) menunjukkan nilai $p = 0,0001$ ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan diameter pulau Langerhans yang signifikan pada minimal 2 kelompok perlakuan. Uji *Post-Hoc LSD* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) rerata diameter pulau Langerhans terdapat pada kelompok kontrol-PSD ($p = 0,0001$), kontrol-TSD ($p = 0,0001$), dan PSD-TSD ($p = 0,012$).



$(0,160 \pm 0,011 \text{ mm})^{* \#}$

$(0,132 \pm 0,031 \text{ mm})^{* \#}$

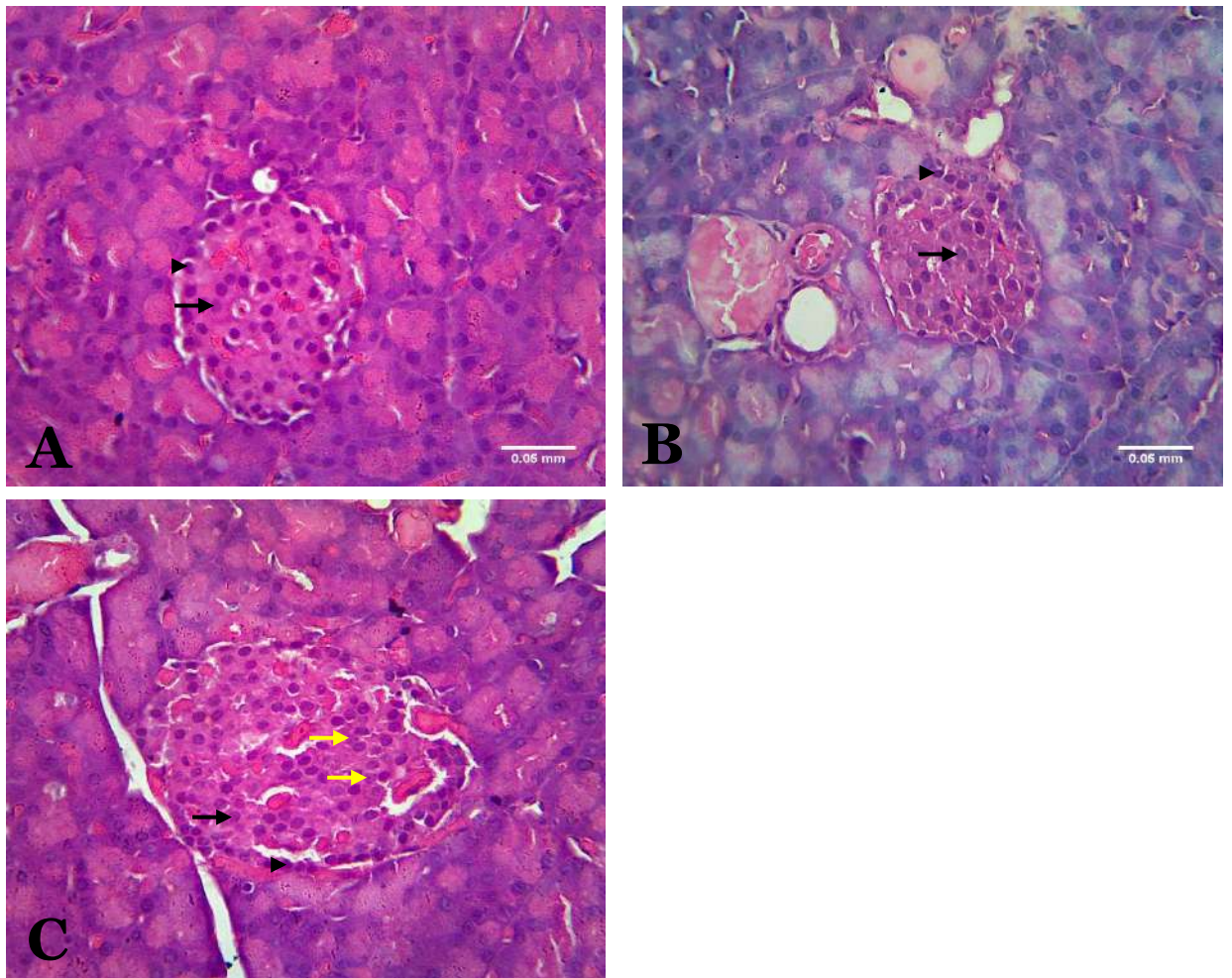
Gambar 4. 5 Rerata diameter pulau Langerhans dengan uji One-Way ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$). (Sumber : Data Primer Penelitian).

Keterangan: * (Perbedaan signifikan antara kelompok Kontrol dan PSD, TSD)
(Perbedaan signifikan antara kelompok PSD dan TSD)

Perbedaan Jumlah Sel Beta Pankreas

Morfologi sel beta pankreas pada pulau langerhans dapat dilihat pada Gambar 4.6. Pada gambar A (Kelompok kontrol) tampak secara umum sebaran sel-sel normal tanpa kerusakan pada pulau Langerhans pankreas. Sel yang berinti gelap terletak di perifer disebut sel alfa dan sel dengan inti lebih terang terletak di sentral disebut sel beta. Gambar B (Kelompok PSD) menunjukkan distribusi sel beta normal yang lebih sedikit daripada A (Kontrol). Gambar C (Kelompok TSD) menunjukkan distribusi sel beta normal yang lebih sedikit daripada A (Kontrol) dan terdapat sel dari pulau Langerhans yang mengalami kerusakan berupa karioreksis (inti sel terbagi menjadi fragmen fragmen). Berdasarkan gambar tersebut dapat diketahui bahwa distribusi sel beta pankreas normal yang paling banyak terdapat pada

kelompok A (Kontrol Sehat).



Gambar 4. 6 Hasil pengamatan sel beta pada pulau Langerhans pankreas. A (Kontrol) menunjukkan sel-sel pulau Langerhans yang terletak di perifer dengan inti gelap (sel alfa) (Kepala panah hitam) dan sel yang terletak di sentral dengan inti lebih terang (sel beta) (Panah hitam). B (PSD) Menunjukkan distribusi sel beta normal yang lebih sedikit daripada A (Kontrol). C (TSD) Menunjukkan distribusi sel beta normal yang lebih sedikit daripada A (Kontrol) dan terdapat sel dari pulau Langerhans yang mengalami kerusakan berupa karioreksis (Panah kuning). Pewarnaan Hematoksilin Eosin pada perbesaran 400x. (Sumber data : Data primer penelitian)

Setelah dilakukan pengamatan secara umum maka dilakukan penghitungan jumlah sel beta pankreas. Rumus yang digunakan adalah Beta-

$p = (Bn/Bt) \times 100\%$. Jumlah sel beta pankreas normal (Bn) dan total keseluruhan sel beta (Bt) (normal dan rusak) digunakan untuk menentukan persentase sel beta (Beta-p) dalam satu pulau Langerhans. Parameter ini digunakan dalam 4 pulau Langerhans setiap sampel dan hasilnya dirata-rata. Sel yang dihitung adalah sel normal dan sel rusak. Kriteria sel yang rusak yaitu mengalami hal seperti berikut : piknotik (inti menggelap, memadat, dan melisut), karioreksis (inti robek dan terbagi menjadi fragmen-fragmen), kariolisis (inti pucat tidak lagi menyerap warna) (Abunasef *et al.*, 2014; Suarsana *et al.*, 2010). Data persentase sel beta pankreas normal pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 4.6.

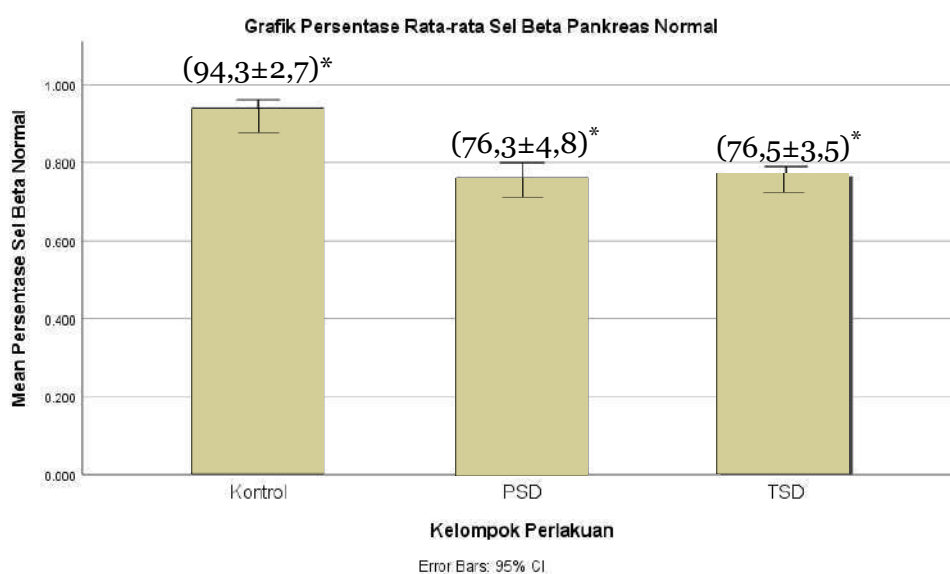
Tabel 4. 6 Rerata Persentase Sel Beta Pankreas Normal (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok	N	Persentase Sel Beta Pankreas Normal (%)				Analisis Statistik
		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	94,3 $\pm$ 2,7	90,5	100,0	94,2	P=0,0001 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	76,5 $\pm$ 3,5	69,9	83,4	77,9	
III (TSD)	10	76,3 $\pm$ 4,8	70,5	81,8	76,1	

Keterangan :SD = standar deviasi

Rerata persentase sel beta pankreas normal secara berurutan dimulai dari kelompok kontrol dengan rerata terbanyak (94,3 $\pm$ 2,7), diikuti kelompok PSD (76,5 $\pm$ 3,5), dan terakhir kelompok TSD (76,3 $\pm$ 4,8). Data ini dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* untuk mencari adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$), yaitu terdapat perbedaan rerata jumlah sel beta normal yang signifikan pada minimal 2 kelompok

perlakuan. Uji bivariat dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD* (Gambar 4.7) untuk mengetahui antar kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) rerata jumlah sel beta pankreas normal terdapat pada kelompok Kontrol-PSD ($p = 0,000$) dan Kontrol-TSD ($p = 0,000$). Tidak terdapat perbedaan rerata jumlah sel beta pankreas yang signifikan antara kelompok PSD dengan TSD karena nilai $p = 0,906$ ($p > 0,05$).



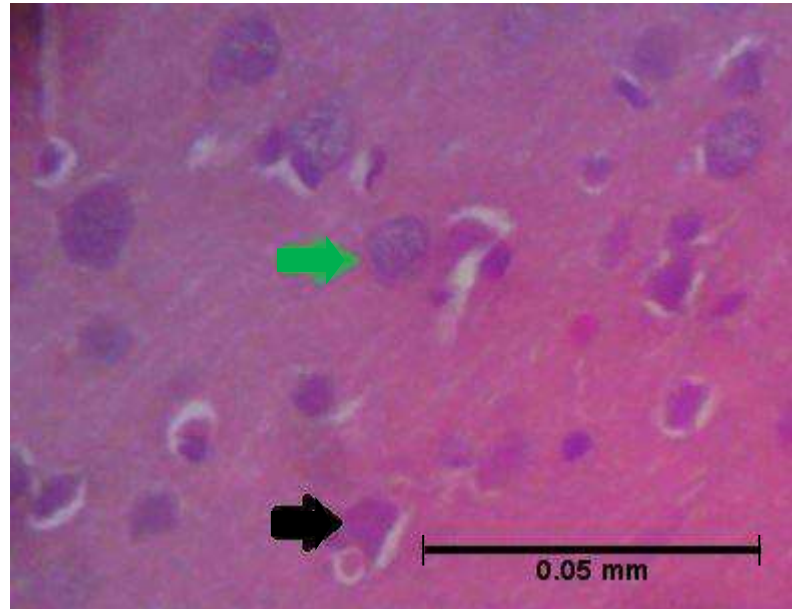
Gambar 4. 7 Rerata Jumlah Sel Beta Pankreas. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$). *berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada uji *Post-Hoc LSD* terhadap kelompok kontrol. (Sumber : Data Primer Penelitian)

Keterangan: * (Perbedaan signifikan antara kelompok Kontrol dan PSD, TSD)

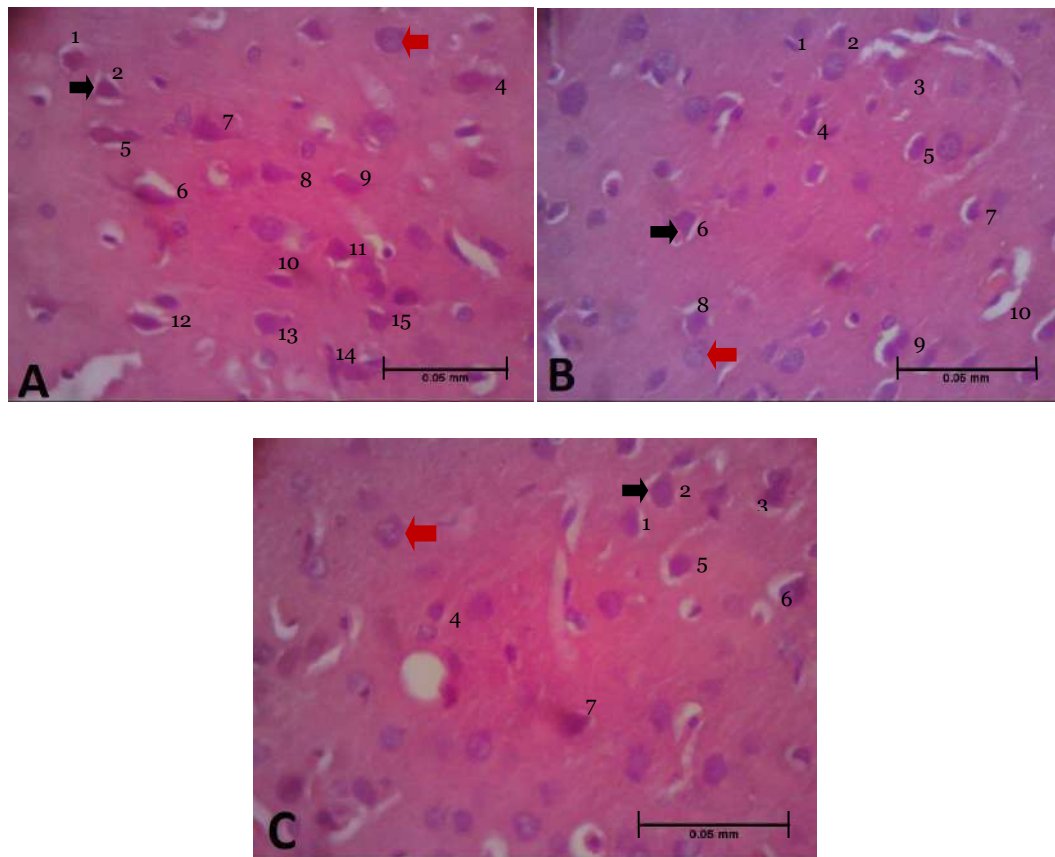
Perbedaan Jumlah Sel Piramidal

Sel piramidal merupakan neuron dengan ciri-ciri badan sel besar, berbentuk segitiga, dengan sitoplasma basofilik (Hernanta, 2013;

Eltony dan Elgayar, 2014). Morfologi sel piramidal dengan pewarnaan HE dapat dilihat pada Gambar 4.8 dan 4.9.



Gambar 4. 8 Sel piramidal korteks prefrontal. Sel piramidal ditandai dengan ciri badan sel berbentuk segitiga dengan sitoplasma basofilik (panah hitam), sedangkan sel granuler dengan badan sel bulat dan sitoplasma bergranul (panah hijau). Pewarnaan HE, pembesaran 400 x(Sumber: data primer penelitian).



Gambar 4. 9 Gambaran histologi sel piramidal korteks prefrontal semua kelompok penelitian. A (kontrol) mempunyai jumlah sel piramidal terbanyak (A) sejumlah 15 sel, diikuti (PSD) (B) sejumlah 10 sel, dan yang paling sedikit dimiliki oleh kelompok (TSD) (C) sejumlah 7 sel. Dalam gambar dapat diamati sel piramidal dengan ciri badan sel berbentuk segitiga dan sitoplasma basofilik (panah hitam) dan sel granuler (panah merah). Pewarnaan HE, pembesaran 400 x (Sumber: data primer penelitian)

Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Image Raster* sebagai alat bantu penanda sel yang telah dihitung. Sel piramidal setiap lapang pandang dihitung dan hasil akhir dinyatakan dalam jumlah total sel piramidal normal dalam 10 lapang pandang. Rerata jumlah sel piramidal setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4. 7 Rerata jumlah sel piramidal setiap kelompok perlakuan (Sumber: Data Primer Penelitian)

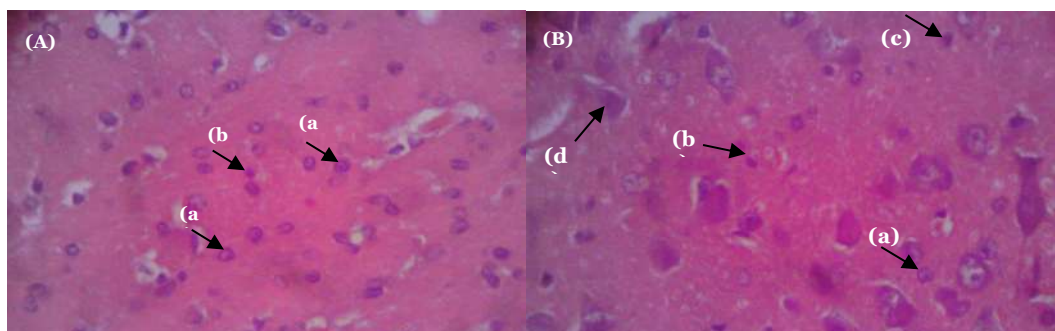
Kelompok	N	Persentase Sel Beta Pankreas Normal (%)				Analisis Statistik
		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	77,10 $\pm$ 26,11	45	131	71,00	P=0,638 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	66,67 $\pm$ 24,55	36	100	56,00	
III (TSD)	10	65,90 $\pm$ 34,91	23	119	54,50	

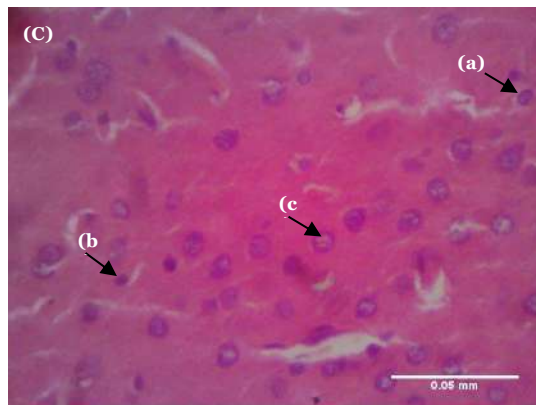
Keterangan :SD = standar deviasi

Berdasarkan Tabel 4.7 diketahui bahwa rerata jumlah sel piramidal tertinggi dimiliki oleh kelompok kontrol (77,10 $\pm$ 26,11), diikuti oleh kelompok PSD (66,67 $\pm$ 24,55) dan rerata terendah pada kelompok TSD (65,90 $\pm$ 34,91). Penghitungan sel piramidal dilakukan oleh peneliti dan interobserver. Uji reliabilitas interobserver menggunakan *Bland Altman* untuk mencari kesesuaian data dalam bentuk numerik. Hasil uji *Bland Altman* didapatkan rentang *limit of agreement* -1,29 s.d. 1,36. Distribusi mayoritas data tersebar di sekitar *mean of difference* dan berada dalam rentang *limit of agreement* sehingga dapat disimpulkan bahwa antara peneliti dan observer mempunyai kesesuaian atau reliabilitas yang baik. Uji statistik *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) (Tabel 4.7) menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan pada 3 kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yaitu $p = 0,638$ sehingga tidak dilakukan uji post hoc.

Perbedaan Jumlah Sel Neuroglia

Jumlah sel neuroglia diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler dan dilakukan penghitungan jumlah dalam 10 lapang pandang untuk satu preparat. Sel yang dihitung adalah sel normal dengan kriteria tidak mengalami piknotik (inti memadat, menggelap, dan melisut), karioreksis (inti robek dan membentuk fragmen-fragmen), kariolisis (inti pucat karena tidak dapat menyerap warna), merupakan ciri-ciri jejas sel yang bersifat irreversibel (Kumar *et al.*, 2007). Pengamatan dilakukan bersama dengan interobserver. Uji reliabilitas interobserver menggunakan *Bland Altman* karena mencari kesesuaian data dalam bentuk numerik. Pengukuran dilakukan oleh dua orang observer di waktu yang sama. Hasil uji *Bland Altman* didapatkan rentang *limit of agreement* -0,71 sampai dengan 0,58, serta distribusi sebagian besar data tersebar di sekitar *mean of difference* dan berada dalam rentang *limit of agreement*. *Limit of agreement* berada di antara -5 dan 5, sehingga dapat disimpulkan bahwa antar observer mempunyai kesesuaian atau reliabilitas yang baik. Gambar 4.10 menunjukkan hasil pengamatan histologi jumlah sel neuroglia otak tikus dan Tabel 4.8. menunjukkan rerata jumlah sel neuroglia normal pada setiap perlakuan.





Gambar 4. 10 Hasil Pengamatan Preparat Histologi Medial Korteks Prefrontal Otak Tikus Perbesaran 400x. Keterangan : (a) sel neuroglia normal, (b) sel neuroglia apoptosis, (c) sel granuler normal, (d) sel pyramidal normal, (A) Kontrol, (B) PSD, (C) TSD.

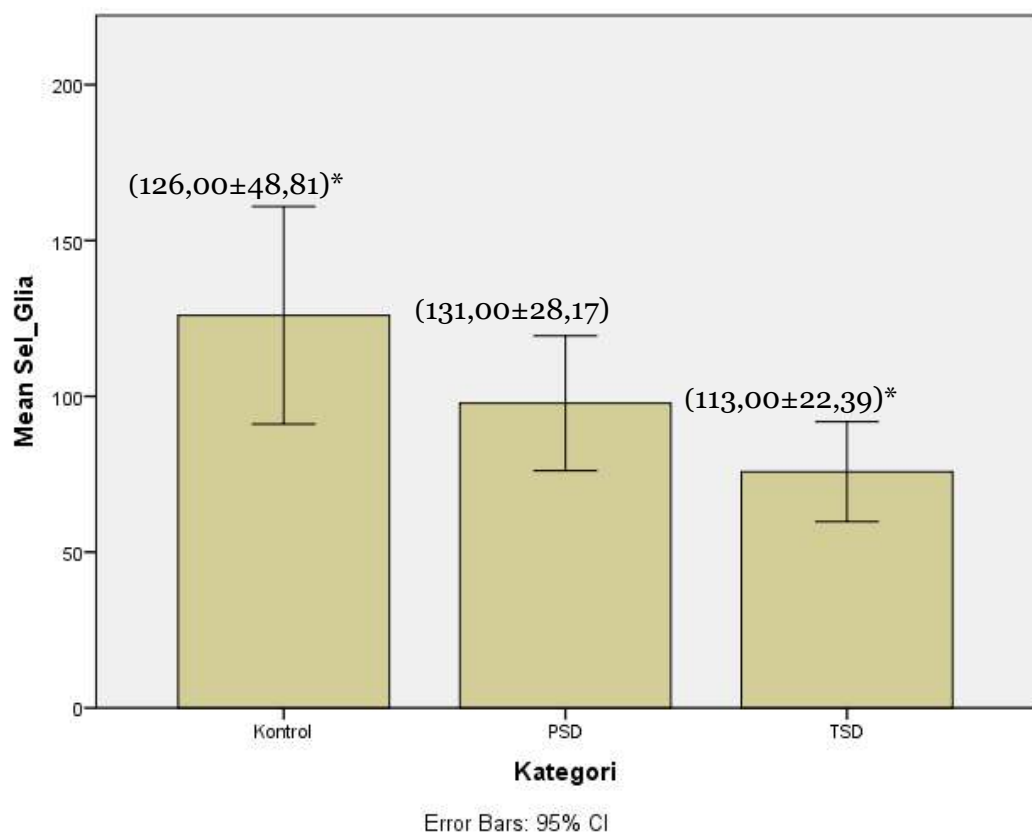
Tabel 4. 8 Rerata Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Hewan Coba (Sumber: Data Primer Penelitian)

Kelompok	n	Persentase Sel Beta Pankreas Normal (%)				Analisis Statistik
		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	126,00 $\pm$ 48,81	50,00	209,00	120,00	P=0,014 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	97,78 $\pm$ 28,17	57,00	131,00	107,00	
III (TSD)	10	75,80 $\pm$ 22,39	40,00	113,00	72,00	

Keterangan :SD = standar deviasi

Tabel 4.8 menunjukkan beda reratajumlah sel neuroglia normal tertinggi pada kelompok kontrol yaitu sebesar (126,00 $\pm$ 48,81)dan beda rerata terendah pada kelompok TSD sebesar (75,80 $\pm$ 22,39).Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan signifikan

pada minimal 2 kelompok perlakuan. Uji *Post-Hoc Bonferroni* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada rerata jumlah sel neuroglia normal kelompok kontrol-TSD ($p = 0,011$), tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata jumlah sel neuroglia normal kelompok kontrol-PSD ($p = 0,280$) dan kelompok PSD-TSD ($p = 0,559$) karena ($p > 0,05$). Berikut rerata jumlah sel neuroglia normal otak hewan coba dijelaskan pada Gambar 4.11.



Gambar 4. 11 Rerata Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Tikus. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$). *berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada uji *Post-Hoc Bonferroni* (Sumber: Data Primer Penelitian)

Keterangan: * (Perbedaan signifikan antara kelompok Kontrol dan TSD)

B. Pembahasan

Pada kondisi stres terjadi peningkatan kortisol melalui aktivasi aksis

hypothalamic pituitary adrenal (HPA) (Spiers *et al.*, 2014). Kortisol yang tinggi menyebabkan penurunan toleransi glukosa (Hackett *et al.*, 2016). Kortisol menginduksi stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) (Villafuerte *et al.*, 2015). ROS dapat mengaktifkan *casein kinase-2* (CK2) dan selanjutnya mengaktivasi *retromer*. *Retromer* menginduksi proses degradasi GLUT-4 dalam lisosom sehingga jumlahnya berkurang. Pada keadaan normal, GLUT-4 berfungsi sebagai transporter glukosa pada sel perifer (Hurrell & Hsu, 2017). Kadar kortisol yang tinggi menghambat enzim *glycogen synthase* sehingga menurunkan pembentukan glikogen. Penurunan GLUT-4 dan *glycogen synthase* menyebabkan kadar glukosa darah tetap tinggi meskipun kadar insulin normal. Keadaan ini disebut sebagai resistensi insulin perifer.

Tikus yang diinduksi *sleep deprivation* mengalami peningkatan aktivitas saraf simpatik (Spiegel *et al.*, 2015). Sistem saraf simpatik menurunkan kerja sel β pankreas sehingga sekresi insulin berkurang. Induksi *sleep deprivation* pada tikus dilaporkan dapat menurunkan kadar insulin (Barf *et al.*, 2010). Berkurangnya sekresi insulin disertai resistensi insulin menyebabkan terjadinya penurunan toleransi glukosa (Meyer *et al.*, 2006). Toleransi glukosa kelompok PSD dan TSD secara statistik tidak berbeda signifikan. Gangguan siklus tidur memiliki pengaruh lebih besar terhadap metabolisme glukosa dibandingkan penurunan durasi tidur (Barf *et al.*, 2010). Studi epidemiologi menunjukkan bahwa durasi tidur penderita *Obstructive Sleep Apnea* (OSA) tidak berkurang, namun tetap memiliki risiko mengalami diabetes melitus tipe 2 (Pamidi & Tasali, 2012).

Induksi *sleep deprivation* pada penelitian ini tidak menyebabkan penurunan jumlah pulau Langerhans, tetapi menurunkan diameter pulau Langerhans. Tikus kelompok PSD dan TSD mengalami penurunan rerata diameter pulau Langerhans pankreas dan penurunan jumlah sel beta pankreas jika dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol. Penurunan kedua variabel ini melibatkan mekanisme stres oksidatif pada pankreas. Keadaan kurang tidur memicu stres oksidatif melalui beberapa mekanisme seperti peningkatan aktivitas aksis HPA dan toksisitas glukosa akibat hiperfagia (Galvão *et al.*, 2009). *Sleep deprivation* menyebabkan kerusakan pada organ pankreas meskipun tidak membuat pulau Langerhans nekrosis secara keseluruhan, juga meningkatkan mortalitas tikus PSD dan TSD akibat gangguan pada multiorgan (Naidoo *et al.*, 2014). Toksisitas glukosa menginduksi stres oksidatif pada sel alfa pankreas dan disfungsi sekresi glukagon. Namun keadaan hiperglikemi dan stres akibat gangguan metabolisme glukosa pada sel beta pankreas tidak signifikan memengaruhi fungsi dan massa sel alfa, sel delta, serta sel F (Kawamori, 2017).

Sleep deprivation menyebabkan stres oksidatif pada sel beta pankreas melalui mekanisme stres sel akibat toksisitas glukosa (Farid *et al.*, 2014). Keadaan kurang tidur memicu hiperfagia sehingga terjadi peningkatan kadar gula darah dan menstimulasi peningkatan sekresi hormon insulin (Martins *et al.*, 2010). Sel merespon hormon insulin dengan meningkatkan ekspresi *Glucose transporter 4* (GLUT4) sehingga ambilan glukosa dari aliran darah juga meningkat (Liu *et al.*, 2007). Kadar hormon insulin yang tinggi memiliki efek negatif terhadap GLUT4 pada membran sel karena mengaktivasi

NADPH oxidase 4 (NOX4), yaitu enzim pengoksidasi kuat penghasil ROS (Mahadev *et al*, 2004). Kadar ROS yang tinggi mengaktivasi *casein kinase-2* (CK-2) kemudian mengaktivasi *retromer* (Ma *et al.*, 2014). *Retromer* selanjutnya memberikan tanda pada kompleks trans-golgi mengirim GLUT4, yang seharusnya ditransportasikan ke membran plasma untuk mengambil glukosa, ke lisosom untuk dihancurkan (Ma *et al.*, 2014). Hal tersebut membuat kadar gula darah tetap tinggi dan menyebabkan toksisitas glukosa (Hurre dan Hsu, 2017). Toksisitas glukosa menyebabkan disfungsi dan perubahan massa sel beta pankreas karena stres oksidatif (Farid *et al.*, 2014).

Pankreas adalah organ dengan kadar antioksidan yang sangat rendah dibandingkan dengan hepar sebagai organ detoksifikasi, oleh karena itu sel beta pankreas sangat rentan terhadap stres oksidatif akibat peningkatan (Wang dan Wang, 2017). Stres oksidatif dalam jangka panjang memicu kerusakan sel dan jaringan melalui berbagai mekanisme seperti perubahan aktivitas enzimatik, disregulasi ekspresi gen, dan apoptosis (Keane *et al.*, 2015). Salah satu target stres oksidatif pada sel beta pankreas adalah *duodenal homeobox factor 1* (PDX-1) yang berperan dalam perkembangan dan diferensiasi pankreas untuk mempertahankan fungsi sel-sel Pulau Langerhans (Gerber dan Rutter, 2017). Mekanisme kerusakan PDX-1 oleh stres oksidatif dimediasi oleh jalur *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), PDX-1 gagal untuk ditranlokasikan dari inti sel ke sitosol akibatnya sel beta tidak dapat merespon glukosa untuk menghasilkan hormon insulin (Fujimoto dan Polonsky, 2009). Selain menyebabkan penurunan ekspresi PDX-1, stres oksidatif juga berpengaruh pada penurunan gen *MafA*, yaitu faktor transkripsi yang sensitif

terhadap kadar glukosa dan berperan dalam produksi insulin (Matsuoka *et al.*, 2004; Harmon *et al.*, 2005). Suatu protein yang disebut P38 *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) sangat peka terhadap stres, bila terjadi stres oksidatif di pulau Langerhans maka P38 akan berikatan dengan MafA. Ikatan tersebut membuat MafA didegradasi melalui jalur *Ubiquitin Proteasomal Pathway* (UPP)(Khattabi, 2013). Degradasi PDX-1 dan MafA yang berlebihan pada stres oksidatif menyebabkan kerusakan dan disfungsi sel beta pankreas sehingga susunan pada pulau Langerhans berubah baik secara struktur maupun fungsi (Robertson dan Harmon, 2007).

Pada analisis diameter disimpulkan bahwa kelompok TSD mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok PSD. Derajat *sleep deprivation* memengaruhi keparahan gangguan metabolisme glukosa (Lisa *et al.*, 2011). TSD meningkatkan resiko intoleransi glukosa dibanding PSD (Gottlieb *et al.*, 2005). Waktu tidur yang diberikan untuk kelompok PSD menurunkan kadar kortisol, meningkatkan kadar antioksidan, dan memperbaiki metabolisme glukosa sehingga perbedaan derajat *sleep deprivation* memengaruhi tingkat stres oksidatif pada pulau Langerhans (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2010; Lisa *et al.*, 2011).

Penurunan jumlah sel beta pankreas pasca *sleep deprivation* pada kelompok PSD dan TSD tidak menunjukkan hasil yang signifikan. Se jauh telaah pustaka peneliti belum ada data mengenai hubungan PSD dan TSD terhadap jumlah sel beta pankreas. Penelitian Carol *et al.* (2014), yaitu *partial sleep deprivation* dan *total sleep deprivation* memiliki efek yang serupa pada kerusakan sel di organ hati dan paru.

Paradoxical sleep deprivation atau *REM sleep deprivation* ditujukan untuk mencegah terjadinya fase tidur REM, sedangkan *Total Sleep Deprivation* ditujukan untuk mencegah fase tidur NREM dan REM. Kedua kelompok tersebut baik *Paradoxical sleep deprivation* dan *Total sleep deprivation* tidak mengalami fase tidur REM (Smith & Peters, 2011). Menurut Knutson (2007), dalam sebuah penelitian pemberian infus glukosa konstan selama satu malam, fase tidur NREM dikaitkan dengan peningkatan kadar glukosa darah, sedangkan fase tidur REM dikaitkan dengan kadar glukosa darah yang stabil. Hal ini dibuktikan dengan penurunan aktivitas metabolisme glukosa pada otak sebanyak 11% dalam fase tidur NREM, dan terjadi pengurangan penggunaan glukosa perifer, sehingga pada fase tidur NREM terdapat peningkatan kadar glukosa dalam darah. Berbeda dengan fase tidur REM yang memiliki penggunaan glukosa perifer yang lebih tinggi daripada NREM, sehingga pada fase ini kadar glukosa dalam darah cenderung stabil. Hasil akhirnya adalah kadar glukosa tinggi atau hiperglikemi, sehingga sel beta pankreas meningkatkan produksi insulinnya dengan cara peningkatan proses *glycolytic flux* dan *TCA cycle*, kedua proses ini menghasilkan ROS yang berlebih sehingga terjadi proses stres oksidatif yang serupa (Gerber & Rutter, 2017).

Stres oksidatif yang terjadi pada sleep deprivation tidak terkompensasi dengan baik, hal ini dibuktikan dari penurunan sebanyak 30% dari aktivitas glutathion dan katalase tanpa peningkatan GPX (*Glutathion peroxidase*). Stres yang ditimbulkan menyebabkan peningkatan asupan makanan sebagai salah satu sumber antioksidan, namun ternyata walaupun asupan makanan

meningkat kadar antioksidan yaitu glutathione dan katalase tetap rendah. Untuk meningkatkan kadar glutathione secara drastis diperlukan *sleep recovery* dalam waktu 48 jam penuh meliputi fase tidur NREM dan REM. Hal ini membuktikan saat terjadi *sleep recovery* stres oksidatif masih terjadi ditandai dengan peningkatan antioksidan sebagai kompensasi dan tubuh memerlukan pemulihan dengan cara *sleep recovery* dalam waktu yang cukup (Everson *et al.*, 2005).

Tikus kelompok PSD dan TSD mengalami penurunan jumlah sel neuroglia normal dan jumlah sel piramidal dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel neuroglia normal didahului dengan mekanisme jejas pada sel. Jejas dalam batas tertentu bersifat reversibel dan akan kembali ke kondisi stabil, namun apabila stres berkepanjangan dan terjadi secara tiba-tiba akan mengakibatkan cedera ireversibel yang berlanjut menjadi kematian sel. Respon adaptasi sel neuroglia pada stres *sleep deprivation* adalah hipertrofi dan peningkatan reaktivasi sel selama 4 hari, dan penurunan reaktivasi sel pada hari ke lima (Birey *et al.*, 2017). Apabila cedera berkelanjutan jejas menjadi ireversibel, sel tidak dapat pulih kembali dan menjadi mati yang dibedakan menjadi nekrosis dan apoptosis (Kumar *et al.*, 2007).

Perubahan jumlah sel neuroglia pada kondisi *sleep deprivation* kronis dipengaruhi oleh aksis *hypothalamic pituitary adrenal* (HPA) yang meningkatkan kadar kortisol plasma (kortikosteron pada hewan) (Spiers *et al.*, 2014). Peningkatan kortisol akibat induksi *sleep deprivation* menghambat transpor glukosa di otak sehingga menurunkan ATP basal.

Glukokortikoid yang meningkat akan menghambat *uptake* glukosa sehingga penurunan kadarnya menyebabkan peningkatan glutamat di celah ekstraseluler (Arjadi *et al.*, 2014).

Glutamat adalah neurotransmitter eksitatorik utama di sistem saraf pusat. Peningkatan kadar glutamat menginduksi eksitotoksisitas, yaitu overaktivasi reseptor glutamat (GluRs) yang memulai proses kematian sel. Reseptor *ionotropic glutamate* (iGlu) terdiri dari *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA), *alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* (AMPA), dan reseptor Kainate. Membran sel dari tiga jenis sel neuroglia mengekspresikan ketiga reseptor tersebut. Overaktivasi pada reseptor NMDA, AMPA dan Kainate menyebabkan masuknya ion Na^+ dan Ca^{2+} . Influx Na^+ mengaktivasi *Voltage Gated Calcium Channel* (VGCC) dan *Sodium Calcium Exchanger* (NCX) yang menyebabkan masuknya ion Ca^{2+} , sehingga terjadi *overload* ion kalsium di dalam sel neuroglia yang menginduksi penyerapan kalsium oleh mitokondria secara cepat, sehingga terjadi depolarisasi mitokondria. Depolarisasi ini menyebabkan, (a) mitokondria melepaskan sitokrom C ke sitosol, yang kemudian berinteraksi dengan *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan mengaktifkan kaspase apoptosis sel; (b) meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui efluks sistin di *Glutamate-Cystine Exchanger* membran sel neuroglia yang menyebabkan kerusakan seluler nonspesifik dan *necrotic-like morphology* (Matute *et al.*, 2006). Peningkatan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) merusak membran lipid dan DNA inti sel (Schieber & Chandel, 2014).

Rerata jumlah sel neuroglia pasca *sleep deprivation* antara kelompok PSD dan TSD mengalami penurunan namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian oleh Khadrawy *et al.* (2011) yang mengukur kadar antioksidan *glutathione reductase* dan kadar *malondialdehyde* (MDA) menggunakan spektrofotometri, menunjukkan penurunan kadar *glutathione reductase* korteks yang signifikan setelah induksi *Paradoxical sleep deprivation* selama 72 jam menjadi ($0,576 \pm 0.153$ mmol/g) dan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) korteks yang signifikan setelah induksi *Paradoxical sleep deprivation* selama 72 jam ($23,04 \pm 0.96$ nmol/g). Peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar *glutathione reductase* membuat sistem antioksidan mitokondria dan sitoplasma kewalahan oleh radikal bebas. Selama terjaga periode aktivitas neuron tinggi, volume oksigen yang signifikan digunakan untuk mempertahankan potensial membran, yang kemudian menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Akumulasi ROS menyebabkan kerusakan DNA, lipid (plasma dan membran organel), dan protein (reseptor dan enzim). Peningkatan peroksidasi lipid diamati pada penelitian ini setelah 72 jam PSD dapat dikaitkan dengan kerusakan membran sel dan organel membran di korteks dan hippocampus.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Singh *et al.* (2008) menyampaikan bahwa perlakuan *paradoxical sleep deprivation* selama 96 jam menyebabkan penurunan peroksidase lipid sebesar 38% di korteks serebri. Penurunan stres oksidatif pada PSD karena peningkatan kadar *superoxide dismutase* (SOD) sebesar 40% dan tidak terjadi perubahan kadar

glutathione peroxidase (GPx). SOD dan GPx merupakan antioksidan yang berperan dalam merubah radikal bebas menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi sel neuron dan glia.

Peningkatan signifikan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) setelah *paradoxical sleep deprivation* menunjukkan respon kompensasi untuk mengendalikan anion superoksida yang meningkat akibat ketidakseimbangan reaksi reduksi dan oksidasi di mitokondria (Rodriguez & Ochoa, 2006). Peningkatan SOD pada perlakuan *paradoxical sleep deprivation* (PSD) sebesar $68,92 \pm 19,08$ U/mL dan *total sleep deprivation* (TSD) sebesar $82,70 \pm 12,93$ U/mL selama 5 hari, memicu percepatan sinyal apoptosis, hal ini karena terjadi perubahan SOD menjadi *superoxide reductase* (SOR), yang berperan sebagai *superoxide oxide* (SOO) yang bertindak sebagai generator radikal bebas melalui *alternative-pathway*. Kelompok PSD memiliki waktu tidur 4 jam sehingga perbedaan kadar SOD kelompok kontrol-PSD tidak sebesar kelompok kontrol-TSD. Metabolisme tubuh saat tidur menurun, hal ini menyebabkan penurunan produk sisa metabolisme sehingga menghambat stres oksidatif yang memicu apoptosis sel (Jati, 2018). Kesempatan tidur pada PSD juga menghambat aktivitas neuron eksitatorik dan neurotransmitter eksitatorik glutamat oleh *glutathione disulfide* (GSSD) (Honda, 1994). Penghambatan ini menurunkan kadar glutamat ekstrasel dan memungkinkan meminimalkan efek eksitotoksitasnya pada sel neuroglia (Inoue *et al.*, 1995).

Tidak terdapat perbedaan jumlah sel piramidal yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok induksi *sleep deprivation* bisa terjadi akibat

adanya mekanisme *neuroprotective* terhadap eksotoksisitas glutamat yang diperankan oleh neuroglia baik dari aktivitasnya maupun sekresi zat seperti *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)(Duman, 2009). Si *et al.* (2004) mengemukakan bahwa temuan paling konsisten dalam studi stres pada *prefrontal cortex* (PFC) adalah penurunan jumlah neuroglia. Paparan stres juga menyebabkan penurunan jumlah kompleksitas dendrit apikal dan mengurangi ukuran badan sel tanpa menurunkan jumlah dari sel piramidal(Cotter *et al.*, 2002). Penelitian pembatasan tidur selama 2 jam dalam 4 hari oleh De vivo *et al.* (2016) menunjukkan bahwa induksi stres tersebut menyebabkan penambahan ukuran mitokondria namun belum mampu merusak struktur membran dan krista dari mitokondria. Mengingat peran neuroglia dalam melindungi neuron, dapat dikatakan bahwa kematian neuron karena induksi stres didahului oleh kematian sel neuroglia sebagai pelindung neuron(Duman, 2009).

Astrosit dan neuron dapat mensekresikan *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) yang mempengaruhi proliferasi, dan differensiasi neuron saat masa pertumbuhan, namun juga berperan penting dalam mempertahankan kelangsungan hidup dan pertahanan fungsi dari neuron yang mengalami kerusakan(Stahlberg *et al.*, 2018). *Brain derived neurotrophic factor* tereksresi cukup tinggi pada struktur seperti *hippocampus*, PFC dan amygdala melalui reseptornya yang dinamakan *tropomyosin related kinase B* (TrkB)(Duman, 2009). *Brain derived neurotrophic factor* merangsang autofosforilasi reseptor dan berinteraksi dengan *docking protein* yang menyebabkan aktivasi salah satu kaskade utama sinyal intraseluler yaitu jalur

microtubule associated protein kinase (MAPK), *phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)*, dan *phospholipase-C- γ (PLC γ)*. Kaskade ini yang mengaktifkan fungsi neurogenesis dari BDNF meliputi proliferasi sel, diferensiasi dan survival(Charney dan Nestler, 2009). Sebagai mekanisme homeostasis kehilangan satu periode tidur 12 jam juga direspon dengan peningkatan kadar BDNF yang dipertahankan selama setidaknya 1 bulan(Zucconi *et al.*, 2006).

Selain astrosit peran neuroprotektor juga dimiliki oleh mikroglia. Mikroglia berperan sebagai makrofag dalam sistem saraf pusat, karena dapat memfagosit sel yang mengalami kematian(Janda *et al.*, 2018). Mikroglia juga dapat melindungi SSP dengan meningkatkan neurogenesis, membersihkan debris, dan menekan peradangan(Chen dan Trapp, 2016). Mekanisme supresi inflamasi merupakan *feedback* negatif dari pengeluaran sitokin proinflamasi seperti IL6, IL-12, and TNF- α yang dikeluarkan terlebih dahulu oleh mikroglia(Rasley *et al.*, 2006 ; Loane dan Byrnes, 2010). Sitokin anti-inflamasi yang dihasilkan mikroglia adalah IL-4, IL-10, dan TGF- β (Colton 2009). Penelitian dengan model meningitis pada hewan coba menunjukkan bahwa mikroglia, bersama dengan astrosit, mengekspresikan jumlah IL-10 yang signifikan, tetapi produksi IL-10 terjadi setelah sitokin inflamasi lainnya seperti IL-6(Rasley *et al.*, 2006). Mikroglia mengekspresikan TGF- β dalam konsentrasi tinggi pada model trauma otak luka tusuk dan kadar TGF- β tersebut mencapai puncaknya pada hari ke-7 pasca cedera. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) yang diekspresikan dalam otak yang terluka juga dapat berkontribusi pada regenerasi saraf dengan merangsang produksi

faktor pertumbuhan saraf dan dengan mengendalikan pembentukan *astroglial scar* (Chen dan Trapp, 2016).

Meskipun tidak signifikan, perbedaan jumlah sel piramidal kelompok kontrol dan kelompok induksi *sleep deprivation* pada penelitian ini dapat disebabkan oleh peningkatan glukokortikoid akibat stres yang dapat mempengaruhi sel piramidal dan sel neuroglia sebagai neuroprotektor (Jauregui-Huerta *et al.* 2010; Landolt *et al.*, 2014). Peningkatan glukokortikoid, kortison dalam hewan, menghambat *uptake* glukosa sehingga penurunan kadarnya meningkatkan glutamat di celah ekstraseluler hingga dapat menyebabkan eksotoksisitas (Gryglewska, 2010). Eksotoksisitas glutamat menyebabkan overaktivasi reseptor glutamate yaitu NMDA pada membran sel piramidal, sedangkan pada membran sel neuroglia yang teraktifasi adalah *alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* (AMPA) dan Kainate (Matute *et al.*, 2006 : Heim dan Nemeroff, 2009). Overaktivasi reseptor glutamat mengakibatkan influks Na^+ yang mengaktifasi *Voltage Gated Calcium Channel* (VGCC) dan *Sodium Calcium Exchanger* (NCX) sehingga terjadi *overload* ion kalsium di dalam sel (Squire *et al.*, 2012). Banyaknya ion kalsium akan diserap secara cepat oleh mitokondria yang dapat menyebabkan depolarisasi mitokondria dengan konsekuensi pengaktifan kaspase apoptosis sel, peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), dan penurunan kadar glutathione (Matute *et al.*, 2006).

Peningkatan ROS dan penurunan kadar glutathione dapat menyebabkan stres oksidatif (Ogundele *et al.*, 2014). Neuroglia memerankan peran neuroprotektornya dengan cara mempertahankan kadar glutathione dan

memberantas ROS secara langsung(Aschner dan Costa, 2004). Peran neuroglia tidak 100 % menghambat efek stres oksidatif terhadap sel piramidal. Bhatia *et al.* (2019) menyatakan bahwa stres oksidatif berulang dapat menyebabkan > 80% kerusakan neuron yang tidak terlindungi neuroglia dan 45% pada neuron dengan perlindungan neuroglia(Bhatia., 2019).

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan tujuan penelitian dan analisis data yang telah dilakukan, maka dapat disampaikan kesimpulan penelitian ini adalah :

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD) memiliki toleransi glukosa darah lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, jumlah sel beta pankreas dan diameter pulau Langerhans lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, jumlah sel neuroglia dan sel piramidal korteks prefrontal otak lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol.
2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan kelompok *total sleep deprivation* (TSD) memiliki toleransi glukosa darah lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, jumlah sel beta pankreas dan diameter pulau Langerhans lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, jumlah sel neuroglia dan sel piramidal korteks prefrontal otak lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak terdapat perbedaan bermakna pada jumlah pulau Langerhans dibandingkan kelompok kontrol.
3. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan kelompok *total sleep deprivation* (TSD) memiliki toleransi glukosa darah dan jumlah sel beta pankreas tidak berbeda signifikan dibandingkan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD), diameter pulau Langerhans lebih rendah dibandingkan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD), jumlah

sel neuroglia korteks prefrontal otak lebih rendah dibandingkan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD), jumlah sel piramidal korteks prefrontal otak lebih tinggi dibandingkan kelompok *paradoxical sleep deprivation* (PSD).

4. Tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah pulau Langerhans dan jumlah sel piramidal korteks prefrontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kelompok kontrol, *paradoxical sleep deprivation* (PSD), dan *total sleep deprivation* (TSD).

B. Saran

1. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan untuk membandingkan toleransi dan kadar glukosa darah sebelum dan sesudah induksi stres *sleep deprivation*.
2. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan penambahan jumlah sampling glukosa untuk menggambarkan perubahan glukosa secara lebih mendetail.
3. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan terhadap kadar hormon insulin, leptin, ghrelin, dan kadar glukokortikoid pasca induksi stres *sleep deprivation*.
4. Sebaiknya dilakukan penimbangan berat organ pankreas untuk mengetahui hubungan perbedaan jumlah sel beta pankreas dan jumlah serta diameter pulau Langerhans dengan berat organ.
5. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan untuk mengukur ketebalan korteks prefrontal otak sebelum dan sesudah induksi stres *sleep deprivation*.

6. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan menambahkan prosedur *sleep recovery* untuk mengetahui ada tidaknya perbaikan toleransi glukosa, perbedaan jumlah dan diameter pulau Langerhans, perbedaan jumlah sel beta pankreas, perbedaan jumlah sel neuroglia dan perbedaan jumlah sel piramidal setelah dilakukan pemulihan.
7. Sebaiknya ditambahkan jumlah kandang perlakuan *Modified Multiple Platform Method* (MMPM) agar tidak terjadi bias stressor pada hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Abunasef, S.K., Amin, H.A., & Abdel-Hamid, G.A. 2014. A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 52(1): 42–50.
- American Academy of Sleep Medicine (AASM). 2008. *Insomnia* (online). Diunduh dari www.aasmnet.org/resources. Diakses 14 April 2019.
- Arjadi, F., Soejono, S.K., Maurits, L.S., Pangestu, M. 2014. Jumlah Sel Piramidal CA3 Hipokampus Tikus Putih Jantan Pada Berbagai Model Stres Kerja Kronik. *Majalah Kedokteran Bandung*. 46(4): 197-202.
- Aschner, M., Costa, L.G. 2004. *The Role of Glia in Neurotoxicity Second Edition*. New York : CRC Press.
- Ayala, J.E., Samuel, V.T., Morthon, G.J. 2010. Standard Operating Procedures for Describing and Performing Metabolic Test of Glucose Homeostasis in Rats. *Disease Model Mechanisms*. 3(10): 525-34.
- Barf, R.P., Gert, V.D., Scheurink, A.J., Hoffmann, K., Novati, A., Hulshof, H. J. 2012. Metabolic Consequences of Chronic Sleep Restriction in Rats: Changes in Body Weight Regulation and Energy Expenditure. *Physiology Behavior*. 107(119): 322-28.
- Bellesi, M., Luisa de Vivo., Giulio. T., Chiara. C. 2017. Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex. *Neuroscience Journal*, 37(21): 5263-5273.
- Bhatia, T.A., Pant, D.B., Eckhoff, E.A., Gongaware, R.N., Do, T., *et al.* 2019. Astrocytes Do Not Forfeit Their Neuroprotective Roles After Surviving Intense Oxidative Stress. *Frontier in Molecular Neuroscience*. 12 (87) : 1-12.
- Birey, F., Michelle, K., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Daniel, J., *et al.* 2015. Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-Like Behavior Through Reduced Secretion of FGF2. *Neuroscience Journal*, 88(5):940-956.
- Buxton, O.M., Cain, S.W., O'Connor, S.P., Porter, J.H., Duffy, J.F., Wang, W. 2012. Adverse Metabolic Consequences in Humans of Prolonged Sleep Restriction Combined With Circadian Disruption. *Science Translational Medicine*. 4(7): 129-43.
- Capdevila, S. 2017. Acclimatization of Rats After Ground Transportation to a New Animal Facility. *Laboratory Animal*. 41(2): 255-61.

- Carol, A.E., Christopher, J.H., Aniko, S., & Neil, H. 2014. Cell Injury and Repair Resulting from Sleep Loss and Sleep Recovery in Laboratory Rats. *Sleep*. 37(12): 1929–1940.
- Charney, D.S., Nestler, E.J. 2009. *Neurobiology of Mental Illness*. New York : Oxford University Press
- Chen, Z., Trapp, B.D. 2016. Microglia and Neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. 136 (1) : 10-17.
- Chrousos, G., Vgontzas, A. N., Kritikou, I. 2016. *HPA Axis and Sleep*. MDText.com, Inc, South Dartmouth.
- Colton, C. A. 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal Neuroimmune Pharmacol*. 4 (4) : 399–418.
- Costes, S., Boss, M., Thomas, A.P., & Matveyenko, A.V. 2015. Activation of Melatonin Signaling Promotes β -Cell Survival and Function. *Molecular endocrinology(Baltimore, Md.)*. 29(5): 682–692.
- Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., Everall, I. 2002. Reduced Glial Cell Density and Neuronal Size in the Anterior Cingulate Cortex in Major Depressive Disorder. *Archives of General Psychiatry*. 58 (6) : 545-553.
- Da Silva Xavier, G. 2018. The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*. 7(3). hal. 54.
- Dahlan, Sopiudin. 2015. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi 6*. Salamba Medika, Jakarta.
- De Vivo, L., Nelson, A.B., Bellesi, M., Noguti, J., Tononi, G., *et al*. 2016. Loss of sleep affects the ultrastructure of pyramidal neurons in the adolescent mouse frontal cortex. *Sleep*. 39 (4) : 861–874.
- Duman, R. S. 2009. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: Stress and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 11 (3) : 239-255.
- Dyspersyn, G., Sauvet, F., Drogou, C., Ciret, S., Gallopin, T., Chennaoui, M. 2013. Validation of Total Sleep Deprivation Model. *Sleep Medicine*. 14(1): 107-13.
- Eltony, S., Elgayar, S. A. M. 2014. Histological study on effect of *Nigella sativa* on aged olfactory system of female albino rat. *Romanian journal of morphology and embryology*. 55 (2) : 325-334.

- Eroschenko, V. P., & Fiore, M. S. H. d. 2015. *Di Fiore's atlas of histology with functional correlations* (12th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams.
- Everson, C.A., Laatsch, C.D., & Hogg, N. 2005. Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 288:2.
- Farid, M., Darwin, E. dan Sulastri, D. 2014. Pengaruh Hiperglikemia terhadap Gambaran Histopatologis Pulau Langerhans Mencit. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(3). hal. 420–428.
- Farindra. I. 2018. Pengaruh Pemberian Sekat Aluminium Foil Terhadap Dampak Stress Oksidatif Akibat Paparan Radiasi Elektromagnetik Pada Jaringan Serebrum Tikus Wistar Jantan (Studi Rasio Neuron dan Neuroglia Serta Kadar Malondialdehyde Jaringan Serebri). *Thesis*. Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.
- Fujimoto, K. dan Polonsky, K. S. 2009. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. 11. hal. 30–37.
- Galvão, M. de O. L. Sinigaglia-Coimbra, Rita. Kawakami, Suzi Emiko. *et al.* 2009. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*. 34(8). hal. 1176–1183.
- Gerber, P.A., & Rutter, G.A. 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & redox signaling* 26(10): 501–518.
- Gottlieb, D. J. Resnick, Helaine E. Redline, Susan. *et al.* 2005. Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Archives of Internal Medicine*. 165(8). hal. 863–868.
- Gryglewska, J.O. 2010. Consequences of Sleep Deprivation. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 23 (1) : 95 – 114.
- Hackett, R.A., Kivimaki, M., Kumari, M., Steptoe, A. 2016. Diurnal Cortisol Patterns, Future Diabetes, and Impaired Glucose Metabolism in the Whitehall II Cohort Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 101(8): 619-25.
- Hernanta, I. 2013. *Ilmu Kedokteran Lengkap tentang Neurosains (1st ed)*. Jogjakarta: D-Medika.

- Hirshkowitz, M., Whiton, K., Albert, S.M., Alessi, C., Bruni, O., DonCarlos, L., Hillard, P.J.A. 2015. National Sleep Foundation's Sleep Time Duration Recommendations. *Methodology and Results Summary*. 1(1): 40-3.
- Honda, K., Komoda, Y., Inoue, S. 1994. Oxidized glutathione regulates physiological sleep in unrestrained rats. *Brain Research*. 636(2): 253–358.
- Hurrle, S. & Hsu, W.H. 2017. Etiology of Oxidative Stress in Insulin Resistance. *Biomedical Journal*. 40(5): 257-62.
- Inoue, S., Honda, K., Komoda, Y. 1995. Sleep as Neuronal Detoxification and Restitution. *Behavioral Brain Research*. 69:91–96.
- Irwin, M.R. 2015. Why Sleep is Important for Health: A Psychoneuroimmunology Perspective. *Annual Review of Psychology*. 66(30): 143-72.
- Janda, E., Boi, L., Carta, A.R. 2018. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease?. *Frontier in Molecular Neuroscience*. 11 (144) : 1-8.
- Jati, R. 2018. Perbedaan Kadar Superoxide Dismutase (SOD) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Pasca Induksi Berbagai Model Stres Sleep Deprivation. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. (Tidak dipublikasikan).
- Jauregui-Huerta, F., Ruvalcaba-Delgadillo, Y., Gonzalez-Castañeda, R., Garcia-Estrada, J., Gonzalez-Perez, O., *et al.*, 2010. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Immunology Reviews*. 6 (3) : 195-204.
- Jones, K. 2012. Oral Dosing (Gavage) in Adult Mice and Rats Standard Operational Procedure (online). *Animale Care Guidelines*. Diunduh dari https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-2012Tech09%20Oral%20Dosing%20%28Gavage%29%20in%20the%20Mouse%20and%20Rat%29%20Updated%20Feb%202015%20final_cc%2C%20ka.pdf. Diakses tanggal 19 Juni 2019.
- Kawamori, Dan. 2017. Exploring the molecular mechanisms underlying a- and b-cell dysfunction in diabetes. *Diabetology International*. 8. hal 248-256.
- Keane, K. N. Cruzat, Vinicius Fernandes. Carlessi, Rodrigo. *et al.* 2015. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. hal. 1-15.
- Khadrawy, Y. A., Neveen. A. N., Heba S. A. 2011. Effect Of Oxidative Stress

Induced By Paradoxical Sleep Deprivation On The Activities Of Na⁺, K⁺-Atpase And Acetylcholinesterase In the Cortex And Hippocampus of Rat. *National Research Center*. 157(2) : 101-107.

- Khattabi, I. 2013. Preventing p38 MAPK-Mediated MafA Degradation Ameliorates beta-Cell Dysfunction under Oxidative Stress. *Molecular endocrinology*. 27. hal. 1-16.
- Knutson, K.L. 2007. Impact of sleep and sleep loss on glucose homeostasis and appetite regulation. *Sleep medicine clinics*. 2(2): 187–197.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins S.L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Edisi 7; alih Bahasa, Brahm U, Pendt ; editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari. EGC. Jakarta
- Landolt, H.P., Sousek, A., Holst, S.C. 2014. Effects of acute and chronic sleep deprivation. *European Sleep Medicine Textbook*. 1 (5) : 13 – 27.
- Lisa, Morselli. Rachel, Leproult; Marcella, Balbo; Karine, S. 2011. Role of sleep duration in the regulation of glucose metabolism and appetite. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 24(5). hal. 1–19.
- Liu, L. Omata, Waka. Kojima, Itaru. Shibata, Hiroshi. 2007. GLUT4 Turnover and Targeting to the Insulin-Responsive Storage Compartment in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes*. 56. hal. 1977–1985.
- Ma, J. Nakagawa, Yuko. Kojima, Itaru. Shibata, Hiroshi. 2014. Prolonged insulin stimulation down-regulates GLUT4 through oxidative stress-mediated retromer inhibition by a protein kinase CK2-dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 289(1). hal. 133–142.
- Mahadev, K. Motoshima, H. Wu, X. Ruddy, J. M. Arnold, R. S. Cheng, G. Lambeth, J. D. Goldstein, B. J. 2004. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (5). hal 1844-1854.
- Marcheva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M.H., et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 466:627–631.
- Martins, C. Kulseng, B. King, N. A. et al. 2010. The effects of exercise-induced weight loss on appetite-related peptides and motivation to eat. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 95(4). hal. 1609–1616.

- Matsuoka, T. A. Artner, Isabella. Henderson, Eva. *et al.* 2004. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(9). hal. 2930–2933.
- Matute, C., Domercq, M., Gomez, M. 2006. Glutamate Mediated Glial Injury : Mechanism and Clinical Importance. *Journal of Glia*. 53: 212-224
- Meyer, C., Pimenta, W., Woerle, H.J. 2006. Different Mechanisms for Impaired Fasting Glucose and Impaired Posprandial Glucose Tolerance in Humans. *Diabetes Care*. 29(8): 1909-14.
- Naidoo, N. Davis, James G. Zhu, Jingxu. 2014. Aging and sleep deprivation induce the unfolded protein response in the pancreas: Implications for metabolism. *Aging Cell*. 13(1). hal. 131–141.
- Ogundele, O.M., Omoaghe, A.O., Ajonijebu, D.C., Ojo, A.A. 2014. Glia activation and its role in oxidative stress. *Metabolic Brain Disease* 29 (2) : 483-493.
- Pamidi, S. & Tasali, E. 2012. Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Neurology*. 3(3): 126-132.
- Periasamy, S., Hsu, D.Z., Fu, Y.H., Liu, M.Y. 2015. Sleep deprivation-induced multi-organ injury: role of oxidative stress and inflammation. *Experimental and Clinical Sciences Journal*. 14 : 672-683.
- Porkka-Heiskanen, T. Van Leeuwen, Wessel M.A. Hublin, Christer. *et al.* 2010. Prolonged sleep restriction affects glucose metabolism in healthy young men. *International Journal of Endocrinology*. 2010. hal. 1–7.
- Power, A.C. 2015. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. Dalam: Kasper, D.L., Fauci, A.S., Longo, D.L. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill Professional, New York. Pp 1325-9.
- Rakshit, K., Thomas, A.P. & Matveyenko, A.V. 2014. Does disruption of circadian rhythms contribute to beta-cell failure in type 2 diabetes?. *Current diabetes reports*. 14(4): 474.
- Rasley, A., Tranguch, S. L., Rati, D. M., Marriott I. 2006. Murine glia express the immunosuppressive cytokine, interleukin-10, following exposure to *Borrelia burgdorferi* or *Neisseria meningitidis*. *Glia*. 53 (6) : 583–592.
- Robertson, R. P. dan Harmon, J. S. 2007. Pancreatic islet β -cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letters*. 581(19). hal. 3743–3748.

- Robertson, R. P. dan Harmon, J. S. 2007. Pancreatic islet β -cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letters*. 581(19). hal. 3743–3748.
- Rodriguez, P.C., Ochoa, A.C. 2006. T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology*. 16: 66-72.
- Schieber, M., & Chandel, N.S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*. 24(10): 453-62.
- Sengupta, P. 2011. The Laboratory Rat: Relating its Age with Human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6): 624-30
- Shelly, E. 2014. Collection of Small Amount of Blood From Tail Tip Microsampling in Rats. *Animale Care Guidelines*. Diunduh dari <https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/TECH%2013%20-%20UBC%20ACC%20Tail%20Poke%20SOP-%20Rat.pdf>.
- Si, X., Miguel-Hidalgo, J.J., O'Dwyer, G., Stockmeier, C.A., Rajkowska, G. 2004. Age-Dependent Reductions in the Level of Glial Fibrillary Acidic Protein in the Prefrontal Cortex in Major Depression. *Neuropsychopharmacology*. 29 (11) : 2088-2096.
- Simasko, S.M. 2008. Novel Analysis of Sleep Pattern in Rats Separates Periods of Vigilance Cycling from Long Duration Wake Events. *Behavioral Brain Research*. 196(2): 228-36.
- Singh, R., Kiloung, J., Singh, S., Sharma, D. 2008. Effect of Paradoxical Sleep Deprivation on Oxidative Stress Parameters in Brain Regions of Adult and Old Rats. *Biogerontology*. 9 : 153-162
- Smith, C. & Peters, K.R. 2011. Chapter 17 - Sleep, memory, and molecular neurobiology. *Handbook of Clinical Neurology*. 98: 259-272
- Spiegel, K., Knutson, K., Leproult, R., Tasali, E., Cauter, E.V. 2015. Sleep Loss: A Novel Risk Factor for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Journal of Applied Physiology*. 99 (5): 2008-19.
- Spiers, J. G., Chen, H. J. C., Sernia, C., Lavidis, N. A. 2014. Activation of The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Axis Induces Cellular Oxidative Stress. *Frontiers in Neuroscience*. 8(456): 1-6.
- Squire, L.R., Bloom, F.E., Spitzer, N.C., Lac, S.D., Ghosh, A., Berg, D. 2008. *Fundamental Neuroscience Third Edition*. USA : Elsevier.
- Stahlberg, M.A., Kügler, S., Dean, C. 2018. Visualizing BDNF cell-to-cell transfer

reveals astrocytes are the primary recipient of neuronal BDNF. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/255935> : 1-27.

- Tandri, H. T., Lestariana, W. dan Nisa, F.Z. 2009. Ekstrak air daun ceplikan (*Ruellia tuberosa* L.) serta pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah dan gambaran histologis pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*. 6 (2). hal 64-70.
- Vargas. I. 2017. Investigating the Effect of Acute Sleep Deprivation on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis Response to A Psychosocial Stressor. *International Journal of Psychoneuroendocrinology*. 79(3): 1-8.
- Villafuerte, G., Miguel-Puga, A.,Rodriguez, E.M., Machado, S., Manjarrez, E., Arias-Carrión, O.. 2015. Review Article Sleep Deprivation and Oxidative Stress in Animal Models: A Systematic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 15(8): 1-8.
- Wang, J. dan Wang, H. 2017. Oxidative stress in pancreatic beta cell regeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. hal 1-14.
- Zhang, P. 2011. Glucose Tolerance Test. *Bio-Protocol*. 101(159): 1-5.
- Zucconi, G.G., Balgouranidou, I., Cipriani, S., Scattoni, R. 2006. One night sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin*. 69 (4) : 375-3.

Lampiran 1 Lembar Persetujuan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
Kampus Unsoed Berkoh Jalan Dr. Gumbreg Nomor 1 Mersi Purwokerto 53112
Telepon (0281) 622022, Faksimili (0281) 624990
Website : <http://fk.unsoed.ac.id> Email : psi.fk@unsoed.ac.id

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Ref: 8395/KEPK/XII/2019

Judul usulan penelitian : Kajian Model Stres *Sleep Deprivation* Terhadap Fungsi Memori dan Pankreas Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)
Title of research proposal

Peneliti Utama : Dr. dr. Fitranto Arjadi, M. Kes
Principle Investigator

Anggota tim peneliti : 1. dr. Mustofa, M.Sc
2. dr. Massita Dwi Yuliani, Sp.KFR
3. Marhamdani
4. Mahayu Dian Suryandaru
5. Maulita Zulfiani
6. Padang Dwika Aprilian
7. Jarwati
Members of research team

Fakultas Kedokteran Jurusan Kedokteran Umum Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

Dokumen yang disetujui : • Protokol penelitian (*Research protocol*)
Documents approved • Informasi Kesediaan

Tanggal persetujuan : 13 Desember 2019
Date of approval

Komisi Etik Penelitian Kedokteran FK Unsoed menyatakan bahwa protokol penelitian tersebut telah memenuhi kaidah etik yang tertera dalam Deklarasi Helsinki 2008 dan dapat dilaksanakan. Komisi Etik Penelitian berhak memantau kegiatan penelitian tersebut sewaktu-waktu. Para peneliti bertanggungjawab menyerahkan laporan akhir atau laporan kemajuan jika diperlukan telaah lebih lanjut. Dokumen ini berlaku untuk satu tahun terhitung sejak tanggal persetujuan.

The Research Ethics Committee states that the above protocol meets the ethical principle outlined in the Declaration of Helsinki 2008 and therefore can be carried out. The Committee has the right to monitor the research activities at any time. The investigator(s) is/are obliged to submit a final report upon the completion of the study or a progress report in case a continuing review is needed. This document is valid for one year beginning from the date of approval.



Ketua Komisi Etik Penelitian,

dr. Remo Widiastuti, MS.

Lampiran 2 Prosedur Pengambilan Sampel

Langkah-langkah pengambilan sampel (Suhaemi, 2011) :

- a. Memberi nomor 1-30 pada tikus.
- b. Membuat 30 gulungan kertas sesuai dengan jumlah kelompok perlakuan (K.A, K.B, K.C) dan jumlah ulangannya. Setiap kelompok perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Misalnya : K.A.1 berarti kelompok perlakuan K.A ulangan ke-1. K.A.2 berarti kelompok perlakuan K.A. ulangan ke-2, dan seterusnya sampai K.A.10.
- c. Membuat tabel dengan angka 1-30.
- d. Melakukan pengocokan 30 gulungan kertas dan mengambil satu per satu. Kertas yang keluar pertama dimasukkan pada tabel nomor 1. Misal : K.B.5 keluar pertama diletakkan pada tabel nomor 1 yang berarti tikus nomor 1 masuk kelompok perlakuan B ulangan 5.

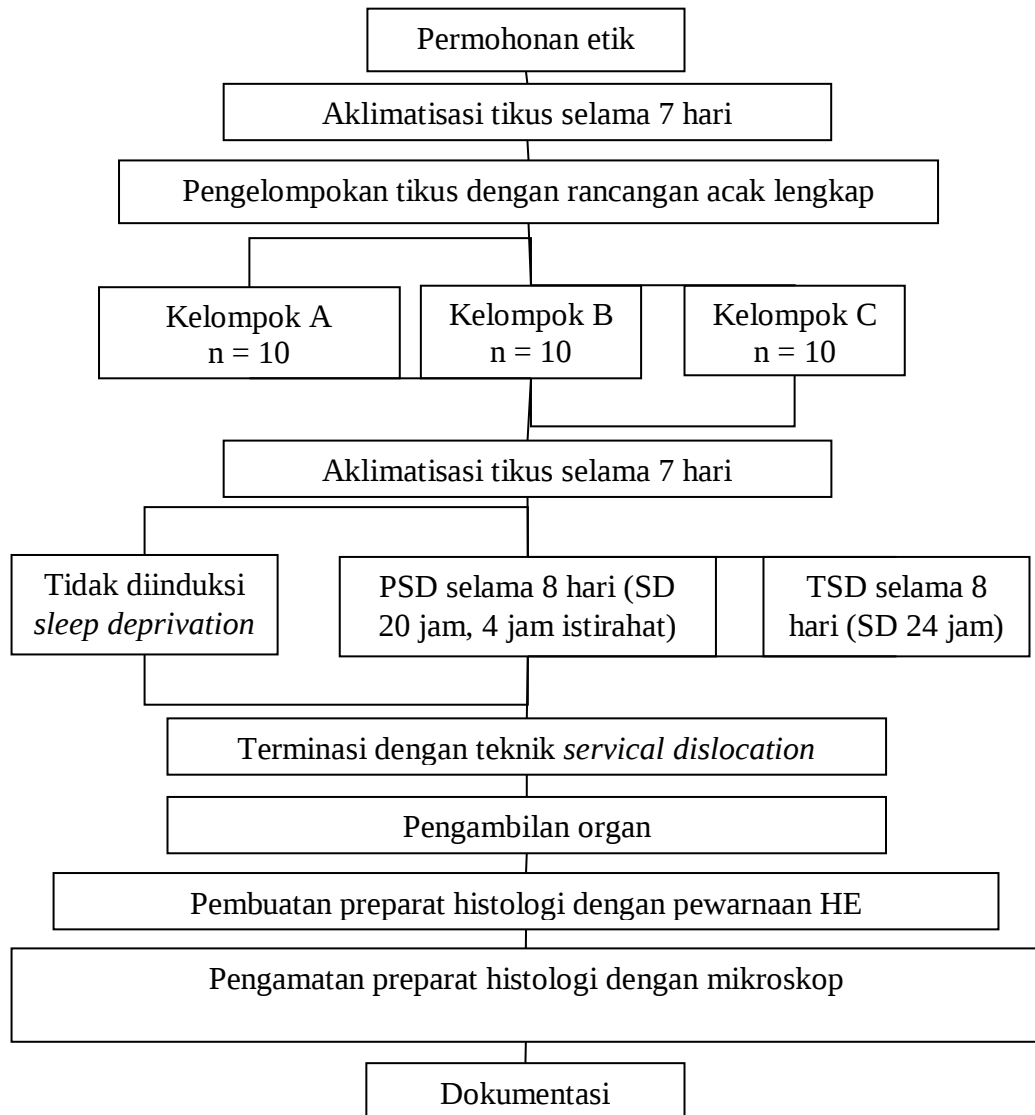
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

- e. Jika pengambilan sampel secara random telah selesai, maka didapatkan 3 kelompok hewan coba.

Lampiran 3 Komposisi Pakan Standar Comfeed AD II

Zat Gizi	Kadar
Air	Maksimal 12 %
Protein kasar	Minimal 15 %
Lemak kasar	3-7 %
Serat kasar	Maksimal 6 %
Abu	Maksimal 7 %
Kalsium	0,9-1,1 %
Fosfor	0,6-0,9 %

Lampiran 4 Tata Urutan Kerja



Lampiran 5 Tata Cara Pengukuran Toleransi Glukosa

- a. Tikus diangkat dengan memegang ekornya dari belakang kemudian diletakkan di atas permukaan kasar.
- b. Tangan kiri perlahan-lahan diluncurkan dari belakang tubuh tikus menuju kepala.
- c. Ibu jari dan telunjuk diselipkan ke depan dan kaki kanan dijepit di antara kedua jari tersebut.
- d. Memegang sonde oral menggunakan tangan kanan dan dimasukkan ke dalam mulut tikus. Perlahan-lahan ujung sonde diluncurkan melalui langit-langit ke arah belakang sampai esofagus.
- e. Meluruskan leher tikus dan sonde didorong perlahan hingga masuk ke lambung tikus, kemudian tikus ditempatkan ke dalam kandang.
- f. Mengukur kadar glukosa pada menit 60 dan 120 menggunakan glukometer.
- g. Memasukkan strip pada slot yang tersedia kemudian ditunggu hingga indikator pada layar menunjukkan strip siap digunakan.
- h. Mencari pembuluh darah vena pada ekor, kemudian dibersihkan menggunakan alkohol 70 %.
- i. Menusuk ekor tikus menggunakan lancet.
- j. Meneteskan darah yang keluar pada strip glukosa yang telah dimasukkan ke dalam glukometer.
- k. Membaca kadar glukosa darah dalam satuan mg/dL.

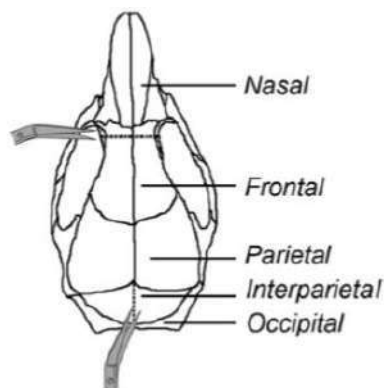
Lampiran 6. Tata Cara pembedahan dan Pengambilan Organ Pankreas

- a. Menyiapkan alat dan bahan.
- b. Mengambil kontainer plastik ukuran 50cc diberi label sesuai nama tikus dan kelompok perlakuan.
- c. Kontainer plastik diisi dengan neutral buffer formalin (NBF) 10% sampai dengan 2/3 volume container.
- d. Tikus dianestesi dengan dengan cara dimasukkan ke gelas beker 500 mL yang telah diberi kapas eter.
- e. Tikus didiamkan hingga hilang kesadaran.
- f. Prosedur pembedahan pada garis median abdominal tikus.
- g. Proses nekropsi jaringan dimulai dengan menyibakkan organ gaster sehingga nampak organ pankreas melintang dari lien, gaster, dan duodenum.
- h. Organ dimasukkan ke dalam kontainer plastik yang diberi NBF 10% sesuai dengan label yang tertera.

Lampiran 7. Cara Pembedahan dan Pengambilan Korteks Prefrontal

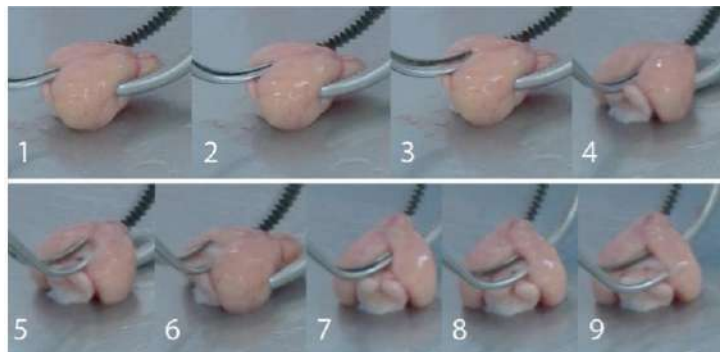
Menggunakan cara sebagai berikut (Spijker, 2011) :

- a. Dibuat sayatan garis tengah kulit kepala menggunakan gunting, kemudian kulit disibakan sampai batas atas mata, buat insisi pada tulang kepala mulai dari ujung tulang parietal sampai tulang frontal (Gambar 1.).



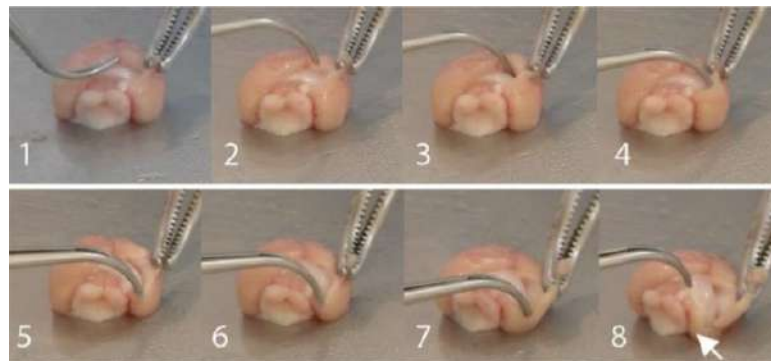
Gambar 1. Bentuk Skematis Tulang Kepala Tikus Wistar

- b. Tulang kepala (*calvaria*) dibuka menggunakan forceps yang sempit dan melengkung, setelah tulang terbuka otak dibebaskan dari selaput otak.
- c. Saraf kranial dipotong agar otak dapat dibebaskan dari *basis cranii*.
- d. Kemudian otak dipindahkan ke pelat logam yang diletakkan di atas es (*cold plate*) dan sisa darah pada otak dibersihkan. Prosedur pengangkatan ini harus dilakukan dalam 2-3 menit.
- e. Sisi ventral otak diposisikan menghadap pelat logam (Gambar 2).



Gambar 2. Pembukaan Garis Tengah Korteks

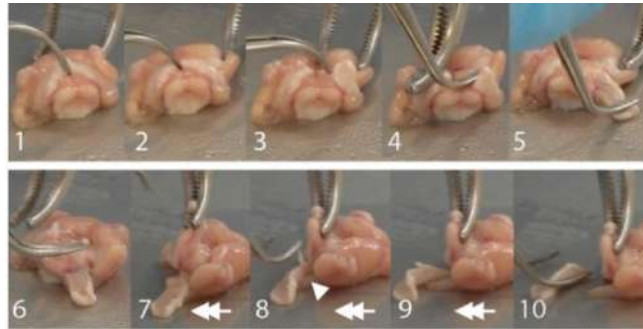
- f. Dilakukan pemotongan pada bagian serebelum.
- g. Forcep kecil lengkung diposisikan di antara kedua belah otak dalam posisi tertutup, dan otak dipegang dengan lembut menggunakan tang besar melengkung (Gambar 2.1, 2.2).
- h. Forcep dibuka perlahan (Gambar 2.3) hingga terlihat bagian berwarna putih yang kemungkinan besar adalah korpus kalosum, dibawahnya terdapat hipocampus.
- i. Setelah dibuka seluas 60% di sepanjang garis tengah, forsep (posisi tertutup) diarahkan 30-40° berlawanan arah jarum jam (Gambar 2.5) forceps dibuka berulang kali untuk membuka korteks kiri dari hippocampus.
- j. Hal yang sama diulangi untuk korteks kanan hingga bagian atas hippocampus terlihat.
- k. Korteks diangkat dengan lembut menggunakan forcep besar (Gambar 3.1).



Gambar 3. Pemisahan Korteks dari Hipocampus (Perhatikan Perbedaan Warna Kedua Struktur Tersebut)

- l. Forcep kecil diputar (arahkan ke bawah dalam posisi tertutup; Gambar 3. 2) untuk memisahkan hippocampus dengan korteks.
- m. Proses membuka dan menutup forsep kecil dilakukan secara berulang sambil diarahkan ke bagian caudal batas hippocampus dan korteks (Gambar 3. 3-5).

- n. Bagian korteks (berwarna merah muda atau kekuningan) dihilangkan dan disisakan bagian hippocampus (abu-abu dan tembus cahaya).
- o. Dilakukan juga pada sisi kontralateral.
- p. Bagian kortikal anterior dari korteks digerakan untuk menampakkan fornix.
- q. Hippocampus dipisahkan dari fornix menggunakan forcep kecil (Gambar 3.9).



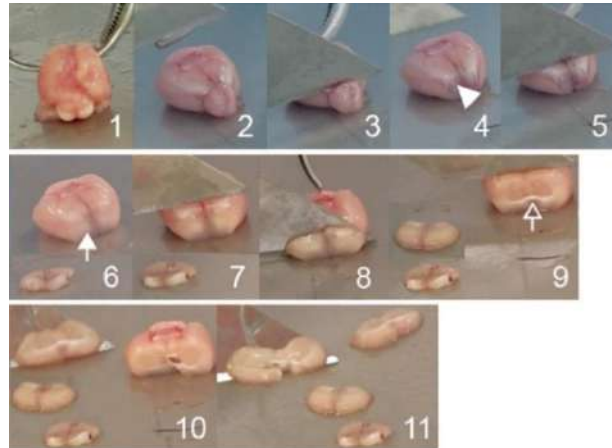
Gambar 4. Pelepasan Hippocampus

- r. Kedua bagian hippocampus dipisahkan (Gambar 3.10 dan 4.1-2), disibakan kesamping sambil menjaga posisi otak dengan forceps yang lebih besar (Gambar 4.3-4).
- s. Hippocampus dilepaskan dari otak (Gambar 4.7-10).
- t. Korteks dilipat kembali menggunakan forcep besar ke posisi semula (Gambar 5.1-7)



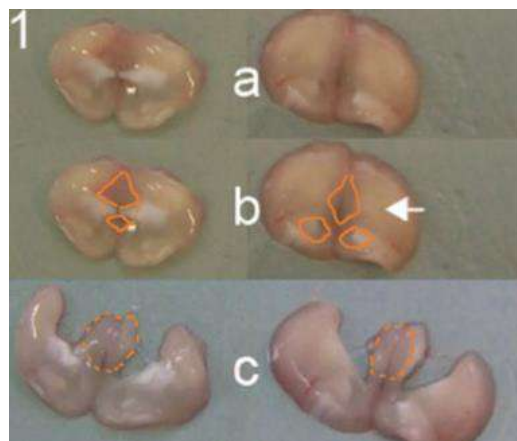
Gambar 5. Pengembalian Korteks Dan Pemutaran Posisi Otak Tikus

- u. Kemudian, otak ditempatkan dengan sisi punggung menghadap pelat logam (Gambar 5.8-9).
- v. Bulbus olfaktorius dipotong menggunakan *razor blade* (Gambar 6.1-3).



Gambar 6. Pemotongan bulbus olfaktorius. Panah pada gambar 6 menunjukan *anterior forceps of corpus callosum* (AFCC)

- w. Terlihat jelas Komisura anterior (panah, Gambar 6.4)
- x. Dilakukan pemotongan secara koronal untuk menampakan korteks prefrontal dan striatum pada tingkat yang berbeda (Gambar 7.)



Gambar 7. Pemotongan Korteks Prefrontal dan Striatum. Panah Menunjukan AFCC Sedangkan *Outline* dari Diseksi Ditunjukan Oleh Garis Oranye

- y. Bagian pertama (Gambar 6.5-6) sebagian besar berisi motor korteks sedangkan bagian selanjutnya berisi *anterior forceps corpus*

callosum(AFCC) (panah, Gambar 6.6 dan 7.1b), dengan area yang lebih gelap di tengah yang mewakili *medial prefrontal corteks* (mPFC)

- z. Dipotong pada bagian yang berisi *medial prefrontal corteks* (mPFC) (Gambar 7-9).

Lampiran 8. Pembuatan Preparat Hematoksilin Eosin Pankreas Tikus

Sebelum tahap pembuatan preparat, perlu dilakukan fiksasi dengan cara merendam preparat di dalam larutan formalin 10% selama 24 jam. Fiksasi ini bertujuan untuk stabilisasi jaringan agar tidak terlarut, berpindah, atau terdistorsi selama tahap selanjutnya.

Langkah-langkah pembuatan preparat histologis adalah sebagai berikut (Indrawati, 2017) :

- a. Tahap pertama adalah *trimming*, yaitu organ dipotong menjadi bagian yang lebih kecil berukuran 1 x 1 cm sesuai dengan area yang akan diamati.
- b. Tahap kedua, organ pankreas yang telah dipotong dicelupkan di air selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat menggunakan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% masing-masing 3 kali pencelupan selama 10 menit, dilanjutkan dengan penjernihan menggunakan xylol (3 kali) masing masing selama 20 menit.
- c. Tahap ketiga adalah proses infiltrasi (*embedding*) yaitu dengan menambahkan paraffin cair I, II, dan III, masing-masing bersuhu 58-60 °C selama 5 menit.
- d. Tahap keempat adalah pengeblokan (*Blocking*), bahan beserta paraffin dipindahkan ke cetakan untuk dilakukan pengeblokan atau pembenaman jaringan ke dalam paraffin cair. Blok paraffin didiamkan selama 2 jam sampai paraffin membeku.
- e. Tahap kelima ialah pemotongan dengan mikrotom, cutter di panaskan dan di tempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata dengan mengatur ketebalan irisan,

kemudian pankreas di potong dengan ukuran 6 μm , lalu pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan ke air hangat (*waterbath*) dengan suhu 37 °C dengan penambahan gelatin. Irisan yang dipilih diambil dengan gelas objek yang sudah melalui proses coating lalu dikeringkan di atas hot plate.

- f. Tahap keenam adalah deparafisasi yaitu preparat dimasukkan ke dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit.
- g. Tahap ketujuh adalah rehidrasi, preparat di masukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), Etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian preparat direndam dalam aquadest selama 10 menit.
- h. Tahap kedelapan adalah pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hematoxylin* selama 3 menit atau sampai di dapatkan hasil warna yang terbaik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit, setelah itu preparat dimasukkan kedalam pewarna *eosin* alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan akuades selama 5 menit.
- i. Tahap kesembilan adalah dehidrasi dengan memasukkan preparat pada seri etanol bertingkat dari 80%, 90%, dan 95% hingga etanol absolute (2 kali).
- j. Tahap kesebelas adalah *clearing* dilakukan dengan memasukkan preparat pada xylol 2 kali selama 5 menit dan dikeringkan.
- k. Tahap terakhir adalah pengeleman dengan etelen DPX.

Lampiran 9. Pembuatan Preparat Hematoksilin Eosin Otak Tikus

- a. Organ dipotong menjadi bagian yang lebih kecil berukuran 1 x 1 cm sesuai dengan area yang akan diamati. Tahapan pemotongan organ ini disebut *trimming*.
- b. Organ otak yang telah dipotong dicelupkan di air selama 15 menit, dilanjutkan dengan pencucian bertingkat menggunakan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% masing-masing 3 kali pencelupan selama 10 menit, dilanjutkan dengan penjernihan selama 20 menit menggunakan xylol yang dilakukan sebanyak 3 kali.
- c. Tahap ketiga adalah proses *embedding* (infiltrasi) yaitu dengan menambahkan paraffin cair I, II, dan III, masing-masing bersuhu 58-60 °C selama 5 menit.
- d. Setelah infiltrasi tahap selanjutnya adalah pengeblokan (*blocking*), bahan beserta paraffin dipindahkan ke cetakan lalu ditenamkan ke dalam paraffin cair. Blok paraffin tersebut didiamkan selama 2 jam sampai paraffin membeku.
- e. Blok paraffin yang telah membeku dipotong dengan mikrotom. Caranya cutter di panaskan dan di tempelkan pada dasar blok sehingga paraffin sedikit meleleh. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata dengan mengatur ketebalan irisan, kemudian otak dipotong dengan ukuran 6 µm, lalu pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan ke air hangat (*waterbath*) dengan suhu 37 °C dengan penambahan gelatin. Irisan yang dipilih diambil dengan gelas objek yang sudah dicoating lalu dikeringkan di atas hot plate.

- f. Tahap keenam adalah deparafisasi yaitu preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 5 menit diulangi 2 kali.
- g. Setelah deparafisasi tahap selanjutnya adalah rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), Etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian preparat direndam dalam aquadest selama 10 menit.
- h. Tahap selanjutnya adalah pewarnaan, preparat ditetesi *hematoxylin* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik, setelah itu cuci dengan air mengalir selama 30 menit dan bilas dengan aquadest selama 5 menit. Selesai dengan pewarnaan *hematoxylin* selanjutnya preparat dimasukkan kedalam pewarna *eosin* alkohol selama 30 menit dan dibilas selama 5 menit dengan aquades.
- i. Tahap kesembilan adalah dehidrasi dengan memasukkan preparat pada seri etanol bertingkat dari 80%, 90%, dan 95% hingga etanol absolute (2 kali).
- j. Tahap selanjutnya adalah *clearing* yaitu memasukkan preparat pada xylol 2 kali selama 5 menit dan dikeringkan.
- k. Tahap terakhir adalah pengeleman dengan etelen DPX.

Lampiran 10. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus**Kelompok Kontrol**

Subjek	BB Sebelum Aklimatisasi (gram)	BB Setelah Aklimatisasi/Sebelum <i>Sleep Deprivation</i> (gram)	BB Setelah 8 Hari (gram)	Perubahan BB Setelah 8 Hari (gram)
A.1	171	174	194	20
A.2	155	152	166	14
A.3	139	150	163	13
A.4	162	175	206	31
A.5	146	158	164	6
A.6	135	143	166	23
A.7	118	128	128	0
A.8	98	102	106	4
A.9	118	125	134	9
A.10	128	138	150	12

Kelompok PSD

Subjek	BB Sebelum Aklimatisasi (gram)	BB Setelah Aklimatisasi/Sebelum <i>Sleep Deprivation</i> (gram)	BB Setelah <i>Sleep Deprivation</i> (gram)	Perubahan BB Setelah <i>Sleep Deprivation</i> (gram)
B.1	65	138	126	-15
B.2	101	145	125	-10
B.3	103	167	143	-6
B.4	86	133	148	-11
B.5	113	137	122	-5
B.6	95	138	132	-4
B.7	118	176	141	-8
B.8	102	143	118	-7
B.9	96	132	116	-5

Kelompok TSD

Kelompok	BB Sebelum Aklimatisasi (gram)	BB Setelah Aklimatisasi/Sebelum <i>Sleep Deprivation</i> (gram)	BB Setelah <i>Sleep Deprivation</i> (gram)	Perubahan BB Setelah <i>Sleep Deprivation</i> (gram)
C.1	182	199	184	-13
C.2	158	170	160	-20
C.3	151	164	158	-11
C.4	154	160	149	-3
C.5	122	130	125	-2
C.6	148	160	156	-5
C.7	148	160	152	-8
C.8	157	165	158	-24
C.9	134	145	140	-4
C.10	182	199	184	-8

Lampiran 11. Hasil Pengukuran Glukosa Darah

Subjek	Glukosa Darah Menit ke-0 / T ₀ (mg/dL)	Glukosa Darah Menit ke-60 / T _{g1} (mg/dL)	Glukosa Darah Menit ke-120 / T _{g2} (mg/dL)	LDDK ⁰⁻¹²⁰ (mg.menit/dL)
A.1	98	134	120	14580
A.2	102	144	108	14940
A.3	88	124	98	13020
A.4	116	136	104	14760
A.5	113	148	96	15150
A.6	104	118	105	13350
A.7	69	118	108	12390
A.8	88	145	116	14820
A.9	113	130	107	14400
A.10	95	126	100	13410
B.1	65	136	125	13860
B.2	101	145	125	15480
B.3	103	167	143	17400
B.4	86	133	148	15000
B.5	113	137	122	15270
B.6	95	138	132	15090
B.7	118	176	141	18330
B.8	102	143	118	15180
B.9	96	144	130	15420
C.1	94	164	148	17100
C.2	123	143	135	16320
C.3	81	144	146	15450
C.4	119	143	137	16260
C.5	118	153	138	16860
C.6	102	183	167	19050
C.7	105	178	165	18780
C.8	44	114	100	11160
C.9	86	164	146	16800
C.10	89	139	138	15150

Lampiran 12. Hasil Penghitungan Jumlah Pulau Langerhans

Kelompok	Jumlah Pulau Langerhans
A.1	10
A.2	9
A.3	40
A.4	25
A.5	5
A.6	25
A.7	47
A.8	17
A.9	30
A.10	21
B.1	30
B.2	24
B.3	19
B.4	29
B.5	16
B.6	23
B.7	13
B.8	25
B.9	13
C.1	19
C.2	4
C.3	44
C.4	24
C.5	20
C.6	14
C.7	26
C.8	17
C.9	26
C.10	26

Lampiran 13. Hasil Pengukuran Diameter Pulau Langerhans

a. Diameter Kelompok Kontrol

Diameter/D (mm)		Kelompok Kontrol								
D1	A.1	A.2	A.3	A.4	A.5	A.6	A.7	A.8	A.9	A.10
D2	0,185	0,257	0,209	0,260	0,099	0,092	0,303	0,189	0,182	0,197
D3	0,321	0,113	0,247	0,266	0,116	0,162	0,087	0,089	0,103	0,172
D4	0,299	0,292	0,136	0,274	0,163	0,278	0,113	0,192	0,265	0,294
D5	0,158	0,478	0,123	0,102		0,146	0,237	0,081	0,144	0,179
D6	0,153	0,090	0,176	0,296		0,225	0,088	0,108	0,096	0,244
D7		0,092	0,18	0,204		0,227	0,119	0,316	0,198	0,234
D8			0,36	0,165		0,12	0,215	0,101	2	0,199
D9			0,286	0,242		0,274	0,223	0,102	0,237	0,122
D10			0,204	0,187		0,282	0,414	0,065	0,208	0,084
D11			0,258	0,269		0,166	0,24	0,091	0,223	0,22
D12			0,225	0,267		0,146	0,121	0,223	0,13	0,133
D13			0,754	0,303		0,288	0,127	0,185	0,144	0,29
D14			0,132	0,152		0,221	0,134	0,195	0,11	0,174
D15			0,082			0,121	0,282	0,136	0,199	0,124
D16			0,207			0,231	0,264	0,093	0,266	0,215
D17			0,124				0,135	0,181	0,302	0,126
D18			0,084				0,196	0,214	0,153	
D19			0,104				0,228		0,168	
D20			0,189				0,297		0,178	
D21			0,217				0,142		0,242	
D22			0,146				0,137		0,312	
D23			0,235				0,303		0,264	
D24			0,254				0,096		0,135	
D25			0,121				0,120		0,142	
D26							0,106		0,155	
D27							0,131		0,161	
D28							0,201		0,163	
D29							0,154			
D30							0,309			
D31							0,085			
D32							0,369			
D33							0,262			
D34							0,433			
Rata-rata	0,223	0,22	0,211	0,230	0,212	0,199	0,202	0,195	0,254	0,188

b. Diameter Kelompok PSD

Diameter/D (mm)Kelompok PSD									
D1	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6	B.7	B.8	B.9
D2	0,141	0,225	0,052	0,131	0,178	0,14	0,288	0,143	0,094
D3	0,121	0,275	0,062	0,205	0,274	0,207	0,133	0,176	0,081
D4	0,128	0,104	0,193	0,205	0,244	0,249	0,139	0,272	0,105
D5	0,169	0,154	0,226	0,060	0,109	0,155	0,117	0,173	0,052
D6	0,204	0,109	0,145	0,137	0,110	0,097	0,216	0,176	0,054
D7	0,154	0,083	0,100	0,133	0,070	0,098	0,114	0,211	0,198
D8	0,146	0,102	0,054	0,388	0,228	0,156	0,124	0,179	0,216
D9	0,130	1,000	0,208	0,197	0,177	0,170	0,148	0,138	0,294
D10	0,384	0,285	0,066	0,13	0,264	0,19		0,193	0,116
D11	0,078	0,227	0,187	0,234	0,140	0,082		0,162	0,145
D12	0,122	0,094	0,205	0,391	0,266	0,065		0,072	0,186
D13	0,239	0,185	0,197	0,142	0,077	0,152		0,093	
D14	0,127	0,140	0,153	0,080		0,261		0,167	
D15	0,177	0,091	0,052	0,075		0,155		0,170	
D16	0,143	0,132	0,062	0,107		0,153			
D17	0,082	0,154		0,076		0,131			
D18	0,212	0,22		0,084		0,135			
D19	0,213	0,205		0,110		0,286			
D20		0,284		0,088					
D21		0,109		0,122					
D22				0,131					
D23				0,205					
Rata-rata	0,166	0,154	0,149	0,156	0,183	0,161	0,166	0,166	0,144

c. Diameter Kelompok TSD

Diameter/D (mm)Kelompok TSD										
D1	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10
D2	0,222	0,35	0,223	0,137	0,194	0,069	0,135	0,140	0,089	0,321
D3	0,165	0,216	0,135	0,131	0,215	0,099	0,190	0,220	0,089	0,243
D4	0,165	0,232	0,215	0,158	0,182	0,059	0,097	0,088	0,192	0,191
D5	0,260		0,102	0,076	0,375	0,068	0,154	0,174	0,081	0,162
D6	0,316		0,157	0,133	0,209	0,077	0,114	0,177	0,108	0,142
D7	0,296		0,201	0,160	0,158	0,105	0,099	0,118	0,316	0,114
D8	0,287		0,086	0,105	0,120	0,080	0,129	0,122	0,101	0,072
D9	0,293		0,349	0,106	0,242	0,095	0,102	0,135	0,102	0,069
D10	0,419		0,140	0,117	0,228	0,082	0,126	0,213	0,065	0,086
D11	0,158		0,313	0,133	0,201	0,102	0,147		0,091	0,108
D12	0,135		0,122	0,143	0,197	0,104	0,188		0,123	0,086
D13	0,266		0,079	0,154	0,137	0,07	0,081		0,085	0,203
D14	0,413		0,228	0,110	0,119	0,084	0,100		0,195	0,247
D15			0,154	0,113					0,136	0,091
D16			0,093	0,115					0,093	0,177
D17			0,146	0,124					0,081	0,115
D18			0,196	0,111						0,060
D19			0,112	0,132						
D20			0,283							
D21			0,104							
D22			0,211							
D23			0,089							
D24			0,161							
D25			0,080							
D26			0,108							
D27			0,144							
D28			0,092							
D29			0,086							
D30			0,092							
D31			0,173							
Rata-rata	0,11	0,095	0,157	0,126	0,191	0,084	0,132	0,153	0,127	0,147

Lampiran 14. Hasil Penghitungan Sel Beta Pankreas

Sampel	Sel Beta Sehat				Sel Beta Rusak				Total				Persentase				Rerata
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.1	P.2	P.3	P.4	P.1	P.2	P.3	P.4	P.1	P.2	P.3	P.4	Total
A.1	55	63	11	12	2	2	0	1	57	65	11	13	96%	97%	100%	92%	96%
A.2	49	10	18	9	3	1	0	2	52	11	18	11	94%	91%	100%	82%	92%
A.3	15	21	43	33	2	1	3	0	17	22	46	33	88%	95%	93%	100%	94%
A.4	33	14	19	30	1	2	1	1	34	16	20	31	97%	88%	95%	97%	94%
A.5	18	17	16	12	0	2	2	0	18	19	18	12	100%	89%	89%	100%	95%
A.6	8	10	14	6	0	0	0	0	8	10	14	6	100%	100%	100%	100%	100%
A.7	10	30	18	26	1	1	2	3	11	31	20	29	91%	97%	90%	90%	92%
A.8	7	40	16	28	1	3	1	4	8	43	17	32	88%	93%	94%	88%	91%
A.9	15	7	17	11	0	1	1	0	15	8	18	11	100%	88%	94%	100%	95%
A.10	8	29	22	27	1	2	1	1	9	31	23	28	89%	94%	96%	96%	94%
B.1	17	17	7	22	2	3	2	5	19	20	9	27	89%	85%	78%	81%	83%
B.2	21	10	23	9	6	5	4	2	27	15	27	11	78%	67%	85%	82%	78%
B.3	11	17	12	7	6	6	3	4	17	23	15	11	65%	74%	80%	64%	71%
B.4	18	22	15	13	5	7	3	3	23	29	18	16	78%	76%	83%	81%	80%
B.5	13	10	9	30	4	3	2	5	17	13	11	35	76%	77%	82%	86%	80%
B.6	17	41	11	40	5	7	5	7	22	48	16	47	77%	85%	69%	85%	79%
B.7	43	6	6	52	10	4	5	10	53	10	11	62	81%	60%	55%	84%	70%
B.8	18	12	8	19	6	3	4	6	24	15	12	25	75%	80%	67%	76%	74%
B.9	2	10	23	26	6	3	4	0	8	13	27	26	25%	77%	85%	100%	72%
C.1	5	9	15	6	3	3	2	1	8	12	17	7	63%	75%	88%	86%	78%
C.2	9	10	12	30	4	7	5	6	13	17	17	36	69%	59%	71%	83%	70%
C.3	22	8	12	16	8	3	4	5	30	11	16	21	73%	73%	75%	76%	74%

C.4	23	29	5	36	5	8	2	11	28	37	7	47	82%	78%	71%	77%	77%
C.5	21	6	9	14	5	2	3	6	26	8	12	20	81%	75%	75%	70%	75%
C.6	4	8	9	5	1	3	3	2	5	11	12	7	80%	73%	75%	71%	75%
C.7	16	21	22	12	4	4	3	4	20	25	25	16	80%	84%	88%	75%	82%
C.8	15	15	18	21	5	6	6	9	20	21	24	30	75%	71%	75%	70%	73%
C.9	55	27	57	21	9	5	15	7	64	32	72	28	86%	84%	79%	75%	81%
C.10	53	11	6	6	11	1	3	2	64	12	9	8	83%	92%	67%	75%	79%

Keterangan :

- **A (Kelompok Kontrol)**
- **B (Kelompok PSD)**
- **C (Kelompok TSD)**
- **P (Pulau Langerhans)**

Lampiran 15. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Piramidal

Kel.	Jumlah sel piramidal, lapang pandang ke-										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
KI. 1	5	1	2	2	3	11	7	9	3	7	50
KI. 2	11	8	7	8	5	4	3	2	5	15	68
KI. 3	8	8	6	11	13	5	7	13	14	9	94
KI. 4	2	2	4	7	2	2	3	9	9	5	45
KI. 5	9	11	7	8	8	8	2	4	6	1	64
KI. 6	4	3	7	7	3	8	11	6	6	3	58
KI. 7	21	18	12	7	8	6	5	7	11	2	97
KI. 8	18	12	15	19	12	13	10	11	10	11	131
KI. 9	5	3	3	5	5	15	24	5	4	4	73
KI. 10	5	7	9	13	9	10	9	9	10	9	90
KII. 1	2	7	5	4	4	4	6	9	3	6	50
KII. 2	12	9	14	8	10	8	10	13	11	0	95
KII. 3	5	8	4	4	2	8	9	10	4	2	56
KII. 4	3	5	8	7	7	3	9	9	5	5	61
KII. 5	10	4	8	7	3	10	9	2	3	0	56
KII. 6	2	4	4	4	5	9	8	4	3	4	47
KII. 7	4	5	3	6	3	2	4	3	4	2	36
KII. 8	17	14	9	14	10	14	7	12	1	2	100
KII. 9	17	12	16	16	7	3	3	2	10	13	99
KIII.1	2	3	3	2	4	0	2	3	2	2	23
KIII.2	5	5	7	9	4	2	8	10	3	7	60
KIII.3	5	2	3	2	3	4	6	7	10	5	47
KIII.4	3	10	6	7	6	3	1	3	0	2	41
KIII.5	6	2	11	2	5	7	6	5	5	0	49
KIII.6	3	3	4	3	1	4	5	0	0	1	24
KIII.7	11	13	5	5	17	19	16	15	17	1	119
KIII.8	11	6	6	10	8	7	12	7	11	16	94
KIII.9	11	6	12	14	14	14	9	5	8	9	102
KIII.10	18	8	14	6	5	5	8	17	11	8	100

Lampiran 16. Dokumentasi Penelitian



Gambar 1. Perlakuan *Sleep Deprivation*
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 2. Tikus Mengalami Stres
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 3. Pengukuran Berat Badan
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 4. Penyondean Beban Glukosa
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 5. Pengukuran Glukosa Darah
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 6. Terminasi Hewan Coba
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 7. Nekropsi Jaringan Pankreas
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 8. Nekropsi Organ Otak
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 9. Otak Tikus
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 10. Penyimpanan Organ
Sumber : Dokumentasi Penelitian



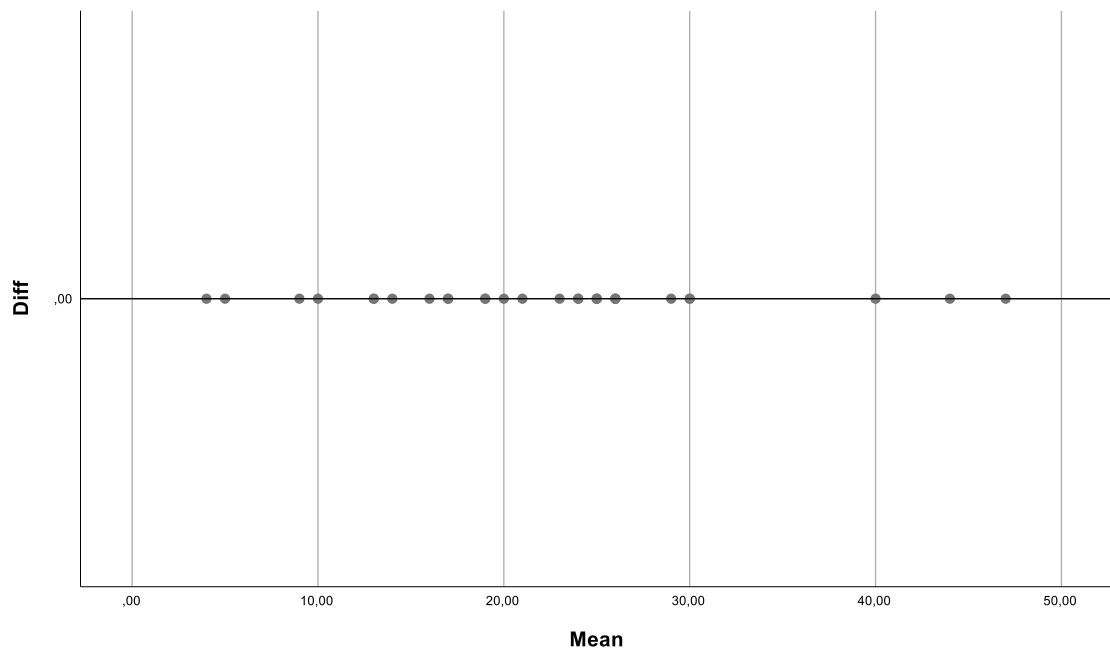
Gambar 11. Preparat Histologis
Sumber : Dokumentasi Penelitian



Gambar 12. Pengamatan Preparat
Sumber : Dokumentasi Penelitian

Lampiran 17. Hasil Uji Reliabilitas Jumlah Pulau Langerhans

a. *Bland Altman Test*



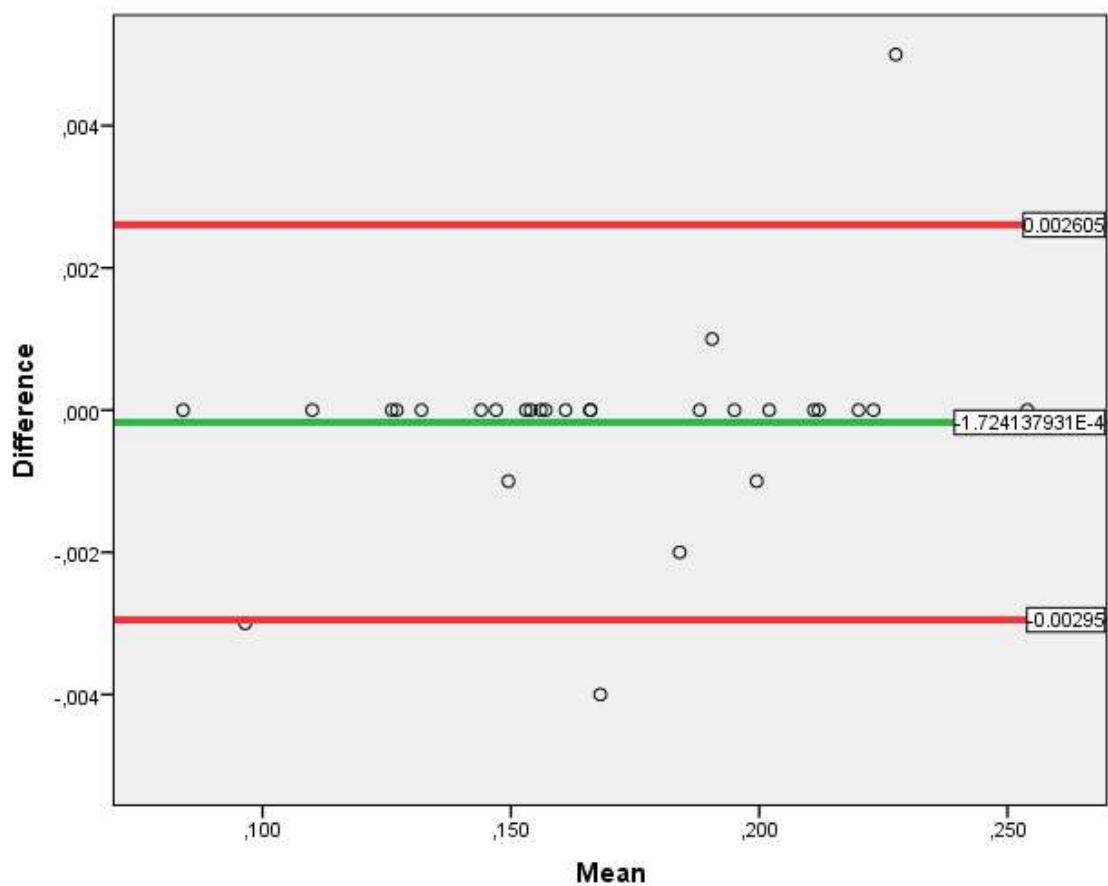
b. *One-Sample Test*

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Difference	-,656	28	,000	-,06667	-,0742	,0591

Lampiran 18. Hasil Uji Reliabilitas Diameter Pulau Langerhans

1. Bland Altman Test



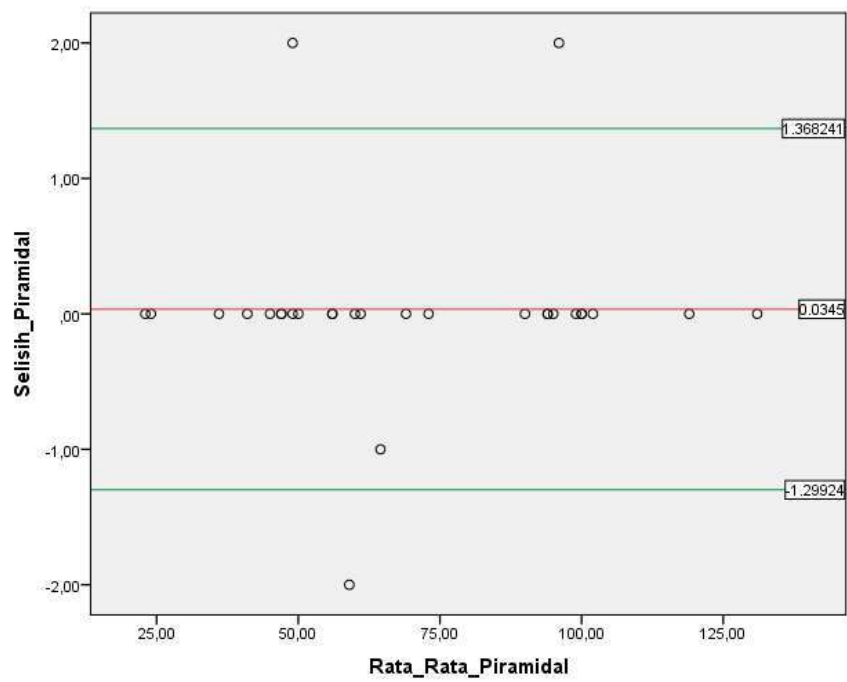
2. One-Sample Test

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Difference	-,656	28	,517	-,000172	-,00071	,00037

Lampiran 19. Uji Reliabilitas Pengamatan Jumlah Sel Piramidal

a. Bland Altman Test



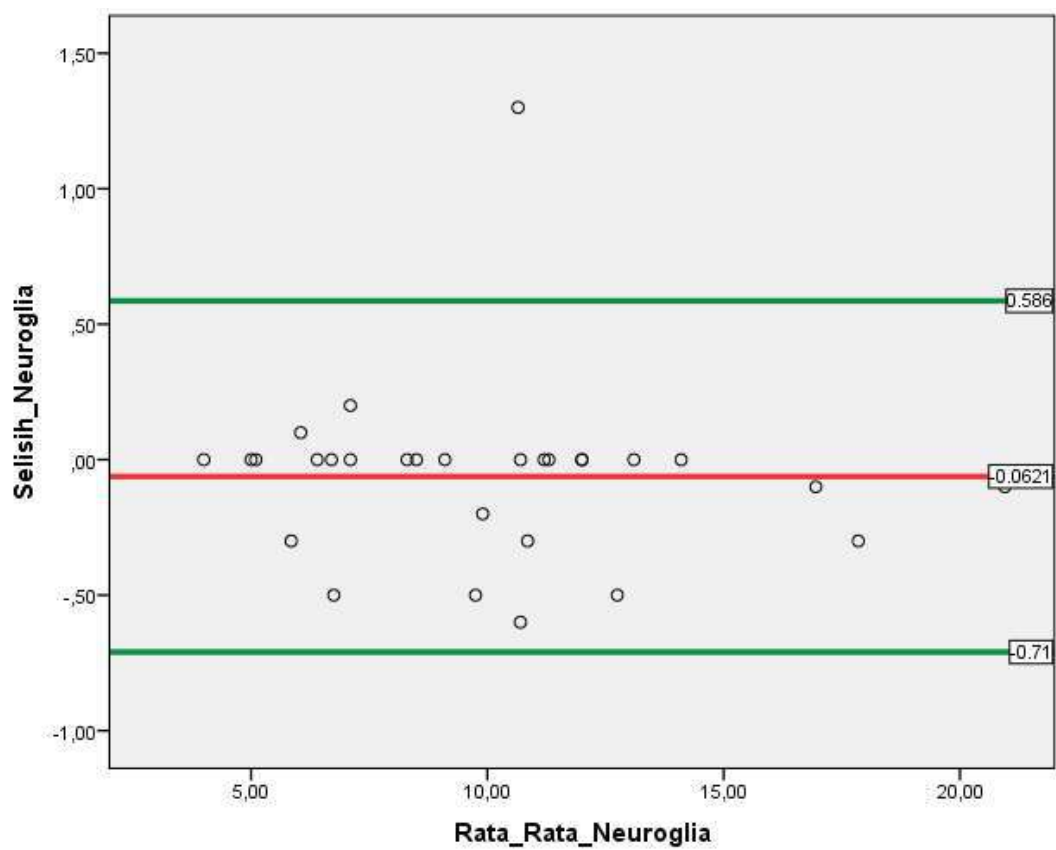
b. One-Sample Test

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Selisih_Piramidal	,273	28	,787	,03448	-,2244	,2933

Lampiran 20. Hasil Uji Reliabilitas Jumlah Sel Neuroglia

a. *Bland Altman Test*



b. *One-Sample Test*

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Selisih_Neuroglia	-1,010	28	,321	-,06207	-,1880	,0638

Lampiran 21. Hasil Olah Data Berat Badan

a. Univariat

Descriptives					
Kelompok Perlakuan			Statistic	Std. Error	
Perubahan_Berat_Badan	Kontrol	Mean	13,2000	2,96198	
		95% Confidence Interval for Mean	6,4995		
		Lower Bound			
		Upper Bound	19,9005		
		5% Trimmed Mean	12,9444		
		Median	12,5000		
		Variance	87,733		
		Std. Deviation	9,36661		
		Minimum	,00		
		Maximum	31,00		
		Range	31,00		
		Interquartile Range	15,25		
		Skewness	,569	,687	
		Kurtosis	-,022	1,334	
	PSD	Mean	-7,8889	1,18374	
		95% Confidence Interval for Mean	-10,6186		
		Lower Bound			
		Upper Bound	-5,1592		
		5% Trimmed Mean	-7,7099		
		Median	-7,0000		
		Variance	12,611		
		Std. Deviation	3,55121		
		Minimum	-15,00		
		Maximum	-4,00		
		Range	11,00		
		Interquartile Range	5,50		
		Skewness	-1,021	,717	
		Kurtosis	,569	1,400	
	TSD	Mean	-9,8000	2,32761	
		95% Confidence Interval for Mean	-15,0654		
		Lower Bound			
		Upper Bound	-4,5346		
		5% Trimmed Mean	-9,4444		
		Median	-8,0000		

Variance	54,178	
Std. Deviation	7,36056	
Minimum	-24,00	
Maximum	-2,00	
Range	22,00	
Interquartile Range	11,00	
Skewness	-,994	,687
Kurtosis	,056	1,334

b. Normalitas Data

Tests of Normality

Kelompok Perlakuan		Shapiro-Wilk ^a	
		df	Sig.
Perubahan_Berat_Badan	Kontrol	10	,901
	PSD	9	,344
	TSD	10	,189

c. Uji Bivariat

ANOVA

Perubahan_Berat_Badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3215,704	2	1607,852	30,335	,000
Within Groups	1378,089	26	53,003		
Total	4593,793	28			

d. Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Perubahan_Berat_Badan

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol	PSD	21,08889*	3,34509	,000
	TSD	23,00000*	3,25587	,000
PSD	Kontrol	-21,08889*	3,34509	,000
	TSD	1,91111	3,34509	,573
TSD	Kontrol	-23,00000*	3,25587	,000
	PSD	-1,91111	3,34509	,573

Lampiran 22. Hasil Olah Data LDDK0-120 Glukosa Darah

a. Statistik Univariat

Descriptives				Statistic	Std. Error
Kelompok Perlakuan					
Luas Daerah Di Bawah Kurva	Kontrol	Mean		14082,00	302,000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13398,83	
			Upper Bound	14765,17	
		5% Trimmed Mean		14116,67	
		Median		14490,00	
		Variance		912040,000	
		Std. Deviation		955,008	
		Minimum		12390	
		Maximum		15150	
		Range		2760	
		Interquartile Range		1583	
		Skewness		-,641	,687
		Kurtosis		-1,091	1,334
	PSD	Mean		15670,00	450,749
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	14630,57	
			Upper Bound	16709,43	
		5% Trimmed Mean		15622,78	
		Median		15270,00	
		Variance		1828575,000	
		Std. Deviation		1352,248	
		Minimum		13860	
		Maximum		18330	
		Range		4470	
		Interquartile Range		1395	
		Skewness		1,129	,717
		Kurtosis		1,049	1,400
	TSD	Mean		16293,00	694,283
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	14722,42	
			Upper Bound	17863,58	
		5% Trimmed Mean		16425,00	
		Median		16560,00	
		Variance		4820290,000	
		Std. Deviation		2195,516	
		Minimum		11160	
		Maximum		19050	
		Range		7890	
		Interquartile Range		2145	
		Skewness		-1,314	,687
		Kurtosis		3,110	1,334

b. Uji Normalitas

Test of Normality

	Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
*. This is a	Kontrol	,230	10	,141	,890	10	,170
	PSD	,334	9	,005	,842	9	,061
	TSD	,201	10	,200*	,877	10	,120

lower bound of the true significance

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Luas Daerah Di Bawah Kurva

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,834	2	26	,446

d. Statistik Bivariat *One-Way ANOVA***ANOVA**

Luas Daerah Di Bawah Kurva

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25887609,31	2	12943804,66	5,082	,014
Within Groups	66219570,00	26	2546906,538		
Total	92107179,31	28			

e. Uji *Post Hoc LSD***Multiple Comparisons**

Dependent variable: Luas Daerah Di Bawah Kurva

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 % Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	PSD	-1588,000*	733,267	,040	-3095,25	-80,75
	TSD	-2211,000*	713,710	,005	-3678,05	-743,95
PSD	Kontrol	1588,000*	733,267	,040	80,75	3095,25
	TSD	-623,000	733,267	,403	-2130,25	884,25
TSD	Kontrol	2211,000*	713,710	,005	743,95	3678,05
	PSD	623,000	733,267	,403	-884,25	2130,25

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Lampiran 23. Hasil Olah Data Jumlah Pulau Langerhans Pankreas

a. Statistik Univariat

Descriptives

			<i>Statistic</i>	<i>Std. Error</i>
Jumlah Pulau Langerhans Kontrol	<i>Mean</i>		23,11	4,783
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	12,08	
		<i>Upper Bound</i>	34,14	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		22,79	
	<i>Median</i>		25,00	
	<i>Variance</i>		205,861	
	<i>Std. Deviation</i>		14,348	
	<i>Minimum</i>		5	
	<i>Maximum</i>		47	
	<i>Range</i>		42	
	<i>Interquartile Range</i>		26	
	<i>Skewness</i>		,411	,717
	<i>Kurtosis</i>		-,858	1,400
Jumlah Pulau Langerhans PSD	<i>Mean</i>		21,33	2,141
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	16,40	
		<i>Upper Bound</i>	26,27	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		21,31	
	<i>Median</i>		23,00	
	<i>Variance</i>		41,250	
	<i>Std. Deviation</i>		6,423	
	<i>Minimum</i>		13	
	<i>Maximum</i>		30	
	<i>Range</i>		17	
	<i>Interquartile Range</i>		13	
	<i>Skewness</i>		-,089	,717
	<i>Kurtosis</i>		-1,452	1,400
Jumlah Pulau Langerhans TSD	<i>Mean</i>		21,56	3,621
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	13,20	
		<i>Upper Bound</i>	29,91	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		21,28	
	<i>Median</i>		20,00	
	<i>Variance</i>		118,028	

<i>Std. Deviation</i>	10,864	
<i>Minimum</i>	4	
<i>Maximum</i>	44	
<i>Range</i>	40	
<i>Interquartile Range</i>	11	
<i>Skewness</i>	,694	,717
<i>Kurtosis</i>	2,222	1,400

d. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
Jumlah Pulau Langerhans Kontrol	,947	9	,662
Jumlah Pulau Langerhans PSD	,923	9	,420
Jumlah Pulau Langerhans TSD	,934	9	,520

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

e. Uji Heterogenitas Data

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Pulau Langerhans

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,572	2	26	,227

f. Uji Bivariat

ANOVA

Jumlah Pulau Langerhans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11,790	2	5,895	,052	,949
Within Groups	2942,900	26	113,188		
Total	2954,690	28			

g. Uji Post-Hoc

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Jumlah Pulau Langerhans
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. .
Kontrol	PSD	1,567	4,888	,751
	TSD	,900	4,758	,851
PSD	Kontrol	-1,567	4,888	,751
	TSD	-,667	4,888	,893
TSD	Kontrol	-,900	4,758	,851
	PSD	,667	4,888	,893

Lampiran 24. Hasil Olah Data Diameter Pulau Langerhans Pankreas

a. Statistik Univariat

Descriptives

			<i>Statistic</i>	<i>Std. Error</i>
Diameter Pulau Langerhans Kontrol	<i>Mean</i>		,21623	,006131
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	,20210	
		<i>Upper Bound</i>	,23037	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		,21531	
	<i>Median</i>		,21200	
	<i>Variance</i>		,000	
	<i>Std. Deviation</i>		,018392	
	<i>Minimum</i>		,195	
	<i>Maximum</i>		,254	
	<i>Range</i>		,059	
	<i>Interquartile Range</i>		,026	
	<i>Skewness</i>		1,020	,717
	<i>Kurtosis</i>		1,157	1,400
Diameter Pulau Langerhans PSD	<i>Mean</i>		,16051	,003838
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	,15166	
		<i>Upper Bound</i>	,16936	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		,16020	
	<i>Median</i>		,16132	
	<i>Variance</i>		,000	
	<i>Std. Deviation</i>		,011514	
	<i>Minimum</i>		,144	
	<i>Maximum</i>		,183	
	<i>Range</i>		,039	
	<i>Interquartile Range</i>		,014	
	<i>Skewness</i>		,560	,717
	<i>Kurtosis</i>		,930	1,400
Diameter Pulau Langerhans TSD	<i>Mean</i>		,13061	,011004
	<i>95% Confidence Interval for Mean</i>	<i>Lower Bound</i>	,10524	
		<i>Upper Bound</i>	,15599	
	<i>5% Trimmed Mean</i>		,12984	
	<i>Median</i>		,12712	
	<i>Variance</i>		,001	

<i>Std. Deviation</i>	,033013	
<i>Minimum</i>	,084	
<i>Maximum</i>	,191	
<i>Range</i>	,107	
<i>Interquartile Range</i>	,053	
<i>Skewness</i>	,426	,717
<i>Kurtosis</i>	,011	1,400

b. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
Diameter Pulau Langerhans Kontrol	,929	9	,473
Diameter Pulau Langerhans PSD	,951	9	,705
Diameter Pulau Langerhans TSD	,972	9	,910

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas Data

Test of Homogeneity of Variances

Diameter Pulau Langerhans

<i>Levene Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>Sig.</i>
2,969	2	26	,069

d. Uji Bivariat

ANOVA

Diameter Pulau Langerhans

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	,034	2	,017	32,726	,000
<i>Within Groups</i>	,013	26	,001		
<i>Total</i>	,047	28			

e. Uji Post-Hoc

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Diameter Pulau Langerhans

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol	PSD	,052891*	,010451	,000
	TSD	,081141*	,010172	,000
PSD	Kontrol	-,052891*	,010451	,000
	TSD	,028250*	,010451	,012
TSD	Kontrol	-,081141*	,010172	,000
	PSD	-,028250*	,010451	,012

Lampiran 25. Hasil Olah Data Sel Beta Pankreas

1. Statistik Univariat

Descriptives			Statistic	Std. Error
Persentase Sel Beta Normal Kelompok Kontrol	Mean		.94250	.008588
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.92307	
		Upper Bound	.96193	
	5% Trimmed Mean		.94139	
	Median		.94200	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.027159	
	Minimum		.905	
	Maximum		1.000	
	Range		.095	
	Interquartile Range		.039	
	Skewness		.816	.687
	Kurtosis		1.250	1.334
Persentase Sel Beta Normal Kelompok PSD	Mean		.76322	.016074
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.72615	
		Upper Bound	.80029	
	5% Trimmed Mean		.76286	
	Median		.77900	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.048223	
	Minimum		.699	
	Maximum		.834	
	Range		.135	
	Interquartile Range		.088	
	Skewness		-.122	.717
	Kurtosis		-1.494	1.400
Persentase Sel Beta Normal Kelompok TSD	Mean		.76460	.011362
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.73890	

	Upper Bound	.79030	
5% Trimmed Mean		.76494	
Median		.76150	
Variance		.001	
Std. Deviation		.035930	
Minimum		.705	
Maximum		.818	
Range		.113	
Interquartile Range		.056	
Skewness		-.005	.687
Kurtosis		-.702	1.334

2. Tes Normalitas Data

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persentase Sel Beta Normal Kelompok Kontrol	.149	10	.200*	.945	10	.610
Persentase Sel Beta Normal Kelompok PSD	.184	9	.200*	.923	9	.419
Persentase Sel Beta Normal Kelompok TSD	.137	10	.200*	.975	10	.935

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

3. Tes Homogenitas Data

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Persentase Sel Beta Normal	Based on Mean	3.183	2	26	.058
	Based on Median	1.888	2	26	.172
	Based on Median and with adjusted df	1.888	2	21.192	.176
	Based on trimmed mean	3.204	2	26	.057

4. Statistik Bivariat One Way Anova

ANOVA

Persentase Sel Beta Normal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.210	2	.105	74.691	.000
Within Groups	.036	26	.001		
Total	.246	28			

5. Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase Sel Beta Normal

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	PSD	.179944*	.017212	.000	.14456	.21532
	TSD	.177900*	.016753	.000	.14346	.21234
PSD	Kontrol	-.179944*	.017212	.000	-.21532	-.14456
	TSD	-.002044	.017212	.906	-.03742	.03334
TSD	Kontrol	-.177900*	.016753	.000	-.21234	-.14346
	PSD	.002044	.017212	.906	-.03334	.03742

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 26. Hasil Olah Data Sel Piramidal

a. Statistik Univariat

Descriptives

			Statistic	Std. Error
Jumlah Sel Piramidal Kelompok Kontrol	Mean		77,10	8,258
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	58,42	
		Upper Bound	95,78	
	5% Trimmed Mean		75,89	
	Median		71,00	
	Variance		681,878	
	Std. Deviation		26,113	
	Minimum		45	
	Maximum		131	
	Range		86	
	Interquartile Range		39	
	Skewness		,847	,687
	Kurtosis		,578	1,334
Jumlah Sel Piramidal Kelompok PSD	Mean		66,67	8,185
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	47,79	
		Upper Bound	85,54	
	5% Trimmed Mean		66,52	
	Median		56,00	
	Variance		603,000	
	Std. Deviation		24,556	
	Minimum		36	

	Maximum		100	
	Range		64	
	Interquartile Range		49	
	Skewness		,542	,717
	Kurtosis		-1,544	1,400
Jumlah Sel Piramidal Kelompok TSD	Mean		65,90	11,040
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	40,93	
		Upper Bound	90,87	
	5% Trimmed Mean		65,33	
	Median		54,50	
	Variance		1218,767	
	Std. Deviation		34,911	
	Minimum		23	
	Maximum		119	
	Range		96	
	Interquartile Range		64	
	Skewness		,257	,687
	Kurtosis		-1,593	1,334

b. Uji Normalitas

Test of Normality

Kelompok Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Luas Daerah Di Bawah Kurva	Kontrol	,162	10	,200	,938	10	,531
	PSD	,258	9	,086	,847	9	,069
	TSD	,190	10	,200*	,904	10	,244

*. This is a lower bound of the true significance

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Sel Piramidal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,686	2	26	,205

d. Statistik Bivariat *One-Way ANOVA***ANOVA**

Sel Piramidal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	772,200	2	386,100	,458	,638
Within Groups	21929,800	26	843,456		
Total	22702,000	28			

Lampiran 27. Hasil Olah Data Jumlah Sel Neuroglia

a. Statistik Univariat

Descriptives			Statistic	Std. Error
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok Kontrol	Mean		128,11	17,095
	95% Lower Bound Confidence Interval for Mean	Upper Bound	88,69 167,53	
	5% Trimmed Mean		127,96	
	Median		120,00	
	Variance		2630,111	
	Std. Deviation		51,285	
	Minimum		50	
	Maximum		209	
	Range		159	
	Interquartile Range		86	
	Skewness		,042	,717
	Kurtosis		-,714	1,400
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok PSD	Mean		97,78	9,389
	95% Lower Bound Confidence Interval for Mean	Upper Bound	76,13 119,43	
	5% Trimmed Mean		98,20	
	Median		107,00	
	Variance		793,444	
	Std. Deviation		28,168	
	Minimum		57	
	Maximum		131	
	Range		74	
	Interquartile Range		57	
	Skewness		-,432	,717
	Kurtosis		-1,640	1,400
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok TSD	Mean		71,67	6,429
	95% Lower Bound Confidence Interval for Mean	Upper Bound	56,84 86,49	
	5% Trimmed Mean		71,96	
	Median		72,00	
	Variance		372,000	

Std. Deviation	19,287	
Minimum	40	
Maximum	98	
Range	58	
Interquartile Range	32	
Skewness	-,290	,717
Kurtosis	-,946	1,400

b. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok Kontrol	,121	9	,200*	,980	9	,965
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok PSD	,196	9	,200*	,892	9	,208
Jumlah Sel Neuroglia Kelompok TSD	,166	9	,200*	,968	9	,878

*. This is a lower bound of the true significance

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Tikus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,078	2	26	,063

d. Statistik Bivariat *One-Way ANOVA***ANOVA**

Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Tikus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12660,707	2	6330,353	5,095	,014
Within Groups	32303,156	26	1242,429		
Total	44963,862	28			

e. Uji *Post Hoc* Bonferroni**Multiple Comparisons**

Dependent variable: Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Tikus
Bonferroni

(I) Kategori	(J) Kategori	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	PSD	28,222	16,195	,280	-13,22	69,67
	TSD	50,200*	15,763	,011	9,86	90,54
PSD	Kontrol	-28,222	16,195	,280	-69,67	13,22
	TSD	21,978	16,195	,559	-19,47	63,42
TSD	Kontrol	-50,200*	15,763	,011	-90,54	-9,86
	PSD	-21,978	16,195	,559	-63,42	19,47

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Lampiran 7. Draft Publikasi

**TOTAL SLEEP DEPRIVATION MENURUNKAN JUMLAH SEL
NEUROGLIA KORTEKS PREFRONTALTIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) JANTAN**

ABSTRAK

Latar belakang : *Stresparadoxicalsleep deprivation* (PSD) dan *totalsleep deprivation* (TSD) meningkatkan terjadinya stres oksidatif dan inflamasi yang merusak sel piramida dan sel neuroglia korteks prefrontal serebrum dan mengganggu fungsi kognisi dan kontrol perilaku.

Tujuan : Mengetahui perbedaan jumlah sel piramidal dan sel neuroglia korteks prefrontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi *paradoxicalsleep deprivation* (PSD) dan *totalsleep deprivation* (TSD).

Metode : Eksperimental dengan desain *post test only with control group*. Tiga puluh ekor tikus putih dibagi secara acak menjadi 3 kelompok yaitu KI (kontrol sehat), KII (PSD 20 jam/hari selama 8 hari), KIII (TSD 24 jam/hari selama 8 hari).

Hasil : Rerata jumlah sel piramidal korteks prefrontal tertinggi terdapat pada KI ($77,10 \pm 26,113$), diikuti KII ($66,67 \pm 24,556$) dan terendah KIII ($65,90 \pm 34,911$) dan dilanjutkan Uji *One Way* ANOVA menunjukkan $p > 0,05$ ($p = 0,638$). Rerata jumlah sel neuroglia normal tertinggi terdapat pada KI ($126,00 \pm 48,81$), diikuti KII ($97,78 \pm 28,17$), dan terendah KIII ($75,80 \pm 22,79$) dilanjutkan . Uji *One Way* ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dan uji *Post-Hoc Bonferroni*

menunjukkan perbedaan rerata signifikan ($p < 0,05$) pada KI-KIII, dan tidak signifikan ($P > 0,05$) pada KI-KII dan KII-KIII.

Kesimpulan: Terdapat perbedaan signifikan pada jumlah sel neuroglia tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata jumlah sel piramidal korteks prefrontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pasca induksi *paradoxical sleep deprivation* (PSD) dan *total sleep deprivation* (TSD).

Kata Kunci : *Paradoxical sleep deprivation* (PSD), *Total sleep deprivation* (TSD), sel piramidal dan neuroglia, *rattus norvegicus*

PENDAHULUAN

Tidur adalah salah satu kebutuhan utama manusia agar tubuh dapat berfungsi kembali secara optimal setelah melakukan aktivitas fisik dan menunjang proses pemulihan kesehatan fisik maupun psikologis^[19]. Pola tidur yang baik dilihat dari segi kualitas dengan mengamati seberapa dalam tidur seseorang dan dari segi kuantitas dengan menilai durasi tidur^[18]. Durasi tidur normal pada orang dewasa 7-9 jam, remaja 8-10 jam, dan anak-anak antara 9-11 jam. Durasi tidur yang berkurang atau lebih pendek dari kebutuhan disebut sleep deprivation^[20] dan dapat menyebabkan gangguan dalam kontrol pengambilan keputusan, memicu pengulangan kesalahan memori kerja dan kehilangan spontanitas individu dalam berkomunikasi sehingga tampak malas, letargik dan tidak termotivasi. Stres karena sleep deprivation pada manusia dapat disamakan dengan berbagai model stres pada hewan coba yaitu paradoxical sleep deprivation (PSD) dan total sleep deprivation (TSD).

Area otak yang berpotensi rusak akibat stres *sleep deprivation* adalah korteks prefrontal yang berperan dalam fungsi kognisi dan kontrol perilaku yang diperankan oleh sel neuroglia dan sel piramidal sebagai *major excitatory neuron*ⁱ dan untuk melihat kadar stres pada *prefrontal cortex* (PFC) adalah dengan mengetahui penurunan jumlah neurogliaⁱⁱ. *Sleep deprivation* menyebabkan hipometabolisme glukosa di otak dengan cara mengaktifkan *hypothalamus-pituitary axis* (HPA) dan sistem *sympatoadrenomedular* sehingga meningkatkan produksi *corticotropin-releasing hormone* (CRH) dan *arginine-vasopressin* (AVP)^[27], memicu peningkatan episode sekresi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dan glukokortikoid, sekaligus menurunkan ekspresi reseptor glukokortikoid^[5]. Glukokortikoid meningkatkan pelepasan glutamat di otak dan ekspresi reseptor *N-methyl-daspartic acid* (NMDA) serta *á-amino-3-hydroxy-5-*

methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) pada membran postsinaps yang menyebabkan pelepasan blokade ion magnesium (Mg^{2+}) dari reseptor NMDA, dan memicu mobilisasi ion Ca^{2+} dalam jumlah banyak menuju sitosol sebagai sinyal apoptosis sel neuron [3].

Belum ada penelitian yang dapat mengkonfirmasi bahwa PSD dan TSD dapat menyebabkan kematian neuroliadan sel piramidal di area korteks prefrontal serebrum yang didominasi oleh sel piramidal. Berdasarkan fakta tersebut, tujuan penelitian adalah untuk mengetahui apakah *sleep deprivation* mampu menurunkan jumlah neuroglia dan sel piramidal di korteks prefrontal serebrum yang sangat penting dalam fungsi kognitif dan pengambilan keputusan.

METODE

Penelitian ini merupakan jenis eksperimental *post test only with control group design* yang berlangsung selama 4 bulan (November 2019 - Februari 2020) di Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Soedirman dan pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman.

Alat dan Bahan

Hewan coba berupa 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan usia 3–4 bulan dan berat badan 100–200 gram dari Laboratorium Hewan Coba FK Universitas Jenderal Soedirman. Induksi *sleep deprivation* menggunakan metode *Modified Multiple Platform Method* (MMPM), suatu tangki berukuran 123 x 44 x 35 cm yang berisi air dan dilengkapi 12 platform dengan ukuran 6,5 cm dengan jarak antar platform adalah 10 cm serta dilengkapi alat *muscle atonia*. Jumlah sel piramidal dan neuroglia dihitung dengan mikroskop cahaya (*Motic*) yang terpasang Optilab. Peralatan lain adalah timbangan digital (*Dragon 303*®), spidol hitam (*Snowman*®), set alat bedah, dan set alat pembuatan preparat HE. Bahan-bahan penelitian berupa pakan (*Comfeed AD II*), air minum (*Aqua*®), eter, xylol, alkohol (90% dan 95%), Etanol (95%, 90%, 80%, dan 70%), gelatin 0,5%, Buffer Normal formalin 10%, paraffin, *aquades*, hematoxylin dan eosin.

Jalan Penelitian

Hewan coba ditimbang, dikelompokkan secara acak, diaklimatisasi selama 7 (tujuh) hari dan ditempatkan pada kandang dengan ukuran 60 x 30 x 30 cm. Makanan dan minuman diberikan dengan jenis, jumlah, dan komposisi yang sama secara *ad libitum* secara *ad libitum* dan berat badan ditimbang kembali pada akhir aklimatisasi. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok (masing-masing kelompok 10 ekor) dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan cara memberi nomor pada tikus dengan angka 1–30, membuat 30 gulungan kertas sesuai jumlah kelompok perlakuan (KI, KII, KIII) dan jumlah ulangnya, membuat tabel dengan angka 1-30 yang mewakili nomor pada tikus, mengocok 30 gulungan kertas dan mengambil satu per satu, angka yang keluar disesuaikan dengan angka tabel yang digunakan sebagai acuan pengelompokan kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok I (sebagai kontrol sehat, tidak diberi perlakuan berbagai model stres *sleep deprivation*), kelompok II (kelompok perlakuan *paradoxical sleep deprivation* selama 192 jam dengan 20 jam *sleep deprivation* mulai dari pukul 11.00-07.00 WIB dan 4 jam istirahat pukul 07.00-11.00 WIB yang dilakukan kontinu), dan kelompok III (kelompok perlakuan *total sleep deprivation* selama 192 jam *sleep deprivation* mulai dari pukul 04.00-04.00 WIB tanpa waktu istirahat).

Modified multiple platform method (MMPM) yang dilengkapi *muscle atonia* dipilih untuk menginduksi stres *sleep deprivation* pada tikus KII dan KIII. Hewan coba yang memasuki fase tidur *rapid eye movement* (REM) akan terjatuh ke dalam air dan terbangun kembali, selain itu efek kejutan listrik setiap 10 menit membuat tikus selalu dalam keadaan terjaga. Terminasi hewan coba dilakukan setelah 8 hari perlakuan 24 dengan inhalasi eter. Otak tikus diambil, dibilas larutan NaCl fisiologis, difiksasi dalam larutan *Buffer Normal Formalin* 10% selama 24 jam untuk kemudian dibuat preparat histologis dengan pewarnaan *hematoxylin eosin*. Penghitungan sel piramid dan neuroglia korteks medial prefrontal dihitung menggunakan perangkat lunak *Image raster v2.1* korteks medial prefrontal dihitung menggunakan perangkat lunak *Image raster v2.1* dengan pembesaran 400 x dalam 10 lapang pandang. Sel neuroglia yang dihitung adalah sel normal dengan kriteria tidak mengalami piknotik, karioreksis, dan kariolisis dan sel piramidal yang dihitung mempunyai ciri berbadan sel besar, segitiga dengan sitoplasma

basofilik. Pengamatan dilakukan bersama dengan interobserver dan uji reliabilitas interobserver menggunakan Bland Altman karena mencari kesesuaian data dalam bentuk numerik.

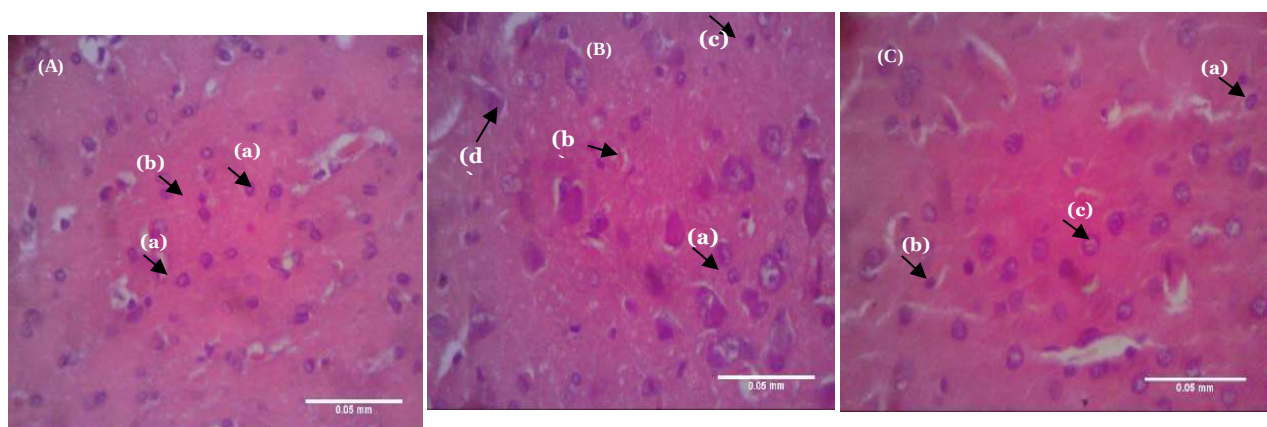
Analisis Data

Data analisis univariat disajikan dalam bentuk nilai maksimum, nilai minimum, *mean*, median dan standar deviasi terhadap variabel yang diteliti. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengetahui normalitas data, homogenitas data diuji menggunakan *Levene's test*, uji parametrik *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk melihat perbedaan antar kelompok dan dilanjutkan dengan *post-hoc Bonferroni* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Etika penelitian didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman No Ref 8395/KEPK/XII/2019

HASIL DAN PEMBAHASAN

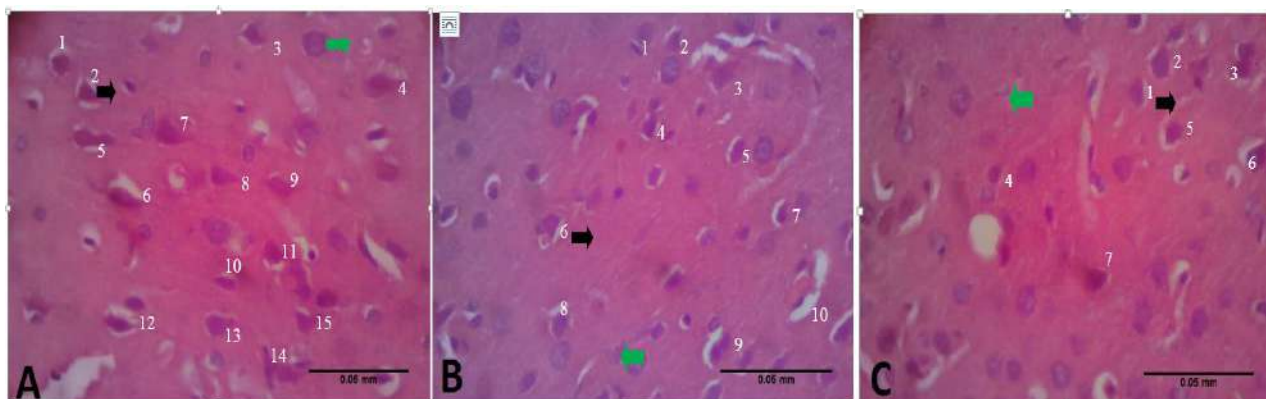
Hasil

Hasil uji Bland Altman pada perhitungan sel neuroglia adalah rentang *limit of agreement* -0,71 - 0,58 dan -1,29 - 1,36 pada sel piramidal serta sebagian besar data didistribusikan tersebar di sekitar *mean of difference* sehingga dapat disimpulkan bahwa ada reliabilitas yang baik antar observer.



Gambar 1. Medial Korteks Prefrontal Otak Tikus (HE,400x).

Keterangan : (a) sel neuroglia normal, (b) sel neuroglia apoptosis, (c) sel granuler normal, (d) sel pyramidal normal, (A) Kontrol, (B) PSD, (C) TSD.



Gambar 2. Sel piramidal korteks prefrontal (HE, 400X) KI (kontrol) mempunyai jumlah sel piramidal terbanyak (A) sejumlah 15 sel, diikuti KII (PSD) (B) sejumlah 10 sel, dan yang paling sedikit dimiliki oleh kelompok K III (TSD) (C) sejumlah 7 sel. Ciri sel piramidal badan sel berbentuk segitiga dan sitoplasma basofilik (panah hitam) dan sel granuler (panah hijau)

Tabel 1. Rerata jumlah sel piramidal setiap kelompok perlakuan

Kelompok	N	Jumlah Sel Piramidal				Analisis Statistik
		Rerata $\pm$ SD	Min	Max	Median	
I (Kontrol)	10	77,10 $\pm$ 26,11	45	131	71,00	P=0,638 (One Way ANOVA)
II (PSD)	9	66,67 $\pm$ 24,55	36	100	56,00	
III (TSD)	10	65,90 $\pm$ 34,91	23	119	54,50	

Tabel 2. Rerata Jumlah Sel Neuroglia Normal Otak Hewan Coba

Kelompok	N	Min.	Max.	Rerata	Std. Deviasi
Kontrol	10	50,00	209,00	126,00	$\pm$ 48,81
PSD	9	57,00	131,00	97,78	$\pm$ 28,17
TSD	1	40,00	113,00	75,80	$\pm$ 22,39

Rerata jumlah sel piramidal tertinggi dimiliki oleh kelompok kontrol (77,10 $\pm$ 26,11) dan rerata terendah pada kelompok TSD (65,90 $\pm$ 34,91) sedangkan rerata jumlah sel neuroglia normal tertinggi pada kelompok kontrol yaitu sebesar (126,00 $\pm$ 48,8) dan beda rerata terendah pada kelompok TSD sebesar (75,80 $\pm$ 22,39). Uji normalitas *Saphiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas *Levene's test* menunjukkan data homogen pada

semua kelompok baik pada hitung sel piramidal maupun neuroglia. Uji *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) hitung sel piramidal menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan pada 3 kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yaitu $p = 0,638$ sehingga tidak dilakukan uji post hoc sedangkan pada hitung sel neuroglia menunjukkan perbedaan signifikan pada minimal 2 kelompok perlakuan ($p = 0,014$). Uji Post-Hoc Bonferroni menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada rerata jumlah sel neuroglia normal kelompok kontrol-TSD ($p = 0,011$), tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata jumlah sel neuroglia normal kelompok kontrol-PSD ($p = 0,280$) dan kelompok PSD-TSD ($p = 0,559$) karena ($p > 0,05$).

Pembahasan

Jumlah rerata sel piramidal korteks prefrontal KI (kontrol) lebih besar dibandingkan K II (PSD) dan K III (TSD) menunjukkan bahwa induksi stres dapat menyebabkan kematian sel piramidal¹². Arjadi *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa jumlah sel piramidal *cornu ammonis 3 hippocampus* pasca induksi stres metode PSD kronik lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol¹⁴. Tidak ada perbedaan signifikan jumlah sel piramidal korteks prefrontal kelompok kontrol dan induksi *sleep deprivation* tidak sesuai penelitian sebelumnya yang menyatakan ada perbedaan jumlah sel piramidal yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok stres jenis immobilisasi, tetapi stres immobilisasi adalah jenis stressor yang lebih kompleks karena melibatkan dimensi psikologis, fisik, dan sosial, sedangkan PSD adalah berdimensi fisik dan psikologisⁱⁱⁱ.

Jumlah sel piramidal tidak berbeda bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok induksi *sleep deprivation* menunjukkan adanya mekanisme *neuroprotective* terhadap eksitoksisitas glutamat yang diperankan oleh neuroglia baik dari aktivitasnya maupun sekresi zat seperti *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)^{iv}. Paparan stres menurunkan jumlah kompleksitas dendrit apikal dan mengurangi ukuran badan sel tanpa menurunkan jumlah dari sel piramidal^v. Perlakuan *sleep deprivation* selama 2 jam dalam 4 hari mampu menambah ukuran mitokondria namun belum mampu merusak struktur membran dan krista dari mitokondria^{vi}. Mengingat peran neuroglia dalam melindungi neuron, maka kematian neuron karena induksi stres didahului oleh kematian sel neuroglia sebagai pelindung neuron¹⁷.

Salah satu neuroprotektor neuroglia adalah astrosityang mensekresikan BDNF, suatu zat yang mempengaruhi proliferasi dan differensiasi neuron saat masa pertumbuhan, mempertahankan kelangsungan hidup dan pertahanan fungsi dari neuron yang mengalami kerusakan^{vii}. Mekanisme homeostasis kehilangan satu periode tidur 12 jam dapat direspon dengan peningkatan kadar BDNF yang dipertahankan selama setidaknya 1 bulan^{viii}. Neuroprotektor lain adalah mikrogia yang berperan sebagai makrofag dalam sistem saraf pusat karena memfagosit sel mati^{ix}, meningkatkan neurogenesis, membersihkan debris, dan menekan peradangan^x.

Perbedaan jumlah sel piramidal kelompok kontrol dan kelompok induksi *sleep deprivation* tak signifikan menunjukkan bahwa peningkatan glukokortikoid akibat stres dapat mempengaruhi sel piramidal dan sel neuroglia sebagai neuroprotektor^{7, xi}. Peningkatan glukokortikoid menghambat *uptake* glukosa sehingga penurunan kadarnya meningkatkan glutamat di celah ekstraseluler hingga dapat menyebabkan eksotoksisitas⁹. Peningkatan glutamat direspon dengan efluks sistin melalui *glutamate-cystine exchanger* di membran sel neuroglia yang menurunkan kadar antioksidan *glutathione* intrasel dan meningkatkan *reactive oxygen species*. Eksotoksisitas glutamat menyebabkan overaktivasi reseptor glutamat yaitu NMDA pada membran sel piramidal, sedangkan pada membran sel neuroglia yang teraktifasi adalah *alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* (AMPA) dan kainate^{xii, xiii}. Overaktivasi reseptor glutamat mengakibatkan influks Na^+ yang mengaktifasi *voltage gated calcium channel* (VGCC) dan *sodium calcium exchanger* (NCX) sehingga terjadi *overload* ion kalsium di dalam sel¹². Banyaknya ion kalsium diserap cepat oleh mitokondria menyebabkan depolarisasi mitokondria dengan akibat pengaktifan kaspase apoptosis sel, peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), dan penurunan kadar glutathione³⁰ dan menimbulkan stres oksidatif^{xiv}. Neuroglia memerankan peran neuroprotektornya dengan cara mempertahankan kadar glutathione dan memberantas ROS secara langsung.

Perubahan jumlah sel neuroglia pada kondisi *sleep deprivation* kronis dipengaruhi oleh aksis *hypothalamic pituitary adrenal* (HPA) yang meningkatkan kadar kortisol plasma (kortikosteron pada hewan). Aksis HPA diawali oleh

pengeluaran *corticotropin releasing hormone* (CRH) dan *arginine vasopressin* (AVP) oleh neuron *paraventricular nucleus* (PVN) di hipotalamus. Kedua hormon ini menstimulasi sekresi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dari hipofisis anterior melalui sistem porta hipotalamus-hipofisis. ACTH mempengaruhi korteks adrenal untuk mensekresi glukokortikoid. ^[24] Peningkatan kortisol akibat induksi *sleep deprivation* menghambat transpor glukosa di otak sehingga menurunkan ATP basal. Glukokortikoid yang meningkat menghambat *uptake* glukosa sehingga penurunan kadarnya menyebabkan peningkatan glutamat di celah ekstraseluler ^[1].

Rerata jumlah sel neuroglia pasca *sleep deprivation* antara kelompok PSD dan TSD mengalami penurunan namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Penelitian Khadrawy *et al.* (2011)^[12] menunjukkan hal yang berbeda, terjadi peningkatan glutamat dan aspartat di hippocampus dan korteks otak tikus, penurunan kadar *glutathione reductase* korteks, peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) setelah induksi *paradoxical sleep deprivation* selama 72 jam ($23,04 \pm 0,96$ nmol/g). Peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar *glutathione reductase* membuat sistem antioksidan mitokondria dan sitoplasma tak mampu melawan radikal bebas. Selama terjaga periode aktivitas neuron tinggi, volume oksigen yang signifikan digunakan untuk mempertahankan potensial membran dan menghasilkan ROS dan akumulasinya merusak membran sel neuroglia di korteks dan hippocampus.

Penelitian Singh *et al.* (2008)^[23] menunjukkan perlakuan *paradoxical sleep deprivation* selama 96 jam menurunkan peroksidase lipid sebesar 38% di korteks serebri. Penurunan stres oksidatif pada PSD karena peningkatan kadar *superoxide dismutase* (SOD) sebesar 40% dan tidak terjadi perubahan kadar *glutathione peroxidase* (GPx) sedangkan SOD dan GPx merupakan antioksidan yang berperan dalam merubah radikal bebas menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi sel neuron dan glia. Peningkatan signifikan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) setelah *paradoxical sleep deprivation* menunjukkan respon kompensasi untuk mengendalikan anion superoksida yang meningkat akibat ketidakseimbangan reaksi reduksi dan oksidasi di mitokondria ^[21]. Peningkatan SOD pada perlakuan *paradoxical sleep deprivation* (PSD) sebesar $68,92 \pm 19,08$ U/mL dan *total sleep*

deprivation (TSD) sebesar $82,70 \pm 12,93$ U/mL selama 5 hari, memicu percepatan sinyal apoptosis, hal ini karena terjadi perubahan SOD menjadi *superoxide reductase* (SOR), yang berperan sebagai *superoxide oxide* (SOO) yang bertindak sebagai generator radikal bebas melalui *alternative-pathway*. Kelompok PSD memiliki waktu tidur 4 jam sehingga perbedaan kadar SOD kelompok kontrol-TSD tidak sebesar kelompok kontrol-TSD. Metabolisme tubuh saat tidur menurun, hal ini menyebabkan penurunan produk sisa metabolisme sehingga menghambat stres oksidatif yang memicu apoptosis sel ^[11]. Kesempatan tidur pada PSD juga menghambat aktivitas neuron eksitatorik dan neurotransmitter eksitatorik glutamat oleh *glutathione disulfide* (GSSD) ^[9]. Penghambatan ini menurunkan kadar glutamat ekstrasel dan meminimalkan efek eksitotoksitasnya pada sel neuroglia ^[10].

KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan jumlah sel piramidal korteks prefrontal yang signifikan antara kelompok kontrol, PSD, dan TSD. Mekanisme yang mendasari belum diketahui secara pasti, namun banyak bukti yang menyatakan bahwa efek neuroprotektif neuroglia baik dari aktifitas maupun pengeluaran zat-zat seperti BDNF dan sitokin anti inflamasi mampu memperbaiki sel piramidal yang mengalami kerusakan sehingga tidak terjadi kematian sel yang berujung pada penurunan jumlah sel piramidal. Simpulan penelitian ini adalah jumlah sel neuroglia medial korteks prefrontal tikus putih jantan paling rendah pada stres *total sleep deprivation* (TSD) dibandingkan dengan *paradoxical sleep deprivation* (PSD).

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kepala Departemen Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman atas izin dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arjadi, F., Soejono, S.K., Maurits, L.S., Pangestu, M. 2014. Jumlah Sel Piramidal CA3 Hipokampus Tikus Putih Jantan Pada Berbagai Model Stres Kerja Kronik. *Majalah Kedokteran Bandung*. 46(4): 197-202.
2. Baehr, M., Frotscher, M. 2016. *Duus Topical Diagnosis in Neurology: Anatomy, Physiology, Signs, Symptom (4th ed)*. Mc-Graw Hill Companies, New York.
3. Bellesi, M., Luisa de Vivo., Giulio. T., Chiara. C. 2017. Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex. *Neuroscience Journal*, 37(21): 5263-5273.
4. Birey, F., Michelle, K., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Daniel, J., *et al.* 2015. Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-Like Behavior Through Reduced Secretion of FGF2. *Neuroscience Journal*, 88(5):940-956.
5. Chrousos, G., Vgontzas, A. N., Kritikou, I. 2016. *HPA Axis and Sleep*. MDText.com, Inc, South Dartmouth.
6. Eng, L.F. and R.S. Ghirnikar. 2014. GFAP and Astroglisis. *Brain Pathology Journal*. 4:229-237.
7. Frank, G.M. 2018. *The Role of Glia in Sleep Regulation and Function*. Handbook. Departement of Biomedical Science, Spokane University. Springer International Publishing. Washington State.
8. Gryglewska, J.O. 2010. Consequences of Sleep Deprivation. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 23(1): 95-114.
9. Honda, K., Komoda, Y., Inoue, S. 1994. Oxidized glutathione regulates physiological sleep in unrestrained rats. *Brain Research*. 636(2): 253–358.
10. Inoue, S., Honda, K., Komoda, Y. 1995. Sleep as Neuronal Detoxification and Restitution. *Behavioral Brain Research*. 69:91–96.
11. Jati, R. 2018. Perbedaan Kadar Superoxide Dismutase (SOD) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Pasca Induksi Berbagai Model Stres Sleep Deprivation. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. (Tidak dipublikasikan).
12. Khadrawy, Y. A., Neveen. A. N., Heba S. A. 2011. Effect Of Oxidative Stress Induced By Paradoxical Sleep Deprivation On The Activities Of Na⁺, K⁺-Atpase And Acetylcholinesterase In the Cortex And Hippocampus of Rat. *National Research Center*. 157(2) : 101-107.
13. Kühn, E. R., K. Bellon , L. Huybrechts , W. Heyns. 2007. Endocrine Differences between the Wistar and Sprague-Dawley Laboratory Rat: Influence of Cold Adaptation. *Hormone and Metabolic Research*. 15(10): 491-498
14. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins S.L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Edisi 7; alih Bahasa, Brahm U, Pendt ; editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari. EGC. Jakarta
15. Kwok. C., Evangelos. K., George. K., Matthew. G., Alan, Muhyaldeen., Christopher P., *et al.* 2018. Self-Reported Sleep Duration and Quality and Cardiovascular Disease and Mortality: A Dose-Response Meta-Analysis. *Journal of the American Heart Association*. 10: 1161

16. Lo, J.C., Ong, J.L. 2016. Cognitive Performance, Sleepiness, and Mood in Partially Sleep Deprived Adolescents: The Need for Sleep Study. *Sleep Journal*. 39(3): 687–698.
17. Matute, C., Domercq, M., Gomez, M. 2006. Glutamate Mediated Glial Injury : Mechanism and Clinical Importance. *Journal of Glia*. 53: 212-224
18. Patrick. Y., Alice. L., Oishik. R., Kavya. P., Shubham. G., Sonika. S., et al. 2017. Effects of Sleep Deprivation On Cognitive and Physical Performance in University Students. *National Institutes of Health*. 15(3): 217–225.
19. Periasamy, S., Hsu, D., Fu, Y., & Liu, M. 2015. Sleep Deprivation-Induced Multi-Organ Injury : Role Of Oxidative Stres and Inflammation. *Original Article*, 672–683.
20. Putri, D., Nasrul, E., Masri, M. 2015. Pengaruh Kurang Tidur terhadap Berat Badan pada Tikus Wistar Jantan. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(1): 78-82.
21. Rodriguez, P.C., Ochoa, A.C. 2006. T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology*. 16: 66-72.
22. Schieber, M., & Chandel, N.S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stres. *Current Biology*. 24(10): 453-62.
23. Singh, R., Kiloung, J., Singh, S., Sharma, D. 2008. Effect of Paradoxical Sleep Deprivation on Oxidative Stress Parameters in Brain Regions of Adult and Old Rats. *Biogerontology*. 9 : 153-162
24. Spiers, J. G., Chen, H. J. C., Sernia, C., Lavidis, N. A. 2014. Activation of The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stres Axis Induces Cellular Oxidative Stres. *Frontiers in Neuroscience*. 8(456): 1-6.
25. Tambunan, S., Asni. E., Malik, Z., Ismawati. 2014. Histopatologi Aorta Toraksika Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Setelah Memberian Diet Selama 12 Minggu. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Kedokteran*. 2(1): 1-3.
26. Taylor Nelson Sofrens (TNS). 2013. *Survei Indeks Pola Hidup Sehat American International Assurance (AIA)*. Indonesia.
27. Vargas. I. 2017. Investigating the Effect of Acute Sleep Deprivation on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis Response to A Psychosocial Stressor. *International Journal of Psychoneuroendocrinology*. 79(3): 1-8.

ⁱ Hernanta, I. 2013. *Ilmu Kedokteran Lengkap tentang Neurosains (1st ed)*. Jogjakarta: D-Medika.

ⁱⁱSi, X., Miguel, H.J.J., O'Dwyer, G., Stockmeier, C.A., Rajkowska, G. 2004. Age-Dependent Reductions in the Level of Glial Fibrillary Acidic Protein in the Prefrontal Cortex in Major Depression. *Neuropsychopharmacology*. 29 (11) : 2088-2096.

ⁱⁱⁱ Arjadi, F., Soejono, S.K., Pangestu, M. 2012. Pengaruh berbagai model stress terhadap reproduksi tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) (Kajian hormonal, densitas ekspresi reseptor CYP19 dan glukokortikoid serta fungsi testis) [Laporan penelitian]. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman.

^{iv}Duman, R. S. 2009. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: Stress and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 11(3) : 239-255.

-
- ^vCotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., Everall, I. 2002. Reduced Glial Cell Density and Neuronal Size in the Anterior Cingulate Cortex in Major Depressive Disorder. *Archive of General Psychiatry*. 58(6) : 545-553.
- ^{vi}De Vivo, L., Nelson, A.B., Bellesi, M., Noguti, J., Tononi, G., *et al.* 2016. Loss of sleep affects the ultrastructure of pyramidal neurons in the adolescent mouse frontal cortex. *Sleep*. 39 (4) : 861–874.
- ^{vii}Stahlberg, M.A., Kügler, S., Dean, C. 2018. Visualizing BDNF cell-to-cell transfer reveals astrocytes are the primary recipient of neuronal BDNF. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/255935> : 1-27.
- ^{viii}Zucconi, G.G., Balgouranidou, I., Cipriani, S., Scattoni, R. 2006. One night sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin*. 69(4):375-3.
- ^{ix}Janda, E., Boi, L., Carta, A.R. 2018. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease?. *Frontier in Molecular Neuroscience*. 11 (144) : 1-8.
- ^x Chen, Z., Trapp, B.D. 2016. Microglia and Neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. 136 (1) : 10-17
- ^{xi} Jauregui-Huerta, F., Ruvalcaba-Delgadillo, Y., Gonzalez-Castañeda, R., Garcia-Estrada, J., Gonzalez-Perez, O., *et al.*, 2010. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Immunoogy Reviews*. 6(3) : 195-204.
- ^{xii}Matute, C., Domercq, M., Gomez, M. 2006. Glutamate Mediated Glial Injury : Mechanism and Clinical Importance. *Journal of Glia*. 53 : 212-224.
- ^{xiii} Heim, C., Nemeroff, C.B. 2009. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectrum*. 14 (1): 13-24.
- ^{xiv} Ogundele, O.M., Omoaghe, A.O., Ajonijebu, D.C., Ojo, A.A. 2014. Glia activation and its role in oxidative stress. *Metabolic Brain Disease* 29(2) : 483-493.